

**Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta**

Studijní program: Biochemie a patobiochemie



**UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta**

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Využití spektroskopických metod v detekci
kolorektálního karcinomu**

Use of spectroscopic methods in colorectal cancer detection

MUDr. Michaela Miškovičová

Školitel: prof. MUDr. Luboš Petruželka, CSc.

Praha 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne 29. září 2020

Michaela Miškovičová

Identifikační záznam:

MIŠKOVIČOVÁ, Michaela. *Využití spektroskopických metod v detekci kolorektálního karcinomu [Use of spectroscopic methods in colorectal cancer detection]*. Praha, 2020. Počet stran: 104, počet příloh: 3. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Onkologická klinika. Vedoucí závěrečné práce: Petruželka, Luboš.

Poděkování:

Chtěla bych především poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Luboši Petruželkovi, CSc. za možnost realizovat své postgraduální studium na Onkologické klinice 1. LF UK a VFN, za hodnotné rady, podporu a odborný dohled v průběhu mého studia.

Dále moc děkuji svým spolupracovníkům z týmu Laboratoře medicínální diagnostiky ze Skupiny chiroptických metod Ústavu analytické biochemie VŠCHT pod skvělým vedením prof. Ing. Vladimíra Setničku, Ph.D., a to zejména Mgr. Alle Synytsyi, Ph.D., Ing. Michalu Tatarkovičovi, Ph.D., Ing. Lucii Habartové, Ph.D., Ing. Markétě Fouskové a Ing. Stanislavu Kykalovi za laskavou odbornou pomoc a nepřetržitou aktivní spolupráci, cenné konzultace a rady při vyhodnocování dat a realizaci publikačních výstupů.

Stejně tak bych chtěla poděkovat všem kolegům z klinických i výzkumných pracovišť, se kterými jsem měla v průběhu svého studia možnost spolupracovat a získávat cenné zkušenosti.

Práce byla podpořena granty Agentury pro zdravotnický výzkum MZČR NT/13259-3, NU/20-229, projekty Univerzity Karlovy PRVOUK P27, GAUK 762216 a programem Specifického univerzitního výzkumu MŠMT (projekty č. 20/2013 A1_FCHI_2013_003, A2_FCHI_2013_003 a 20/2014 A1_FCHI_2014_003, A2_FCHI_2014_005).

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 malignitu 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

1	ÚVOD.....	11
1.1	Kolorektální karcinom.....	11
1.1.1	Základní charakteristika, klasifikace.....	11
1.1.2	Epidemiologie.....	13
1.1.3	Etiopatogeneze.....	16
1.1.4	Hereditární kolorektální karcinom.....	20
1.1.5	Diagnostika.....	21
1.1.5.1	Screeningový program.....	21
1.1.5.2	Anamnéza, fyzikální vyšetření, laboratorní vyšetření.....	24
1.1.5.3	Zobrazovací metody.....	25
1.1.5.4	Histopatologické vyšetření	27
1.1.5.5	Molekulární testování.....	28
1.2	Spektroskopické metody.....	30
1.2.1	Metody vibrační molekulové spektroskopie.....	30
1.2.1.1	Infračervená spektroskopie.....	30
1.2.1.1.1	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací.....	33
1.2.1.2	Ramanova spektroskopie.....	33
1.2.1.2.1	Ramanova mikrospektroskopie.....	38
1.2.1.2.2	Sondy v Ramanově mikrospektroskopii.....	39
1.2.1.2.3	Rezonanční Ramanova spektroskopie.....	40
1.2.1.2.4	Koherentní anti-Stokesova Ramanova spektroskopie.....	40
1.2.1.2.5	Stimulovaná Ramanova spektroskopie.....	41
1.2.1.2.6	Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie.....	41
1.2.1.2.7	Potenciální klinické aplikace.....	42
1.2.2	Metody chiroptické spektroskopie.....	42
1.2.2.1	Elektronový cirkulární dichroismus.....	43
1.2.2.2	Ramanova optická aktivita.....	45
1.3	Statistická analýza spektrálních dat.....	48
2	VÝCHODISKA A CÍLE PRÁCE.....	50
3	MATERIÁL A METODY.....	52
3.1	Analýza plazmy.....	52

3.1.1	Výběr pacientů a kontrol.....	52
3.1.2	Příprava vzorků k analýze.....	54
3.1.3	Postupy spektroskopických analýz.....	55
3.1.3.1	Absorpční IČ spektroskopie.....	55
3.1.3.2	Ramanova a ROA spektroskopie.....	56
3.1.3.3	Spektroskopie ECD.....	57
3.2	Analýza tkáně	58
3.2.1	Analýza tkáně <i>ex vivo</i>	58
3.2.1.1	Výběr pacientů, příprava vzorků k analýze.....	58
3.2.1.2	Postup spektroskopických analýz.....	59
3.2.2	Analýza tkáně <i>in vivo</i>	62
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	65
4.1	Analýza plazmy	65
4.1.1	Absorpční IČ spektroskopie.....	65
4.1.2	Ramanova spektroskopie.....	66
4.1.3	Ramanova optická aktivita.....	68
4.1.4	Elektronový cirkulární dichroismus.....	69
4.1.5	Statistické vyhodnocení.....	70
4.2	Analýza tkáně <i>ex vivo</i>	74
4.2.1	Spektrální variabilita vzorků tkáně tlustého střeva.....	74
4.2.1.1	Variabilita dat vzhledem k intra-tkáňové heterogenitě.....	75
4.2.1.2	Variabilita dat vzhledem k inter-pacientské heterogenitě.....	76
4.2.2	Vliv excitační vlnové délky na tkáňové markery.....	78
4.2.3	Spektrální rozdíly způsobeny patologickým procesem ve střevní tkáni.....	80
4.2.4	Statistické vyhodnocení.....	82
4.3	Analýza tkáně <i>in vivo</i>	86
4.4	Interpretace dat - shrnutí	87
4.4.1	Analýza plazmy.....	87
4.4.2	Analýza tkáně.....	88
5	ZÁVĚR	90
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	94
	SEZNAM TABULEK.....	95
	LITERATURA.....	97
	SEZNAM PŘÍLOH.....	104

SEZNAM ZKRATEK

Zkratka	Význam
A	absorbance
ADR	rychlost detekce adenomu (adenoma detection rate)
APC	gen adenomatous polyposis coli
ATR	zeslabený úplný odraz (attenuated total reflectance)
BRCA1	gen <u>b</u> reast <u>c</u> ancer <u>1</u> , early onset
CA 19-9	carbohydrate antigen 19-9
CARS	koherentní anti-Stokesova Ramanova spektroskopie
CCD detektor	charge-couple device detektor, zařízení s vázanými náboji
CEA	karcinoembryonální antigen
CpG	cytosine-phosphatidyl-guanin
CRC	kolorektální karcinom (<u>c</u> olorectal <u>c</u> ancer)
CT	computed tomography
DNA	kyselina deoxyribonukleová (<u>d</u> eoxyribonucleic <u>a</u> cid)
DTGS	deuterovaný triglycinsulfát
ECD	elektronový cirkulární dichroismus
EGFR	receptor pro lidský epidermální růstový faktor ErbB-1 čili HER1 (epidermal growth factor receptor)
FIR	daleká infračervená oblast (far infrared)
FT	Fourierova transformace
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR)
Ge	germánium
FAP	familiární adenomatózní polypóza
FIT	Fecal Immunohistochemical Test
HER1	receptor pro lidský epidermální růstový faktor, též EGFR či ErbB-1 (<u>h</u> uman epidermal growth factor receptor)
HNPCC	hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (<u>H</u> ereditary <u>n</u> on- <u>p</u> olyposis <u>c</u> olorectal <u>c</u> ancer)
HSA	lidský sérový albumin (HSA)
HWNRS	Ramanova spektroskopie ve vysokých vlnkách
IČ	infračervené
K3EDTA	tri-draselná sůl kyseliny etylen-diamin-tetraoctové
K-RAS	protein kódovaný genem Kras (<u>K</u> rat sarcoma oncogene)
KRK	kolorektální karcinom
LDA	lineární diskriminační analýza
MAP	MUTYH-asociovaná polypóza

MIR	střední infračervená oblast (middle infrared)
MLH-1	gen <u>MutL</u> homolog 1
MMR	oprava chybného párování bazí (mismatch repair)
NIR	spektroskopie v blízké infračervené oblasti (near infrared)
MKN-O	Mezinárodní klasifikace nemocí pro Onkologii
MRI	magnetická rezonance (magnetic resonance imaging)
MSH-2	gen <u>MutS</u> Homolog 2
MSH-6	gen <u>MutS</u> Homolog 2
NIR	near infrared – blízké infračervené záření
nm	nanometr
MUTYH	gen <u>MutY</u> DNA Glycosylase
N-RAS	protein kódovaný genem Nras (N <u>rat</u> sarcoma oncogene)
p53	protein p53
p.a.	pro analýzu
PBS	solný roztok fosfátem pufovaný (Phosphate Buffered Saline)
PC	hlavní komponent (Principal component)
PCA	analýza hlavních komponent (Principal component analysis)
phe	fenylalanin
PMS2	gen <u>PMS1</u> Homolog 2
RAS	protein kódovaný genem Ras (<u>rat</u> sarcoma oncogene)
ROA	Ramanova optická aktivita
RRS	rezonanční Ramanova spektroskopie
RSD	relative standard deviation (relativní směrodatná odchylka)
s	<u>sekunda</u>
SERS	povrchově zesílená Ramanova spektroskopie
SNR	poměr signálu k šumu (SNR)
SRS	stimulovaná Ramanova spektroskopie
TNM	klasifikace nádorů podle tumoru, uzlin a metastáz (tumor, <u>n</u> odi, <u>m</u> etastasis)
T	transmitance
TOKS	test okultního krvácení do stolice
UV	ultrafialové
VCD	vibrační cirkulární dichroismus
VIS	viditelné
W	watt
ZN	zhoubný <u>n</u> ovotvar

1 ÚVOD

1.1 Kolorektální karcinom

1.1.1 Základní charakteristika, klasifikace

Kolorektální karcinom (KRK) je maligní nádorové onemocnění zahrnující z topografického hlediska karcinom rekta a rekto-sigmoideálního přechodu a karcinomy tračníku (tlustého střeva). 95 % kolorektálních karcinomů tvoří adenokarcinomy vycházející z mucin produkujících žlázek sliznice tlustého střeva a konečníku, velmi vzácně se jedná o neuroendokrinní tumory, dlaždicobuněčné karcinomy nebo jiné velmi raritní histologické diagnózy (Leopoldo S. et al, 2008). V době diagnózy je synchronní postižení jiné části tlustého střeva diagnostikováno u přibližně 5 % pacientů (Bos A. et al, 2008).

Je důležité zmínit, že u kolorektálního karcinomu rozlišujeme anatomicky 2 základní nádorové typy onemocnění, lišící se svým charakterem šíření a následně pak možnostmi operativy a protinádorové léčby. Karcinom rekta má tendenci spíše k šíření lokoregionálnímu, prorůstáním přes vrstvu střevní stěny k okolitým orgánům a metastázování lymfogenní cestou do regionálních lymfatických uzlin. Na druhé straně karcinom tračníku/tlustého střeva častěji metastazuje vzdáleně, hematogenně nejčastěji do jater nebo do plic. Při stejném klinickém stádiu je lokalizace karcinomu v rektu prognosticky horší než v tlustém střevě (Riihimäki M. et al, 2016). Dle recentních poznatků má neméně důležitý prognostický a prediktivní význam i anatomická lokalizace karcinomů tlustého střeva. Nádory lokalizované proximálně od flexura lienalis se označují za pravostranné, nádory lokalizované v této flexuře nebo distálně od ní se označují jako levostranné. Lokalizace nádorů v pravém tračníku je považována za nezávislý negativní prognostický faktor u pacientů s kolorektálním karcinomem v časných i pokročilých stádiích (Loupakis F. et al, 2015). Základní přehled anatomických lokalizací a sublokalizací KRK znázorňuje **Obrázek 1**.

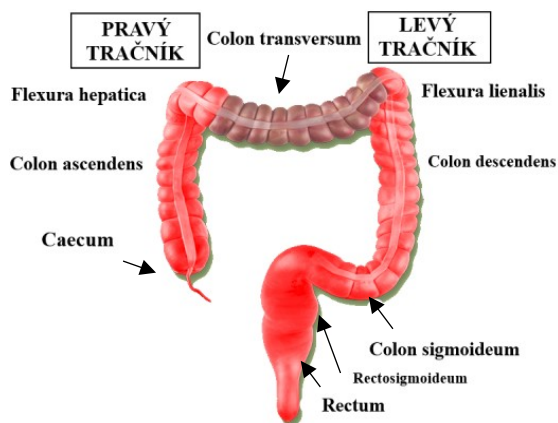
Obrázek 1: Anatomické lokalizace a sublokalizace kolorektálního karcinomu
(převzato z Derks et al. 2006)
(MKN-O: C18-C20)

Tlusté střevo (C18)

1. Caecum (C18.0)
2. Colon ascendens (C18.2)
3. Flexura hepatica (C18.3)
4. Colon transversum (C18.4)
5. Flexura lienalis (C18.5)
6. Colon descendens (C18.6)
7. Colon sigmoideum (C18.7)

Rectosigmoideální přechod (C19)

Rectum (C20)



Pro klasifikaci kolorektálního karcinomu a určení jeho rozsahu se běžně uplatňují 2 klasifikační systémy – TNM a Dukes. V současné době se u nás od r. 2017 užívá 8. vydání TNM Klasifikace zhoubných novotvarů. Podobně jako u jiných malignit rozlišujeme u kolorektálního karcinomu 4 stádia v závislosti na rozsahu primárního nádoru, který hodnotíme dle hloubky invaze do vrstev střevní stěny nebo okolí (T-tumour), regionální lymfadenopatie (N-nodes) a vzdálené diseminaci (M-metastases).

Ke každé anatomické lokalizaci, resp. její části patří regionální lymfatické uzliny, jejichž postižení se hodnotí jako N1 (**Tabulka 1**). Metastázy v jiných lymfatických uzlinách se klasifikují jako metastázy vzdálené.

Tabulka 1: Regionální lymfatické uzliny dle anatomické lokalizace (podle TNM klasifikace maligních nádorů, 8. vydání 2017, česká verze ÚZIS, Praha)

Lokalizace KRK	Regionální lymfatické uzliny
Caecum	ileokolické, pravostranné kolické
Colon ascendens	ileokolické, pravostranné kolické, střední kolické
Flexura hepatica	střední kolické, pravostranné kolické
Colon transversum	pravostranné kolické, střední kolické, levostranné kolické, dolní mezenterické
Flexura lienalis	střední kolické, levostranné kolické, dolní mezenterické
Colon descendens	levostranné kolické, dolní mezenterické
Colon sigmoideum	sigmoideální, levostranné kolické, horní rektální (hemoroidální), dolní mezenterické a rektosigmoideální
Rectum	horní, střední a dolní rektální (hemoroidální), dolní mezenterické, vnitřní ilické, mezorektální (pararektální), laterální sakrální, presakrální a sakrální promontoriální (Gerotovy)

Stádium I představuje primární nádor maximálně do velikosti T2, tedy s prorůstáním nejhluběji do tunica muscularis propria, bez regionální lymfadenopatie. Stádium II se klasifikuje opět jen jako samotné postižení primárním tumorem, šířícím se do subserózy

(T3) a to až do velikosti T4b, tedy i s možným přímým šířením nádoru do okolitých orgánů, nadále ale bez regionální lymfadenopatie. Mezi pokročilejší stádia se již řadí stádium III, které je charakteristické přítomností regionální lymfadenopatie. Záchyt vzdálených metastáz při primární diagnóze kolorektálního karcinomu se hodnotí jako stádium IV. V systému Dukes představuje stádium A tumor ohraničený střevní stěnou, ve stadiu B tumor zasahuje nebo proniká serózou, pozitivita perikolických nebo perivaskulárních lymfatických uzlin se klasifikuje jako stádium C a stádium D znamená přítomnost vzdálených metastáz. Přehled TNM klasifikace kolorektálního karcinomu znázorňuje **Tabulka 2**.

Tabulka 2: TNM klasifikace kolorektálního karcinomu (podle TNM klasifikace maligních nádorů, 8. vydání 2017, česká verze ÚZIS, Praha)

T - Primární nádor		N - Regionální mízní uzliny		M - Vzdálené metastázy	
TX	nelze hodnotit	NX	nelze hodnotit	MX	nelze hodnotit
T0	bez známek primárního nádoru	N0	bez známek metastáz	M0	bez známek metastáz
Tis	karcinom in situ: intraepiteliální nebo invaze do lamina propria mucosae	N1a	metastáza v 1 uzlině	M1a	metastázy omezené na 1 orgán (játra, plíce, vaječník) nebo neregionální mízní uzliny
T1	postihuje submukózu	N1b	metastáza v 2-3 uzlinách		
T2	postihuje tunica muscularis propria	N1c	ložiska v subseróze nebo neperitonealizované perikolické či perirektální měkké tkáni bez metastázy v regionální mízní uzlině		
T3	postihuje subserózu nebo se šíří do neperitonealizované perikolické či perirektální tkáně	N2a	metastázy v 4-6 uzlinách	M1b	metastázy ve 2 a více orgánech nebo na peritoneu
T4a	prorůstá na viscerální peritoneum	N2b	metastázy v 7 a více uzlinách		
T4b	přímo postihuje jiné orgány či struktury				
Rozdělení do stádií - TNM klasifikace				Dukes	
0	Tis N0 M0				
I	T1 N0 M0 T2 N0 M0				A
IIA IIB IIC	T3 N0 M0 T4a N0 M0 T4b N0 M0				B
IIIA IIIB IIIC	T1-2 N1 M0 T1 N2a M0 T3-4a N1 M0 T2-3 N2a M0 T1-2 N2b M0 T4a N2a M0 T3-4a N2b M0 T4b N1-2 M0				C

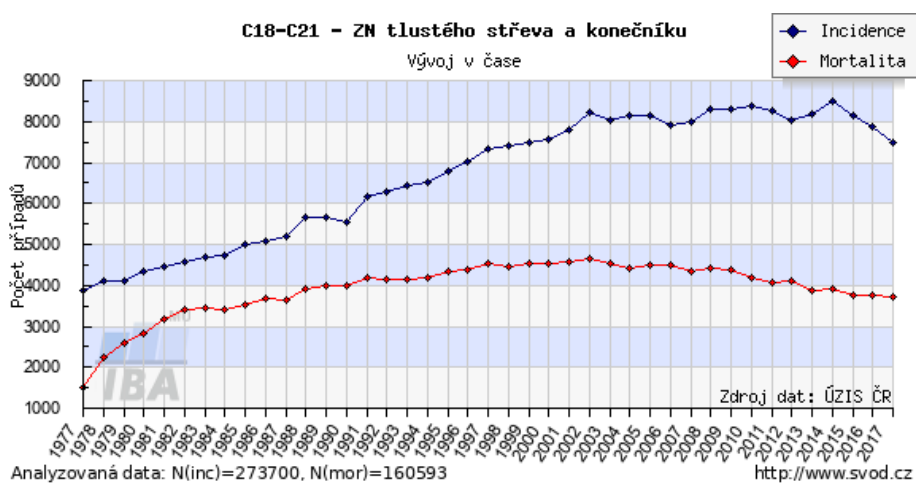
IVA	jakékoliv T, jakékoliv N, M1a	D
IVB	jakékoliv T, jakékoliv N, M1b	

1.1.2 Epidemiologie

S incidencí přibližně 1,8 milion případů za rok a roční mortalitou téměř 861 000 obyvatel představuje kolorektální karcinom 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.

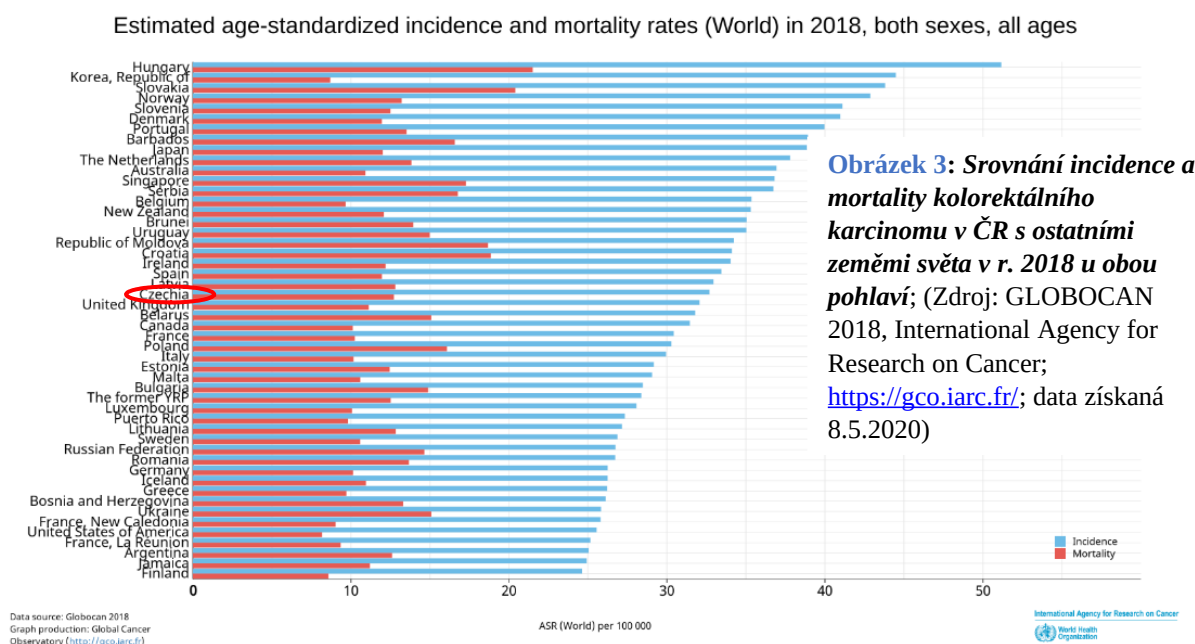
Kolorektální karcinom je v ČR nejčtenějším nádorem, vezmeme-li incidenci bez ohledu na pohlaví. Jak u mužů, tak u žen se jedná o druhou nejčastější malignitu. V roce 2017 byl nově diagnostikován u 4400 mužů a 2934 žen, celkově tedy přibylo 7334 případů (www.SVOD.cz; data získaná 8.5.2020). Ke srovnání bylo v roce 1977 diagnostikováno 3758 nových pacientů s kolorektálním karcinomem, 5040 jich přibylo v roce 1987, 7245 v roce 1997 a 7855 v roce 2007. Můžeme tedy konstatovat, že se za posledních 40 let počet nových případů téměř zdvojnásobil, nicméně v posledních přibližně 15 letech incidence stagnuje až pomalu klesá (**Obrázek 2**, graf zahrnuje i diagnózu C21 – ZN řitního kanálu, která představuje přibližně 200 nových případů ročně).



Obrázek 2: Časový vývoj **incidence** (počet nových případů na 100 000 osob) **a mortality** (počet úmrtí v souvislosti s diagnózou na 100 000 osob) **pro diagnózu kolorektálního karcinomu v ČR;** (www.SVOD.cz; data získaná 8.5.2020)

Úmrtnost na kolorektální karcinom se v posledních letech mírně snižuje. Tento pozitivní trend je pravděpodobně způsoben zahájením screeningových programů. V roce 2017 zemřelo v souvislosti s touto diagnózou 3646 pacientů. V roce 1977 zemřelo 1464 pacientů, 3540 v roce 1987, 4465 v roce 1997 a 4289 v roce 2007.

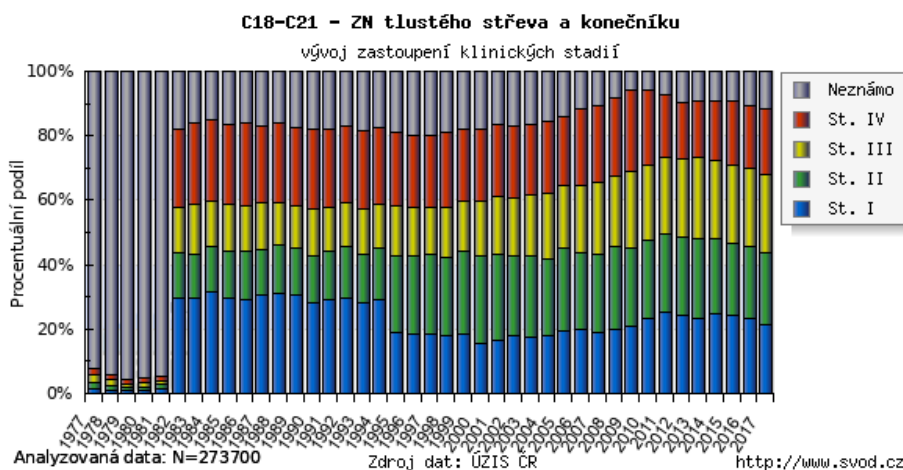
Státy střední Evropy vykazují celosvětově nejvyšší hodnoty incidence a mortality, naše pozice se ale zlepšuje, dle recentně publikovaných dat nám v roce 2018 patřilo 23. místo v incidenci a 22. místo v mortalitě kolorektálního karcinomu (**Obrázek 3**).



Incidence začíná narůstat po 50. roce života, čemuž odpovídá i věk zahájení screeningu kolorektálního karcinomu. Nejčastěji se kolorektální karcinom vyskytuje ve věkové kategorii 65 až 75 let. (www.SVOD.cz; data získaná 8.5.2020). V podstatné míře ale postihuje i pacienty v produktivním věku, téměř 18 % všech je nemocných je mladších 60 let. Prudký nárůst incidence pak začíná již po 45. roce života.

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 (stádium I a II) v době diagnózy, která v roce 1997 tvořila 42,9 %, v roce 2007 43,3 % a v roce 2017 43,6 % pacientů (**Obrázek 4**, graf zahrnuje i diagnózu C21). 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 %. Z prezentovaných dat je patrné, že kolorektální screening, který započal v lednu 2009, zatím nevedl k výraznějšímu snížení stádia v době diagnózy. (www.SVOD.cz; data získaná 8.5.2020). Tento fakt významně zhoršuje celkovou prognózu pacientů a dosažitelné výsledky léčby. U metastatického onemocnění je pětileté relativní přežití méně než 20 %, naopak u stádia I dosahuje více než 90 % (OECD, 2015). Nepříznivá situace se v čase nijak nelepší a ani poslední dostupná data nenaznačují pozitivní trend.



Obrázek 4: Časový vývoj zastoupení jednotlivých klinických stádií kolorektálního karcinomu v ČR; (www.SVOD.cz; data získaná 8.5.2020)

Podle mikrosimulačních modelů používaných v USA (tzv. MISCAN model) má ale screening kolorektálního karcinomu hlavní podíl na snižování incidence a mortality. Samotný screening vedl v USA v letech 1987-2010 ke snížení mortality o 53 % (Zauber A.G., 2015).

1.1.3 Etiopatogeneze

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 adenokarcinomů lokalizovaných v konečníku 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, diferenciace, apoptózy a signálních drah v buňce, které se projeví její nádorovou transformací (Hanahan D., Weinberg R.A., 2000). Vznik somatických mutací genomové DNA v jednotlivých buňkách je běžným jevem, jehož frekvence se zvyšuje v důsledku expozice mutagenních faktorů. K jejich

reparaci slouží DNA reparační mechanismy opravující různé druhy poškození DNA. V průběhu stárnutí organismu dochází ke zvýšené pravděpodobnosti, že některé ze vzniklých alterací DNA zůstanou neopraveny.

Bylo publikováno několik studií a metaanalýz, které ovlivnitelné faktory životního stylu hodnotí jako protektivní, nebo jako rizikové, které možnost vzniku onemocnění zvyšují. Mezi faktory rizikové patří západní styl života spojený s obezitou (Aleksandrova K. et al, 2013), nízkou fyzickou aktivitou, nepřiměřeným příjmem červeného masa, živočišných tuků a uzenin (Magalhães B. et al, 2012), nestřídmým pitím alkoholu (LoConte N.K. et al, 2018) a kouřením (Liang P.S. et al, 2009). S nižším rizikem vzniku kolorektálního karcinomu je spojován vysoký příjem vlákniny ve stravě (Aune D. et al, 2011), příjem rybího masa (Wu S. et al, 2012), užívání hormonální antikoncepce (Bosetti C. et al, 2009) nebo hormonální substituční léčby (Grodstein F. et al, 1999). Zajímavý je protektivní účinek kyseliny acetylsalicylové, u které dávka 75-300 mg denně užívaná několik let snižuje riziko vzniku kolorektálního karcinomu, přičemž větší efekt byl pozorován v prevenci proximálního karcinomu a pro vyšší denní dávky (Rothwell P.M. et al, 2010).

Vyšší riziko gastrointestinálních malignit, a především kolorektálního karcinomu, mají pacienti po prodělané radioterapii na oblast dutiny břišní pro malignitu v dětském věku. V dospělosti se zvyšuje riziko karcinomu rekta po radioterapii karcinomu prostaty. Riziko kolorektálního karcinomu je spojováno také s dlouhodobou androgen-deprivační terapií (Gillesen S. et al, 2010). Mezi rizikové skupiny patří i pacienti s idiopatickými střevními záněty, jako je Crohnova nemoc nebo ulcerózní kolitida, zvláště v případě doprovodné primární sklerozující cholangitidy (Marchesa P. et al, 1997). Po desetiletém průběhu pankolitidy činí riziko vzniku nádoru 1-2 % ročně.

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). Před 30 lety objevil Vogelstein a jeho kolegové důležitý model karcinogeneze kolorekta, který nazvali sekvence adenom-karcinom (Fearon E.R., Vogelstein B., 1990). Nejčastěji nádory vznikají právě touto klasicky akceptovanou cestou (70-75 % kolorektálních karcinomů), tedy procesem intraepiteliální neoplazie nejprve nízkého a následně vysokého stupně. Převládajícím znakem této dráhy je chromozomální nestabilita s vysokým procentem aneuploidie. S akumulací mutací v genech jako APC, KRAS, NRAS a

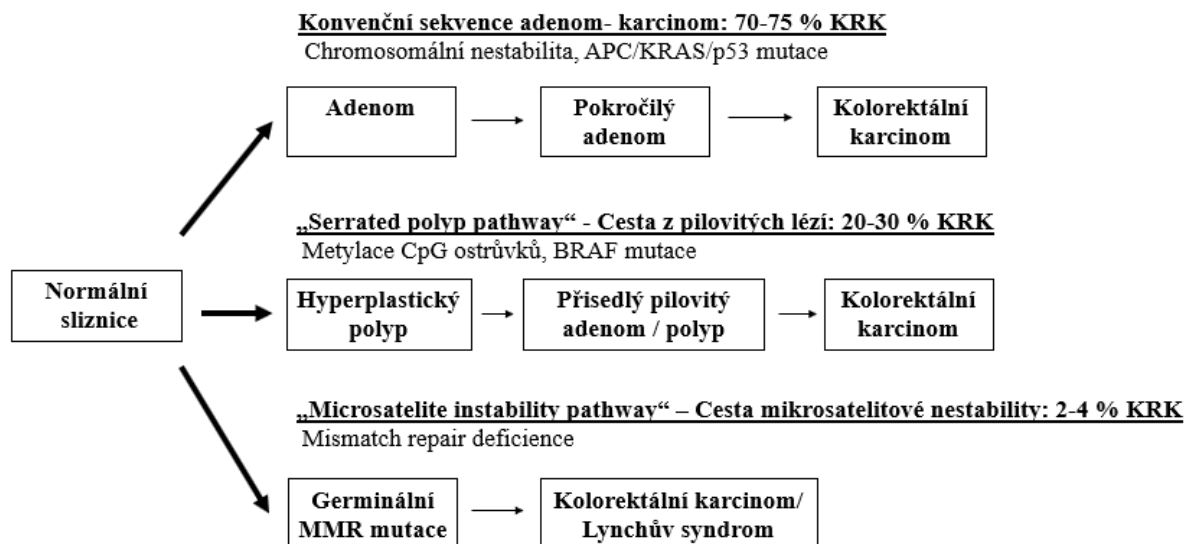
p53 nastane postupná transformace normální střevní sliznice na maligní epitel do podoby adenomu. K tomuto dochází nejčastěji v adenomech, zejména vilózních a tubulovilózních než čistě tubulárních. Jedná se o vícestupňový proces, který zahrnuje low grade dysplazii – dysplazii nízkého stupně diferenciaci, high grade dysplazii – dysplazii vysokého stupně diferenciaci a eventuálně následně přeměnu v adenokarcinom. Završení tohoto procesu trvá 10 a víc let, proto je tento časový interval doporučen jako rozmezí při provádění screeningové kolonoskopie osobám ve středním riziku.

Jinou cestou kolorektální karcinogeneze je tzv. „serrated polyp pathway“ – tedy cesta z pilovitých lézí a byla popsána poměrně nedávno (Leggett B., Whitehall V., 2010). Hlavním prekurzorem jsou „serrated polyps“ - pilovité polypy, zejména přisedlé pilovité adenomy. Tímto způsobem vznikají nádory převážně v pravé polovině tračníku, u pacientů mladších, často se specifických fenotypem – vyskytují se jako ploché léze s pilovitým nebo solidním růstem. Histologicky je pro ně mnohdy charakteristická mucinózní diferenciaci či přítomnost intraepiteliálních lymfocytů (Rex D.K. et al, 2012). Hlavním molekulárním znakem je často BRAF mutace nebo metylace původně funkčního genu (CpG ostrůvků DNA) u nefamiliárních nádorů. Tato dráha je odpovědná za vznik 20–30 % kolorektálních karcinomů (Yang S. et al, 2004; Huang C.S. et al, 2004).

Další důležitou příčinou vzniku kolorektálního karcinomu je germinální mutace některého z MMR (mismatch repair) - opravných genů (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2), která vede k mikrosatelitové nestabilitě a k přítomnosti chyb při opravách DNA během její replikace. Této nemoci se říká Lynchův syndrom (známý i jako HNPCC – hereditární nepolypózní kolorektální karcinom), který je považován za nejčastější typ hereditárního kolorektálního karcinomu a reprezentuje 2-4 % všech případů této malignity (Jasperson K.W. et al, 2010).

Hlavní molekulární dráhy patogeneze kolorektálního karcinomu znázorňuje **Obrázek 5**.

Obrázek 5: Hlavní molekulární dráhy patogeneze kolorektálního karcinomu (převzato z Li D. et al., 2018)



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. Riziko vzniku nádorového onemocnění u nosiče mutace v nádorovém predispozičním genu je zřídka absolutní. Pravděpodobnost, s jakou ke vzniku onemocnění u nosičů mutací dochází, označujeme jako penetranci. Úplnou penetrancí se vyznačují mutace v genu *APC* při vzniku karcinomu tlustého střeva u pacientů s dědičným výskytem familiární adenomatózní polypózy. Jako mutace v genech spojené s vysokou penetrancí se označují varianty, které pro nosiče mutací znamenají více než pětinasobné zvýšení pravděpodobnosti vzniku onemocnění v porovnání s nenosičem. Středně penetrantní varianty jsou spojeny se dvou až pětinasobným zvýšením rizika. Dalším příkladem je již zmíněný Lynchův syndrom. Tyto dva syndromy představují příčinu onemocnění pouze u 5 % pacientů s kolorektálním karcinomem, v neselektované populaci pacientů s kolorektálním karcinomem nalezneme zárodečné patogenní mutace u 10 % pacientů (Lynch H.T., de la Chapelle A., 2003).

Většinu přednádorových lézí lze endoskopicky odstranit, nicméně některé léze mohou být ploché, a tedy endoskopicky těžko vizualizovatelné. Navíc se předpokládá, že větší ploché léze (≥ 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.

Endoskopická resekce adenomových polypů vede k redukci incidence kolorektálního karcinomu. V americké prospektivní studii (National Polyp Study) bylo sledováno 1418 pacientů, kteří podstoupili kolonoskopické vyšetření s endoskopickou resekcí jednoho nebo více polypů (Winaver S.J. et al, 1993). Během průměrné délky sledování 6 let byla u těchto jedinců incidence kolorektálního karcinomu o 76 % nižší než u pacientů, kteří kolonoskopické vyšetření v rámci běžné screeningové populace nepodstoupili.

1.1.4 Hereditární kolorektální karcinom

Hereditárně podmíněný kolorektální karcinom je majoritně determinován znaky endogenními. Řadíme sem onemocnění s vrozenou mutací některého z genů podílejících se na regulaci buněčného cyklu či DNA reparačních procesů. Vrozené syndromy představují významné riziko vzniku kolorektálního karcinomu a často i dalších malignit.

Jak již bylo uvedeno, nejčastějšími dědičnými syndromy, které souvisí s karcinomem tlustého střeva, jsou Lynchův syndrom (dědičný nepolypózní kolorektální karcinom; HNPCC) a familiární adenomatózní polypóza (FAP). Tyto dva syndromy se podílejí na vzniku kolorektálního karcinomu pouze v 5 % případů, přesto představují 90-95 % zjištěných mutací u pacientů s dědičnou formou KRK (Lynch H.T. et al, 1993).

Příčinou Lynchova syndromu jsou mutace v některém z genů proteinů, které se účastní oprav chybného párování bazí v DNA (tzv. „mismatch repair“ geny, MMR). Nejčastěji se jedná o mutaci genu *MLH1*, méně často pak *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, event. *PMS1* (Moreira L. et al, 2012). Karcinomy tlustého střeva vzniklé v rámci Lynchova syndromu jsou charakteristické časným výskytem, až 70 % primárních tumorů se nachází před lienální flexurou (tedy v pravé části colon) a 10 % pacientů má synchronní tumor v jiné části střeva (Parry S. et al, 2011). Celoživotní riziko onemocnění kolorektálním karcinomem se blíží k 80 %. Dalším typickým nádorovým onemocněním, které Lynchův syndrom doprovází, je karcinom endometria, který v průběhu života může postihnout až 60 % nosiček mutace (Jenkins M.A. et al, 2006). Méně často se pak vyskytují jiné malignity (karcinom ovaria, žaludku, tenkého střeva, hepatobiliárního systému, močových cest, prsu a další).

Klasická forma familiární adenomatózní polypózy (FAP) se vyznačuje výskytem více než 100 adenomatózních polypů tlustého střeva (nebo méně polypů v mladším věku), podkladem tohoto syndromu je zárodečná mutace v genu *APC* (Burt R.W. et al, 1995). Zodpovídá pouze za vznik ~ 1 % karcinomů tlustého střeva. Mnohočetné polypy se objevují časně v distální oblasti tlustého střeva a v konečníku, současně se mohou vyskytovat i v tenkém střevu a v žaludku, kde jsou spojeny rovněž se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu. Polypy se u nosičů mutací objevují již kolem 16 roku života a kolorektální karcinom vzniká u téměř 100 % nemocných do 50 let věku (Bisgaard M.L. et al, 1994).

Vzácnější forma polypózy je spojena s přítomností dědičných mutací v obou alelách genu *MUTYH*. Typickým projevem *MUTYH*-asociované polypózy (MAP) je výskyt mnohočetných polypů v tlustém střevě (Sieber O.M. et al., 2003). Vzácné jsou projevy mimo colon (polypy v žaludku nebo duodenu, osteomy, hypertrofie pigmentového epitelu retiny). Kromě karcinomu tlustého střeva je u nosičů bialelických mutací zvýšené riziko vzniku karcinomu močového měchýře, duodena a ovaria (Terdiman J.P., 2009).

Další skupinou hereditárních nádorových onemocnění jsou hamartomatózní polypózní syndromy, který výskyt je ale velmi vzácný. Patří sem Peutz–Jeghers syndrom (mutace v genu *STK11*), juvenilní polypóza (mutace v genu *SMAD4/ BMPR1A*) a Cowdenův syndrom (mutace v genu *PTEN/ BMPR1A*).

1.1.5 Diagnostika

1.1.5.1 Screeningový program

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).

Primární prevencí rozumíme eliminaci nepříznivých, exogenních faktorů, kterými jsou především nevhodná strava s vysokým obsahem živočišných tuků a červeného masa, potraviny upravované smažením, grilováním, či pečením, zvýšená konzumace alkoholu, kouření, ale také nedostatek pohybu a obezita (Tárraga López P.J. et al, 2014).

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. V případě

kolorektálního karcinomu se jedná o zdravou populaci nad 50 let s negativní rodinnou a osobní anamnézou stran této diagnózy, bez dědičných polypózních syndromů a bez chronických střevních zánětlivých onemocnění. Cílem screeningu KRK je zvýšení četnosti záchytu zhoubných nádorů kolorekta a přednádorových lézí, tzv. prekanceróz. Mezi tyto prekancerózy patří zejména 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).

K sekundární prevenci se řadí i dlouhodobé sledování vysoko rizikových skupin populace, mezi které řadíme pacienty s idiopatickými střevními záněty, jedince se známým nebo suspektním hereditárním syndromem KRK, jedince s pozitivní rodinnou anamnézou KRK nebo adenomového polypu u příbuzného prvního stupně ve věku pod 60 let a dále pacienty s osobní anamnézou adenomového polypu. Jsou pro ně vypracovány jednotlivé dispenzární programy, lišící se dle stupně rizika (Wolf A.M.D. et al, 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).

Screening KRK má v České republice letitou tradici a prochází kontinuálním vývojem. Již v roce 2000, po Německu v pořadí druhý na světě, byl zahájen národní program screeningu KRK u asymptomatických jedinců. Vychází z předpokladu, že věk je jedním z hlavních rizikových faktorů sporadického KRK. Bezpříznakovým jedincům od 50 let věku byl nabídnut guajakový test na okultní krvácení ve stolici (gTOKS) následovaný kolonoskopií v případě jeho pozitivity. Počátkem roku 2009 došlo k zásadní úpravě programu zavedením primární screeningové kolonoskopie a imunochemických testů na okultní krvácení do stolice (FIT).

Zavedením FIT, primární screeningové kolonoskopie a zapojením ambulantních gynekologů došlo k nárůstu pokrytí cílové populace, která v ČR čítá 3,8 milionu jedinců, na 25 %. Nicméně pro signifikantní změnu incidence a mortality na toto zhoubné onemocnění je nezbytná účast 50 %, optimálně až 65 % cílové populace. V lednu r. 2014 proto došlo ke změně oportunního programu na populační zavedení státem organizovaného adresného zvaní.

Program zvaní je koordinován Ministerstvem zdravotnictví ČR ve spolupráci s plátcí zdravotní péče a s odbornými lékařskými společnostmi (Vojtěchová G. et al, 2014).

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.

Testy na okultní krvácení do stolice jsou neinvazivním vyšetřením, které detekují mikroskopické ztráty krve do stolice, k nimž dochází u adenomových polypů sporadicky, a navíc v závislosti na velikosti adenomu. Proto je zásadním požadavkem pro detekci kolorektální neoplázie opakování těchto testů v jednoletém nebo dvouletém intervalu. Současné imunochemické testy jsou na trhu kvalitativní a kvantitativní. Kvantitativní imunochemická detekce krve ve stolici (Fecal Immunohistochemical Test – FIT) se stává prioritou, doporučena hodnota tzv. cut-off, tedy minimální koncentrace hemoglobinu, aby byl test považován za pozitivní, je ve většině českých akreditovaných laboratoří 75 ng/ml, což odpovídá 15 µg/g stolice (Kocna P., Zima T., 2015). Kvantitativní FIT nevyžadují dietní omezení v odběru a umožňují nastavení hodnoty cut-off podle požadované senzitivity a kapacity kolonoskopických center. Vyšetření na analyzátoch tak není zkresleno subjektivním hodnocením, testy navíc dovolují porovnávat výsledky v evropském měřítku a kvalitu analýzy je možné ověřovat externí kontrolou (Lee J.K. et al, 2014).

V případě pozitivního výsledku TOKS je indikována screeningová kolonoskopie. Primární screeningová kolonoskopie je alternativní metodou pro ty jedince, kteří se nerozhodli pro TOKS, recentně byla věková hranice o 5 let snížena rovněž na věk 50 let. Při negativním kolonoskopickém nálezu je další preventivní vyšetření hrazeno zdravotní pojišťovnou za 10 let. Bohužel až 25 % pacientů, kteří podstoupí kolonoskopii, má neadekvátně připravené tlusté střevo (Seeff L.C. et al., 2004). Screeningovou kolonoskopii se špatnou či velmi špatnou střevní přípravou nelze považovat za adekvátní (Vepřeková G. et al, 2012).

Základní výsledky programu screeningu kolorektálního karcinomu jsou uvedeny v **Tabulce 3**.

Tabulka 3: Časový vývoj počtu vyšetřených osob a zachycených kolorektálních neoplázií v programu screeningu kolorektálního karcinomu (převzato z Tomášek et al., *Onkologie minimum pro praxi*, 2015)

Rok	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Screening TOKS								
Počet osob vyšetřených TOKS	272 658	320 317	352 595	411 0831	520 064	524 551	551 883	573 101
Počet osob s výsledkem TOKS +	9 709	10 555	14 628	20 564	31 736	35 067	38 309	42 704
Pozitivita TOKS	3,6 %	3,3 %	4,1 %	5,0 %	6,1 %	6,7 %	6,9 %	7,5 %
Počet osob vyšetřených kolonoskopií*	5 334	5 679	7 458	11 711	18 327	20 132	21 137	21 837
Nález adenomových polypů	1 578	1 635	2 367	3 781	6 234	7 134	7 802	8 660
Podíl při kolonoskopii	29,6 %	28,8 %	31,7 %	32,3 %	34,0 %	35,4 %	36,9 %	39,7 %
Nález karcinomu	335	337	446	599	828	733	778	803
Podíl při kolonoskopii	6,3 %	5,9 %	6,0 %	5,1 %	4,5 %	3,6 %	3,7 %	3,7 %
Screening primární screeningovou kolonoskopií								
Počet osob vyšetřených kolonoskopií				1 362	4 400	4 576	4 495	4 933
Nález adenomových polypů				345	1 076	1 162	1 145	1 348
Podíl při kolonoskopii				25,3 %	24,5 %	25,4 %	25,5 %	27,3 %
Nález karcinomu				24	43	42	35	48
Podíl při kolonoskopii				1,8 %	1,0 %	0,9 %	0,8 %	1,0 %

*Data z Registru screeningu kolorektálního karcinomu, nemusí zcela pokrývat všechny pacienty s pozitivním výsledkem TOKS.

Zdroj dat: Registr screeningu kolorektálního karcinomu, IBA MU, Národní referenční centrum

Při pozitivním výsledku kolonoskopie se další diagnostický a terapeutický postup řídí dle doporučení pro pacienty s vysokým rizikem kolorektálního karcinomu. Pokud se naleznou a odstraní polypy – prekancerózy, je pacient podle nálezu dispenzarizován. Zvýšené riziko rekurence je při nálezu pokročilého adenomu nebo více než 3 adenomů nebo věku nad 60 let (Wolf A.M.D. et al, 2018).

V ČR je do screeningu zapojeno přibližně 170 endoskopických pracovišť, center pro screeningovou kolonoskopií, která musela splnit určitá kritéria a jejichž kvalita je průběžně kontrolována (www.kolorektum.cz). Výsledky kolonoskopií se zadávají do Registru screeningu kolorektálního karcinomu, který spravuje Institut biostatiky a analýz Masarykovy univerzity. Podle evropských doporučení se sleduje například pokrytí screeningovým vyšetřením, podíl pozitivních testů na okultní krvácení, záchyt adenomů (ADR – adenoma detection rate) a provedení totální kolonoskopie (caecal intubation rate), stadium nádorů diagnostikovaných ve screeningu, míra komplikací, časový interval mezi pozitivním výsledkem ze stolice a kolonoskopií. Jedno z doporučení týkajících se ADR například stanoví, že při screeningové kolonoskopii by se mohlo detekovat 25 % adenomů u mužů a 15 % u žen nad 50 let (Tomášek et al, 2015).

1.1.5.2 Anamnéza, fyzikální vyšetření, laboratorní vyšetření

V rámci anamnézy je potřeba zjistit možný výskyt nádorových onemocnění v rodině, obezřetnost je na místě při postižení jednoho a více příbuzných prvního stupně, zvláště pokud u nich vznikl karcinom před dosažením věku 50 let. Při podezření na dědičnou formu kolorektálního karcinomu indikujeme konzultaci klinického genetika. Dále sledujeme exogenní rizikové faktory. Důležitý je taky rozbor obtíží, jako nejčastější symptomy pacienti popisují krvácení z konečníku, ztrátu hmotnosti, bolesti břicha, průjem nebo zácpu. Velká část pacientů je asymptomatická, což je spojeno s úskalím časně diagnostiky a potřeby provádění pravidelných screeningových vyšetření se zaměřením na rizikovou populaci (Hamilton W. et al, 2005).

Klinické vyšetření je cíleno na vyšetření břicha (palpační citlivost, hepatomegalie, ascites) a digitální vyšetření konečníku per rectum. Zvláště významné je toto vyšetření u tumorů těsně nad anorektální junkcí, které mohou být při endoskopickém vyšetření přehlédnuty (Hamilton W. et al, 2005).

V laboratoři 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 specificitu 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.

Markery je nutné vyšetřit před resekci 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

1.1.5.3 Zobrazovací metody

V diagnostice kolorektálního karcinomu používáme celou paletu různých 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. Vyšetřen tedy musí být celý tračník až do céka. Kromě biopsie suspektních útvarů je možné provádět také výkony terapeutické mnohých počínajících změn (polypektomie, ošetření argon-plazma koagulací či technika mukosektomie). Nevýhodou kolonoskopie jsou možné komplikace při výkonu, zvláště ve spojení s polypektomií. Dalším faktorem ovlivňujícím výtěžnost kolonoskopie je zkušenost endoskopisty, která na jedné straně ovlivňuje procento komplikací, ale souvisí i s procentem intervalových karcinomů, tj. karcinomů, které se objevují neočekávaně v intervalu, který by měl být pokryt kolonoskopií. Popisuje se v rozmezí 1,8–9,2 % cílové populace (Kaminski M.F. et al, 2010). V případě, že nebyla kompletní kolonoskopie provedena před operací nádoru (nejčastěji pro stenozující tumor), je třeba ji doplnit do 6 měsíců po operaci.

K verifikaci nádorů rekta postačuje rektoskopie, i v tomto případě se ale doporučuje dovyšetřit pacienta totální kolonoskopií k vyloučení synchronní nádorové duplicity, která se může vyskytovat u 2-10 % případů (Kim M.S., Park Y.J., 2007).

Dvojkontrastní irigografii využíváme méně často, především v situaci, kdy není možné provést endoskopické vyšetření. Podobnou indikaci má virtuální kolonoskopie (CT kolonografie). Pomocí těchto zobrazovacích metod logicky ale nezískáme tkáňový vzorek potřebný k provedení histopatologické verifikace, která je základem pro stanovení diagnózy nádorového onemocnění. K verifikaci malignity pak musíme volit jinou cestu, v případě suspektních metastáz biopsií vzdáleného ložiska (jaterní biopsie, plicní biopsie), nebo biopsií jiné přístupné metastázy. Při vysoké suspekci na malignitu je další možností provedení chirurgického výkonu i bez předchozí verifikace. Získáme při něm následně dostatek materiálu k podrobnému histopatologickému vyšetření (Kim D.D., 2019).

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). Samotný ultrazvuk břicha není dostatečnou stagingovou metodou před radikální operací kolorektálního karcinomu. Jako nejsenzitivnější metody pro hodnocení lokoregionálního postižení se u pacientů s nádory rekta jeví magnetická rezonance pánve nebo transrektální ultrasonografie. Pomocí těchto vyšetření stanovujeme hloubku prorůstání stěnou rekta, vztah k okolním orgánům a také stav regionálních lymfatických uzlin. Obě metody jsou validní při hodnocení nádorů T2 a T3. MRI

však může prohlédnout některé nádory T1, na druhé straně nádory T4 zobrazuje přesněji. Při hodnocení postižení fascií a uzlinového postižení je mírně senzitivnější MRI. Cílem je přesně topizovat nádor, zjistit jeho rozsah, eventuální fixaci či prorůstání do okolních struktur (svěrače, rektovaginální septum atd.). Pro další strategii chirurgické léčby je důležité i přesné určení vzdálenosti dolního kaudálního okraje nádoru od anokutálního přechodu, která se přesně stanovuje metodou rigidní rektoskopie (Kekelidze M. et al, 2013).

PET/CT vyšetření je v tomto případě indikováno spíše výjimečně, a to u nemocných před zvažovanou kurativní resekcí metastatického onemocnění, aby se vyloučilo postižení v oblastech, kde operace není plánována. V rámci klasického stagingového vyšetření k vyloučení vzdálené generalizace je dostatečné provedení klasického CT vyšetření s kontrastní látkou. K objasnění nejasných ložisek v játrech může pomoci ultrazvukové vyšetření s kontrastní látkou nebo MRI jater (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. Optimální diagnostický postup u primárního karcinomu rekta a tlustého střeva ukazuje **Tabulka 4**.

Tabulka 4: Optimální diagnostický postup u kolorektálního karcinomu (převzato z Tomášek et al., Onkologie minimum pro praxi, 2015)

Parametr	Metoda - rektum	Metoda - tlusté střevo
lokalizace	per rectum rigidní rektoskopie	kolonoskopie
morfologická verifikace	biopsie	biopsie
stadium cT <ul style="list-style-type: none"> • časná • mírně pokročilá/pokročilá 	TRUS, MRI MRI	kolonoskopie kolonoskopie, CT
infiltrace svěračů	MRI (TRUS, DRE)	
stadium cN	MRI (CT, TRUS)	
stadium M	CT, MRI, (USG) jater, břicha CT hrudníku PET/CT v případě extenzivní extramurální vaskulární invaze	CT, MRI, (USG) jater, břicha CT hrudníku PET/CT v případě extenzivní extramurální vaskulární invaze
u všech pacientů	zhodnocení a stanovení léčebného postupu cestou multidisciplinárního týmu	zhodnocení a stanovení léčebného postupu cestou multidisciplinárního týmu

1.1.5.4 Histopatologické vyšetření

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.

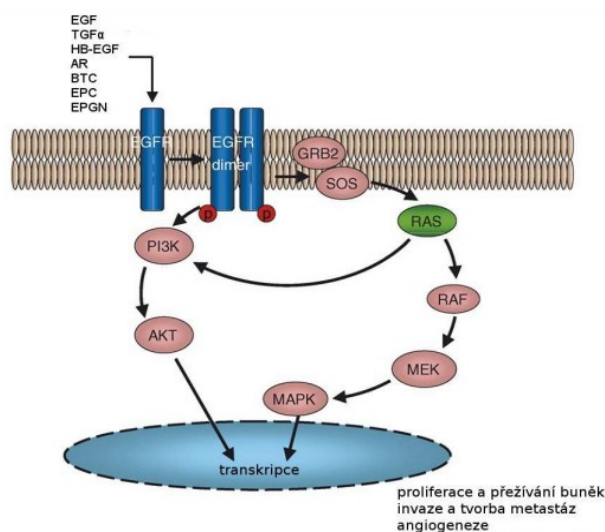
Po odebrání biopsie je vzorek umístěn do nádoby s roztokem formaldehydu nebo jinou kapalinou, aby byla zachována charakteristika vzorku. Patolog nejprve sleduje vzorek bez mikroskopu, což umožňuje zjistit velikost, barvu, konzistenci a jiné makroskopické charakteristiky. Toto hrubé vyhodnocení napomáhá rozhodnout, které části tkáně jsou nejvhodnější pro zkoumání mikroskopem. Poté je vzorek umístěn do formy s horkým parafinem, ten se následně ochladí a vytvoří pevný blok, který tkáň chrání. Parafinový blok se zabudovanou tkání se vloží na mikrotom, který z bloku nakrájí velmi tenké řezy, jež se umístí na skleněná okénka a tkáň je obarvena speciálním barvivem. Barevně zvýrazněné buňky a jejich části lze poté lépe pozorovat pod mikroskopem (Kather J. et al, 2016).

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 epiteliálních buněk sliznice tlustého střeva. Vzácně rozlišujeme několik dalších typů: mucinózní adenokarcinom (s tvorbou extracelulárního hleu), karcinom z prstenčitých buněk, skvamózní karcinom, adenoskvamózní karcinom, nediferencovaný karcinom nebo neuroendokrinní tumor či karcinom. Konvenční adenokarcinom je charakterizován formováním žláz, které je základem pro rozlišení stupně diferenciacie tumoru. U dobře diferencovaného adenokarcinomu (grade 1) je přes 95 % tumoru formováno žlázou. Středně diferencovaný adenokarcinom (grade 2) vykazuje 50-95 % žlázové formace a špatně diferencovaný adenokarcinom (grade 3) je převážně solidní s podílem žlázové formace menším než 50 %. Většina kolorektálních adenokarcinomů (~70 %) jsou morfologicky dle stupně diferenciacie klasifikovány jako středně diferencované. Dobře diferencované (10 %) a špatně diferencované adenokarcinomy (20 %) představují menší podíl (Fleming M. et al, 2012).

1.1.5.5 Molekulární testování

Molekulární testování u kolorektálního karcinomu se stává stále komplexnějším. Základní oblastí je problematika testování signální dráhy začínající receptorem EGFR (též zvaným ErbB1 nebo HER1), která je zásadní s ohledem na dostupnou cílenou léčbu.

Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) je povrchový receptor s tyrosinkinázovou aktivitou, který po navázání příslušného ligandu vede ke stimulaci růstu buněk a útlumu apoptózy. Nejvýznamnější signální kaskádou aktivovanou tímto receptorem je MAP kinázová dráha s aktivací proteinů rodiny RAS (K, N- a H-RAS) a následnou aktivací B-RAF kinázy (Kassouf E. et al, 2016). Aktivační mutace v těchto protoonkogenech vede k autonomní stimulaci signální dráhy nezávislé na povrchovém receptoru, čímž dochází ke stimulaci buněk a k množení, přežívání a dediferenciaci spojené s metastazováním (Douillard J.Y. et al, 2013). Signální dráhu aktivovanou EGFR znázorňuje **Obrázek 6**.



Obrázek 6: Signální dráhy aktivované přes EGFR (převzato z Raponi et al., 2008).

Vazba ligandu vyvolá dimerizaci receptoru a následně je fosforylací prostřednictvím ATP aktivována vnitrobuněčná doména EGFR. K fosforylovaným tyrosinům této domény se váží efektorové proteiny a spouští se tak signální dráhy, které vedou signál do jádra. Nadměrná aktivace cílových genů se podílí na procesech spojených s růstem nádoru.

Mutace v genu *K-RAS* (kodony 12 a 13) jsou identifikovány u 42,4 % pacientů, ostatní *RAS* mutace u 6,9 % pacientů a *B-RAF* mutace u 8,8 % pacientů s kolorektálním karcinomem (Vaughn C.P. et al, 2011).

Zatímco u pacientů s lokalizovaným KRK nebyl prokázán prognostický význam mutací v genu *K-RAS* (Roth A.D. et al, 2010), u pacientů s generalizovaným KRK jsou mutace v exonu 2 spojeny s horší prognózou a zároveň se jedná o prediktivní markery pro odpověď na anti-EGFR terapii (Therkildsen C. et al, 2014).

Aktivační mutace genu *BRAF* se vyskytují u méně než 10 % sporadických CRC, nejčastěji se jedná o mutaci V600 (vedoucí v kodonu 600 k záměně valinu za jinou aminokyselinu) a představuje velmi negativní prognostický faktor jak v časných stádiích, tak u metastazujících KRK (Roth A.D. et al, 2010; Modest D.P. et al, 2016). Tyto mutace se vyskytují častěji u mladších pacientů, u pravostranných a méně diferencovaných tumorů.

Důležitým prognostickým, ale i prediktivním ukazatelem KRK je mikrosatelitová instabilita, která je korelátorem vrozených nebo získaných poruch oprav chybného párování bází v DNA

(mismatch repair; MMR). Mikrosatelitová nestabilita se nachází v 15-20 % sporadických karcinomů střeva (Shibata D. et al, 1994). V případě tumoru s deficitem MMR (somatickou, včetně metylace promotoru MLH1, nebo hereditární) je typický výskyt velkého počtu replikačních chyb. Mikrosatelitová instabilita je definována jako nestabilita více než 30 % mikrosatelitových oblastí (Thibodeau S.N. et al, 1993). U pacientů s lokalizovaným tumorem bez vzdálených metastáz je MSI dobrým prognostickým faktorem a je spojena s delším přežitím (Zaanan A. et al, 2018). Prognostický význam MSI u metastatického KRK je nejasný, prevalence MSI je 3,5 % (tedy významně menší než u lokalizovaných stádií) (Smith C.G. et al, 2013). MSI je u těchto pacientů často spojena se současnou mutací BRAF a tím i s horší prognózou (Venderbosch S. et al, 2014). Na druhou stranu je prokázána dobrá odpověď pacientů s mikrosatelitovou instabilitou na podávání anti-PD1 protilátek, které významně prodlužují přežívání těchto pacientů (Lee V., 2016). Mikrosatelitová instabilita by měla být vyšetřována u všech pacientů s kolorektálním karcinodem.

1.2 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. Klasifikují se na základě veličiny, která je měřena nebo vypočítána, nebo podle měřícího procesu.

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. Zatímco ECD umožňuje studium konformace

chirálních molekul, ROA se zaměřuje na konkrétní vazby jednotlivých funkčních skupin a strukturní detaily.

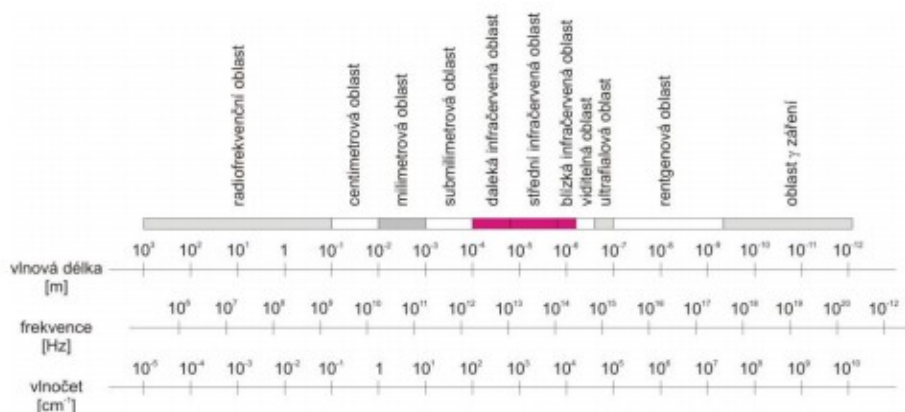
1.2.1 Metody vibrační molekulové spektroskopie

1.2.1.1 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) Spektrum elektromagnetického záření znázorňuje **Obrázek 7**. Infračervené záření tedy navazuje na záření viditelné na jedné straně a na záření mikrovlnné na straně druhé. Pro vymezení infračerveného záření v elektromagnetickém spektru neexistují přesné hranice, byly zvoleny jakési definiční meze, které se občas v různých literárních pramenech nepatrně různí (Kania P., 2007).

Obrázek 7: Spektrum elektromagnetického záření (převzato z Kania P., 2007)



Infračervené záření tedy navazuje na záření viditelné na jedné straně a na záření mikrovlnné na straně druhé. Pro vymezení infračerveného záření v elektromagnetickém spektru neexistují

přesné hranice, byly zvoleny jakési definiční meze, které se občas v různých literárních pramenech nepatrně různí (Kania P., 2007).

Podle vžitě konvence infračervenou spektroskopii z praktických důvodů dělíme podle vlnových délek záření na dalekou (FIR z angl. far infrared), střední (MIR z angl. middle infrared) a blízkou (NIR z angl. near infrared). Pro identifikaci a určování chemické struktury má největší význam střední infračervená oblast ($4000\text{--}200\text{ cm}^{-1}$) (Stuart, B. H., 2005).

Technika infračervené spektroskopie měří pohlcení infračerveného záření o různé vlnové délce analyzovaným materiálem. Můžeme říct, že v podstatě měří rotačně-vibrační přechody molekul. Zpočátku bylo její využití jen ve fyzikálních, fyzikálně chemických a analytických laboratořích, avšak jejím vývojem bylo možné získat informace z hlediska struktury a chemického složení biologických materiálů na molekulární úrovni.

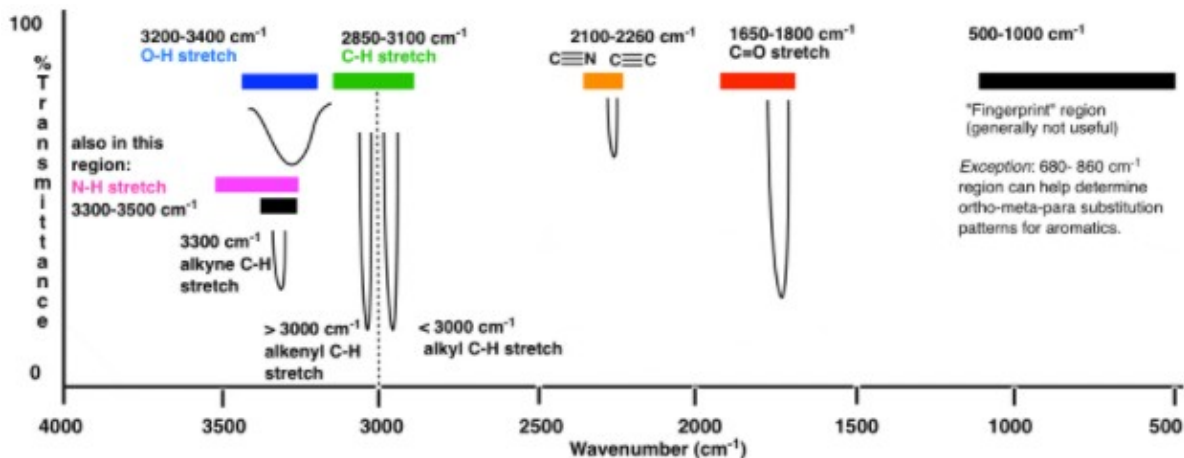
Principem metody je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem. Podmínkou této absorpce je nenulová změna dipólového momentu při přechodu do vyššího vibračního stavu. Energie fotonů infračerveného záření ($1\text{--}60\text{ kJ/mol}$) nestačí na excitaci elektronů, ale dochází při ní ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly, tzn. ke zvětšení amplitudy vibrace nebo zrychlení rotace molekuly (Kania P., 2007).

Analytickým výstupem je infračervené spektrum, ve kterém se jednotlivé chemické vazby projeví charakteristickou vibrací. Infračervené spektrum představuje grafické zobrazení funkční závislosti energie, většinou vyjádřené v procentech transmitance (T) nebo jednotkách absorbance (A) na vlnové délce dopadajícího záření. Transmitance (propustnost) je definována jako poměr intenzity záření, které prošlo vzorkem (I), k intenzitě záření vycházejícího ze zdroje (I_0). Absorbance je definována jako dekadický logaritmus $1/T$. Závislost energie na vlnové délce je logaritmická, proto se používá vlnočty (cm^{-1}), který je definován jako převrácená hodnota vlnové délky (λ , μm), a tedy uvedená závislost energie na vlnočtu bude funkcí lineární (Kania P., 2007).

Absorpční pásy mající vrcholy v intervalu $4000\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ jsou vhodné pro identifikaci funkčních skupin (např. --OH , C=O , N-H , CH_3 a jiné, viz [Obrázek 8](#)). Tato oblast obsahuje charakteristické pásy jednotlivých vazeb, které odpovídají převážně valenčním vibracím. Pásy v oblasti $1500\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ jsou nazývané oblastí „otisku prst“ (fingerprint region). Tato oblast obsahuje pásy odpovídající převážně deformačním vibracím a charakterizuje každou

molekulu jako celek. Pomocí digitalizovaných knihoven infračervených spekter je možno identifikovat neznámou analyzovanou látku.

Obrázek 8: Typické infračervené absorpční pásy různých typů vazeb pro vlnočty 4000-500 cm^{-1}
(převzato z https://www.masterorganicchemistry.com/2016/11/23/quick_analysis_of_ir_spectra/)



Infračervené záření bylo objeveno v roce 1800 astronomem Wiliamem Herschelem, při měření tepelného záření slunce. První studie interakce infračerveného záření se vzorky byly provedeny až začátkem 20. století, v té době se totiž povedlo sestrojít použitelný detektor. První prototyp infračerveného spektrometru k identifikaci chemické struktury látek byl sestrojen ve 30. letech a první komerční spektrometr ho brzy následoval (Barth A., 2007).

Až do 70. let byly spektrometry výhradně disperzní, pracovaly na principu rozkladu a jako monochromátor se využíval hranol nebo mřížka. Neumožňovaly však analýzu silně absorbujících matric, analýza pevných vzorků byla většinou omezena na práškové materiály, které byly měřeny ve formě směsi s halogenidy alkalických kovů nebo metodou kapilární vrstvy, suspenze prášku v lehkém alifatickém oleji mezi okénky z monokrystalů halogenidů alkalických kovů nebo kovů alkalických zemin (Barth A., 2007).

S rozvojem výpočetní techniky v 80. letech 20. století dochází k praktickému rozšíření infračervených spektrometrů s Fourierovou transformací (FTIR spektrometry). Jedná se o přístroje pracující na principu interference spektra, které na rozdíl od disperzních přístrojů měří interferogram modulovaného svazku záření po průchodu vzorkem. Pro jejich zavedení do praxe bylo nutné spojení spektrometru s počítačem, jelikož tato metoda vyžaduje poměrně složité výpočty (Surewicz W.K. et al.).

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).

1.2.1.1.1 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

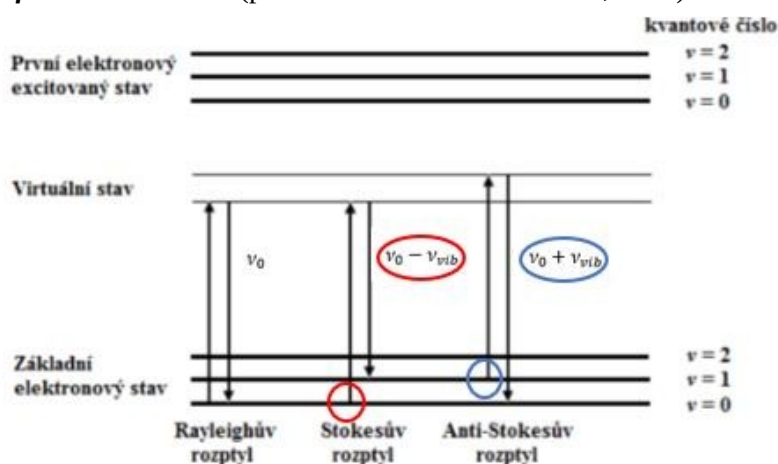
Analýza tkání pomocí FTIR zobrazování vykazuje několik předností ve srovnání s konvenčními histopatologickými metodami. Mezi ty hlavní patří možnost vytvořit obraz bez použití kontrastních barviv, vysoká citlivost a molekulární prostorové rozlišení v řádech několika mikrometrů. Také příprava vzorku a s tím spojené možné změny buněčných struktur tvořených proteiny, nukleovými kyselinami, nebo lipidy jsou minimální (Steiner G., Koch E., 2009). Při měření dopadá na detektor vždy celý svazek záření. Takové uspořádání umožňuje i experimenty, při nichž dochází k velkým energetickým ztrátám, tj. měření silně absorbujících vzorků. Různé studie prokázaly potenciál této metody zaznamenat poměrně přesvědčivě rozdíly mezi normální a nádorovou tkání na základě jejich biochemického složení a chování (Petibois C., Déléris G., 2006).

1.2.1.2 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je jednou z metod vibrační molekulové spektroskopie patřící mezi metody elektromagnetické spektroskopie. Pojmenována je po svém objeviteli, indickém fyzikovi Chandrasekharu Venkatu Ramanovi, který jí experimentálně potvrdil v roce 1928 pomocí rozptylu slunečního záření na molekulách kapalin (Fenn M. B., et al). 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).

Při Ramanově spektroskopii interaguje monochromatický laserový paprsek s molekulami vzorku, čímž dojde k jejich excitaci ze základního elektronového do tzv. virtuálního energetického (nekvantovaného) stavu. Pokud nastane deexcitace do stavu, v němž se molekula nacházela před působením budícího záření, vlnová délka emitovaného záření při deexcitaci je stejná jako vlnová délka excitujícího záření. Tento jev se nazývá elastický neboli Rayleighův rozptyl záření. 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. Při deexcitaci se mohou dopadající fotony vrátit na vyšší excitovanou vibrační hladinu základního elektronového stavu a zároveň emitují záření s nižší energií (větší vlnovou délkou), než bylo záření budící. Svou energií tedy mohou jejím poskytnutím vazebným vibracím ztratit, nastane tzv. Stokesův rozptyl a tyto změny vlnové délky se v Ramanově spektru projeví jako Stokesovy linie. Na druhé straně může nastat případ, kdy se molekuly před excitací nachází na vyšší vibrační hladině základního elektronového stavu a během deexcitace pak dochází k jejich návratu na základní vibrační hladinu základního elektronového stavu za současné emise záření s větší energií a menší vlnovou délkou. Dopadající fotony takto mohou energii z vazebných vibrací odebrat, což odpovídá tzv. anti-Stokesově rozptylu, v Ramanově spektru se tyto změny vlnové délky označují jako anti-Stokesovy linie. Jsou méně intenzivní než Stokesovy linie, jelikož ve stavu excitovaném se nachází menší množství molekul než ve stavu základním. Rozdíl energií dopadajících a rozptýlených fotonů je dán změnou energií molekulárních vibrací (Wilson E. et al, 1955; Crawford A. et al). Jednotlivé typy přechodů molekul do různých stavů ukazuje **Obrázek 9**.

Obrázek 9: Schéma přechodů mezi různými energetickými stavy molekul při excitaci v blízké infračervené oblasti (převzato z Bumbrah G.S. et al, 2016)



Stokesův rozptyl: rozptýlené záření je energeticky chudší oproti dopadajícímu:

$$E = h \cdot \nu - \Omega$$

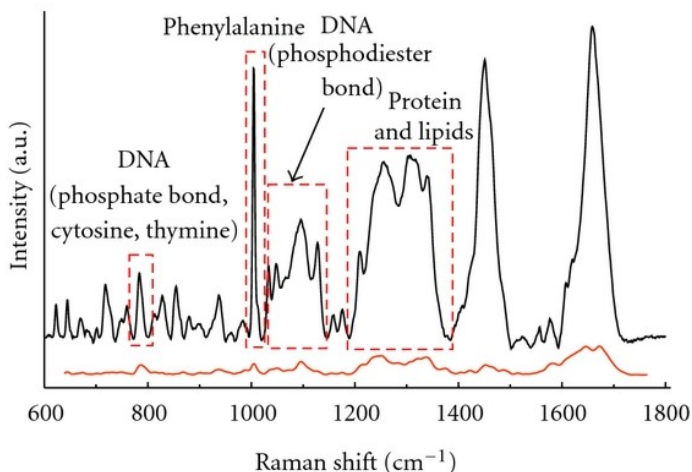
anti-Stokesův rozptyl: rozptýlené záření je energeticky bohatší oproti dopadajícímu:

$$E = h \cdot \nu + \Omega$$

ν_0 = frekvence budícího záření, ν_{vib} = vibrační frekvence, \mathbf{E} = vektor intenzity elektrického pole dopadajícího záření, h = Planckova konstanta, Ω = charakteristický rozdíl

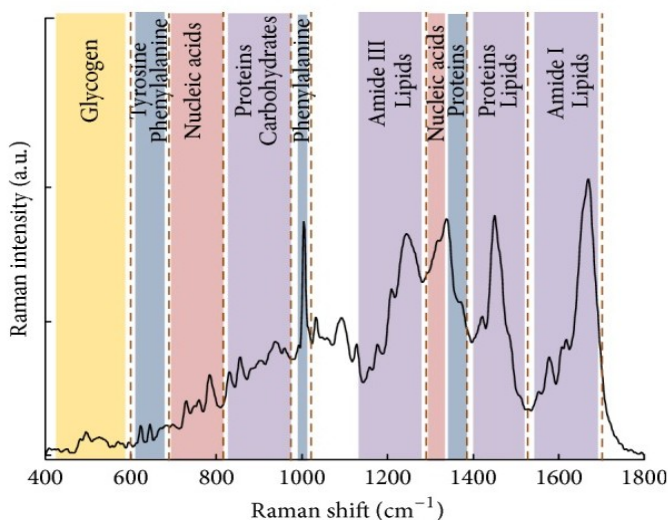
Detekcí těchto rozptýlených fotonů a výsledkem záznamu měření je získáno Ramanovo spektrum, tedy graf zobrazující závislost intenzity Ramanova rozptylu (intenzity záření) u každé vlnové délky. Každý pás specificky charakterizuje molekulární vazbu, polohy jednotlivých pásů dávají informace o charakteru vazeb a druhu vázaných atomů v molekule. Intenzita těchto pásů poskytuje kvantitativní údaj a je úměrná koncentraci dané složky ve vzorku. Výsledné spektrum tedy poskytuje informace o chemických vazbách souvisejících s různými molekulami a funkčními skupinami, které jsou přítomny v buňkách a tkáních. Rozdíl v energiích je způsoben změnami v rotačních a vibračních energiích molekuly. Intenzita Ramanových pásů je v kvantitativní analýze charakterizována jejich výškou nebo plochou (Bumbrah G.S. et al, 2016).

Soubor Ramanových spekter tedy produkuje jakýsi „fingerprint“ reprezentující molekulární vibrace specifické pro jednotlivé chemické vazby v určitých sloučeninách a poskytuje tak informace o biochemickém složení vzorku. 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 $2000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. 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. Příklady Ramanových spekter nádorových buněk ukazují **Obrázky 10** a **11**. Kvůli biologické podstatě vzorků se Ramanovy pásy často překrývají, což znesnadňuje správnou identifikaci jednotlivých složek ve vzorku. Biologické vzorky mají také tendenci vykazovat silnou fluorescenci, jejíž signál může Ramanovy pásy rovněž překrývat (Fenn N.B. et al, 2011).



Obrázek 10: Příklad průměrného Ramanova spektra buňky karcinomu plic (převzato z Fenn N.B. et al., 2011)

Dominantní spektrální pásy (černá linie) korelují s molekulárními vibracemi získaných z Ramanova rozptylu DNA, tuků a proteinů. Osa x představuje Ramanův posun v jednotkách cm^{-1}



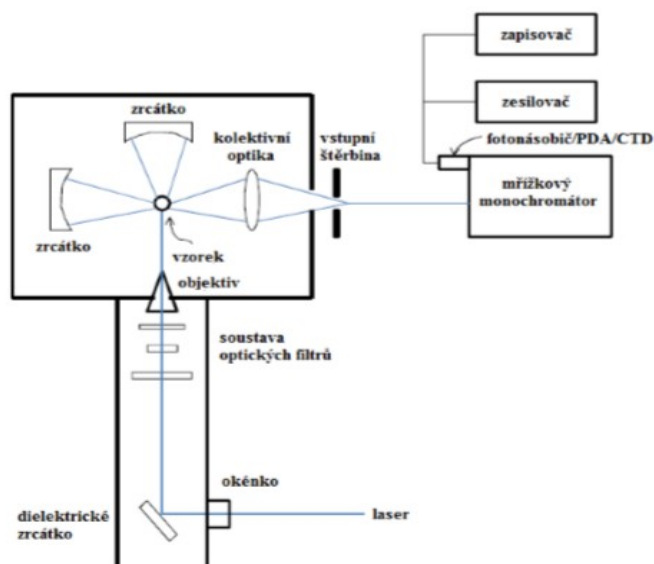
Obrázek 11: Příklad průměrného Ramanova spektra – „fingerprint“ buňky cervikálního karcinomu (převzato z Lyng F.M. et al, 2015)

Hlavní pásy představují glykogen, proteiny, lipidy a nukleové kyseliny

Glycogen
 Proteins
 Nucleic acids
 Amide and lipids

Jako zdroje monochromatického záření v Ramanových spektrometrech dnes výhradně slouží lasery. Jednoduché schéma jeho uspořádání znázorňuje **Obrázek 12**. Monochromatický laserový paprsek prochází okénkem do komory s optickou soustavou, kde je dielektrickým zrcátkem odražen. Dále míří skrz několik optických filtrů a objektiv přímo na vzorek, který je

umístěn ve skleněné nebo křemenné kyvetě. Záření rozptýlené (emitované) vzorkem je prostřednictvím několika zrcátek kolem kyvety nasměrováno na kolektivní optiku, která se nachází zpravidla v pravém úhlu vůči dopadajícímu paprsku a fokusuje jej na vstupní štěrbinu. Po průchodu touto



Obrázek 12: Schéma uspořádání Ramanova spektrometru (převzato z Crawford A. et al., 2017)

štěrbínou putuje dále do dvojitého nebo trojitého mřížkového monochromátoru. Ten společně s různými stínícími filtry odseparuje velmi intenzivní Rayleighovu složku rozptýleného záření od relativně slabé Ramanovy složky. Jako detektory mohou sloužit fotonásobiče, soustavy fotodiod nebo jiné sofistikovanější systémy, kterých úlohou je převod světelného signálu na elektrický (Crawford A. et al, 2017).

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).

Pro biomedicínské aplikace se při měření Ramanových spekter používá laser pracující v blízké infračervené oblasti (NIR), a to převážně laser diodový. NIR laser hlouběji proniká, poskytuje spektra s velmi redukováným pozadím a je řešením problémů s fluorescencí a absorpcí, které by vznikly při ozáření buněk či tkání viditelným (VIS) nebo ultrafialovým (UV) zářením. Velkým pozitivem je fakt, že ani dlouhodobá expozice buněk relativně výkonově silnému NIR laseru neovlivňuje jejich životnost (Shie I., Huser T.R., 2013).

Naměřená Ramanova spektra jednotlivých oblastí vzorku tkáně vykazují často odlišné průběhy a současně každé ze získaných spekter zahrnuje velké množství dat. Následkem je pak jejich poměrně obtížná interpretace. Pro komplexní analýzu výsledků je proto nutné využití pokročilých matematických metod k co nejpresnějšímu popisu signifikantních rozdílů mezi spektry. Jedním ze zájmů současného výzkumu při vývoji instrumentace Ramanovy

spektroskopie je tedy i vývoj vhodných metod ke zpracování dat. Kombinace těchto metod s Ramanovou spektroskopií by tak nabízela rychlou a přesnou klasifikaci a mapování tkání v klinické praxi.

Metoda Ramanovy spektroskopie se stala efektivním nástrojem pro zkoumání toxikologických účinků různých materiálů, buněčné diferenciaci, buněčné proliferace, biokompatibility, farmakologické účinnosti a mechanismů buněčné smrti. Klinické využití Ramanovy spektroskopie se v současné době nachází ve vývojových stádiích, ale v dalších letech by mohla být implementována jako komplementární nebo alternativní metoda k patologickým a klinickým testům.

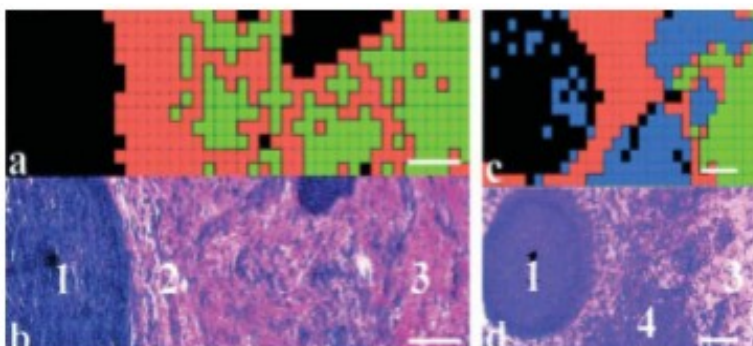
Pro maximální redukci nevýhod Ramanovy spektroskopie, které souvisejí se slabými signály, obvykle poměrně silnou fluorescencí a omezenou penetrační hloubkou, byly vyvinuty pokročilé metody Ramanovy spektroskopie, mezi které patří rezonanční Ramanova spektroskopie (RRS), koherentní anti-Stokesova Ramanova spektroskopie (CARS) a stimulovaná Ramanova spektroskopie (SRS).

1.2.1.2.1 Ramanova mikrospektroskopie

V Ramanově mikrospektroskopii se jako nejefektivnější zdroj záření uplatnil laser pracující v červené viditelné až infračervené oblasti spektra, protože při záření o vlnových délkách z modré a zelené viditelné oblasti spektra dochází často k fluorescenci. Také bylo prokázáno, že záření ze spektrální oblasti pod 600 nm obvykle poškozuje buňky (Puppels G. J. et al, 1991), protože je výrazně absorbováno různými buněčnými složkami jako jsou proteiny, aminokyseliny, nukleové kyseliny a další biomolekuly, což vede k jejich rozkladu nebo k vytváření reaktivních molekul kyslíku.

Při mapování pomocí Ramanovy mikrospektroskopie je hlavní podmínkou pro klinické využití přijatelná skenovací doba. Dvou-dimenzionální Ramanovy spektrální mapy se vytváří skenováním po jednotlivých bodech ve vzorku (Esmonde-White F. W. L., Morris M. D., 2010). Mapování se realizuje pohybem sondy přes vzorek, kterému se říká rastrování. Při tomto pohybu je do každého bodu fokusován laser, čímž jsou postupně získána jednotlivá

spektra v definovaném rozsahu a následně dochází k jejich převedení do dvou-dimenzionální



Obrázek 13: Srovnání Ramanových map

mapy. Každý pixel mapy tedy koreluje s x-y souřadnicí daného vzorku. Příklad této mapy je prezentován na **Obrázku 13**, kde dochází ke srovnání obrazů Ramanových map z části tkáně s obrazy získanými mikroskopickým vyšetřením ze stejné části tkáně obarvené hematoxylin-eozinem. Na základě těchto obrazů byla jednoznačně rozlišena oblast bazocelulárního karcinomu (BCC) od oblasti normální tkáně (Smith Z.J. et al., 2011).

Přestože princip metody mapování bod po bodu umožňuje získat mapy o relativně vysokém rozlišení, jeho nevýhodou je dlouhá skenovací doba, někdy až několika hodinová. Využití této techniky v klinické analýze je tedy nevhodné. Mapování Ramanovou mikrospektroskopií nachází své uplatnění v analýzách bioptovaných vzorků *ex vivo*, vykazuje ale i potenciál pro mapování tkání *in vivo*, kdy je nutné výrazně urychlit dobu skenování. Budoucí klinické využití Ramanovy mikrospektroskopie pro zkoumání tkání vyžaduje vývoj v třídimenzionálním mapování neboli hloubkové tkáňové analýze (Esmonde-White F. W. L., Morris M. D., 2010).

1.2.1.2 Sondy v Ramanově mikrospektroskopii

Inzercí speciální Ramanovy sondy do endoskopu se nabízejí jedinečné podmínky pro vyšetřování touto metodou *in vivo*. Sonda s optickými vlákny by měla být flexibilní a vykazovat vhodné optické vlastnosti, její výroba by měla být zároveň levná. Vývoj takové optické Ramanovy sondy pro endoskopickou aplikaci je obtížný, zejména kvůli spektrálním interferencím v oblasti $2000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, které vznikají z důvodu využívání křemenných optických vláken (Nijssen A. et al, 2009). Signál, který poskytují křemenná vlákna v oblasti $1300\text{--}700\text{ cm}^{-1}$, totiž překrývá slabé Ramanovy signály vzorku. Navíc komerčně dostupné sondy mají většinou velký průměr. Proto jsou v současnosti vyvíjeny sondy o průměru maximálně 2 mm, které poskytují vysoký poměr signálu k šumu (SNR) a zároveň umožňují rychlou analýzu (Moz J. T. et al, 2004).

Optická Ramanova sonda je zpravidla založena na principu konfokální optiky, má tedy větší průměr, ale efektivně zamezuje vzniku pozadí ve formě rozptylu a fluorescence, jež jsou generovány optickými vlákny (Matousek P., Stone N., 2009). Všechny optické komponenty jako čočky a filtry jsou v Ramanově sondě vestavěny do její špičky ve vysoce kompaktní konstrukci. Tyto sondy jsou vyvíjeny s cílem co nejvíc snížit průměr sondy se zachováním vysokého SNR (Huang Z. et al, 2009).

Další možností, která umožňuje vyhnout se omezení spojeného s křemennými vlákny, je Ramanova spektroskopie ve vysokých vlnočtech (HWNRS), která pracuje ve spektrální

oblasti 4000–2500 cm^{-1} . Tato oblast již není ovlivněna signálem pozadí a fluorescencí, které zapříčiňují křemenná vlákna. Při vývoji jednodušších optických Ramanových sond je to jistě výhodou, protože není potřeba využívat složité filtry. Při HWNRS mohou být uplatněny i komerční endoskopické sondy. Několik studií ukázalo úspěšné využití HWNRS při detekci různých typů nádorových onemocnění (Lin K. et al, 2017).

1.2.1.2.3 Rezonanční Ramanova spektroskopie

Rezonanční Ramanova spektroskopie (RRS) je metoda, která jako možnost zesílení Ramanova signálu využívá výběr excitační vlnové délky pro elektronovou rezonanci dané molekuly. Pomocí ní je možné zesílit Ramanův signál až o 5 řádů, což je ale obvykle spojeno se silnou fluorescencí. Vyžaduje tak využití velmi rychlých optických spínačů k aplikaci krátkodobých pulzů, odečet pozadí a prostorový offset Ramanova rozptylu daný vícenásobnou excitací. Významnou technikou značně redukující toto fluorescenční pozadí je Ramanova spektroskopie, která pracuje na základě nízkoenergetického pulzu několikanásobně opakovaného vysokou rychlostí, která vede k možnosti detekce i rezonančních Ramanových signálů biologických vzorků (Knorr F. et al., 2010).

1.2.1.2.4 Koherentní anti-Stokesova Ramanova spektroskopie

Zesílit Ramanův signál je možné i metodou koherentní anti-Stokesovy Ramanovy spektroskopie (CARS). Její signál je generován fokusací dvou laserových paprsků na vzorek, kdy první paprsek způsobí Stokesův posun v Ramanově rozptylu, zatímco druhý paprsek je naladěn na stejnou frekvenci jako specifický Ramanův pás (Zumbusch A. et al, 1999). Dochází tak k nelineární integraci těchto dvou paprsků, které následně simultánně excitují charakteristické vibrace a zesilují tak odpovídající anti-Stokesův signál. Tento výsledný CARS signál je více než tisíckrát silnější než nezesílený Ramanův signál. Pomocí velmi krátké expoziční doby vzorku potřebné k detekci signálu se jeví tato metoda jako velmi slibná při klinické aplikaci a zobrazování živých buněk a tkání.

1.2.1.2.5 Stimulovaná Ramanova spektroskopie

Pro metodu stimulované Ramanovy spektroskopie (SRS) je charakteristické vytváření Ramanova signálu koherentní interakcí budícího a Stokesova paprsku, kdy rozdíl mezi frekvencemi těchto paprsků odpovídá frekvenci Ramanovy vibrace. Ve výsledku se při koherentní excitaci molekulárních vibrací intenzita budícího paprsku snižuje, zatímco u Stokesova paprsku se zvyšuje, což je způsobeno stimulovanou emisí Ramanových

rozptýlených fotonů. Tyto změny jsou sice ve srovnání s původními laserovými intenzitami velmi malé, takto vzniklé fotony lze ale s využitím vysokofrekvenční modulační techniky přímo detekovat (Freudiger C.W. et al, 2008). Vzhledem k velmi malému vlivu pozadí způsobeného rezonancí, na rozdíl od CARS, představuje SRS nadějnou možnost využití pro zobrazování *in vivo*.

1.2.1.2.6 Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie

Na základě mimořádně velkého zesílení Ramanova signálu lze pomocí povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS) dosáhnout lepších výsledků. Signál je zesílen prostřednictvím kovových nanočástic připravených ze zlata, stříbra nebo mědi, na jejichž povrchu vzniká plasmonová rezonance (Campion A., Kambhampati P., 1998). Molekuly vzorku adsorbované na povrchu těchto částic interagují s elektromagnetickým zářením a poskytují o 10-15 řádů silnější Ramanův signál, a to pomocí vzniku zesíleného elektrického pole kolem částic a mechanismu přenosu náboje. Průměr nanočástic se pohybuje v řádech desítek nanometrů a vlnová délka elektromagnetického záření musí vyvolat povrchově lokalizovanou plasmonovou rezonanci. Na morfologii a agregaci nanočástic závisí zesílení Ramanova signálu. SERS může být i kombinována například s fluorescenční spektroskopií, což umožňuje analýzu lidské virové RNA (Sha M.Y. et al, 2007), byly publikovány i studie analýzy DNA pomocí SERS (Green M. et al, 2006). Velkým pokrokem je však vývoj SERS s použitím specifických sekvenčně krátkých oligonukleotidů, která dokáže detekovat BRCA-1 gen u karcinomu prsu (Pal A. et al, 2006). Jako vysoce sofistikovaná metoda umožňuje SERS diagnostiku nádorového onemocnění na molekulární úrovni (Guarrotxena N., Bazan G. C., 2011). Její vývoj pro aplikace v analýze malignit může spolu s rychle se rozvíjejícími nanotechnologiemi znamenat v budoucnu velký průlom v diagnostice nádorových onemocnění.

1.2.1.2.7 Potenciální klinické aplikace

Ramanova spektroskopie s využitím konfokální optiky naměří spektra z různých oblastí jedné buňky, kdy každé spektrum reflektuje lokální buněčnou charakteristiku. Spektrum buněčného jádra vykazuje především pásy DNA a proteinů, zatímco u cytoplazmy lze sledovat signály proteinů a různých metabolitů jako cukrů a lipidů (Puppels G. J. et al, 1990). Touto metodou je také možné získat spektra izolovaných chromozomů.

Ramanovu spektroskopii lze využít pro studii buněk imunitního systému a jejich chování při setkání s cizorodým agens (Van Manen H. J. et al, 2005), zkoumání mikrobiálních kultur

(Choo-Smith L.P et al, 2001) či stanovení rozdílů fyziologických a nádorových buněk (Chen K. et al, 2016). Běžné histopatologické vyšetření poskytuje především informace o struktuře buněk nádorové tkáně, zatímco Ramanova spektroskopie sleduje chemické změny, které karcinogenezi doprovází. Pomocí Ramanovy spektroskopie byla zkoumána karcinogeneze mozkového gliomu, kde byly pozorovány kvantitativní změny mezi druhým a třetím stádiem (Mizuno A. et al, 1994). Další studie například demonstrují, že Ramanova spektroskopie může spolehlivě diferencovat normální, benigní a maligní tkáň prsu (Chowdary M.V. et al, 2009).

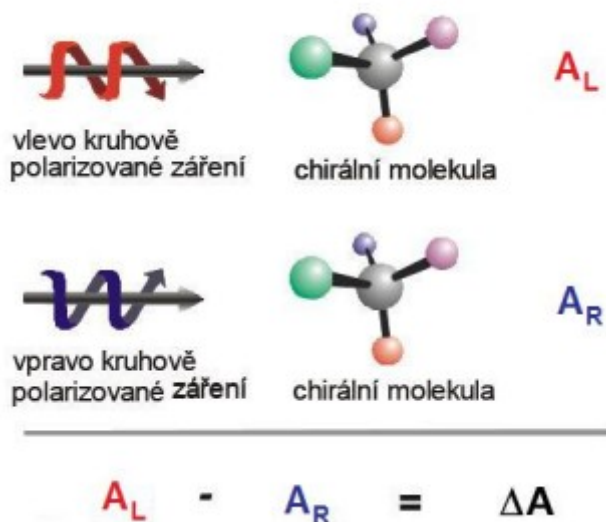
1.2.2 Metody chiroptické spektroskopie

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 spektroskopií ECD (elektronový cirkulární dichroismus) a ROA (Ramanova optická aktivita).

1.2.2.1 Elektronový cirkulární dichroismus

Cirkulárně dichroické metody představují chirální varianty konvenční absorpční spektroskopie. Podle spektrálního oboru používaného záření rozlišujeme elektronový (ECD) a vibrační cirkulární dichroismus (VCD). Zatímco spektroskopie ECD pracuje v ultrafialové a viditelné (UV-VIS) oblasti záření, kdy jsou sledovány přechody mezi elektronovými hladinami molekuly, metoda VCD pracuje v infračervené (IČ) oblasti záření a lokálně sleduje vibrační přechody v molekule (Urbanová M., Maloň P., 2012).

Podstatou cirkulárního dichroismu je rozdílná interakce měřené chirální molekuly s levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaným zářením, jak znázorňuje **Obrázek 14**.



Obrázek 14: Podstata cirkulárního dichroismu – odlišná míra interakce chirální molekuly s levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaným zářením

(převzato ze Setnička V. et al., 2010)

Výsledný signál pro daný vlnčet můžeme popsat jako rozdíl absorbancí (ΔA) levotočivě (A_L) a pravotočivě (A_R) kruhově polarizovaného záření chirální molekulou:

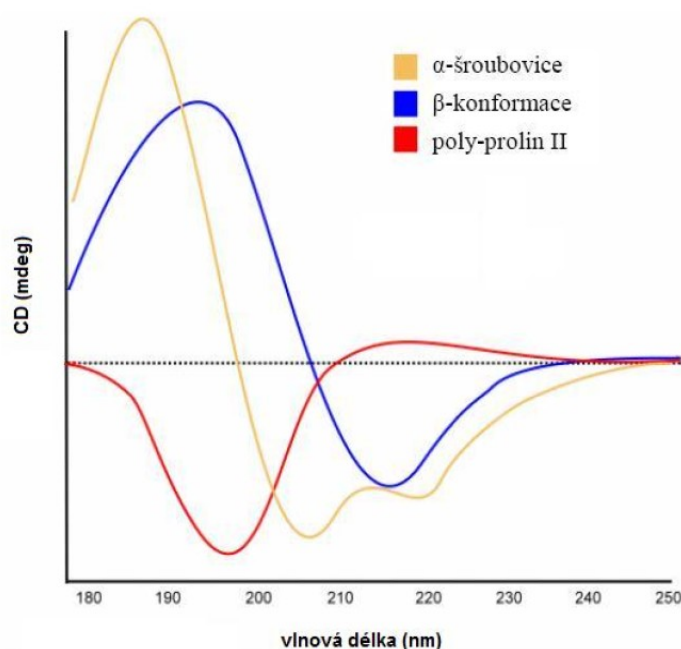
$$\Delta A = A_L - A_R = (\epsilon_L - \epsilon_R) cl$$

kde ϵ_L , ϵ_R jsou molární absorpční koeficienty, c je látková koncentrace a l tloušťka absorbující vrstvy. Hodnoty ΔA lze teoreticky získat postupným změřením absorpčních spekter vzorku při levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaným dopadajícím záření, kdy získané hodnoty A_L a A_R jsou odečteny, čímž získáme výsledné diferenční spektrum ΔA . Tato experimentální metodologie je využívána při měření spekter ROA. V případě ECD a VCD vzniká problém s velmi malými hodnotami rozdílů absorbancí ΔA , které činí řádově 10^{-3} - 10^{-5} hodnoty příslušné absorbance. Dosud neexistují dostatečně stabilní spektrometry, které by dokázaly tyto nízké rozdíly absorbancí spolehlivě zaznamenat. Proto se absorpce levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaného záření měří synchronně, a to pomocí fotoelastického modulátoru, který je nejpodstatnějším prvkem spektrometru pro měření CD. Piezoelektricky řízený mechanický tlak je regulován optickým prvkem modulátoru, který z lineárně polarizovaného záření vytváří střídavě vlevo a vpravo kruhově polarizované záření s frekvencí několika desítek kilohertzů (Setnička V., Urbanová M., 2010).

Zdroj záření představuje xenonová lampa pracující ve spektrální oblasti 175-900 nm. Rozklad záření na záření monochromatické a jeho lineární polarizaci zajišťují dva hranolové monochromátory, které musí být vůči sobě vhodně orientovány. K zesílení signálu slouží citlivý lock-in zesilovač, který pracuje synchronně s frekvencí fotoelastického modulátoru. Záření procházející vzorkem dopadá na fotonásobič, který slouží jako detektor. Dochází k elektronickému zpracování signálu, čímž je získáno spektrum ECD. Vzorky jsou měřeny

především ve formě roztoků, které musí být dokonale homogenní, aby nevznikaly falešné ECD signály způsobené polarizačními efekty (Setnička V., Urbanová M., 2010).

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). Jedná se o $n-\pi^*$ přechod, který je sledován v oblasti 210-230 nm, a $\pi-\pi^*$ přechod, jenž je zaznamenáván v oblasti 185-200 nm. Právě tyto spektrální oblasti odrážejí základní typy sekundárních struktur, které zahrnuje pravotočivá α -helikální struktura, β -konformace a lokálně uspořádaná levotočivá helikální struktura označovaná jako poly-prolin II (PPII). Charakteristické průběhy spekter ECD pro uvedené sekundární struktury ukazuje **Obrázek 15**.



Obrázek 15: Spektra ECD charakteristická pro jednotlivé konformace proteinů a peptidů

(převzato ze Setnička V. et al., 2010)

Zatímco jednotlivé sekundární struktury proteinů a peptidů ovlivňují absorpční pásy charakteristické pro přechody peptidové vazby velmi málo, spektra ECD jsou velmi citlivá a charakteristicky reflektují danou sekundární strukturu. Biologická aktivita proteinů a peptidů přirozeně souvisí s příslušnými sekundárními strukturami a jejich změnami, které korelují právě s tvarem spekter ECD (Berova N. et al, 2000).

1.2.2.2 Ramanova optická aktivita

Ramanova optická aktivita je metodou chiroptické spektroskopie, u které je po interakci vzorku s dopadajícím zářením a následném vzniku Ramanova rozptýleného záření měřen

$$\Delta = \frac{I^R - I^L}{I^R + I^L}$$

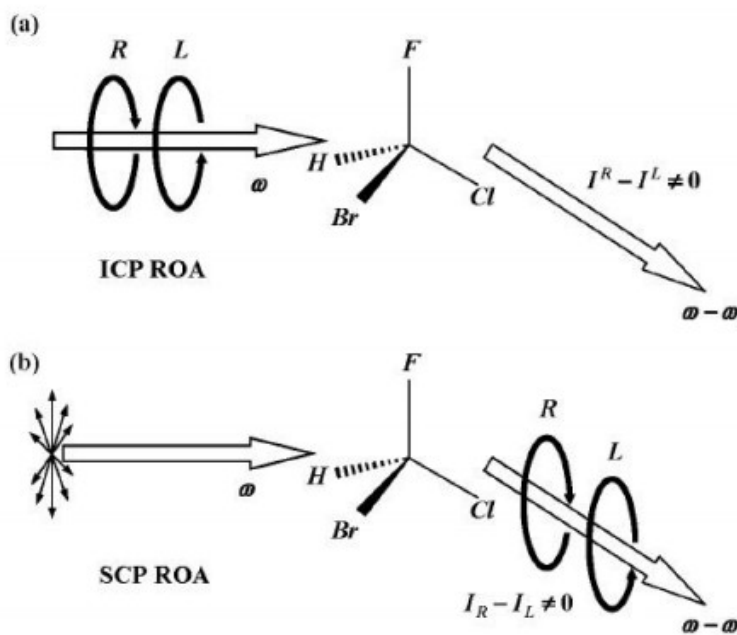
rozdíl pro pravotočivě a levotočivě kruhově polarizované záření (Baumruk V.). Jako výsledek je získáno zdrojové Ramanovo spektrum a vlastní ROA spektrum. Podíl ROA signálu k Ramanovu signálu vyjadřuje bezrozměrná veličina zvaná diferenční cirkulární intenzita Δ , která je definována jako

kde I^R , I^L jsou intenzity rozptylu dopadajícího pravotočivě a levotočivě kruhově polarizovaného záření^{64,65}. Intenzita ROA signálů nabývá velmi nízkých hodnot, jedná se řádově maximálně o 10^{-3} hodnoty intenzity rozptylu. Principem ROA, podobně jako VCD, 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.

ROA lze měřit v různých experimentálních uspořádáních. Prvním volitelným parametrem je geometrie rozptylu, přičemž dnes je nejčastěji využíván tzv. zpětný rozptyl (180°), protože tato geometrie poskytuje nejpříznivější poměr ROA k Ramanovu signálu (Kopecký V., Baumruk V., 2011). Zpočátku byla měření ROA prováděna v geometrii pravouhlé (90°).

Experimentální uspořádání můžeme rozdělit i podle modulačního schématu, tedy způsobu měření ROA. Při uspořádání založeném na modulaci polarizace dopadajícího záření (ICP) je buzen Ramanův rozptyl pravotočivě a levotočivě kruhově polarizovaným zářením, které je modulováno pomocí elektrooptického modulátoru (Kopecký V., Baumruk V., 2011). Schéma tohoto uspořádání je znázorněno na [Obrázku 16a](#). Ve variantě ICP se měří buď totální rozptyl, kdy je experiment realizován v geometrii 180° , nebo jeho polarizovaná, respektive depolarizovaná složka za využití 90° geometrie.

U další možnosti experimentálního uspořádání, názorně zobrazeného na [Obrázku 16b](#), je zaznamenávána intenzita pravotočivě a levotočivě kruhově polarizované složky v rozptýleném záření (SCP) (Baumruk V.). V tomto případě jsou intenzity rozptýleného záření I^R a I^L měřeny současně. Hlavní výhodou varianty SCP oproti ICP je v tom, že jsou spektra ROA zbavena šumu. Ten je dán několika náhodnými ději, zejména přítomností prachových částic ve vzorku, fluktuace hustoty či kolísání výkonu laseru (Baumruk V.).



Obrázek 16: Experimentální uspořádání ROA pro ICP (a) a SCP (b)

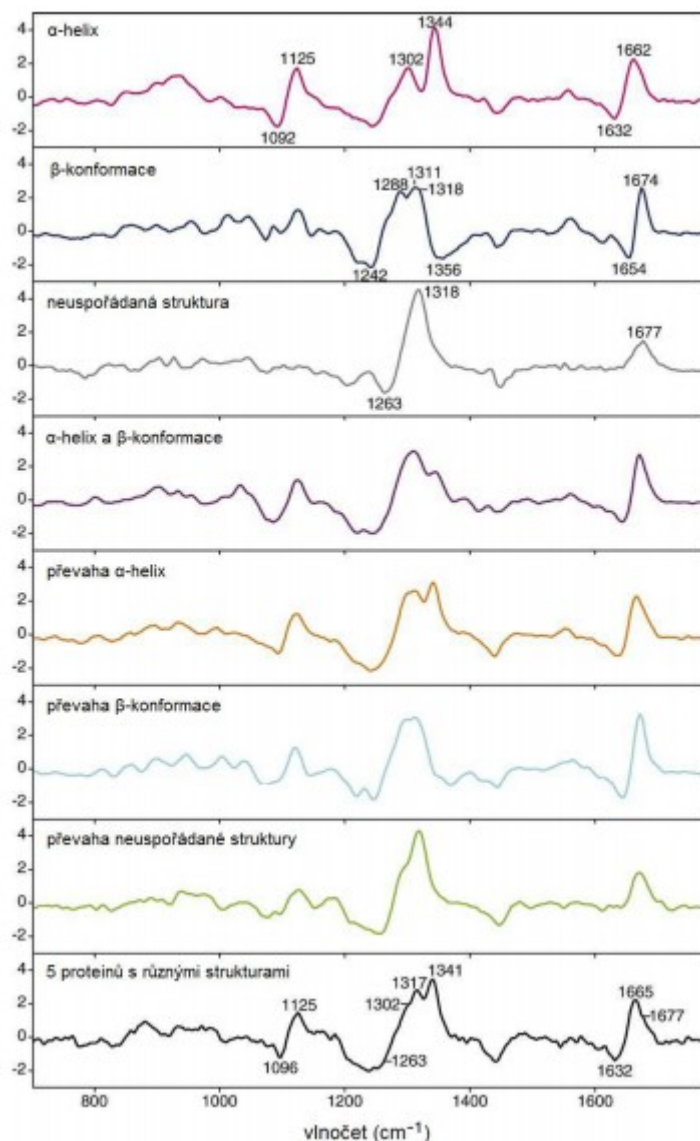
(převzato z Baumruk V.)

Spektrometry pro měření ROA mají několik společných komponent, do kterých patří budící pevnolátkový laser, zobrazovací spektrograf a chlazený CCD detektor. V uspořádání ICP se navíc nachází v excitační části elektrooptický modulátor, který poskytuje při průchodu laserem pravotočivě a levotočivě kruhově polarizované záření. Pro variantu SCP je důležitá přítomnost polarizačního děliče v detekční části, který dokáže oddělit pravotočivě a levotočivě kruhově polarizované složky v rozptýleném záření, jež jsou dále vedeny pomocí vláknové optiky do spektrografu a zobrazeny na CCD detektoru. Jejich následným odečtením je získáno spektrum ROA (Kopecký V., Baumruk V., 2011).

I metoda ROA se nabízí jako slibný nástroj pro zkoumání struktury a konformace proteinů a peptidů (Barron L.D. et al, 2007). Tyto látky vykazují na pásy bohatá spektra ROA, čímž je možné získat informace o sekundární i terciární struktuře peptidové páteře, konformaci postranních řetězců nebo jednotlivých strukturních částech přítomných v rozvinutém stavu. Nejvýraznější ROA pásy vznikají na základě vibračních souřadnic nejpevnějších chirálních částí struktury, které tvoří především peptidová páteř, zatímco slabší signály většinou pochází z postranních řetězců aminokyselin (Barron L.D. et al, 2000). Ve spektrech ROA dominují pásy ve třech oblastech. V první oblasti $\sim 870\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ jsou pásy dány valenční vibrací vazeb $\text{C}\alpha\text{--C}$, $\text{C}\alpha\text{--C}\beta$ a $\text{C}\alpha\text{--N}$. V případě druhé oblasti $\sim 1230\text{--}1310\text{ cm}^{-1}$ se projevuje rovinná deformační vibrace N--H spřažená s valenční vibrací $\text{C}\alpha\text{--N}$, přičemž tato oblast je označována

jako amid III. Třetí oblast $\sim 1630\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ zvaná amid I zastupuje pásy vznikajícími na základě valenční vibrace skupiny C=O peptidové vazby. Právě v těchto oblastech odráží tvar a poloha pásů charakteristicky danou sekundární strukturu (Al-Karadaghi S. et al, 2000).

Na **Obrázku 17** jsou prezentovány charakteristické průběhy spekter ROA pro základní sekundární struktury proteinů a peptidů a jejich kombinace.



Obrázek 17: Spektra ROA charakteristická pro α -helix a β -konformaci proteinů

(převzato ze Setnička V. et al., 2010)

Struktura α -helix se projevuje zejména v oblasti amidu I, kde tvoří v ROA spektru dublet s centrem $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$, který je složen z negativního pásu při nižším vlnočtu a pozitivního pásu při vyšším vlnočtu (Barron L.D. et al, 2000). U α -helikálních polypeptidů se často vyskytuje i dublet s centrem $\sim 1103\text{ cm}^{-1}$, který je tvořený negativním pásem u nižšího vlnočtu a pozitivním pásem při vyšším vlnočtu. Kladné pásy v oblasti $\sim 870\text{--}950\text{ cm}^{-1}$ odpovídají rovněž α -helikální struktuře (Zhu F. et al, 2005). V ROA spektrech albuminu, který představuje α -

helikální strukturu, lze navíc pozorovat pozitivní pásy v oblasti amidu III, které jsou lokalizovány v mezích $\sim 1340\text{--}1345\text{ cm}^{-1}$ a $\sim 1297\text{--}1312\text{ cm}^{-1}$. Spektra ROA v případě β -konformace nevykazují takovou pestrost. Tato struktura se projevuje především negativními pásy v oblasti $\sim 1235\text{--}1248\text{ cm}^{-1}$, některé proteiny obsahující β -konformaci poskytují navíc negativní pás $\sim 1220\text{ cm}^{-1}$. Pro β -konformaci proteinů lze podobně jako u α -helikální struktury pozorovat dublet v oblasti amidu I.

ROA a VCD mohou zkoumat všechny typy chirálních látek, protože spektrální projevy u těchto dvou metod jsou dány přechody mezi vibračními hladinami molekul (Setnička V., 2010). U ROA je však možné měřit spektra ve střední IČ oblasti až přibližně ke 100 cm^{-1} , zatímco spektra VCD nelze pod 600 cm^{-1} běžně zaznamenávat. ROA dále vykazuje obrovskou výhodu ve schopnosti měřit spektra vodných roztoků. Voda silně absorbuje infračervené záření a komplikuje měření spekter VCD v několika spektrálních oblastech, na druhé straně poskytuje velmi slabý Ramanův rozptyl a může být v ROA používána jako běžné rozpouštědlo (Baumruk V.). Při měření spekter ROA jsou ve srovnání s VCD potřebné koncentrace vzorku menší. Všechny tyto výhody ROA jsou velmi důležité v rozboru biologicky významných látek, proto může tato metoda hrát v budoucnu velkou roli v klinických analýzách.

1.3 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).

PCA transformuje data do podprostoru, ve kterém je většina variačních modů zachycena jako lineární kombinace původního vstupu (Jolliffe I.A., Cadima J., 2016). LDA je přímočaré klasifikační schéma, které je více než na redukci rozměrnosti dat založeno na tom, jak se data liší a cílí k efektivní selekci lineární kombinace vstupu, který nejlépe diskriminuje klasifikaci každého vzorku ke korespondujícímu označení (např. karcinom/zdravá kontrola) (Balakrishnama S., Ganapathiraju S., 1998).

Všechna spektra vzorků krevní plazmy byla po úpravě analyzována metodou hlavních komponent (PCA) v programu The Unscrambler X, verze 10.1 (Camo, Norsko), kdy bylo využito procedury cross validace a algoritmu NIPALS k výpočtu tří hlavních komponent. Výsledky PCA byly vyjádřeny prostřednictvím grafů skóre, které umožňují sledovat strukturu ve spektrálních datech a vzorcích. K vyhodnocení dat pomocí lineární diskriminační analýzy (LDA) na základě vybraných spektrálních pásů byl využit program XLStat (Win), verze 2009 (Addinsoft, Francie). Tato metoda poskytla klasifikaci vzorků krevní plazmy do skupin pacientů a kontrolních jedinců. Výsledky byly vyjádřeny ve formě grafu a konfuzní matice (označovaná též jako kontingenční tabulka). Tato matice umožňuje přehledně pozorovat číselné výsledky statistického vyhodnocení, kdy obsahuje informace o počtu vzorků, které byly přiřazeny správně či chybně do skupin, do nichž byly predikovány před vlastním vyhodnocením LDA, a dále informace o procentuálním správném přiřazení jednotlivých vzorků. Metoda LDA byla také aplikována na široké spektrální oblasti využitím spojení s metodou PCA. Výpočet tří hlavních komponent a jejich následné vyhodnocení pomocí LDA bylo provedeno v programu The Unscrambler X. Výsledky jsou opět vyobrazeny v podobě konfuzní matice. Ke klasifikaci vzorků byla také využita metoda podpůrných vektorů (SVM). Spektra vzorků krevní plazmy byla touto metodou analyzována v programu The Unscrambler X. K vyhodnocení byl nastaven typ klasifikace C-SVC s faktorem penalizace C o hodnotě 1 a Kernelův typ algoritmu jako lineární, tedy bez jádrové transformace. Výsledky jsou vyjádřeny pomocí konfuzní matice.

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 časné 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 stádia 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

3.1.1 Výběr pacientů a kontrol

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 stádia 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. Charakteristika pacientů včetně výsledků histopatologického vyšetření a klinického nebo patologického stagingu jsou shrnuty v *Tabulce 5* a *6*.

Ze 30 pacientů bylo 20 pacientů mužského pohlaví. Co se týče lokalizace tumoru, většina pacientů měla primární tumor v rektosigmatu (n=8; 27 %), 7 pacientů v sigmatu (23 %), 6 v colon transversum (20 %), 4 pacienti měli tumor v colon ascendens (13 %), 3 pacienti v céku (10 %) a tumor rekta a v colon descendens byl nalezen u 1 pacienta (3 %). U všech pacientů byl verifikován adenokarcinom různého stupně diferenciacie, u 2 pacientů byl diagnostikován dobře diferencovaný adenokarcinom (7 %), u 21 pacientů středně diferencovaný adenokarcinom (70 %) a u 7 pacientů středně diferencovaný adenokarcinom (23 %).

Stran klinického stádia podle UICC (International Union Against Cancer) bylo rozdělení pacientů následující: stádium I (n= 2; 7 %), stádium II (n=9; 30 %), stádium III (n=6; 20 %) a stádium IV (n=13; 43 %). Následně byla provedena ještě separace 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

tvorili pacienti v pokročilejším klinickém stádiu (stádium III+IV; n=19), u kterých bylo zjištěno metastázování do regionálních lymfatických uzlin, nebo systémová generalizace.

Tabulka 5: Přehled charakteristiky pacientů s kolorektálním karcinomem

Číslo pacienta	Věk (roky)	Pohlaví	Lokalizace tumoru (colon)	Histologie	T	N	M	Stádium
1	63	muž	sigmoideum	adenokarcinom grade 2	pT2	pN1a	M0	IIIA
2	77	muž	rectosigmoideum	adenokarcinom grade 2	pT3	pN0	M0	IIA
3	72	muž	sigmoideum	adenokarcinom grade 2	pT4b	pN2a	M0	IIIC
4	60	muž	rectosigmoideum	adenokarcinom grade 2	pT4a	pN1c	M1	IV
5	63	muž	rectosigmoideum	adenokarcinom grade 2	pT3	pN0	M0	IIA
6	37	muž	rectosigmoideum	adenokarcinom grade 3	pT3	pN0	M0	IIA
7	47	muž	sigmoideum	adenokarcinom grade 1	pT3	pN0	M0	IIA
8	80	žena	sigmoideum	adenokarcinom grade 2	pT3	pN0	M0	IIA
9	64	žena	ascendens	adenokarcinom grade 2	pT3	pN0	M0	IIA
10	62	muž	transversum	adenokarcinom grade 3	pT3	pN0	M0	IIA
11	66	žena	sigmoideum	adenokarcinom grade 2	pT4b	pN2a	M1	IV
12	52	žena	caecum	adenokarcinom grade 2	pT3	pN1b	M0	IIIB
13	67	muž	caecum	adenokarcinom grade 3	pT3	pN1a	M0	IIIB
14	55	muž	sigmoideum	adenokarcinom grade 2	pT1	pN0	M0	I
15	77	žena	caecum	adenokarcinom grade 2	pT2	pN0	M0	I
16	86	žena	ascendens	adenokarcinom grade 3	pT3	pN0	M0	IIA
17	66	muž	ascendens	adenokarcinom grade 2	pT3	pN1b	M0	IIIB
18	75	muž	transversum	adenokarcinom grade 2	pT3	pN0	M0	IIA
19	49	žena	transversum	adenokarcinom grade 2	pT3	pN0	M0	IIA
20	46	muž	transversum	adenokarcinom grade 3	T4	N1	M1	IV
21	67	žena	rectosigmoideum	adenokarcinom grade 2	T3	N1	M1	IV
22	76	žena	transversum	adenokarcinom grade 3	pT4a	pN1a	M1	IV
23	62	žena	sigmoideum	adenokarcinom grade 2	pT3	pN1a	M1	IV
24	71	muž	rectosigmoideum	adenokarcinom grade 2	T4	N1	M1	IV

25	74	muž	ascendens	adenokarcinom grade 2	pT4	pN2a	M1	IV
26	59	muž	rectosigmoideum	adenokarcinom grade 1	pT2	pN1a	M1	IV
27	70	muž	rectosigmoideum	adenokarcinom grade 2	T4a	N0	M1	IV
28	60	muž	transversum	adenokarcinom grade 3	pT4a	pN1b	M1	IV
29	59	muž	rectum	adenokarcinom grade 2	pT2	pN0	M1	IV
30	75	muž	descendens	adenokarcinom grade 2	T3	N1	M1	IV

Tabulka 6: Charakteristika pacientů s kolorektálním karcinomem – souhrn

Věk	64,6 (37-86) let
Pohlaví	
Muži	20 (66,7 %)
Ženy	10 (33,3 %)
Lokalizace tumoru	
Pravý tračník	10 (33,3 %)
Levý tračník	20 (66,7 %)
Morfologie tumoru	
Adenokarcinom grade 1	2 (6,7 %)
Adenokarcinom grade 2	21 (70,0 %)
Adenokarcinom grade 3	7 (23,3 %)
Stádium	
I	2 (6,7 %)
II	9 (30,0 %)
III	6 (20,0 %)
IV	13 (43,3 %)

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 (*Tabulka 7*). Hladiny všech parametrů byly víc patologické v případě pacientů s kolorektálním karcinomem, dominovala hypalbuminémie a hypoproteinémie.

Tabulka 7: Vybrané biochemické parametry získané měřením plazmy pacientů s kolorektálním karcinomem a zdravých kontrol

	Albumin (g/l)	Celková bílkovina (g/l)	CRP (mg/l)	Glukóza (mmol/l)	CEA (μg/l)	CA 19-9 (kIU/l)
Pacienti (průměrná hodnota)	21,4-45,6 (37,58)	46,8-74,1 (59,73)	1,0-223,9 (44,88)	4,7-19,5 (8,42)	0,5-353,4 (31,20)	2,1-9700,6 (685,74)
Kontroly (průměrná hodnota)	44,7-55,5 (49,32)	65,1-86,0 (74,61)	1,0-20,4 (4,60)	2,7-7,4 (4,27)	0,8-7,1 (1,83)	2,0-20,1 (6,20)

3.1.2 Příprava vzorků k analýze

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 (teplota -78,3 °C) do Laboratoře medicínální diagnostiky Ústavu analytické chemie VŠCHT v Praze. Tady došlo k jejich uchování v hlubokomrazícím boxu Lab 11/EL19L (Elcold, Dánsko) při teplotě -80 °C.

Před vlastní spektroskopickou analýzou byly vzorky krevní plazmy pozvolna rozmrazeny při laboratorní teplotě a zfiltrány přes filtr s póry 0,45 μm (Millipore, Německo) na odstředivce KR 22i (Jouan, Francie) při přetížení 13 000 G po dobu 10 minut.

Spektroskopií ECD byla měřena spektra vzorků 4x ředěných sterilním fosfátovým pufrům PBS připraveným v lékárně Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (koncentrace 200 mmol.l⁻¹, pH=7,4), u ostatních metod byla analyzována spektra neředěných vzorků krevní plazmy.

V případě měření Ramanových a ROA spekter byl ke vzorkům krevní plazmy přidáván jodid sodný (Penta, čistota p.a.) jako fluorescenční zhašedlo. Kyvety používané při měření ECD, Ramanových a ROA spekter a ATR krystal IČ spektrometru byly po analýze vždy čištěny

pomocí čističe Starna CellClean (Starna Scientific Ltd., Velká Británie) a oplachovány několikrát destilovanou vodou a methanolem (Sigma-Aldrich, čistota p.a.).

Manipulace se vzorky krevní plazmy byla prováděna pomocí pipet Nichipet EX-Plus (Nichiryo, Japonsko) typu NPL0100 (10–100 μl) a NPL01000 (100–1000 μl) a vzorkovnic (typ Safe-Lock, PCR Clean) s maximálním objemem 2 ml (Eppendorf AG, Německo).

3.1.3 Postupy spektroskopických analýz

Spektroskopické měření vzorků krevní plazmy byly provedeny čtyřmi metodami, kterými jsou absorpční IČ spektroskopie, Ramanova spektroskopie, Ramanova optická aktivita (ROA) a elektronový cirkulární dichroismus (ECD). Nastavené přístrojové parametry a postupy měření jsou shrnuty v následujících odstavcích.

3.1.3.1 Absorpční IČ spektroskopie

IČ spektra byla měřena na spektrometru FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA), který je vybaven keramickou tyčinkou EverGlo jako zdrojem záření pro střední IČ oblast a DTGS (deuterovaný triglycinsulfát) detektorem. Měření IČ spekter bylo provedeno za laboratorní teploty, a to technikou zeslabeného úplného odrazu (ATR), proto byl do spektrometru zařazen ATR krystal ze selenidu zinku (ZnSe). IČ spektra byla měřena při rozlišení 4 cm^{-1} ve spektrální oblasti 4000–400 cm^{-1} . Nastavení parametrů, měření a úprava spekter byly provedeny v programu OMNIC, verze 8.2 (Thermo Scientific, USA).

ATR krystal byl vyčištěn před každým měřením pomocí čističe Starna CellClean, následně několikrát opláchnut methanolem a destilovanou vodou. Poté se na ATR krystal pipetovalo 30 μl vzorku krevní plazmy a bylo spuštěno měření IČ spekter, přičemž byla vždy měřena spektra vzorků nezředěných. Naměřená IČ spektra byla korigována na základní linii odečtením naměřených spekter destilované vody za identických podmínek. Z důvodu zhoršené kvality spekter v oblasti 1700–1500 cm^{-1} způsobené rotačně-vibračními přechody molekul vody byla odečítána také IČ spektra vodní páry. Pro statistické vyhodnocení byla spektra srovnána na základní linii u 2000 cm^{-1} .

3.1.3.2 Ramanova a ROA spektroskopie

Měření Ramanových a ROA spekter bylo prováděno současně na spektrometru ChiralRaman-2X (Biotools, USA), který je vybaven laserem Opus (Laser Quantum, Velká Británie) s excitační vlnovou délkou 532 nm a CCD detektorem s rozlišením 1024 obrazových prvků. Ramanova a ROA spektra byla měřena při rozlišení $\sim 7 \text{ cm}^{-1}$ ve spektrálním rozsahu 2500–100 cm^{-1} . Pro měření spekter byla použita křemenná kyveta o rozměrech 4x4 mm (Biotools, USA). Nastavení parametrů měření a úprava spekter byla prováděny v programech ROA, verze 4.0 (Critical Link, USA), rd224.exe (Josef Kapitán, Biotools) a Spectra Manager, verze 2.08.04 (Jasco, Japonsko).

Před každým měřením bylo nutné provést kalibraci vlnových délek, respektive vlnočtů, a to na základě změření spektra neonové výbojky, kdy byla nastavena perioda doby expozice 1,029 s a akumulace 32 záznamů. Prostřednictvím emisních čar neonu byla následně kalibrována osa vlnočtů v programu ROA. Před vlastním měřením bylo nezbytné zjistit propustnost optické soustavy, která časem klesá z důvodu usazování prachových částic na optické prvky spektrometru.

Před každým měřením Ramanových a ROA spekter byla křemenná kyveta vyčištěna pomocí čističe Starna CellClean, několikrát opláchnuta methanolem a destilovanou vodou. Následně se do kyvety odpipetovalo 100 μl vzorku krevní plazmy s přidáním 10 mg jodidu sodného jako fluorescenčního zhášedla. Po důkladném promíchání byla kyveta vložena do speciálního držáku a poté do kyvetového prostoru spektrometru. Pro redukci fluorescenčního pozadí bylo na vzorek po dobu 12 hodin svíceno laserem o výkonu 280 mW. Následovalo vlastní měření Ramanových a ROA spekter při výkonu laseru 250 mW s celkovou dobou expozice 24 hodin. U získaných spekter proběhla korekce základní linie prostřednictvím filtrace využívající Fourierovu transformaci (Člupek M. et al., 2007). Spektrum bylo vyhlazeno až do míry odstranění veškerého signálu kromě pozadí a odečteno od původního spektra.

3.1.3.3 Spektroskopie ECD

Spektra ECD byla měřena na spektrometru J-815 (Jasco, Japonsko) při teplotě 23°C. Tento spektrometr je vybaven xenonovou pulzní výbojkou jako zdrojem záření, dvojitým monochromátorem a fotonásobičem schopným detekovat signál ve spektrální oblasti 163–900 nm. Před měřením spekter bylo nutné nastavit několik parametrů, a to rychlost skenování 50 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$, dobu odpovědi 2 s, šířku štěrbin 2 nm, citlivost standardní (tj. 100 mdeg), rozlišení 0,1 nm, počet akumulací 6 a spektrální rozsah, který souvisel s koncentrací vzorku a

také ovlivňoval potřebný průtok tlakového dusíku k profukování přístroje. Spektra čtyřikrát zředěných vzorků byla měřena ve spektrální oblasti 185–280 nm při průtoku dusíku 17 l.min⁻¹. Zředění vzorků jsme dosáhli smíšením 100 µl vzorku filtrované krevní plazmy s 300 µl sterilního fosfátového pufru PBS.

Pro měření všech spekter ECD byla použita rozebíratelná křemenná kyveta o tloušťce měřené vrstvy 0,01 mm (Hellma, Německo). Teplota 23 °C byla udržována pomocí Peltierova článku CDF-426S/15 s přesností 0,1 °C. Nastavení parametrů měření a úprava spekter byly provedeny v programu Spectra Manager, verze 2.08.04 (Jasco, Japonsko).

Před každým měřením spekter ECD byla křemenná kyveta vyčištěna čističem Starna CellClean, několikrát opláchnuta methanolem a destilovanou vodou. Poté bylo do kyvety odpipetováno 40 µl vzorku krevní plazmy a po vložení kyvety do kyvetového prostoru bylo spuštěno měření spekter ECD. Zředěné vzorky umožnily měření spekter v oblasti 185–280 nm, což poskytlo větší množství spektrálních informací vedoucí ke spolehlivější analýze dat. Výsledná spektra ECD byla získána zprůměrováním 6 naměřených spekter. Odečet pozadí nebo vyhlazování spekter nebylo z důvodu velmi dobré kvality surových spekter prováděno.

3.2 Analýza tkáně

Jak již bylo opakovaně uvedeno, Ramanova spektroskopie je nedestruktivní metoda, která je schopna měřit a analyzovat biologické tkáně s minimálním vlivem na jejich strukturu. Její efektivita 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).

I přes schopnost Ramanovy spektroskopie poskytnout podstatné informace o biologickém složení vzoru, nízký poměr signálu k šumu a velká míra autofluorescence často způsobují problémy při získávání spektrálních dat. Využití odpovídajícího excitačního zdroje může přispět k minimalizaci autofluorescence. Excitační vlnová délka λ_{ex} je vybírána závisle na analytickém zadání a typu tkáně, nejvíc využívanými λ_{ex} jsou 532, 632, 647, 785 a 1064 nm (Efremov E.V. et al, 2008).

Excitační záření s větší vlnovou délkou (785 a 1064 nm) je pro své relativně nízké pozadí často optimální volbou při měření čerstvé tkáně. Na druhé straně, pro zvyšující se intenzitu signálu, excitace s kratší vlnovou délkou (např. 532, 632 a 647 nm) často způsobují nechtěnou autofluorescenci a tkáňové poškození (Smith Z.J. et al, 2011; Efremov E.V. et al, 2007).

Zesílení odezvy můžeme docílit, pokud je excitované záření blízké frekvenci elektronového přechodu tkáňových chromoforů. Vlivem tohoto efektu dochází k významnému zesílení intenzit jinak slabých Ramanových pásů, a to přes spojování elektronových a vibračních přechodů. Získané Ramanovy spektra jsou vysoce citlivé ke změnám struktury a prostředí, které jsou nezbytné pro intenzivní zkoumání odlišných částí biomolekulárních komplexů (porfyrinů, karotenoidů, proteinů, aj.) (Synytsya A. et al, 2004).

Naše práce se zaměřila na studium potenciálu Ramanovy spektroskopie v diagnostice kolorektálního karcinomu. Snažili jsme se zhodnotit, zdali je tato metoda schopna detektovat spektrální rozdíly mezi normální a patologickou tkání tlustého střeva a která λ_{ex} je optimální pro tyto účely.

3.2.1 Analýza tkáně *ex vivo*

3.2.1.1 Výběr pacientů, příprava vzorků k analýze

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. Charakteristiku pacientů shrnuje **Tabulka 8**. 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 mm²), 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. Zkumavky se uzavřely, aby nedocházelo k odpařování vody. Následně bylo analyzováno 10-20 nezávisle vybraných míst odebrané tkáně.

Tabulka 8: Charakteristika pacientů s kolorektálním karcinomem k ex vivo analýze

Číslo pacienta	Věk (roky)	Pohlaví	Lokalizace tumoru (colon)	Histologie	T	N	M	Stádium
1	70	žena	sigmoideum	adenokarcinom grade 2	pT3	pN1a	M0	IIIB
2	75	muž	rectosigmoideum	adenokarcinom grade 3	pT4b	pN2a	M0	IIIC
3	72	muž	sigmoideum	adenokarcinom grade 2	pT4b	pN2a	M0	IIIC
4	60	muž	descendens	adenokarcinom grade 1	pT2	pN1a	M0	IIIA
5	78	muž	rectosigmoideum	adenokarcinom grade 2	pT3	pN0	M0	IIIB
6	42	žena	ascendens	adenokarcinom grade 2	pT4a	pN1a	M0	IIIB
7	58	muž	sigmoideum	adenokarcinom grade 3	pT3	pN2b	M0	IIIC
8	80	žena	sigmoideum	adenokarcinom grade 1	pT3	pN2a	M0	IIIB
9	64	žena	ascendens	adenokarcinom grade 2	pT4a	pN2a	M0	IIIC
10	62	muž	transversum	adenokarcinom grade 3	pT4b	pN2b	M0	IIIC
11	67	muž	sigmoideum	adenokarcinom grade 2	pT2	pN1a	M0	IIIA
12	58	muž	transversum	adenokarcinom grade 2	pT3	pN1b	M0	IIIB
13	67	muž	caecum	adenokarcinom grade 3	pT3	pN1a	M0	IIIB
14	74	žena	sigmoidem	adenokarcinom grade 2	pT4b	pN2a	M0	IIIC

3.2.1.2 Postup spektroskopických analýz

V naší práci byl omezený výběr excitační vlnové délky (λ_{ex}) kvůli faktu, že excitační vlnová délka $\leq 514,5$ nm může zesílit fotodisociaci a dokonce způsobit degradaci tkáně (Puppels G.J. et al, 1991). Podmínky měření tkáně tlustého střeva Ramanovou spektroskopií s různou λ_{ex} jsou shrnuty v *Tabulce 9*.

Tabulka 9: Podmínky pro měření vzorků tkání tlustého střeva Ramanovou spektroskopií s různou excitační vlnovou délkou λ_{ex} *zesílení rezonance

Ramanova metoda	λ_{ex} (nm)	Síla laseru při dopadu na vzorek (mW)	Počet scanů pro 1 měření	Doba expozice (hodiny) pro 1 měření	Pův od hlavních pásů
NIR-FT	1064	~ 60	1024	1	Hlavní složky (proteiny, lipidy, nukleové kyseliny)
Vis-NIR	785	~ 60	50	0,25	Hlavní složky a chromofory* (hem)
Vis	532	11	96	0,06	Chromofory* (hem, karotenoidy) a hlavní složky

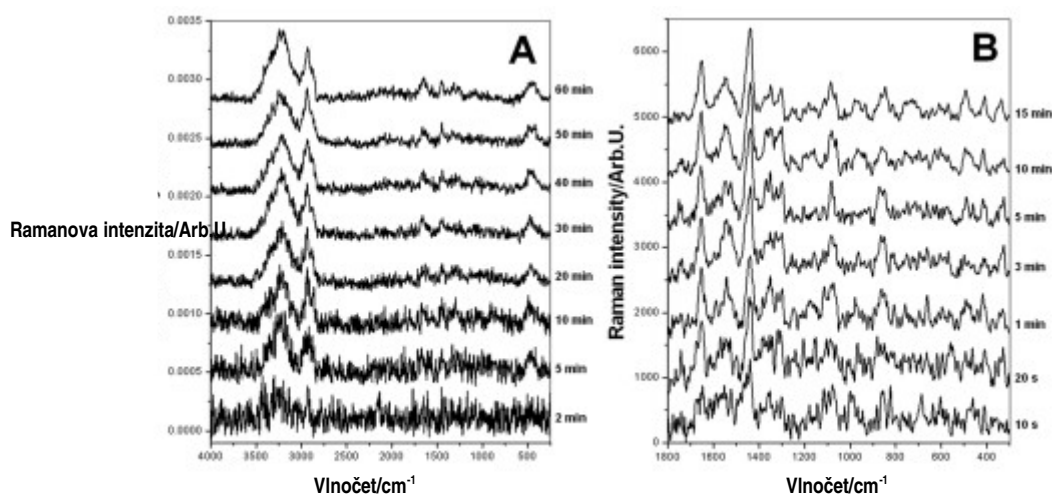
Měření pomocí Ramanova spektrometru v blízké infračervené oblasti s Fourierovou transformací (Near-infrared Fourier transform – NIR-FT) s λ_{ex} 1064 nm má široké využití pro zkoumání různých typů lidských tkání, včetně tumorů (Gašior-Głogowska M. et al, 2013; Philipsen P.A. et al, 2013). Energie této excitační vlnové délky je nižší ve srovnání s viditelným zářením, ale dostatečná pro iniciaci Ramanova rozptylu. Blízké infračervené světlo je nedestruktivní a nemutagení (Molckovsky A. et al, 2003), takže je možné měřit biologické vzorky bez tepelného poškození nebo fotopoškození. Při této vlnové délce navíc dochází k eliminaci velkého množství nežádoucí vnitřní fluorescence, protože většina biomolekul neabsorbují 1064 nm.

V naší práci byla NIR-FT-Ramanova spektra tkáně tlustého střeva zaznamenána na Bruker FT-Ramanovém (FRA 106/S, Equinox 55/S) spektrometru, který je vybaven křemenným děličem svazku a Ge detektorem (chlazený tekutým dusíkem). Oblast vzorku jednotného rozměru (0,8 mm²) byla ozářena laserovým paprskem síly 250 mW, což koresponduje se silou 60 mW cílenou na vzorek. Záznam spekter probíhal při teplotě 22°C. Celkově se sumarizovalo 1024 nezávislých skenů s následným vytvořením individuálního Ramanova spektra s rozlišením 2 cm⁻¹. V průběhu trvání procedury přes 60 minut došlo k amplifikaci signálů a nárustu poměru signálu k šumu (**Obrázek 18A**).

NIR-Vis-Ramanova spektroskopie (λ_{ex} 785 nm) je rovněž nedestruktivní měřicí technika, která se užívá často pro rutinní analýzu biologických vzorků (Lieber C.A., Kabeer M.H., 2010; Lin K. et al, 2012). Ve srovnání s NIR excitační vlnovou délkou 1064 nm, Ramanova spektra měřena za těchto podmínek vykazují signifikantní zesílení intenzity specifických vibrací související s chromofory, které absorbují 785 nm. Navíc, ve srovnání s technikou NIR-FT

Raman, dochází k rychlejšímu dosažení adekvátní úrovně odstupu signálu od šumu. Zaznamenání NIR-Vis-Ramanových spekter ($200\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$, rozlišení 5 cm^{-1}) vzorků tkáně tlustého střeva proběhlo prostřednictvím DeltaNu Advantage NIR spektrometru (DeltaNu Inc., USA), který je vybaven diodovým laserem ($\lambda_{\text{ex}} = 785\text{ nm}$, síla laseru cílená na vzorek 60 mW). Každé spektrum bylo generováno akumulací 50 skenů po expozici laserem po dobu 20 s při teplotě $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Získání vhodného odstupu signálu od šumu s cílem zabránit poškození vzorku vyžadovalo proceduru skenování (50 akumulací) přes 15 minut (**Obrázek 18B**).

Obrázek 18: NIR-FT Ramanova (A) a NIR-Vis-Ramanova (B) spektra zdravé tkáně kolorektálního karcinomu zaznamenaná z jednoho místa a akumulována v průběhu různých intervalů skenování



V případě Vis-Raman ($\lambda_{\text{ex}} 532\text{ nm}$), by měla být užívána nižší síla laseru a kratší expozice, abychom zabránili destrukci biologických vzorků. Měření za těchto podmínek demonstruje signifikantní zesílení absorpce chromoforů ve viditelné oblasti kolem λ_{ex} . Toto měření je navíc pravidelně doprovázeno nežádoucím intenzivním autofluorescenčním pozadím, které bylo odstraněno matematicky. Vis-Raman spektra vzorků tkáně tlustého střeva byly zaznamenané komerčně dostupným Ramanovým spektrometrem (ChiralRAMAN-2XTM (BioTools Inc., USA) vybaveným laserem Quantum MPC 6000 (Opus systems). Uzavřená skleněná zkumavka se vzorkem byla umístěna do optimalizované termostatického článku při teplotě $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Každé spektrum jsme získali akumulací 96 skenů se spektrálním rozlišením 7 cm^{-1} . Doba osvětlení 2 s na 1 sken byla nastavena podle optimálního operačního rozsahu CCD-detektoru. Celková doba expozice trvala $\sim 0,06\text{ h}$. Tyto podmínky byly zvoleny jako optimální, protože nevedly k viditelným destrukcím vzorků a poskytovaly dobrou úroveň odstupu signálu od šumu.

Průměrná Ramanova spektra s různou excitační vlnovou délkou ($\lambda_{\text{ex}} \sim 1064, 785\text{ a } 532\text{ nm}$) vzorků normální a patologické tkáně tlustého střeva z 10-20 nezávislých oblastí byla

korigována, vyhlazena filtrem a normalizována podle pásu tkáňového markeru $\sim 1447 \text{ cm}^{-1}$ s využitím softwaru Origin 6.0 (Microcal Origin, USA). Následně se přistoupilo k jejich importu do softwaru (CAMO Software Inc.) k statistickému vyhodnocení, které zahrnovalo Analýzu hlavních komponent (PCA), která se využila k redukci vysoce dimenzionálního datasetu zmenšením počtu nekorelujících hlavních komponent.

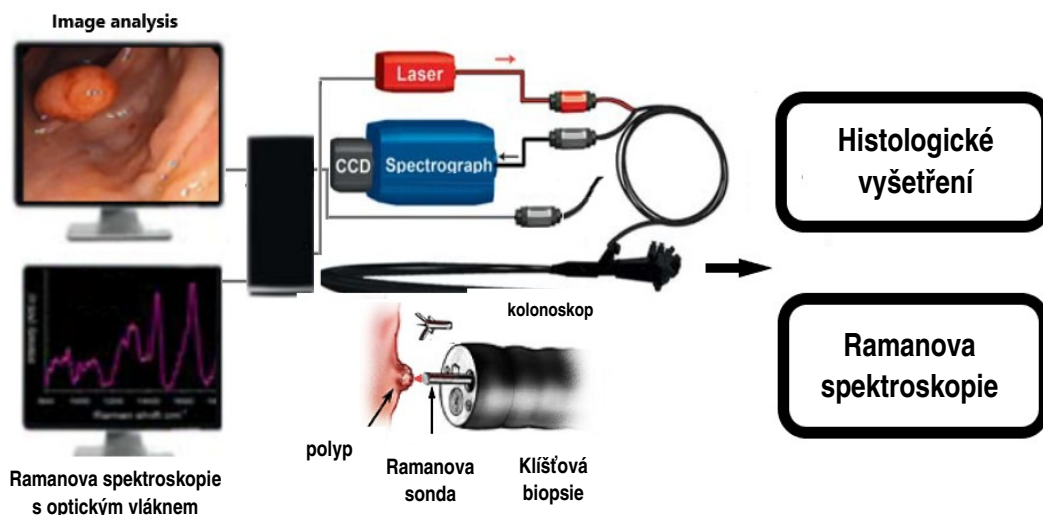
3.2.2 Analýza tkáně *in vivo*

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. Schéma projektu znázorňuje [Obrázek 19](#).

Obrázek 19: Schéma projektu zobrazující analýzu tkáně tlustého střeva *in vivo* Ramanovou spektroskopií pomocí Ramanovy sondy při kolonoskopickém vyšetření

Zobrazení



Provazení analýzy Ramanovou spektroskopií *in vivo* pomocí sondy s optickým vláknem není zatím běžně užívanou technikou, co se týče klinických aplikací. Jen malý počet výzkumných týmů se věnuje aplikaci této techniky v klinické praxi, např. skupina kolem prof. M. S. Bergholta (Bergholt M.S. et al, 2014; Bergholt M.S. et al, 2016). Toto měření je spojeno s mnohými technickými problémy, jako jsou např. slabý Ramanův rozptyl, zdlouhavá měření, či ztráta Ramanova signálu při přecházení optických vláknem (Wang Z. et al, 2017; Wang W.C. et al, 2019).

Z těchto důvodů bylo pro *in vivo* klinickou diagnostiku nutné vyvinout miniaturní Ramanovu sondu s optickým vláknem, která může překonat technické komplikace. Tato jedinečná sonda byla vyvinuta v Laboratoři medicíně diagnostiky Ústavu analytické chemie VŠCHT v Praze a není prozatím komerčně dostupná.

Jedná se o miniaturní sondu s 1 mm safírovou čočkou, která umožňuje efektivní zaměření excitační vlnové délky ($\lambda_{\text{ex}}=785 \text{ nm}$) na povrch tkáně tlustého střeva a zároveň asistuje v kolekci Ramanova rozptylu. Ramanova sonda obsahuje jedno centrální excitační vlákno ($200 \mu\text{m}$) a sedm okolních vláken (každé jedno $300 \mu\text{m}$) vyrobených z nízké hluchného silikonu. Tloušťka ($2,1 \text{ mm}$) a délka 300 cm sondy dovoluje její použití v kolonoskopu, kde je efektivně dostupná pro celou délku tlustého střeva.

Naše předběžné *ex vivo* testy Ramanovy sondy s optickým vláknem na biologických tkáních (prasečí plíce, srdce, svaly) dokázaly, že výsledky tohoto měření jsou srovnatelné s výsledky, které byly získány konvenční Ramanovou spektroskopií s excitační vlnovou délkou $\lambda_{\text{ex}}=785 \text{ nm}$.

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.

Během kolonoskopie jsou všechny suspektní patologické léze tlustého střeva analyzovány současně *in vivo* Ramanovou spektroskopií, po které následuje histopatologické vyšetření jednotlivých odebraných vzorků. Po definitivním vyhodnocení patologa je v plánu analýza Ramanovou spektroskopií *ex vivo* ze stejného tkáňového bloku.

Během kolonoskopie je používán videokolonoskop CF- HQ190L/1 disponujícím duálním cíleným optickým systémem. Ramanův endoskopický systém pro *in vivo* analýzu s optickým vláknem obsahuje NIR-Vis HT 0119-001 Ramanův spektrometr ($\lambda_{\text{ex}} = 785 \text{ nm}$), který je vybaven úzce čárovým diodovým laserem NLM-785-IMF(S)-500 s maximálním výstupem 500 mW; termoelektricky chlazená iVac 316 CCD kamera provozována softwarem Solis a 3 metry dlouhá Ramanova sonda s vnějším průměrem 2,1 mm byla vyvinuta cestou laboratoře VŠCHT. Kompaktní Ramanova endoskopická sonda navržena pro kolonoskopii obsahuje vlákna $7 \times 300 \mu\text{m}$ obklopující centrální excitační vlákno ($200 \mu\text{m}$ v průměru). Pro dosažení efektivního záznamu Ramanova spektra z epitelu sliznice a úzkému fokusu excitačního světla na povrch sliznice tlustého střeva je hrot Ramanovy sondy spojený s 1,0 mm safírovou čočkou.

V případě bioptického odběru jsou získané vzorky uchovány nativně v chladičím boxu při teplotě $+4 \text{ }^\circ\text{C}$, transportována do Laboratoře medicínální diagnostiky Ústavu analytické chemie VŠCHT a následně analyzována *ex vivo* konvenční Ramanovou spektroskopií v ten samý den. Pro *ex vivo* analýzu se užívá NIR-Ramanův spektrometr DeltaNu Inc., který je vybaven diodovým laserem ($\lambda_{\text{ex}}=785 \text{ nm}$) s maximálním výstupem 100 mW a NIR-optimalizovanou CCD kamerou. Systém získává Ramanova spektra ve spektrálním rozsahu $200\text{--}2000 \text{ cm}^{-1}$ s rozlišením 5 cm^{-1} (tzv. biomolekulární “fingerprinting”).

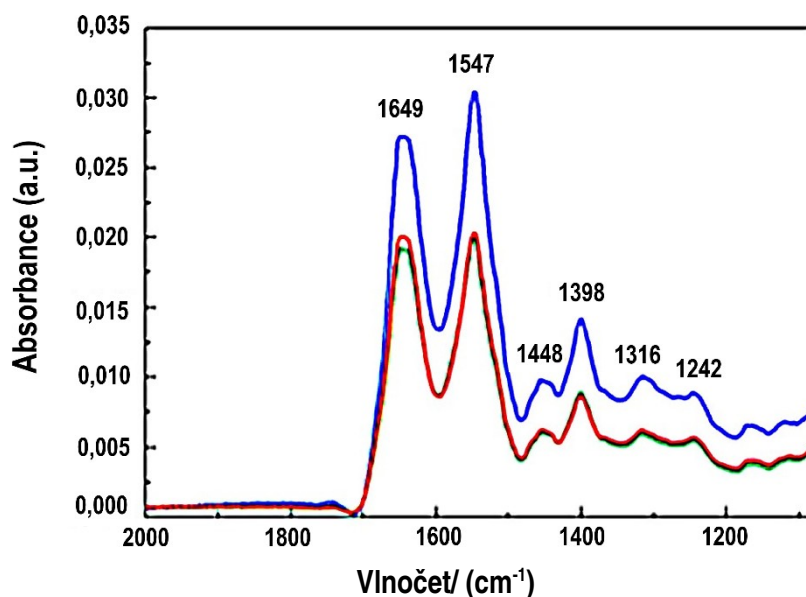
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

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

Výsledná IČ spektra odráží hlavní spektrální projevy vzorků krevní plazmy ve spektrální oblasti 1100–2000 cm^{-1} a jsou prezentována na [Obrázku 20](#).



Obrázek 20: Průměrná absorpční IČ spektra s Fourierovou transformací vzorků krevní plazmy pacientů s kolorektálním karcinomem stádia I+II (—), stádia III+IV (—) a kontrolních jedinců (—)

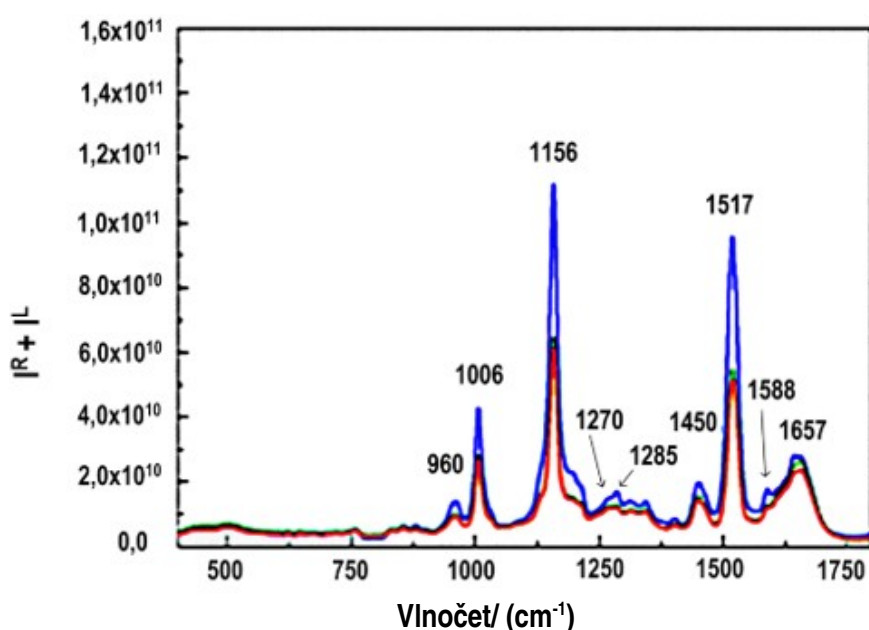
V IČ spektrech dominují svou intenzitou dva pásy. Oba tyto pásy souvisí se sekundární strukturou proteinů přítomných v krevní plazmě (Daidone I. et al, 2010). První pás se nachází u $\sim 1649 \text{ cm}^{-1}$ a je označován jako amid I, který všeobecně bývá pozorován ve spektrální oblasti $1620\text{--}1670 \text{ cm}^{-1}$, 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 vibrace skupiny N–H spolu s valenční vibrací skupiny C–N peptidové vazby a je možné jej sledovat v oblasti $1500\text{--}1600 \text{ cm}^{-1}$. Vzorky krevní plazmy se v IČ spektrech tedy projevují především právě v oblastech amidu I a amidu II, přičemž jak již bylo zmíněno, průběh spekter v těchto oblastech poskytuje důležité informace o sekundární struktuře v ní obsažených proteinech (Piva J. et al, 2011). Ve spektrální oblasti $1200\text{--}1480 \text{ cm}^{-1}$ se nachází další méně intenzivní pásy. Pás $\sim 1448 \text{ cm}^{-1}$ by mohl být přiřazen deformačním vibracím skupin CH₃ a CH₂ vázaných na postranních řetězcích proteinů a oblast $1260\text{--}1390 \text{ cm}^{-1}$ by mohla naznačovat méně specifické vibrace alifatických řetězců v kombinaci se symetrickou valenční vibrací skupiny COO– v proteinech. Jedná se však o oblast, ve které vzniká mnoho překrývajících se pásů mimo jiné z důvodu velmi komplexní matrix, jíž vzorek krevní plazmy beze sporu představuje (Piva J. et al, 2011). Proto interpretaci pásů v této oblasti nelze empirickými pravidly jednoznačně provést. Pro statistické vyhodnocení byly tedy použity pouze pásy amidu I a II, tedy celková spektrální oblast $1480\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$.

IČ spektra vzorků zobrazená na obrázku 20 jsou barevně kódována podle diagnózy jednotlivých jedinců. Kontrolní vzorky jsou zobrazeny modrou barvou a vzorky pacientů v

klinickém stádiu I+II zelenou barvou a v klinickém stádiu III+IV červenou barvou. 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 (**Obrázek 21**) dominují tři výrazné pásy, které jsou dány přítomností karotenoidů (Saleem M. et al, 2013).



Obrázek 21: Průměrná Ramanova spektra vzorků krevní plazmy pacientů s kolorektálním karcinomem stádia I+II (—), stádia III+IV (—) a kontrolních jedinců (—)

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 spektrech se dále nachází již méně intenzivní pásy, které naznačují přítomnost proteinů (Teare M.D., Woll P.J., 2007). Jedná se o pás $\sim 1657 \text{ cm}^{-1}$ označovaný jako amid I (valenční vibrace C=O peptidové vazby), pás $\sim 1285 \text{ cm}^{-1}$ s ramínkem u $\sim 1270 \text{ cm}^{-1}$ známý jako amid III (deformační vibrace N–H s valenční vibrací C–N) a pás $\sim 879 \text{ cm}^{-1}$ daný valenční vibrací C–C v proteinech. Spektra také poskytují pásy fenylalaninu, mezi které se kromě zmíněného pásu $\sim 1006 \text{ cm}^{-1}$ řadí pás $\sim 1588 \text{ cm}^{-1}$ odpovídající deformační vibraci C=C a pás $\sim 1196 \text{ cm}^{-1}$, který je projevem valenční vibrace C–C₆H₅ vyskytující se také u tryptofanu (Teare M.D., Woll P.J., 2007). Pás $\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$ může vznikat na základě přítomnosti proteinů, ale odpovídá především deformačním vibracím CH₂ např.

fosfolipidů (Saleem M. et al, 2013). Poslední pozorovaný pás $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ představuje vibrační chování sacharidů. Pro přehlednost je stručná interpretace Ramanových spekter vzorků krevní plazmy shrnuta v *Tabulce 10*.

Tabulka 10: Významné pásy vzorků krevní plazmy v Ramanových spektrech a jejich přiřazení k charakteristickým vibracím biomolekul

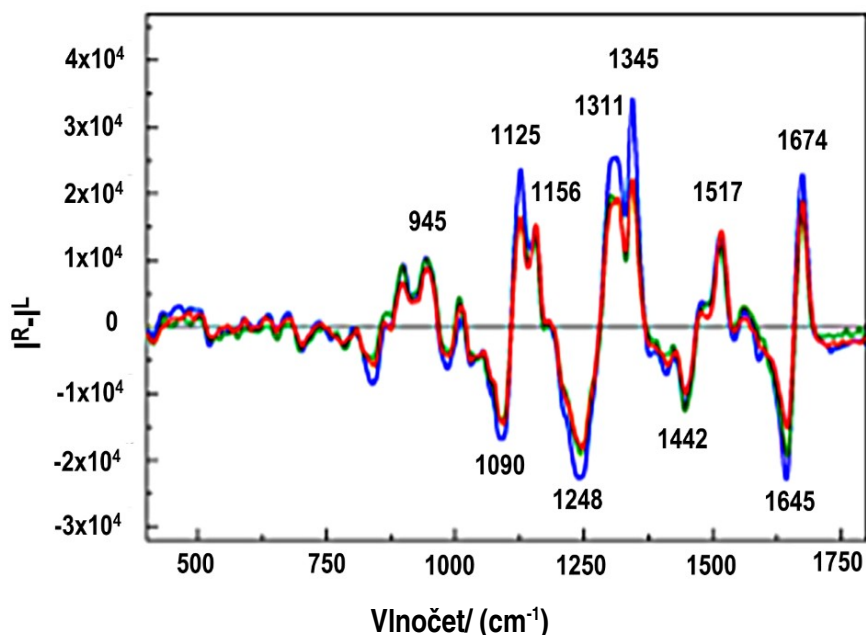
Vlnočet (cm^{-1})	Vibrace ^a	Přiřazení biomolekuly
1657	$\nu (\text{C}=\text{O})$ – amid I	proteiny
1588	$\delta (\text{C}=\text{C})$	fenylalanin, tryptofan
1517	$\nu (\text{C}=\text{C})$	karotenoidy
1450	$\delta (\text{C}-\text{H})$	fosfolipidy, proteiny
1285	$\nu (\text{C}-\text{N})$ – amid III	proteiny
1196	$\nu (\text{C}-\text{C}_6\text{H}_5)$	fenylalanin, tryptofan
1156	$\nu (\text{C}-\text{C})$	karotenoidy
1006	$\nu (\text{C}-\text{N})$	karotenoidy, fenylalanin
960	$\nu (\text{C}-\text{C})$	sacharidy
879	$\nu (\text{C}-\text{C})$	proteiny

^a ν – valenční vibrace, δ – deformační vibrace

Ve většině zmíněných pásů sledujeme v našem měření rozdíly 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 cm^{-1} , který odráží biomolekuly proteinů, pás klinických stádií I+II se blíží k pásu kontrolních jedinců.

4.1.3 Ramanova optická aktivita

Jako nová metoda v analýze vzorků krevní plazmy byla využita spektroskopie ROA, která umožňuje stejně jako spektroskopie ECD získávat informace o struktuře a konformaci biomolekul. Ve spektrech ROA byla pozornost zaměřena především na oblasti odrážející sekundární strukturu proteinů. Průměrná ROA spektra vzorků krevní plazmy pacientů s kolorektálním karcinomem a kontrolních jedinců znázorňuje *Obrázek 22*.



Obrázek 22: Průměrná ROA spektra vzorků krevní plazmy pacientů s kolorektálním karcinomem stádia I+II (—), stádia III+IV (—) a kontrolních jedinců (—)

Spektra vzorků krevní plazmy poskytují především pásy charakteristické pro α -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 $\sim 1125 \text{ cm}^{-1}$. Charakteristiky α -helikální konformace byly také pozorovány v oblasti amidu III, kde vznikly kladné pásy ~ 1345 a $\sim 1311 \text{ cm}^{-1}$. Převládající α -helikální konformaci odráží i kladný pás 945 cm^{-1} . Ve spektrech ROA se dále projevil i náznak přítomnosti konformace β -skládaného listu (Barron L. D. et al, 2000), kterou reflektuje záporný pás $\sim 1248 \text{ cm}^{-1}$. Negativní pás 1442 cm^{-1} představuje alifatické postranné řetězce (Barron L. D. et al, 2007). Pozorované změny těchto pásů mezi jednotlivými měřenými skupinami demonstrují narušení struktury plazmatických bílkovin během karcinogeneze a metastázování.

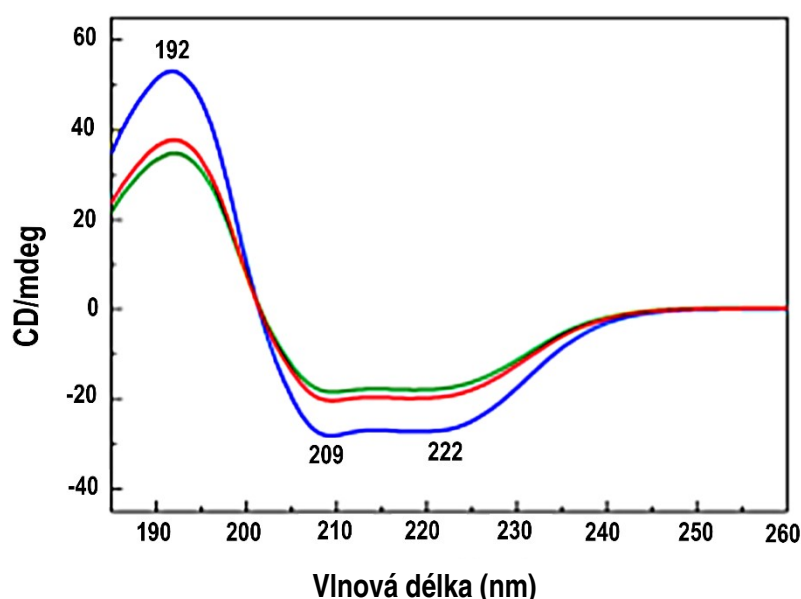
Prominentní kladné pásy 1156 a 1517 cm^{-1} mohou být přiřazeny k plazmatickým karotenoidům, které se překrývají s pásy reziduí aromatických aminokyselin (Synytsya A. et al, 2013).

4.1.4 Elektronový cirkulární dichroismus

Ke studii vzorků krevní plazmy byla dále využita spektroskopie elektronového cirkulárního dichroismu (ECD), která je účinným nástrojem strukturní analýzy biomolekul. Spektroskopie ECD je v tomto případě opět zaměřena především na analýzu proteinů přítomných v krevní plazmě. Při měření spekter ECD vzorků krevní plazmy byly tedy sledovány spektrální oblasti,

kde se projevuje $n-\pi^*$ přechod amidové skupiny peptidové vazby, který je pozorován v oblasti 210–230 nm, a $\pi-\pi^*$ přechod v oblasti 185–200 nm.

Při měření spekter ECD nezředěných vzorků krevní plazmy však docházelo k vysoké absorpci záření, a tudíž nebylo možné je měřit v nižších spektrálních oblastech pod 200 nm. Proto byly vzorky krevní plazmy čtyřikrát zředěny sterilním fosfátovým pufrům o $\text{pH}=7,4$ a koncentraci 200 mmol.l^{-1} , což umožnilo zaznamenání spekter ECD až k vlnové délce 185 nm. Výsledná spektra ECD zředěných vzorků krevní plazmy měřená ve spektrální oblasti 185–200 nm jsou prezentována na [Obrázku 23](#).



Obrázek 23: Průměrná ECD spektra vzorků krevní plazmy pacientů s kolorektálním karcinomem stádia I-II (—), stádia III-IV (—) a kontrolních jedinců (—)

Spektra byla srovnána na stejnou hodnotu absorbance při vlnovce 2000 cm^{-1}

Pozorujeme zde celkem tři pásy – dva záporné široké pásy s maximy $\sim 222 \text{ nm}$ a 209 nm a též kladný pás u 192 nm . Intenzita a poměr intenzit těchto pásů charakteristicky odráží sekundární strukturu proteinů v krevní plazmě. Tyto pásy odpovídají konkrétně α -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 α -helikální konformace.

Na základě srovnání intenzit zmíněných pásů 222 nm 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 vyhodnocení

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

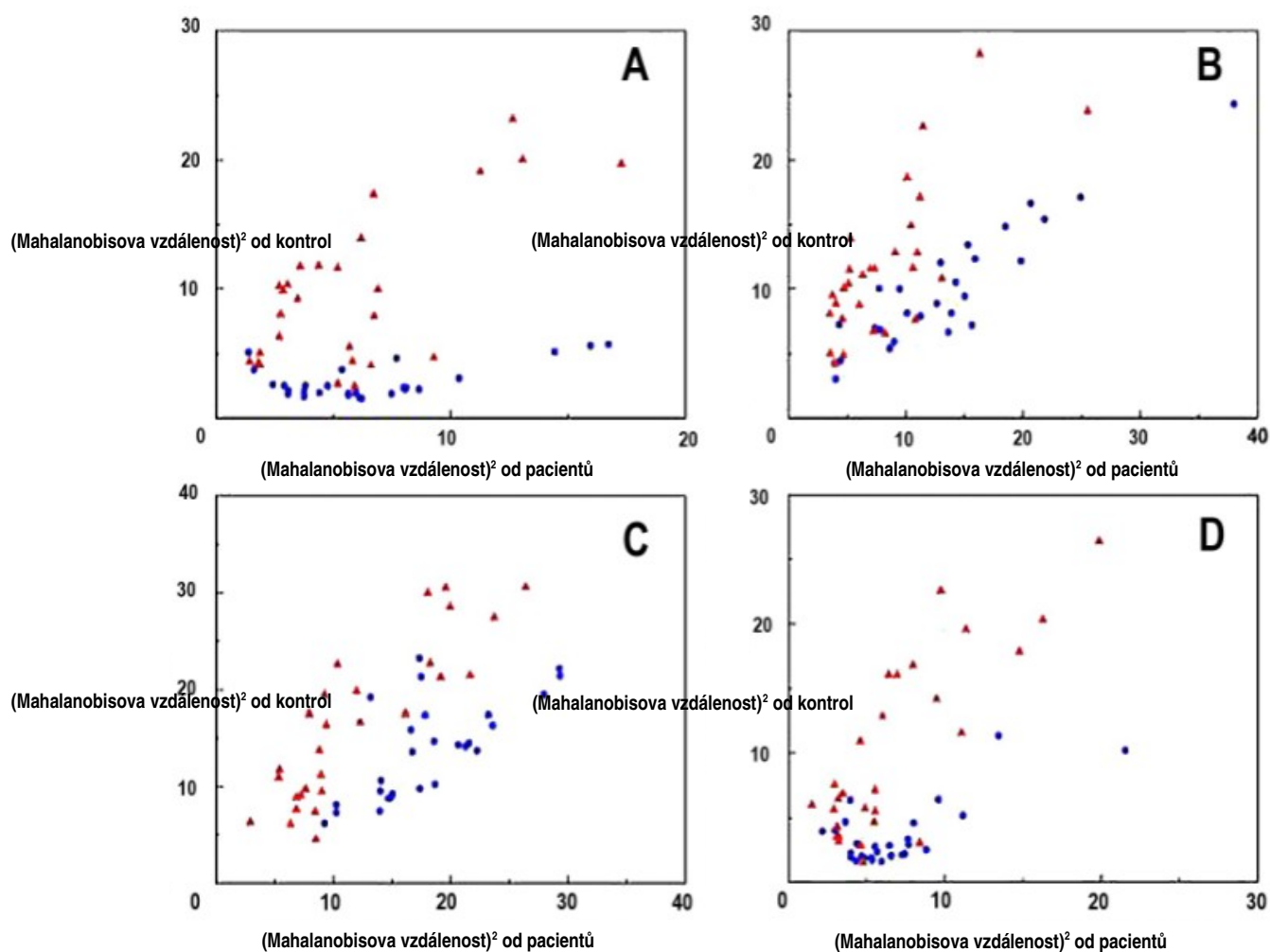
K evaluaci metodou LDA byly vybrány spektrální pásy odrážející zejména sekundární strukturu bílkovin. K tomuto hodnocení jsme nakombinovali 27 pásů, které vykazovaly nejvýznamnější rozdíly mezi měřenými skupinami, získané pomocí jednotlivých spektroskopických metod: 4 pásy z FT-IR (1244, 1400, 1547 a 1639 cm^{-1}), 8 pásů z Ramana (1270, 1285, 1341, 1357, 1391, 1450, 1517 a 1586 cm^{-1}), 12 pásů z ROA (833, 956, 1264, 1295, 1301, 1311, 1345, 1442, 1604, 1645, 1665 a 1674 cm^{-1}) a 3 pásy z ECD (192, 209 a 222 nm). 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.

Další 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 srovnatelné 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 druhé mocniny Mahalanobisových

Obrázek 24: Grafické znázornění LDA ze spektrálních dat vzorků krevní plazmy pacientů s kolorektálním karcinomem (▲) a kontrolní skupiny (●) pomocí druhé mocniny Mahalanobisových vzdáleností pro individuální spektroskopické metody: ECD (A), Raman (B), ROA (C), FT-IR (D)

vzdáleností (Maesschalck R. et al, 2000). Grafické znázornění LDA ze spektrálních dat vzorků krevní plazmy pacientů s kolorektálním karcinomem a kontrolní skupiny pro individuální spektroskopické metody znázorňuje **Obrázek 24**. U všech analýz je patrná částečná separace jednotlivých skupin, v některých případech se ale skupiny překrývají.

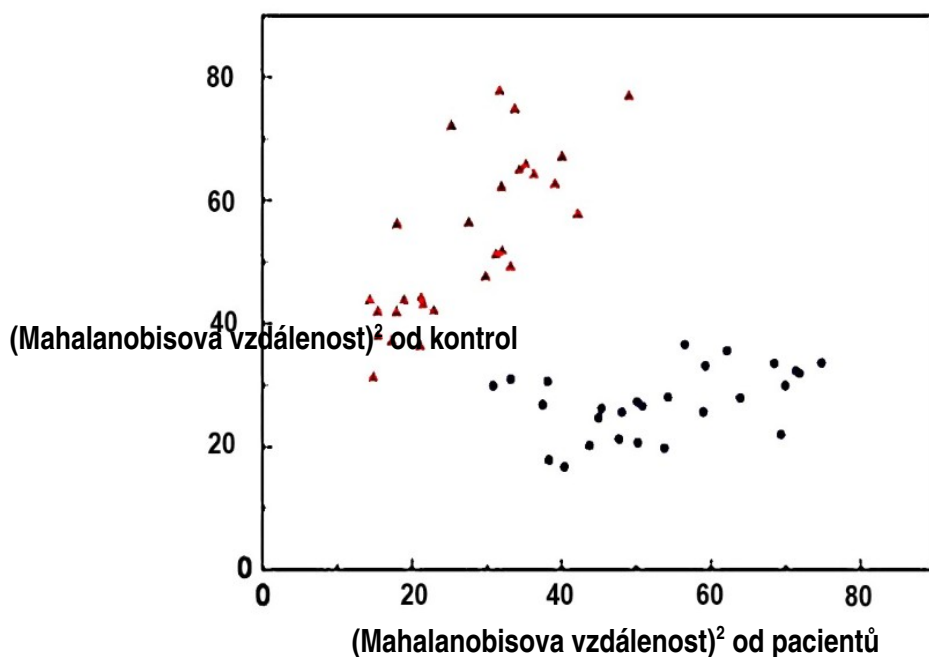


Celková klasifikační schopnost modelů dosáhla 71-81 %, každý model byl zpracován metodou křížové validace (**Tabulka 11**). Nejvyšší senzitivitu (77 %) a specificitu (85 %) vykazovala spektroskopie ECD, zatímco nejnižší senzitivita byla pozorována u ROA a Ramanovy spektroskopie (70 %). Nejnižší specificitu (73 %) vidíme opět u Ramanovy spektroskopie, zatímco u ROA dosáhla 79 %. Statistické vyhodnocení ECD dat potvrdilo, že dosáhly po křížové validaci nejvyšší přesnost (81 %), nejnižší přesnosti (71 %) bylo dosaženo Ramanovou spektroskopií.

Tabulka 11: Výsledky klasifikace vzorků skupin pacientů s kolorektálním karcinomem a kontrolních jedinců metodou LDA (údaje pro křížové validaci, klinická diagnóza – řádky, spektroskopická analýza – sloupce) pro jednotlivé spektroskopické metody

ECD					Raman				
	Karcinom	Kontrola	Celkem	% Správnosti		Karcinom	Kontrola	Celkem	% Správnosti
Karcinom	23	7	30	77 %	Karcinom	21	9	30	70 %
Kontrola	5	28	33	85 %	Kontrola	9	24	33	73 %
Celkem	28	35	63	81 %	Celkem	30	33	63	71 %
ROA					FT-IR				
	Karcinom	Kontrola	Celkem	% Správnosti		Karcinom	Kontrola	Celkem	% Správnosti
Karcinom	21	9	30	70 %	Karcinom	22	8	30	74 %
Kontrola	7	26	33	79 %	Kontrola	6	27	33	81 %
Celkem	28	35	63	74 %	Celkem	28	35	63	77 %

Společným vyhodnocením všech spektroskopických metod došlo k signifikantnímu 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 (**Obrázek 25**). Diskriminační schopnost našeho modelu dosáhla v tomto případě 100 %.



Obrázek 25: Grafické znázornění LDA z kombinace spektrálních dat ECD, Raman, ROA a FT-IR vzorků plazmy pacientů s kolorektálním karcinomem (\blacktriangle) a kontrolní skupiny (\bullet) pomocí druhé mocniny Mahalanobisových vzdáleností

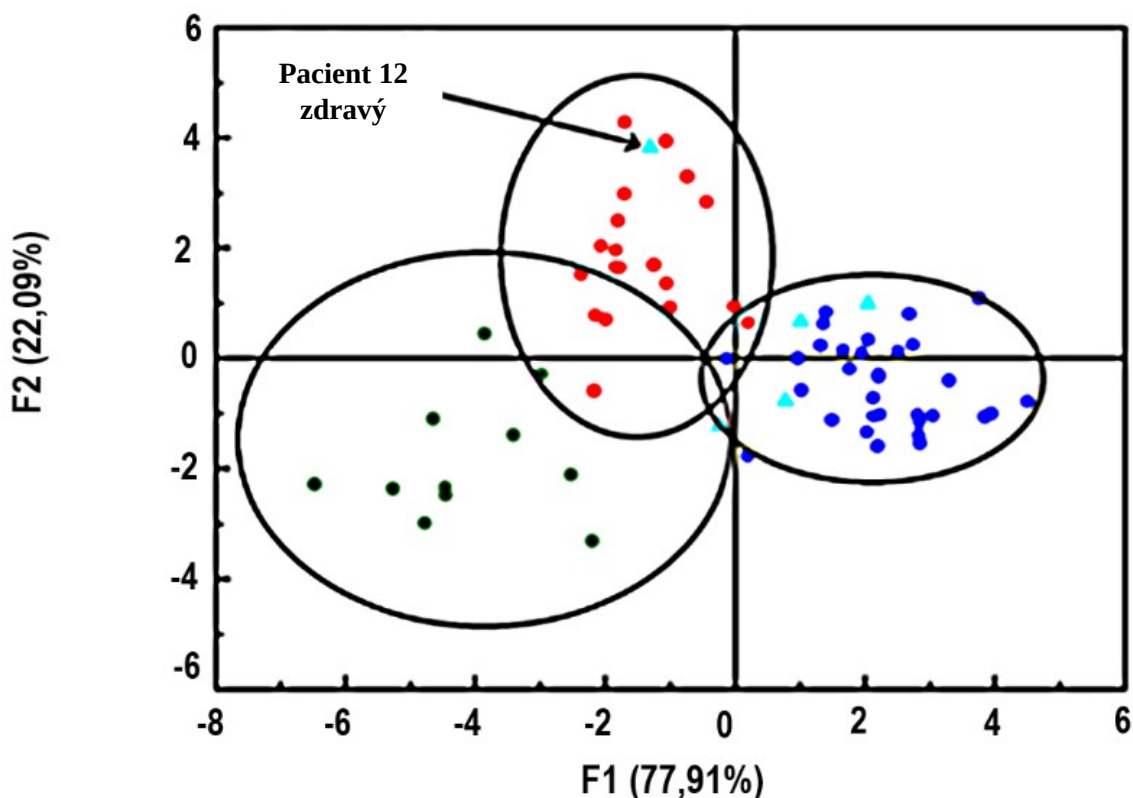
Pro soubor 63 vzorků (30 pacientů a 33 zdravých kontrol) bylo po křížové validaci metodou LDA dosaženo 90 % senzitivity, 75 % specifity a správnosti 83 % (**Tabulka 12**). Nesprávně bylo klasifikováno 8 vzorků z kontrolní skupiny a 3 vzorky ze skupiny pacientů s kolorektálním karcinomem.

Tabulka 12: Výsledky klasifikace vzorků skupin pacientů s kolorektálním karcinomem a kontrolních jedinců metodou LDA (údaje pro křížové validaci, klinická diagnóza – řádky, spektroskopická analýza – sloupce) po vyhodnocení všech spektroskopických metod

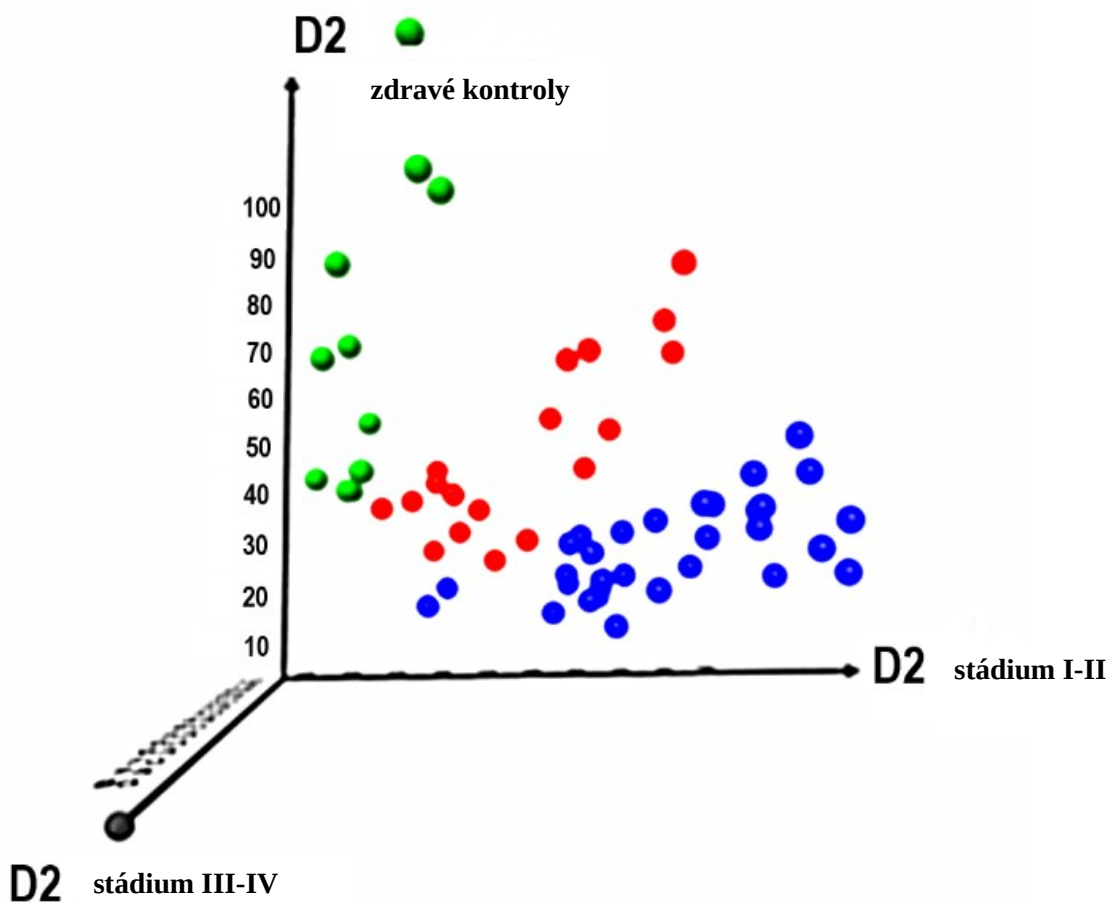
	Karcinom	Kontrola	Celkem	% Správnosti
Karcinom	27	3	30	90 %
Kontrola	8	25	33	75 %
Celkem	35	28	63	83 %

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.

Grafické znázornění výsledků klasifikace metodou LDA je prezentováno na **Obrázku 26**, kde faktory F1 a F2 postihují 100,0% variability spektrálních dat (údaje bez křížové validace) a je dobře zřetelná separace skupiny kontrolních jedinců od skupin pacientů za současného rozlišení lokalizovaných stádií (I+II) a stádií s uzlinovými nebo vzdálenými metastázemi (III+IV). 3D vizualizace výsledků znázorňuje **Obrázek 27**.



Obrázek 26: Grafické výsledky LDA pro kombinaci spektroskopických dat ECD, Raman, ROA a FT-IR: kontrolní skupina (modrá), pacienti s kolorektálním karcinomem stádia I-II (zelená), pacienti s kolorektálním karcinomem stádia III-IV (červená), „zdraví pacienti“ (tyrkysová)



Obrázek 27: 3D grafická prezentace výsledků LDA pro kombinaci ECD, Raman, ROA a FT-IR znázorňující diferenciaci mezi kontrolní skupinou (modrá), pacienty s kolorektálním karcinomem stádia I-II (zelená) a pacienty s kolorektálním karcinomem stádia III-IV (červená)

Na [Obrázku 26](#) jsou ilustrovány i výsledky predikce zdravotního stavu 5 pacientů v remisi (potvrzených dle konvenčního klinického, laboratorního a zobrazovacího vyšetření), 4 pacienti byli zařazeni do skupiny „zdravých jedinců“, u 1 pacienta (Pacient 12 zdravý) byla dle CT vyšetření vyslovena suspekce na generalizaci. Právě tento pacient byl přiřazen do skupiny pacientů ve stádiu III-IV. Z výsledků spektrálních analýz je zřejmé, že námi zvolený model je schopen v souladu s klinickou diagnózou správně predikovat pacienty jako vyléčené (zdravé).

4.2 Analýza tkáně *ex vivo*

4.2.1 Spektrální variabilita vzorků tkáně tlustého střeva

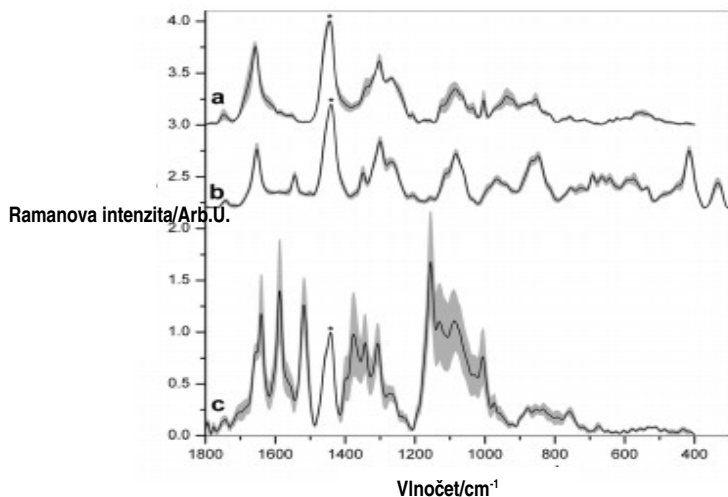
Analýza tkáně je poněkud složitější, protože tkáňové vzorky jsou obecně velmi heterogenním materiálem. Důležitým aspektem k úspěšné spektroskopické diagnóze kolorektálního

karcinomu je podmínka, že interní spektrální variabilita pro vzorky zdravé tkáně tlustého střeva získané od jednoho pacienta nebo od vícero pacientů by měla být méně výrazná, než rozdíly mezi spektry zdravé tkáně a kolorektálního karcinomu. Lépe řečeno, kombinovaná variabilita (ve vztahu k lokalizaci tkáně a pacientovi) by měla být méně signifikantní ve srovnání s rozdíly indukovanými patologickými změnami. V opačném případě by se mělo provést odebrání spektrální variability způsobené abnormalitou tkáně z celkové spektrální variability za pomoci vhodných metod multivariační analýzy. Navíc pro konečný vývoj klinické aplikace spektrální variability způsobené kolorektálním karcinomem by měly být separovány důsledky jiných onemocnění. Vzorky zdravé tkáně tlustého střeva a tkáně kolorektálního karcinomu získané od 14 pacientů byly analyzovány se stanovením různých aspektů spektrální variability.

4.2.1.1 Variabilita dat vzhledem k intra-tkáňové heterogenitě

Z anatomické stránky je tlusté střevo komplexní orgán s heterogenní vícevrstevní strukturou. Kolorektální karcinom zasahuje nejenom sliznici tlustého střeva, ale často prorůstá do hlubších vrstev a postihuje submukózu, svalovou vrstvu nebo okolní tuk. Všechny tyto části tkáně tlustého střeva mají různé chemické složení: proteiny a sacharidy jsou asociovány zejména s povrchovým epitelem (sliznicí) nebo svalovou vrstvou, kolagen je hlavním komponentem submukózy a lipidy převládají v perikolickém tuku.

Průměrné Ramanovo spektrum je výsledkem překrývajících se pásů, které pocházejí z rozličných částí tkáně kolorektálního karcinomu, lokální specifita přispívá k celkové variabilitě spektrálních dat získaných z jednoho vzorku tlustého střeva. Aby bylo pokryto maximum části vzorku, Ramanova spektra (λ_{ex} 1064, 785 and 532 nm) byla získána z 10-20 nezávislých míst daného vzorku normální i patologické tkáně tlustého střeva každého pacienta. Regiony pro každou λ_{ex} zaznamenané měřením zdravé tkáně tlustého střeva ze vzorku jednoho pacienta jsou znázorněny na [Obrázku 28](#).



Obrázek 28: Průměrná Ramanova spektra (černá linie) a směrodatné odchylky (šedé oblasti) zdravé tkáně tlustého střeva (10-20 nezávislých míst) měřená při různé excitační vlnové délce λ_{ex} 1064 nm (a), 785 nm (b) a 532 nm (c) a normalizována na $\sim 1447\text{ cm}^{-1}$ (vyznačeno hvězdičkou)

Individuální spektra získaná z jednoho vzorku tlustého střeva v různých místech demonstrují evidentní variabilitu v specifických spektrálních regionech, ke které přispívají hlavní tkáňové komponenty – lipidy, proteiny, nukleové kyseliny a sacharidy. Pro NIR-FT-Ramanova spektra (λ_{ex} 1064 nm) byla pozorována signifikantní variabilita kolem 1750 cm^{-1} (C=O stretching, tzn. valenční vibrace, vibrace ve směru chemické vazby), 1671 cm^{-1} (amid I), 1340 cm^{-1} (CH_2 wagging, tzn. deformační vějířová vibrace), 1300 cm^{-1} (CH_2 twisting, tzn. deformační krouživá vibrace), 1245 cm^{-1} (amide III) a $1100\text{-}855\text{ cm}^{-1}$ (CC a P=O valenční vibrace, ring breathing vibrace, tzn. prstencová dýchací vibrace aromatického kruhu).

NIR-Vis Ramanova spektra (λ_{ex} 785 nm) demonstrují variabilitu u vlnočtu 1653 cm^{-1} (amid I, C=O valenční vibrace), 1350 cm^{-1} (CH_2 deformační vějířová vibrace), 1285 cm^{-1} (CH_2 deformační krouživá vibrace, amid III) a $1118\text{-}877\text{ cm}^{-1}$ (CC valenční vibrace, prstencová dýchací vibrace aromatického kruhu). Relativní směrodatná odchylka (RSD) signifikantně mezi pásy kolísala a souvisela s podílem specifických vibrací. U NIR-FT Ramanových spekter byla relativní směrodatná odchylka (RSD) lipidového pásu $\sim 1750\text{ cm}^{-1}$ ($\sim 53\%$) výrazně vyšší, než u korespondujících hodnot dvou sousedních pásů 1654 a 1268 cm^{-1} , a to pro podíl proteinu a nenasycených mastných kyselin ($\sim 5\text{-}8\%$). RSD vedlejších pásů 1340 a 1302 cm^{-1} odpovídala zejména vibracím CH_2 a činila 26% a 13% . Relativní intenzita těchto pásů závisela na poměru lipidu k proteinu. Vedlejší pás 1086 cm^{-1} (RSD $\sim 19\%$) může představovat podíl nukleových kyselin a fosfolipidů, zatímco sousedící pás 940 cm^{-1} (RSD $\sim 29\%$) může souviset s CC valenčními vibracemi peptidové kostry v helikální konformaci.

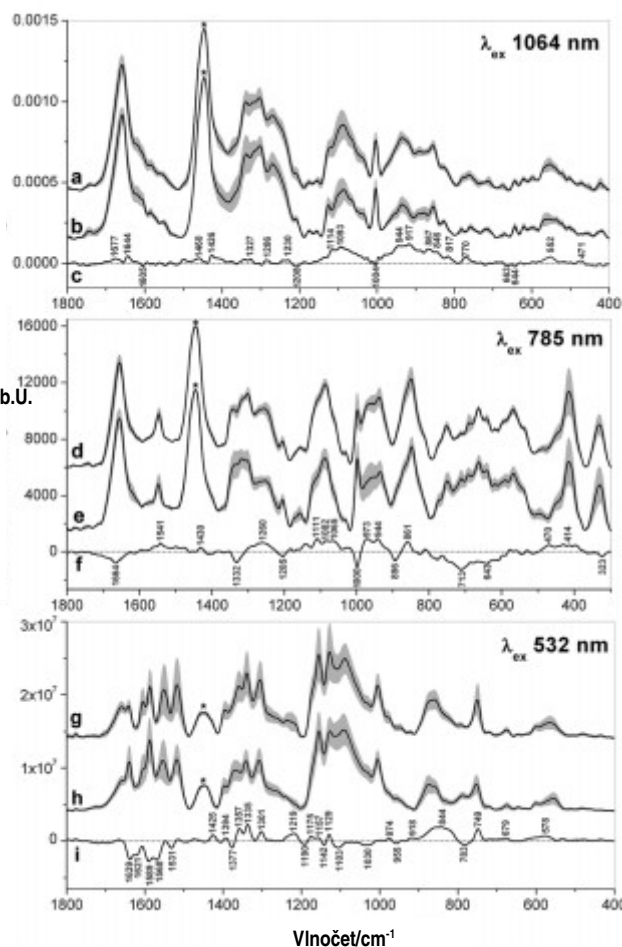
NIR-Vis-Ramanova spektra (λ_{ex} 785 nm) a speciálně Vis-Ramanova spektra (λ_{ex} 532 nm) vykazovaly intenzivní rezonanční zesílené pásy tkáňových chromoforů (hem, karoteinoidy, aj.) absorbovány regiony, které jsou blízké odpovídajícím excitačním liniím.

U Vis-Ramanových spekter (λ_{ex} 532 nm) byla nejvyšší variabilita přisuzována zejména pásům tkáňových chromoforů (RSD 22-35 %), např. 3 intenzivní a úzké pásy karotenoidů u 1514, 1155 a 1006 cm^{-1} a 7 pasů vibrací hemu u 1640, 1587, 1377, 1343, 1308, 1130 a 1088 cm^{-1} . Všechny tyto pásy měly určitý podíl na vibracích zmíněných výše, ale komponenty chromoforu jsou vzhledem k zesílené rezonanci výraznější.

4.2.1.2 Variabilita dat vzhledem k inter-pacientské heterogenitě

Vycházejíc z faktu, že střevní tkáň (zdravá i patologická) je vysoce heterogenní, soubor dat z průměrných spekter získaných z analýzy jednotlivých tkání představoval značnou variabilitu.

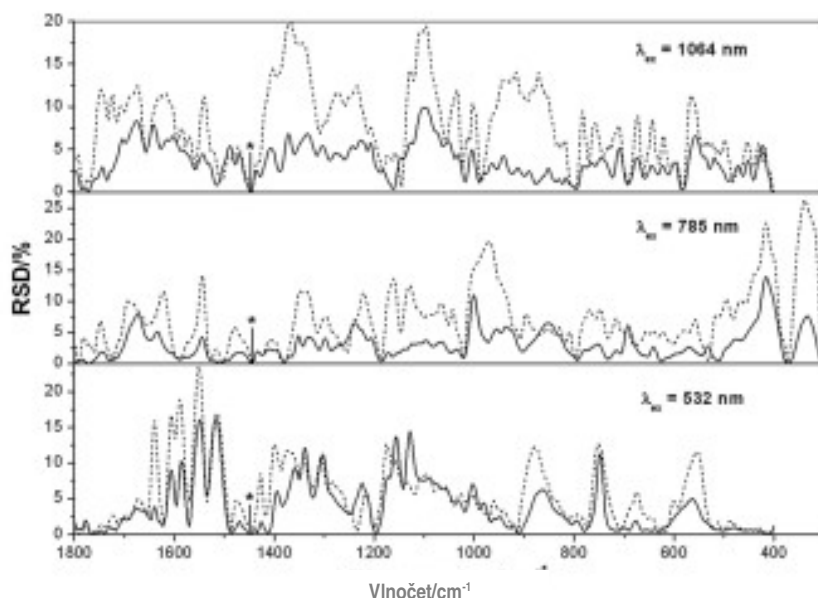
Ke zprůměrování bylo důležité eliminovat efekt kolísání hladin jednotlivých substancí v rámci různých lokalit vzorku. Průměrná spektra byla normalizována podle intenzity pásů u $\sim 1446\text{--}1449 \text{ cm}^{-1}$ (CH_2 deformační nůžková vibrace a CH_3 deformační vibrace u lipidů a proteinů) a byla použita ke kalkulaci průměru celého souboru. Průměrná spektra s intervaly směrodatné odchylky znázorňuje [Obrázek 29](#).



Obrázek 29: Průměrná Ramanova spektra (černá linie) a směrodatné odchylky (šedé oblasti) vzorků zdravé (a,d,g) a patologické (b,e,h) tkáně tlustého střeva získané od 14 pacientů a korespondující rozdíly spekter normálních a patologických (c,f,i); spektra byla měřena při 3 různých excitačních vlnových délkách (λ_{ex} 1064 nm – vrchní panel, 785 nm – střední panel, 532 nm - spodní panel) a normalizována na ~ 1447 cm^{-1} (vyznačeno hvězdičkou)

Rozsah hodnot relativních směrodatných odchylek pro Ramanova spektra normálních a patologických vzorků tkáně tlustého střeva od 14 pacientů ilustruje **Obrázek 30**. Výrazné rozdíly RSD mezi normálními a patologickými vzorky reflektují deviace v tkáňové homeostáze způsobené expanzí maligních lézí. Tento rozdíl může být spojen i s postupem nemoci u každého pacienta. V případě dat z měření NIR-FT-Raman a NIR-Vis Raman (λ_{ex} 1064 a 785 nm) byla spektrální variabilita patologické střevní tkáně (RSD nad 20-26 %) významně vyšší než variabilita normální střevní tkáně.

Co se týče měření Vis-Ramanových spekter (λ_{ex} 532 nm), vyšší variabilita byla detekována u vibračních pásů hemu v regionech 1640–1550 a 1400–1365 cm^{-1} , shodnou nebo nižší variabilitu vykazovaly vibrační pásy karotenoidů v regionech 1514, 1155 a 1006 cm^{-1} , podobně jako několik pásů hemu blízko 1340, 1305 a 1130 cm^{-1} , na které měly významný podíl základní složky tkáně. Struktura hemu jako části myoglobinu a jiné hemoproteiny by mohly představovat sensitivní marker abnormality tkání u kolorektálního karcinomu.



Obrázek 30: Relativní směrodatné odchylky (RSD) Ramanových spekter normální (solidní) a patologické (tečkovité) tkáně tlustého střeva získané od 14 pacientů; spektra byla měřena při 3 různých excitačních vlnových délkách (λ_{ex} 1064 nm – vrchní panel, 785 nm – střední panel, 532 nm – spodní panel) a normalizována na $\sim 1447 \text{ cm}^{-1}$ (vyznačeno hvězdičkou)

4.2.2 Vliv excitační vlnové délky na tkáňové markery

Při srovnávání průměrných Ramanových spekter normální a patologické tkáně tlustého střeva měřených v různých excitačních vlnových délkách (**Obrázek 29**), jsou patrné evidentní rozdíly v pozicích a intenzitách pásů. Přidělení vazeb a význam jednotlivých Ramanových pásů shrnuje **Tabulka 13**.

Pásy hlavních molekulárních komponent, tj. proteinů, lipidů, nukleových kyselin převládají v NIR-FT-Ramanových spektrech (λ_{ex} 1064 nm) normálních a patologických tkání tlustého střeva (**Obrázek 29a-c**). Poměr mezi intenzitami reflektujícími stav tkáně na molekulární úrovni může umožnit vyhledat spektrální markery abnormalit pro diagnostické účely.

Tabulka 13: Pozice a přidělení charakteristických Ramanových pásů citlivých na normální stav (n) a patologické změny (a) tkáně tlustého střeva

Wavenumber (cm ⁻¹)						Assignments ²⁹⁻³⁷	
λ_{ex} 1064 nm		λ_{ex} 785 nm		λ_{ex} 532 nm		Vibration mode	Compounds
n	a	n	a	n	a		
1741	1744	1740	1740			$\nu(C=O)$	Lipids (esters)
1658	1658	1655	1655	1659	1657	Amide I, $\nu(C=C)$	Proteins (α -helix), lipids (unsaturated fatty acids)
				1641	1641	$\nu_{10}-\nu(C_{\alpha}C_{\beta})_{sym}$	Oxy-Mb (haeme core)
				1607	1605	$\nu_{10}-\nu(C_{\alpha}C_{\beta})_{sym}$	Deoxy-Mb (haeme core)
				1587	1587	$\nu_{17}-\nu(C_{\alpha}C_{\beta})_{sym}$	Oxy-Mb (haeme core)
				1552	1554	$\nu_{17}-\nu(C_{\alpha}C_{\beta})_{sym}$	Deoxy-Mb (haeme core)
		1546	1548			$\nu_{11}-\nu(C_{\beta}C_{\gamma})$	Deoxy-Mb (haeme core)
				1517	1517	$\nu(C=C)$	Carotenoids
1447	1447	1445	1446	1449	1446	$\delta(CH_2)$, $\delta_{as}(CH_2)$	Lipids, proteins (aliphatic amino acids)
				1396	1396	$\nu_{20}-\nu(\text{Pyr quarter-ring})$	Mb (haeme core)
				1362	1367	$\nu_4-\nu(\text{Pyr half-ring})_{sym}$	Mb (haeme core)
				1340	1343	$\nu_{41}-\nu(\text{Pyr half-ring})_{sym}$	Mb (haeme core)
1339	1338	1343	1336			$\omega(CH_2, CH_3)$	Lipids, proteins (aliphatic amino acids, Trp)
			1318				
1304	1302	1302	1304			$\tau(CH_2, CH_3)$	Lipids, proteins (aliphatic amino acids)
				1306	1308	$\nu_{21}-\delta_{asym}(C_{\alpha}H)$	Mb (haeme core)
1270	1270	1255	1253			Amide III	Proteins (α -helix), collagen
1208	1208	1205	1205			$\nu(CPH)$	Proteins (Phe)
		1158	1158	1155	1155	$\nu(CC), \nu(CN)$	Proteins, carotenoids
				1129	1127	$\nu_{22}-\nu(\text{Pyr half-ring})_{asym}$	Mb (haeme core)
1126	1126					$\nu(CC), \nu(CN)$	Lipids, proteins
1088	1086	1088	1089	1088	1090	$\nu_1(PO_2^-), \nu(CN), \nu(CC)$	Nucleic acids, lipids, proteins
1004	1004	1000	1000	1006	1006	Ring breathing, $\rho(CH_2)$	Proteins (Phe), carotenoids
935	936	938	937			$\nu(CC)$	Proteins (α -helix), collagen (Pro)
855	854	852	849	860	874	Ring breathing; $\nu(CC)$	Proteins (Tyr), collagen (Pro)
830	827						Proteins (Tyr)
	781			791	789	Ring breathing	Nucleic acids (C, U)
762	758	754	752	749	752	Ring breathing; $\nu_{15}-\nu(\text{Pyr breathing})$	Proteins (Trp), Mb (porphyrin core)
713	716	713	713				Nucleic acids (A)
		690	692			Ring breathing	Nucleic acids (G)
675	670	666	664	676	676	Ring breathing, $\nu(CS)$	Nucleic acids (T), proteins (Cys)
644	644	643	643			$\tau(CC)$	Proteins (Tyr)
621	620	620	620			$\tau(CC)$	Proteins (Phe)
598	599		592				
553	557	569	569	563	555	$\nu(CS), \nu(Fe-O_2)$	Proteins (Cys), oxy-Mb
		416	416			$\delta(Fe-O-O)$	Oxy-Mb
		332	332			$\delta(N_{His}-Fe-O)$	Oxy-Mb

Charakteristické pásy hlavních tkáňových komponent byly taktéž pozorovány i v NIR-Vis-Ramanových spektrech (λ_{ex} 785 nm) (**Obrázek 29d-f**). Nové pásy kolem 753 a 1545 cm⁻¹ jsou přiřazeny k vibracím hemu (Wood B.R., McNaughton D., 2002). Zesílené byly i tři pásy nízkého vlnočtu, které odrážely oxygenovaný hem: 332 cm⁻¹ (N_{His}—Fe—O deformační vibrace), 416 cm⁻¹ (Fe—O—O deformační vibrace) a 569 cm⁻¹ (Fe—O₂ valenční vibrace). U spekter Vis-Raman (λ_{ex} 532 nm) je většina zmíněných charakteristických pásů hlavních tkáňových komponent překryto množstvím nových intenzivních pásů přiřazených k vibračním modům vnitřních tkáňových chromoforů (karotenoidy, hem). Karotenoidy jsou hodně rozšířené u všech typů lidské tkáně. Obsahují systém konjugovaných vazeb C=C a demonstrují absorpci s maximem u 480 nm. Ramanovy pásy karotenoidů ~1517 cm⁻¹ (C=C valenční vibrace), 1157 cm⁻¹ (CC valenční vibrace) a 1005 cm⁻¹ (CH₃ deformační kývavá vibrace) jsou charakterizovány expresivním zesílením na excitační vlnové délce 532 nm.

Makromolekula hemu absorbuje vlnové délky ~400 nm a dále v regionu 500-600 nm. V důsledku toho množství charakteristických pásů hemové skupiny u 1641, 1607, 1587, 1552, 1396, 1362-1367, 1340-1343, 1306-1308, 1127-1129, 749-752 a 6767 cm^{-1} podstupuje rezonanční zesílení ve Vis-Ramanových spektrech (λ_{ex} 532 nm) normálních i patologických vzorků tkáně (Das G. et al., 2008). Tyto hemové skupiny pocházejí zejména z myoglobinu, hlavního proteinu vázajícího kyslík v lidské tkáni.

4.2.3 Spektrální rozdíly způsobeny patologickým procesem ve střevní tkáni

Tří páry průměrných Ramanových spekter (+/- směrodatná odchylka, n=14) byly zaznamenány za rozličné excitační vlnové délky λ_{ex} z normálních (**Obrázek 29a,d,g**) a patologických (**Obrázek 29b,e,h**) tkání tlustého střeva a demonstrují výrazné diference evidentní z korespondujících rozdílových spekter (**Obrázek 29c,f,i**). Pozitivní a negativní vrcholy těchto rozdílových spekter byly využity k diskriminaci vzorků podle molekulární abnormality.

Minima rozdílového NIR-FT-Ramanova spektra (λ_{ex} 1064 nm) (**Obrázek 29c**) u vlnočtu 1605-1519 cm^{-1} (C=C valenční vibrace), 1208 cm^{-1} (C—Ph valenční vibrace), 1004 cm^{-1} (valenční symetrická prstencová dýchací vibrace C—C náležící fenylyalaninu) a 644 cm^{-1} (CC deformační krouživá vibrace) naznačují vibrace aromatických aminokyselin. Naopak, maxima tohoto spektra u vlnočtu 1677 a 1644 cm^{-1} (amid I), 1460 cm^{-1} (CH_2 deformační nůžková vibrace), 1327 cm^{-1} (CH_2 a CH_3 deformační vějířová vibrace), 1283 a 1230 cm^{-1} (amid III) a 1114-917 cm^{-1} (CC a CN valenční vibrace) pocházejí zejména ze skeletálních vibrací peptidových vazeb a alifatických řetězců. Negativní pík u vlnočtu 663 cm^{-1} (CS valenční vibrace) a pozitivní u 552 cm^{-1} (SS valenční vibrace) jsou odrazem destrukce disulfidové vazby u patologické střevní tkáně. Pozorované spektroskopické rozdíly mohou být vysvětlovány strukturální reorganizací nativních proteinů u patologicky změněné tkáně tlustého střeva. Navíc, dva negativní pásy u vlnočtu 1748 cm^{-1} (C=O valenční vibrace) a 1298 cm^{-1} (CH_2 a CH_3 deformační krouživá vibrace, $\delta\text{CH—}$ deformační vibrace) jsou markery pro tkáňové lipidy. Zvyšování těchto pásů v případě patologicky změněné tkáně tlustého střeva může být vysvětleno tím, že podle histopatologického vyšetření byla popsána perikolická tuková vrstva u 6 ze 14 pacientů. Spektra vzorků tkáně tlustého střeva obsahující perikolický tuk podobně vykazovaly signifikantní snížení v pásu u 1088 cm^{-1} (PO^{2-} valenční vibrace fosfolipidů a nukleových kyselin).

Rozdílové NIR-Vis-Ramanovo spektrum (λ_{ex} 785 nm) (**Obrázek 29f**) má několik minim, a to u vlnočtu 1605, 1205, 1000 a 643 cm^{-1} , které pocházejí z vibrací aromatických aminokyselin. Maxima u 1260 cm^{-1} (amid III) a 944 cm^{-1} (CC valenční vibrace) mohou reflektovat poškození proteinů ve střevě způsobené patologickým procesem. Tyto pásy jsou přiřazeny alfa-helikálním strukturám, které dominují u proteinů normální střevní tkáně (Tuma R., 2005; Iconomidou V.A. et al, 2000).

Několik překrývajících se negativních odlišných pásů v regionu 800-550 cm^{-1} vychází z prstencové dýchací vibrace aromatického kruhu nukleotidů a aromatických aminokyselin. Vyšší intenzita proteinových pásů a pásů DNA ve spektrech patologicky změněné tkáně tlustého střeva může korelovat s vyšším stupněm divizní aktivity. Pozitivní a negativní pásy související s prstencovou dýchací vibrací aromatického kruhu tyrozinu byly pozorovány u vlnočtu 861 a 826 cm^{-1} , s touto aminokyselinou je asociován i negativní pás u 643 cm^{-1} . Tyto pásy mohou svědčit pro odchylky v molekulárním prostředí tyrozinových jednotek v proteinech.

Pásy vibrací jádra porfyriu (hemu) převažují ve Vis-Ramanových spektrech (λ_{ex} 532 nm) normálních i patologicky změněných tkání tlustého střeva. Rozdílové Vis-Raman spektrum (**Obrázek 29i**) má několik negativních pásů vibrací porfyriu jádra, a to u vlnočtů 1639, 1621, 1589, 1568, 1377, 1190, 1142, 1103, 955 a 783 cm^{-1} . Nicméně, ostatní porfyriu vibrace byly nalezeny jako pozitivní pásy u 1607, 1547, 1394, 1357, 1335, 1301, 1219, 1175, 1129, 974, 749 a 679 cm^{-1} . Některé z těchto pásů jsou sensitivní na oxidaci/redukci a rotační stav kationu železa v hemu (Yamamoto T. et al, 1973; Wood B.R. et al, 2001).

Pozitivní pásy u 1607, 1547 a 1357 cm^{-1} jsou charakteristické pro vysoký rotační stav deoxyhemu, přičemž tři negativní pásy u vlnočtu 1639, 1589 a 1377 cm^{-1} představují markery nízkého rotačního a oxidovaného stavu hemu. Podobně i v rozdílovém NIR-Vis-Ramanovém spektru pochází pozitivní pás u vlnočtu 1541 cm^{-1} z vibrací deoxyhemu. Z toho důvodu je oxidovaný hem víc typický pro patologicky změněnou tkáň tlustého střeva a deoxidovaný hem pro normální tkáň tlustého střeva.

Hem je prostetická skupina obsahující atom železa ve středu tetrapyrrolového jádra, na něj jsou navázány substituenty. Demonstruje prooxidační vlastnosti. Jedná se o tkáňový pigment, jeho červená barva je způsobena konjugovaným systémem dvojných vazeb, kvůli kterému se dobře excituje a následně emituje červenou část spektra viditelného světla. Hem je součástí mnohých enzymů a transportních proteinů, mezi které patří i myoglobin. V normálním svalu

je koncentrace oxidovaného (navazujícího kyslík) myoglobinu, tj. metmyoglobinu, nízká kvůli přítomnosti metmyoglobin reduktázy, která v přítomnosti kofaktoru NADH a koenzymu cytochromu b4 mění hemové železo Fe^{3+} metmyoglobinu zpátky na Fe^{2+} deoxidované formy (Khalife K.H. et al, 2008). Myoglobin nehraje jen klíčovou roli v transportu kyslíku, ale účastní se i vychytávání volných radikálů. Vysoká hladina myoglobinu byla zjištěna ve tkáních s nízkou koncentrací kyslíku jako buněčné odpovědi na hypoxii. Co se týče svalových buněk, byla pozorována vysoká exprese hemoproteinu v buňkách karcinomu (Flonta S.E. et al, 2009). Tato skutečnost je pravděpodobně spojena s překonáváním metabolických změn asociovaných s růstem nádoru.

4.2.4 Statistické vyhodnocení

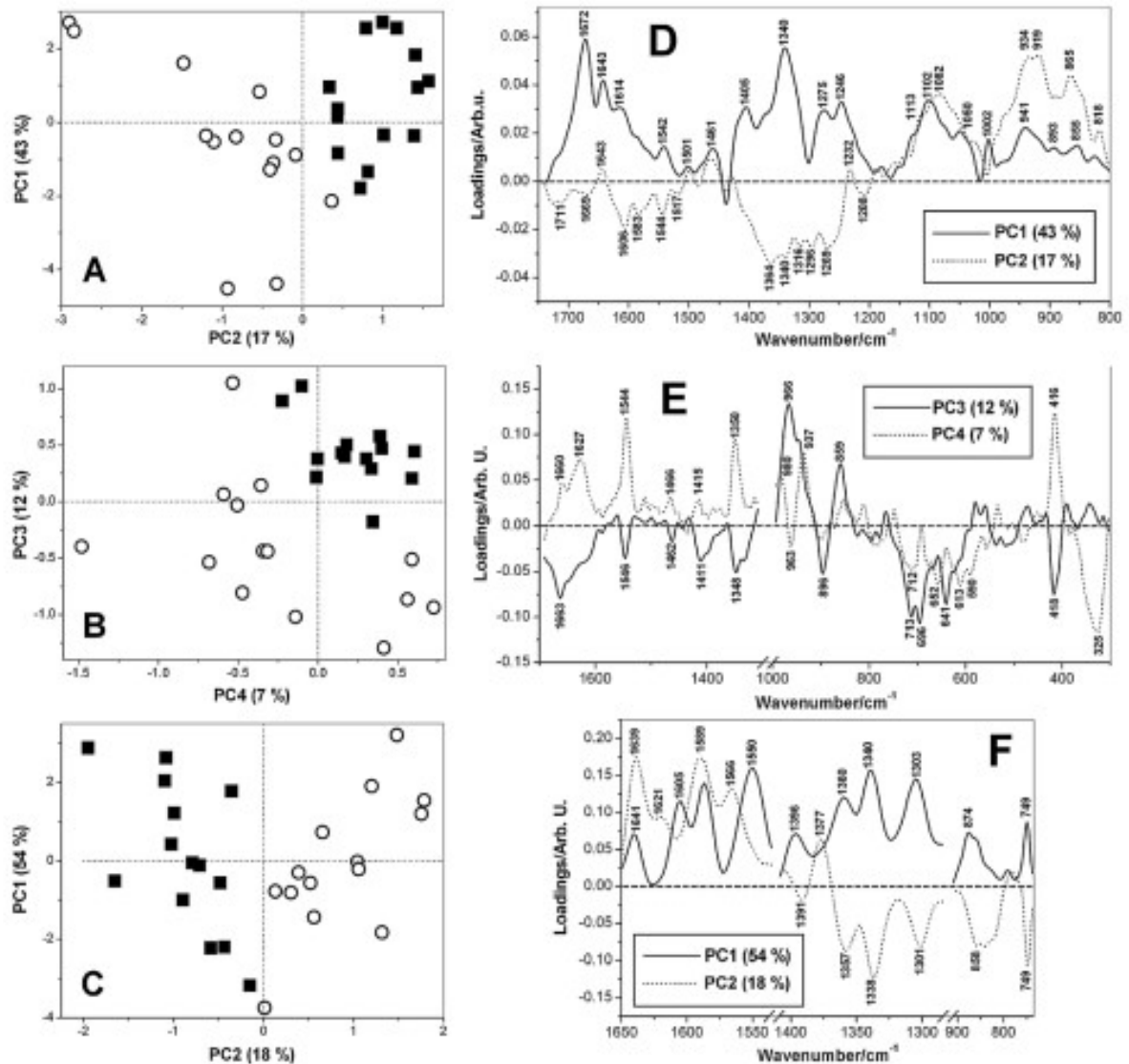
Průměrná Ramanova spektra vzorků tkáně tlustého střeva ($n = 28$) měřena na každé excitační linii byla analyzována formou PCA (analýza hlavních komponent) za účelem rozlišení normálních a patologicky změněných tkání. Průměrné PC2 (NIR-FT a Vis-Raman) a PC3/PC4 (NIR-Vis-Raman) skóre ukázaly signifikantní rozdíly mezi těmito dvěma soubory. Tyto komponenty byly označeny jako hlavní diskriminanty. I když PC1 zahrnoval největší rozptyl dat (43 % pro NIR-FT Raman, 35 % pro NIR-Vis-Raman a 64 % pro Vis-Raman), nebyla prokázána signifikantní diference mezi skupinami.

Následně se vytvořilo dvoudimenzionální PC skóre (**Obrázek 31a-c**) zahrnující hlavní komponenty (PCs) zmíněné výše, např. PC1 versus PC2 pro NIR-FT-Raman a Vis-Raman a PC3 versus PC4 pro NIR-Vis-Raman. Výsledné grafy těchto párů hlavních komponent znázorňuje **Obrázek 31d-f**. Tyto kombinace byly nejvíc validní, co se týče diskriminace mezi vzorky zdravé a patologicky změněné tkáně tlustého střeva.

PCA/NIR-FT-Raman ($1750-800\text{ cm}^{-1}$)

Všechny zdravé vzorky tkáně měly pozitivní PC2 skóre, přičemž většina těch patologicky změněných měla PC2 skóre negativní (**Obrázek 31a**). Distribuce v rámci PC1 skóre byla podobná pro obě skupiny, 2 patologické vzorky tkáně tlustého střeva vykazovaly extrémně nízké hodnoty PC1 skóre. Výsledná křivka pro PC1 měla hlavně pozitivní pásy, zatímco PC2 křivka měla pásy pozitivní i negativní (**Obrázek 31d**). Tyto pásy korespondují s charakteristickými vibracemi hlavních tkáňových komponent, zejména proteinů a lipidů (**Tabulka 9**). Tyto molekuly se u různých vlnových délek významně překrývají, proto je velmi složité přesně určit, které proteiny nebo lipidy jsou odpovědné za spektroskopické změny.

Obrázek 31: Grafy komponentního skóre (a-c) a výsledné zatěžovací grafy pro PCA (d-f) Ramanových spekter ($n=28$) vzorků zdravé (plné čtverce) a patologicky změněné (prázdné kruhy) tkáně tlustého střeva získaných od 14 pacientů; spektra byla měřena při 3 různých excitačních vlnových délkách (λ_{ex}) 1064 nm (a,d), 785 nm (b,e) a 532 nm (c,f).



Výrazně negativní PC2 pásy byly nalezeny v regionech 1720–1517 cm⁻¹ (C=C a C=O valenční vibrace zahrnující amide I) a 1364–1208 cm⁻¹ (CH₂ a CH₃ deformační vibrace, amid III); intenzivně pozitivní pásy u vlnočtu 1113–818 cm⁻¹ (CC a CN valenční vibrace, prstencová dýchací vibrace aromatického kruhu). Je důležité poznamenat, že tato křivka má několik negativních a pozitivních pásů vibrací amidu I a amidů III u vlnočtů 1669, 1643, 1269 a 1232 cm⁻¹, které jsou citlivé na konformaci proteinů (Synytsya A. et al, 2013; Mirtič A, Grdadolnik J.,2013; Huang Y.Y. et al, 2010).

PCA/NIR-Vis-Raman (1700–1300 a 1000-300 cm^{-1})

Normální a patologicky změněné vzorky tkáně byly částečně rozlišené kombinací skóre PC3 a PC4, přičemž byly obě pozitivní pro zdravé i patologicky změněné vzorky tkáně tlustého střeva a negativní pro většinu těch patologicky změněných (**Obrázek 31b**). Výsledný graf těchto hlavních komponent ukázal, že je zde několik výrazných pásů na podobné pozici, ale opačných pólů (**Obrázek 31e**). Naopak, obě hlavní komponenta měla pozitivní pásy v regionu 713 a 690 cm^{-1} (vibrace nukleotidů a aromatických aminokyselin) (Synytsya A. et al, 2004; Puppels G.J. et al, 1991; Gašior-Głogowska M. et al, 2013). Rezonancí zesílené pásy u vlnočtu 1544, 416 a 325 cm^{-1} (vibrace hemu) se podílejí na pozitivních i negativních pásech.

PCA/Vis-Raman (1650–1535, 1408–1200 a 912–738 cm^{-1})

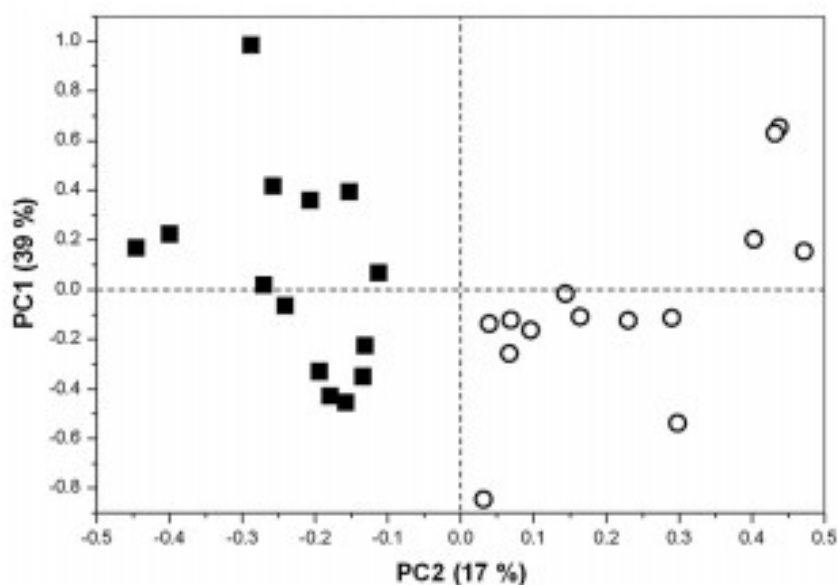
Hlavní diskriminant PC2 umístil normální a patologicky změněné vzorky tkáně tlustého střeva do negativních a pozitivních oblastí skórovacího grafu (**Obrázek 31c**). Následná křivka pro PC2 má negativní pásy u 1639, 1589 a 1377 cm^{-1} , které jsou charakteristické pro oxy-hem (**Obrázek 31f**). Na druhé straně, PC1 rozlišuje vzorky na základě relativního množství hemu. Křivka zde následně vykazuje intenzivní pozitivní píky, charakteristické pro vibrace hemu. PC1 skóre tedy narůstá vlivem těchto pásů (**Obrázek 31c,f**). Dva vzorky měly extrémně nízké PC1 skóre a jejich Vis-Ramanova spektra demonstrovaly nejslabší pásy hemových vibrací z celého souboru vzorků. Tyto vzorky byly získané od jednoho pacienta a histopatologické vyšetření zde potvrdilo vysoké zastoupení perikolického tuku.

Na základě rozdílových spekter (**Obrázek 29c,f,i**) a křivek hlavních komponent (**Obrázek 31d-f**), byly zkoumány Ramanové intenzity pásů s očekávanou sensitivitou ke tkáňové abnormalitě jako proměnné pomocí PCA (analýzy hlavních komponent) s cílem dosáhnout efektivnější diskriminaci. Vlnové délky 30 vybraných pásů (9 z NIR-FT-Raman, 13 z NIR-Vis-Raman a 11 u Vis-Raman) jsou shrnuty v **Tabulce 14**; ostatní pásy byly z databáze odebrány. Výsledné PCA skóre grafu PC1 versus PC2 (**Obrázek 32**) demonstruje kompletní separaci normální a patologické tkáně kolorektálního karcinomu pro 14 pacientů.

Tabulka 14: Charakteristické vlnočty Ramanových markerů (ν cm^{-1}) využitých pro diskriminaci normálních a patologických vzorků tlustého střeva pomocí PCA

Vlnočty (cm^{-1})		
$\lambda_{\text{ex}} 1064 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{ex}} 785 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{ex}} 532 \text{ nm}$
1643	1350	1639
1606	980	1621
1364	965	1589
1340	937	1566
1316	896	1394
934	859	1377
865	713	1360
818	696	1338
	656	1303
	641	858
	613	749
	590	
	325	

Obrázek 32: Graf komponentního skóre PC1 versus PC2 pro PCA intenzity pro 33 charakteristických pásů jako Ramanových markerů: diskriminace vzorků zdravé (plné čtverce) a patologicky změněné (otevřené kruhy) tkáně tlustého střeva získaných od 14 pacientů; spektra byla měřena při 3 různých excitačních vlnových délkách ($\lambda_{\text{ex}} 1064 \text{ nm} - 9$ pásů, $785 \text{ nm} - 13$ pásů a $532 \text{ nm} - 11$ pásů) a normalizována na 1447 cm^{-1}

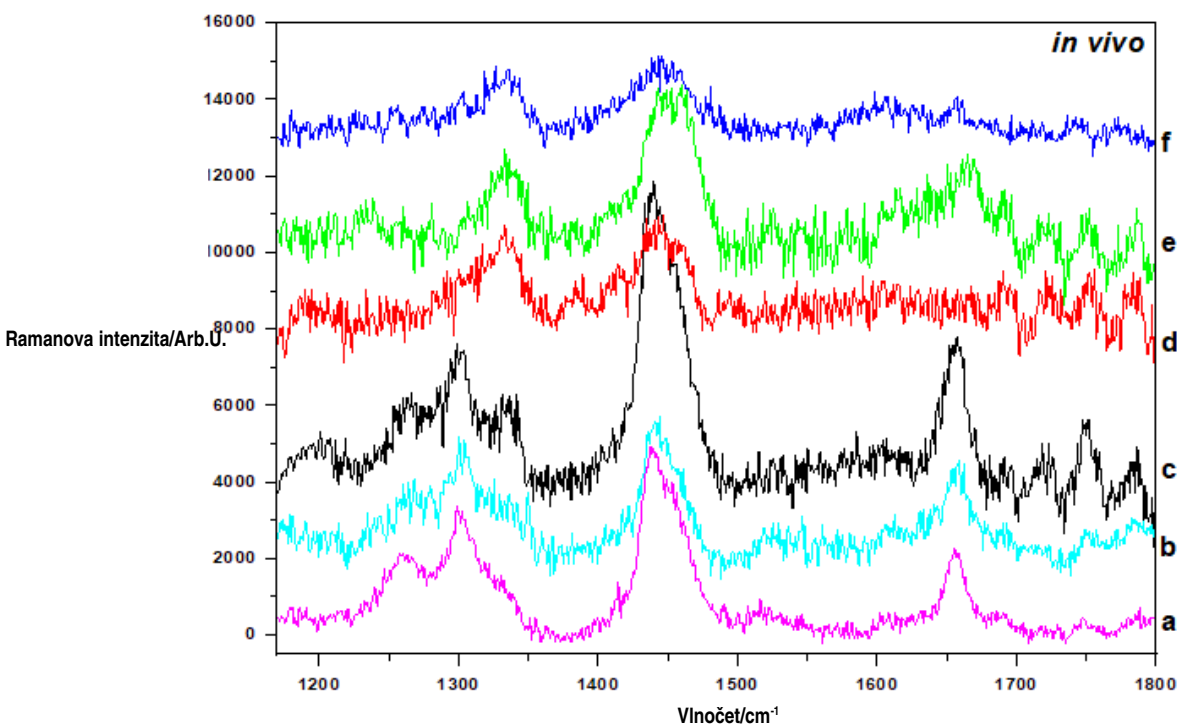


Souhrnem můžeme říct, že v závislosti na jednotlivých Ramanových spektrech (λ_{ex} 1064, 785 and 532 nm) bylo dosaženo jen částečné separace 2 zmíněných skupin. Na druhé straně, PCA kombinované databáze obsahující normalizované Ramanové intenzity vybraných charakteristik NIR-FT, NIR-Vis nebo Vis-Ramanových pásů vedla k mnohem efektivnější diskriminaci normálních a patologicky změněných vzorků tkání tlustého střeva pro 14 pacientů. Z toho důvodu není žádná ze zde využitých excitačních vlnových délek superiorní vůči ostatním, kombinace všech tří může pomoci překonat slabé stránky každé metody a nabízí lepší možnosti k detekci abnormalit způsobených kolorektálním karcinomem.

4.3 Analýza tkáně *in vivo*

Náš výzkum analýzy tkáně tlustého střeva Ramanovou spektroskopií pomocí sondy *in vivo* probíhá jen několik měsíců, probíhá měření a sběr spektroskopických a histopatologických dat. V plánu máme zařadit a vyšetřit vzorky od 60-80 pacientů ročně. Jako příklad uvádím vybraná prozatím nasbíraná charakteristická *in vivo* spektra tkáně, následně po exstirpaci měřena *ex vivo*, u každé určité patologie ověřené histopatologickým vyšetřením (**Obrázek 33 a 34**).

Obrázek 33: Ramanova spektra tkáně tlustého střeva naměřena *in vivo* dle histopatologické diagnostiky: a) normální sliznice; b) normální sliznice; c) polyp rekta, hist. serrated léze bez dysplastických změn; d) polyp c. ascendes, hist. tubulární adenom s low grade dysplastickými změnami; e) polyp rekta, hist. tubulovilózní adenom s low grade dysplastickými změnami



Obrázek 34: Ramanova spektra tkáně tlustého střeva naměřena po exstirpaci ex vivo dle histopatologické diagnostiky:

S004) polyp rekta, hist. adenom s low grade dysplastickými změnami

S005) polyp colon ascendens, hist. adenom s low grade dysplastickými změnami

S009) tumor colon ascendens, hist. středně diferencovaný invazivní adenokarcinom

S012) polyp colon sigmoideum, hist. adenom s low grade dysplastickými změnami

S013) polyp colon sigmoideum, hist. adenom s low grade dysplastickými změnami

S018) tumor rektosigmoidea, hist. dobře diferencovaný invazivní adenokarcinom

S021) tumor rekta, hist. dobře diferencovaný invazivní adenokarcinom

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 metabolity, které jsou s tumorem asociovány. K rozdílům v kompozici proteinů a k změnám prostředí fluoroforů dochází na základě alterace jejich fyzikálně-chemických vlastností.

4.4.2 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 (λ_{ex} 1064 nm) a NIR-Vis-Ramanových spektrech (λ_{ex} 785nm), zatímco kvůli rezonančnímu zesílení převažují ve spektrech Vis-Raman (λ_{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-Ramano a Vis-Ramano 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.

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 tkáň 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 časně 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 časně diagnostiky a následně urychlení intervence v terapii kolorektálního karcinomu, která je podmínkou pro zlepšení stále neutěšených výsledků léčby nemocných v našem oboru.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Číslo	Název obrázku	Strana
1	Anatomické lokalizace a sublokalizace kolorektálního karcinomu	11
2	Časový vývoj incidence a mortality pro diagnózu kolorektálního karcinomu v ČR	14
3	Srovnání incidence a mortality kolorektálního karcinomu v ČR s ostatními zeměmi světa v r. 2018 u obou pohlaví	15
4	Časový vývoj zastoupení jednotlivých klinických stádií kolorektálního karcinomu v ČR	16
5	Hlavní molekulární dráhy patogeneze kolorektálního karcinomu	18
6	Signální dráhy aktivované přes EGFR	28
7	Spektrum elektromagnetického záření	31
8	Typické infračervené absorpční pásy různých typů vazeb pro vlnočty 4000-500 cm ⁻¹	32
9	Schéma přechodů mezi různými energetickými stavy molekul při excitaci v blízké infračervené oblasti	35
10	Příklad průměrného Ramanova spektra buňky karcinomu plic	36
11	Příklad průměrného Ramanova spektra – „fingerprint“ buňky cervikálního karcinomu	36
12	Schéma uspořádání Ramanova spektrometru	37
13	Srovnání Ramanových map s mikroskopickými obrazy	39
14	Podstata cirkulárního dichroismu	43
15	Spektra ECD charakteristická pro jednotlivé konformace proteinů a peptidů	44
16	Experimentální uspořádání ROA pro ICP (a) a SCP (b)	46
17	Spektra ROA charakteristická pro α -helix a β -konformaci proteinů	47
18	NIR-FT Ramanova (A) a NIR-Vis-Ramanova (B) spektra zdravé tkáně kolorektálního karcinomu zaznamenaná z jednoho místa a akumulována v průběhu různých intervalů skenování	61
19	Schéma projektu zobrazující analýzu tkáně tlustého střeva in vivo Ramanovou spektroskopií pomocí Ramanovy sondy při kolonoskopickém vyšetření	62
20	Průměrná absorpční IČ spektra s Fourierovou transformací vzorků krevní plazmy pacientů s kolorektálním karcinomem a kontrolních jedinců	65
21	Průměrná Ramanova spektra krevní plazmy pacientů s kolorektálním karcinomem a kontrolních jedinců	66
22	Průměrná ROA spektra krevní plazmy pacientů s kolorektálním karcinomem a kontrolních jedinců	68
23	Průměrná ECD spektra krevní plazmy pacientů s kolorektálním karcinomem a kontrolních jedinců	69
24	Grafické znázornění LDA ze spektrálních dat vzorků krevní plazmy pacientů s kolorektálním karcinomem a kontrolní skupiny pomocí druhé mocniny	71

Mahalanobisových vzdáleností pro individuální spektroskopické metody		
25	Grafické znázornění LDA z kombinace spektrálních dat ECD, Raman, ROA a FT-IR vzorků plazmy pacientů s kolorektálním karcinomem a kontrolní skupiny pomocí druhé mocniny Mahalanobisových vzdáleností	72
26	Grafické výsledky LDA pro kombinaci spektroskopických dat ECD, Raman, ROA a FT-IR: kontrolní skupina, pacienti s kolorektálním karcinomem stádia I-II, pacienti s kolorektálním karcinomem stádia III-IV, „zdraví pacienti“	73
27	3D grafická prezentace výsledků LDA pro kombinaci ECD, Raman, ROA a FT-IR znázorňující diferenciaci mezi kontrolní skupinou, pacienty s kolorektálním karcinomem stádia I-II a pacienty s kolorektálním karcinomem stádia III-IV	74
28	Průměrná Ramanova spektra a směrodatné odchylky zdravé tkáně tlustého střeva (10-20 nezávislých míst) měřená při různé excitační vlnové délce λ_{ex} 1064 nm (a), 785 nm (b) a 532 nm (c) a normalizována na $\sim 1447 \text{ cm}^{-1}$	75
29	Průměrná Ramanova spektra a směrodatné odchylky vzorků zdravé (a,d,g) a patologické (b,e,h) tkáně tlustého střeva získané od 14 pacientů a korespondující rozdíly spekter normálních a patologických (c,f,i); spektra byla měřena při 3 různých excitačních vlnových délkách (λ_{ex} 1064 nm – vrchní panel, 785 nm – střední panel, 532 nm - spodní panel) a normalizována na $\sim 1447 \text{ cm}^{-1}$	76
30	Relativní směrodatné odchylky (RSD) Ramanových spekter normální a patologické tkáně tlustého střeva získané od 14 pacientů; spektra byla měřena při 3 různých excitačních vlnových délkách (λ_{ex} 1064 nm – vrchní panel, 785 nm – střední panel, 532 nm – spodní panel) a normalizována na $\sim 1447 \text{ cm}^{-1}$	78
31	Grafy komponentního skóre (a-c) a výsledné zatěžovací grafy pro PCA Ramanových spekter (n=28) vzorků zdravé a patologicky změněné tkáně tlustého střeva získaných od 14 pacientů; spektra byla měřena při 3 různých excitačních vlnových délkách (λ_{ex}) 1064 nm (a,d), 785 nm (b,e) a 532 nm (c,f).	83
32	Graf komponentního skóre PC1 versus PC2 pro PCA intenzity pro 33 charakteristických pásů jako Ramanových markerů: diskriminace vzorků zdravé (plné čtverce) a patologicky změněné (otevřené kruhy) tkáně tlustého střeva získaných od 14 pacientů; spektra byla měřena při 3 různých excitačních vlnových délkách (λ_{ex} 1064 nm – 9 pásů, 785 nm – 13 pásů a 532 nm – 11 pásů) a normalizována na 1447 cm^{-1}	85
33	Ramanova spektra tkáně tlustého střeva naměřena <i>in vivo</i> dle histopatologické diagnostiky	86
34	Ramanova spektra tkáně tlustého střeva naměřena po exstirpaci <i>ex vivo</i> dle histopatologické diagnostiky	87

SEZNAM TABULEK

Číslo	Název tabulky	Strana
1	Regionální lymfatické uzliny dle anatomické lokalizace	12
2	TNM klasifikace kolorektálního karcinomu	13
3	Časový vývoj počtu vyšetřených osob a zachycených kolorektálních neoplázií v programu screeningu kolorektálního karcinomu	23
4	Optimální diagnostický postup u kolorektálního karcinomu	27
5	Přehled charakteristiky pacientů s kolorektálním karcinomem	53
6	Charakteristika pacientů s kolorektálním karcinomem – souhrn	53
7	Vybrané biochemické parametry získané měřením plazmy pacientů s kolorektálním karcinomem a zdravých kontrol	54
8	Charakteristika pacientů s kolorektálním karcinomem k <i>in vivo</i> analýze	59
9	Podmínky pro měření vzorků tkání tlustého střeva Ramanovou spektroskopií s různou excitační vlnovou délkou	60
10	Významné pásy vzorků krevní plazmy v Ramanových spektrech a jejich přiřazení k charakteristickým vibračním biomolekul	67
11	Výsledky klasifikace vzorků skupin pacientů s kolorektálním karcinomem a kontrolních jedinců metodou LDA pro jednotlivé spektroskopické metody	72
12	Výsledky klasifikace vzorků skupin pacientů s kolorektálním karcinomem a kontrolních jedinců metodou LDA po vyhodnocení všech spektroskopických metod	73
13	Charakteristické vlnočty Ramanových markerů (v cm^{-1}) využitých pro diskriminaci normálních a patologických vzorků tlustého střeva pomocí PCA	79
14	Charakteristické vlnočty Ramanových markerů (v cm^{-1}) využitých pro diskriminaci normálních a patologických vzorků tlustého střeva pomocí PCA	85

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
- 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.
- 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>
- Jasperon 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 system 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
- 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 germline 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 (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.
- Zaanen 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 PŘÍLOH

1. 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.

(5letý IF= 2,792)

2. 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.

(5letý IF= 3,444)

3. **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.

(5letý IF=1,780)