

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭЛЛИПСОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА ПРИ ИЗМЕРЕНИИ ВБЛИЗИ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА В ДИАГНОСТИКЕ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

DOI: 10.17691/stm2019.11.2.10

УДК 616.345–006.6–073.5

Поступила 1.03.2018 г.

© **В.Н. Кручинин**, к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории эллипсометрии¹;
М.В. Кручинина, д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории гастроэнтерологии²;
доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней³;
Я.И. Прудникова, аспирант лаборатории гастроэнтерологии²;
Е.В. Спесивцев, к.техн.н., старший научный сотрудник лаборатории эллипсометрии¹;
С.В. Рыхлицкий, к.техн.н., руководитель лаборатории эллипсометрии¹;
С.Е. Пельтек, к.б.н., руководитель лаборатории молекулярных биотехнологий⁴;
С.В. Шеховцов, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярных биотехнологий⁴;
Г.В. Шувалов, к.техн.н., директор⁵

¹Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова Сибирского отделения РАН, проспект Академика Лаврентьева, 13, Новосибирск, 630090;

²НИИ терапии и профилактической медицины — филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, ул. Б. Богаткова, 175/1, Новосибирск, 630089;

³Новосибирский государственный медицинский университет, Красный проспект, 52, Новосибирск, 630091;

⁴Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090;

⁵Сибирский государственный ордена Трудового Красного Знамени НИИ метрологии, проспект Димитрова, 4, Новосибирск, 630004

Цель исследования — оценить возможности использования эллипсометрического аналитического комплекса для повышения чувствительности современных малоинвазивных экспрессных оптических методов, основанных на анализе отражения поляризованного света вблизи наблюдаемого поверхностного плазмонного резонанса при полном внутреннем отражении в диагностике колоректального рака у пациентов с различной локализацией метастазов.

Материалы и методы. Исследована специфическая высокочувствительная реакция моноклональных антител, иммобилизованных на поверхности чипов, с опухолевой М2-пируваткиназой сыворотки крови условно здоровых лиц без онкологической патологии и патологии внутренних органов (n=19) и больных колоректальным раком различных локализаций (n=49), разделенных на три подгруппы в зависимости от локализации метастазов: 1-я подгруппа — местно-регионарный колоректальный рак (n=15); 2-я — только печеночные метастазы (n=18); 3-я — внепеченочные метастазы (n=16). Определение концентраций опухолевой М2-пируваткиназы происходило в процессе ее взаимодействия с моноклональными антителами. Детекцию реакции осуществляли путем измерения изменений показателя преломления приповерхностной области чипа с помощью высокочувствительных оптических систем, основанных на измерении состояния поляризации света вблизи наблюдения поверхностного плазмонного резонанса.

Результаты. Взаимодействие опухолевой М2-пируваткиназы сыворотки крови с антителами приводит к заметному изменению оптических свойств среды, что говорит о высокой специфичности данной реакции. Обнаружены достоверные различия равновес-

Для контактов: Кручинин Владимир Николаевич, e-mail: vladd.kruch@yandex.ru

ных величин уровня опухолевой M2-пируваткиназы в сыворотке крови, превышающие 20-кратный уровень, как в группах здоровых лиц и пациентов, больных колоректальным раком, так и в группах больных колоректальным раком с метастазами различных локализаций. Диагностическая эффективность оптических методов в определении опухолевой M2-пируваткиназы сыворотки крови при выявлении колоректального рака подтверждена данными последующего ROC-анализа.

Заключение. Полученные результаты перспективны для разработки методов ранней диагностики колоректального рака, выявления метастазов различных локализаций, в перспективе — рецидивов заболевания, а также для контроля за качеством проводимого лечения.

Ключевые слова: диагностика рака; колоректальный рак; эллипсометрия; поверхностный плазмонный резонанс; опухолевая M2-пируваткиназа.

Как цитировать: Kruchinin V.N., Kruchinina M.V., Prudnikova Ya.I., Spesivtsev E.V., Rykhlitskiy S.V., Peltek S.E., Shehovtsov S.V., Shuvalov G.V. Ellipsometry analytical complex for measuring near the surface plasmon resonance in colorectal cancer diagnosis. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2019; 11(2): 69–76, <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.10>

English

Ellipsometry Analytical Complex for Measuring near the Surface Plasmon Resonance in Colorectal Cancer Diagnosis

V.N. Kruchinin, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Ellipsometry¹;
M.V. Kruchinina, MD, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Gastroenterology²;
 Associate Professor, Department of Propedeutics of Internal Diseases³;
Ya.I. Prudnikova, PhD Student, Laboratory of Gastroenterology²;
E.V. Spesivtsev, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Ellipsometry¹;
S.V. Rykhlitskiy, PhD, Head of the Laboratory of Ellipsometry¹;
S.E. Peltek, PhD, Head of the Laboratory of Molecular Biotechnology⁴;
S.V. Shehovtsov, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology⁴;
G.V. Shuvalov, PhD, Director⁵

¹Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 13 Akademika Lavrentieva Avenue, Novosibirsk, 630090, Russia;

²Institution of Internal and Preventive Medicine — Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 175/1 Borisa Bogatkova St., Novosibirsk, 630089, Russia;

³Novosibirsk State Medical University, 52 Krasny Prospect, Novosibirsk, 630091, Russia;

⁴The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Akademika Lavrentieva Avenue, Novosibirsk, 630090, Russia;

⁵Siberian State Order of the Red Banner of Labor Research Institute of Metrology, 4 Prospekt Dimitrova, Novosibirsk, 630004, Russia

The aim of the study was to assess the ellipsometry analytical complex for its diagnostic potential related to colorectal cancer and metastases of different localization. The proposed ellipsometry was aimed to complement the current non-invasive optical methods based on the reflection of polarized light near the surface plasmon resonance under full internal reflection.

Materials and Methods. We measured the highly specific and sensitive reaction between tumor-associated M2-pyruvate kinase and the respective monoclonal antibodies immobilized on chips. The biological material (blood serum) was obtained from healthy (cancer-free) subjects (n=19) and from patients with colorectal cancer of various localizations (n=49). The examined patients were divided into three subgroups depending on localization of the metastases: 1st subgroup — local-regional colorectal cancer (n=15); 2nd subgroup — hepatic metastases only (n=18); 3rd subgroup — extrahepatic metastases (n=16). We also determined the concentrations of tumor M2-pyruvate kinase during its interaction with the monoclonal antibodies. In this, we measured the refractive index of the chip near-surface area by using highly sensitive optical systems able to measure the light polarization near the surface plasmon resonance.

Results. The interaction of serum M2-pyruvate kinase with the antibodies leads to a noticeable change in the optical properties of the medium, which indicates a high specificity of this reaction. We found significant differences (>20-fold) in the equilibrium levels of serum M2-pyruvate kinase both in healthy individuals and in patients with colorectal cancer, as well as in patients with metastases of various localizations. The diagnostic potential of these optical methods in respect to cancer-specific serum M2-pyruvate kinase as a marker of colorectal cancer was confirmed by subsequent ROC analysis.

Conclusion. The results obtained are promising for the development of methods for early diagnosis of colorectal cancer, for the detection of metastases of various locations, and (in the long term) for the detection of the recurrent disease, as well as for the treatment follow-up.

Key words: cancer diagnostics; colorectal cancer; ellipsometry; surface plasmon resonance; tumor M2-pyruvate kinase.

Введение

Рак толстой кишки по распространенности в мире среди онкологических заболеваний занимает третье место у мужчин и второе — у женщин [1, 2].

Несмотря на детальное предоперационное обследование пациентов с колоректальным раком (КРР), включающее высокотехнологичные методики, такие как компьютерная томография [3], в ряде случаев могут остаться незамеченными отдаленные метастазы. В дальнейшем при гистологическом исследовании хирургических образцов определяются глубина опухолевой инвазии и вовлеченность лимфатических узлов, что часто служит основанием для изменения первоначально установленной стадии. Американским обществом клинической онкологии [4] рекомендовано проведение ежегодного обследования, включая компьютерную томографию и определение раково-эмбрионального антигена в сыворотке крови, каждые три месяца в течение трех лет пациентов со II и III стадиями заболевания, если они являются кандидатами на хирургическое вмешательство или химиотерапию в связи с наличием метастатической болезни [5]. Интенсивное послеоперационное наблюдение необходимо для обнаружения метастазов, поддающихся резекции [6, 7]. Это обуславливает решение проблемы поиска маркеров, позволяющих установить стадию заболевания или наличие метастазов в предельно ранние сроки.

Пируваткиназа — ключевой фермент метаболизма глюкозы — существует в виде различных изоформ, характеризующихся тканеспецифичностью. Пируваткиназа типа L обнаружена в печени и проксимальных почечных канальцах, типа R — в эритроцитах, типа M1 — в мышцах и мозге и типа M2 — в легких. В своей активной форме все изоформы фермента состоят из четырех идентичных субъединиц (т.е. являются тетрамерами) [8, 9]. При развитии опухоли количество исходных тканеспецифичных изоэнзимов снижается и опухолевые клетки начинают вырабатывать M2-пируваткиназу (M2-ПК). Поскольку количество M2-ПК возрастает, изоэнзим, который изначально состоял из четырех субъединиц, расщепляется до димера, имеющего более низкую активность.

Димерную форму M2-ПК, характерную именно для опухолевых клеток, называют опухолевой M2-пируваткиназой. Димеризация опухолевой M2-ПК происходит вследствие фосфорилирования или прямого связывания онкопротеинов и приводит к снижению активности энзима, так же, как и в случае с глюкозой при синтезе нуклеиновых кислот, фосфолипидов и аминокислот. Опухолевая M2-ПК относится к веществам-биомаркерам, по содержанию которых в организме можно судить о наличии новообразований [10–13]. В случаях развития злокачественных новообразований в сыворотке крови также существенно возрастает уровень M2-изомера пируваткиназы. Таким образом,

определение уровня опухолевой M2-ПК в сыворотке крови у пациентов с КРР патогенетически обосновано и будет служить отражением измененного опухолевого метаболизма [14].

Сложность работы с биомаркерами зачастую заключается в их низкой концентрации в тканях организма, поэтому в современной медицинской диагностике крайне актуальной задачей является совершенствование подходов к оценке малых концентраций данного метаболита и повышение чувствительности методик для определения его уровня. Метод, позволяющий выявить низкие уровни M2-ПК в сыворотке крови, их динамику, перспективен для ранней диагностики КРР, обнаружения occultных метастазов до или после операции, оптимизации установления стадии КРР, что потенциально повлияет на тактику лечения.

Среди современных высокочувствительных методов, использующихся в ранней диагностике онкологических заболеваний в настоящее время, многообещающими являются оптические методы, основанные на анализе света, отраженного, пропущенного или рассеянного биологической средой, ввиду их малой инвазивности и сравнительно простой пробоподготовки. Одним из приемов повышения их чувствительности служит исследование отраженного поляризованного света в условиях наличия поверхностного плазмонного резонанса (ППР) при полном внутреннем отражении [15–17]. Это обеспечивает беспрецедентно высокую чувствительность к особенностям состояния пограничной фазы на поверхности и в приповерхностной области резонансной среды — нанослоях металла (золото), в качестве которых могут выступать растворы биоорганических молекул (сыворотка крови). Свет при этом отражается от поверхности стеклянной пластины, покрытой тонким слоем золота, выступающего в роли чипа, с предварительно иммобилизованными на его поверхности молекулами высокоспецифичных моноклональных антител к опухолевой M2-ПК. Для исследования особенностей отраженного поляризованного света вблизи наблюдения ППР все чаще используется эллипсометрия как метод, позволяющий с высокой точностью и производительностью измерять параметры отраженного поляризованного света, определять оптические характеристики отражающей системы [18] и количество прореагировавших биомолекул.

Цель исследования — разработать способ повышения чувствительности современных малоинвазивных оптических методов в диагностике колоректального рака у пациентов с различной локализацией метастазов.

Для этого с помощью метода спектральной эллипсометрии вблизи наблюдения ППР проведена детекция опухолевой M2-ПК сыворотки крови пациентов с помощью высокоспецифичных моноклональных антител, выступающих в качестве зонда к детектируемому белковому маркеру [19].

Материалы и методы

Обследованы 68 человек: 19 условно здоровых лиц (средний возраст — 53±8 лет) без онкологической патологии и манифестирующей патологии внутренних органов и 49 пациентов (средний возраст — 52±9 лет, 22 женщины, 27 мужчин) с КРР различных локализаций: поперечно-ободочной кишки (n=3), нисходящих отделов толстой кишки (n=3), сигмовидной кишки (n=9), ректосигмоидного отдела (n=6), прямой кишки (n=22), а также с первично-множественными опухолями толстой кишки (n=6). Гистологически у всех пациентов диагностирована аденокарцинома различной степени дифференцировки с преобладанием умеренной. Диагноз был верифицирован на основе комплексного клиничко-инструментального обследования (включая УЗИ, КТ, мультиспиральную компьютерную томографию, колоноскопию, фиброгастродуоденоскопию, гистологические исследования) в условиях онкологического стационара.

Пациенты с КРР были разделены на три подгруппы в зависимости от локализации метастазов: в 1-ю подгруппу вошли 15 пациентов с местно-регионарным КРР (7 из них имели II, 8 — III стадию заболевания); 2-ю подгруппу составили 18 больных с метастазами только в печень (12 из них имели одиночные метастазы, остальные — множественные; размеры узлов варьировали от 16 до 92 мм в диаметре); 3-я подгруппа включала 16 пациентов с внепеченочными метастазами (в том числе в надключичные лимфоузлы, легкие, кости, головной мозг). Таким образом, пациенты 2-й и 3-й подгрупп имели IV стадию КРР. 3 пациента (20%) из 1-й, 6 (33%) — из 2-й и 11 (69%) — из 3-й подгрупп подвергались воздействию адьювантной полихимиотерапии в течение 3 мес.

Работа проведена в соответствии с Хельсинкской декларацией (2013) и одобрена Комитетом биомедицинской этики Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины — филиала Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

В работе использовалась сыворотка крови обследуемых, полученная центрифугированием цельной крови, взятой натощак, со скоростью 2000 об./мин в течение 20 мин. Для дальнейших исследований она разбавлялась фосфатным буфером. В работе приведены данные, полученные при разбавлении образцов сыворотки крови 1:250.

Высокоспецифичные моноклональные антитела Anti-РKM2 antibody [EPR10138(B)] (Abcam, США) были иммобилизованы к поверхности золота (~30–40 нм) по методике, описанной в работе [20]. Тонкий слой золота использовался как резонансная среда и входил в состав стеклянных пластин для последующих эллипсометрических измерений («Эллипс-СПЭК», ИФП СО РАН) [21], а также в состав специальных

чипов для измерений при помощи оптической биосенсорной системы ProteOn XPR36 (Bio-Rad, США). Пластины для эллипсометрических измерений укреплялись внутренней стороной в специальной проточной ячейке, выполненной по схеме Кречмана (рис. 1) [22], сквозь которую непрерывно циркулировал раствор фосфатного буфера и осуществлялся ввод пробы (сыворотка). На обратную сторону пластин через слой глицерина укреплялась призма, с использованием которой проводили эллипсометрические измерения. Две величины, измеряемые в эллипсометрии (углы Ψ и Δ — соотношение амплитуд и разность фаз отраженного и падающего лучей поляризованного света соответственно), связаны с параметрами отражающей системы уравнением

$$\operatorname{tg} \Psi \cdot e^{i\Delta} = R_p / R_s, \tag{1}$$

где R_p, R_s — комплексные коэффициенты отражения света для волн, поляризованных в плоскости падения и перпендикулярно к ней, которые зависят от оптических свойств отражающей системы [23].

Условие наблюдения ППР можно записать как

$$\sqrt{\epsilon_{пр}} \cdot \sin(\phi_0) = \sqrt{\frac{\epsilon_{мет} \cdot \epsilon_{раств}}{\epsilon_{мет} + \epsilon_{раств}}}, \tag{2}$$

где $\epsilon_{пр}, \epsilon_{мет}, \epsilon_{раств}$ — диэлектрические константы материала призмы и пластины, слоя металла (золото) и раствора (сыворотка в фосфатном буфере) [22].

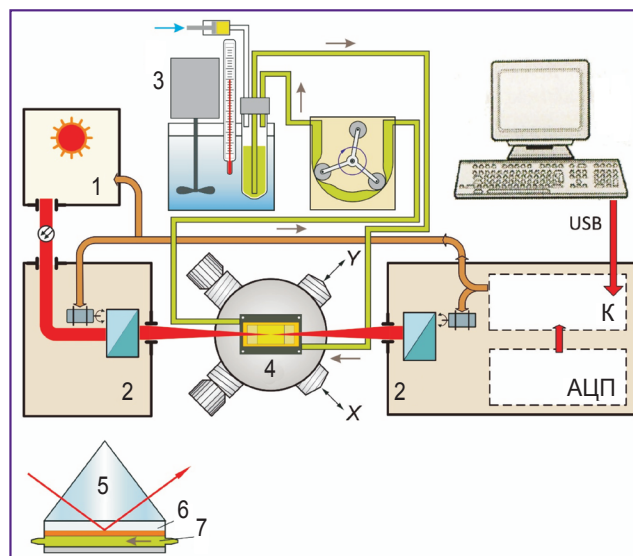


Рис. 1. Схема эллипсометрического комплекса с поверхностным плазмонным резонансом:

1 — источник света с монохроматором; 2 — эллипсометр; 3 — система напуска, термостатирования и циркуляции пробы; 4 — прецизионный предметный столик с ППР-ячейкой. В нижней части рисунка показана схема ППР-ячейки: 5 — призма; 6 — стеклянная пластина с нанесенным слоем золота; 7 — корпус ячейки. Здесь АЦП — аналого-цифровой преобразователь, К — контроллер

Изменение диэлектрической константы раствора в условиях наблюдения ППР по формуле (2) приведет к сдвигу пика поглощения ППР и, следовательно, к изменению эллипсометрических углов Ψ и Δ согласно уравнению (1). Экспериментально подтверждено, что измерение в условиях резонансного поглощения света увеличивает чувствительность эллипсометрии на 2–3 порядка и позволяет уверенно определять концентрации отдельных белковых молекул до десятых долей нанogramмов в миллилитре.

Параллельно проводили детекцию антигенов к высокоспецифичным моноклональным антителам к М2-ПК в сыворотках крови, взятых у здоровых людей и больных с КРР, при помощи оптической биосенсорной системы ProteOn XPR36, принцип действия которой также основан на измерении отраженного поляризованного света в условиях ППР. Антитела к опухолевой М2-ПК человека ковалентно связывали с покрытой золотом поверхностью сенсорного чипа GLC. И в том, и в другом случаях реакция изучалась в сходных физико-химических условиях при наблюдении ППР. Разница в качестве информации, полученной на эллипсометре «Эллипс-СПЭК» и с помощью биосенсорной системы ProteOn XPR36, объяснялась способом анализа параметров отраженного поляризованного света (в эллипсометрии учитывается также фазовая составляющая сигнала).

Результаты и обсуждение

В нашем исследовании была использована сыворотка крови обследованных пациентов. На рис. 2 представлена кинетика взаимодействия высокоспецифичных моноклональных антител к опухолевой М2-ПК с антигенами сыворотки крови пациентов в исследуемых группах при определении методом спектральной эллипсометрии и оптической биосенсорной системы ProteOn XPR36 вблизи наблюдения ППР.

Средний равновесный уровень сывороточной опухолевой М2-ПК, определенный в группе здоровых обследуемых, составил $11,6 \pm 4,5$ RU (resonance unit — единица резонанса) и не зависел от пола ($p=0,51$) и возраста ($p=0,61$). 1 RU эквивалентен сдвигу, вызываемому связыванием 1 пг (10^{-15} кг) протеина на 1 мм^2 чувствительной поверхности, и соответствует $\sim 1,12$ угл. мин эллипсометрического угла Δ .

Средний равновесный сывороточный уровень опухолевой М2-ПК среди пациентов с местно-регионарным КРР (1-я подгруппа) оказался равным $67,4 \pm 9,8$ RU; среди больных с КРР с метастазами в печень (2-я подгруппа) — $162,5 \pm 17,8$ RU и у больных с внепеченочными метастазами (3-я подгруппа) — $269,2 \pm 14,6$ RU ($p < 0,001-0,05$), отличаясь в 6–23 раза от такового в группе здоровых (см. таблицу).

Данные, полученные с помощью спектрального эллипсометрического ППР-комплекса «Эллипс-СПЭК» (см. рис. 2), оказались сопоставимы с результатами, полученными на приборе ProteOn XPR36.

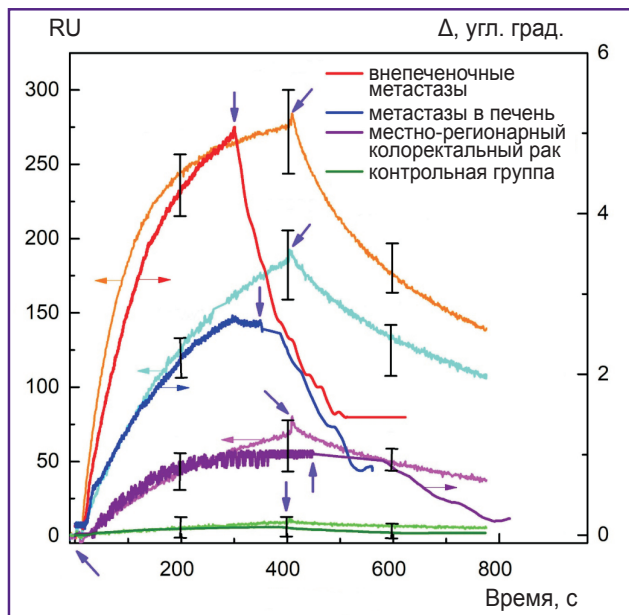


Рис. 2. Сенсограммы связывания и распада комплексов, получаемых при взаимодействии антигенов сыворотки крови и высокоспецифичных моноклональных антител к опухолевой М2-ПК у пациентов с колоректальным раком и здоровых лиц при разбавлении сыворотки крови 1:250

Стрелками показаны моменты подачи пробы и начала промывки. В парах: более темные кривые — данные «Эллипс-СПЭК», более светлые кривые — данные ProteOn XPR36

Средние равновесные уровни опухолевой М2-ПК сыворотки, определенные с помощью эффекта поверхностного плазмонного резонанса (M±m)

Группы обследованных	Средний уровень сывороточной М2-ПК, RU	p, менее
Группа сравнения (n=19)	$11,6 \pm 4,5$	—
1-я подгруппа, местно-регионарный колоректальный рак (n=15)	$67,4 \pm 9,8$	10^{-7*}
2-я подгруппа, колоректальный рак IV стадии с метастазами в печень (n=18)	$162,5 \pm 17,8$	10^{-7*} $1-2=10^{-6}$
3-я подгруппа, колоректальный рак IV стадии с внепеченочными метастазами (n=16)	$269,2 \pm 14,6$	10^{-7*} $1-3=10^{-7}$ $2-3=5,1 \cdot 10^{-6}$

Примечание: * — статистическая значимость различий значений с группой сравнения; 1–2, 1–3, 2–3 — между группами.

Различия в уровнях опухолевой пируваткиназы, связанные со стадией КРР, были выявлены в исследованиях [10], где установлены ассоциации концентрации энзима со стадией по классификации Duke [24].

Интересна роль высоких уровней опухолевой М2-ПК в развитии метастазирования. В исследовании [25]

показана роль опухолевой М2-ПК в развитии новых сосудов в случаях наличия раневой поверхности, что ассоциировано с увеличением секреции сосудистого эндотелиального фактора роста. При опухолевом росте и прогрессировании высокие уровни М2-ПК, таким образом, обеспечивают образование новых сосудов в растущей массе опухоли. Тем самым клетки получают преимущество в неблагоприятном метаболическом окружении, особенно при метастазировании.

Диагностическая чувствительность при определении разницы сывороточного уровня опухолевой М2-ПК в случае КРР и у здоровых лиц составила 98%, что согласуется с результатами исследования [26] и превышает чувствительность методов колоноскопии, исследования кала на скрытую кровь, определения раково-эмбрионального антигена, фекальной М2-ПК [27, 28]. Так, в клинической практике опухолевую М2-ПК в кале определяют иммунологически с помощью моноклональных антител (иммуно-ферментный анализ), специфических к димерной форме. При дискриминантном уровне 4 ЕД/мл специфичность для КРР составляет 79%, чувствительность — 85% (при наличии или отсутствии кровотечения) [29], что ниже, чем полученные значения RU в настоящей работе.

В случае, когда пороговое значение уровня сывороточной опухолевой М2-ПК составляло $11,6 \pm 4,5$ RU, не было пропущено ни одного случая пациентов с КРР, что позволяет избежать 43,4% проведенных колоноскопий. Диагностическая чувствительность для всех

случаев КРР возрастала при снижении пороговых значений уровней сывороточной М2-ПК.

При проведении ROC-анализа по выявлению метастазов различных локализаций при КРР величины AUC для сывороточной М2-ПК составили 0,91–0,98 (95% доверительный интервал) с достаточно высокими уровнями чувствительности и специфичности (рис. 3).

Заключение

С помощью метода спектральной эллипсометрии и оптической биосенсорной системы ProteOn XPR36, основанных на измерении состояния поляризации света вблизи наблюдения поверхностного плазмонного резонанса, исследована специфическая высокочувствительная реакция моноклональных антител, иммобилизованных на поверхности чипов, с опухолевой М2-пируваткиназой сыворотки крови пациентов, больных колоректальным раком с метастазами различных локализаций.

Обнаружены достоверные различия уровней опухолевой М2-пируваткиназы в сыворотке крови как в группах здоровых лиц и пациентов, больных колоректальным раком (более чем в 20 раз), так и в группах больных колоректальным раком с метастазами различных локализаций. Диагностическая эффективность оптических методов в дифференцировании групп подтверждена данными последующего ROC-анализа (AUC — 0,91–0,98).

Полученные результаты перспективны для разработки методов ранней диагностики рака, в том числе колоректального, для выявления метастазов различных локализаций, а в перспективе — рецидивов заболевания, а также для контроля за качеством проводимого лечения.

Благодарность. Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам Новосибирского областного онкологического диспансера, оказавшим содействие и помощь при обследовании пациентов.

Финансирование исследования. Работа выполнена в рамках темы «Эпидемиологический мониторинг состояния здоровья населения и изучение молекулярно-генетических и молекулярно-биологических механизмов развития распространенных терапевтических заболеваний в Сибири для совершенствования подходов к их диагностике, профилактике и лечению», ГЗ №0324-2018-0001, рег. №АААА-А17-117112850280-2.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить.

Литература/References

1. Федоров В.Э., Поделякин К.А. Эпидемиологические аспекты колоректального рака. Медицинский альманах 2017; 4: 145–148. Fedorov V.E., Podelyakin K.A.

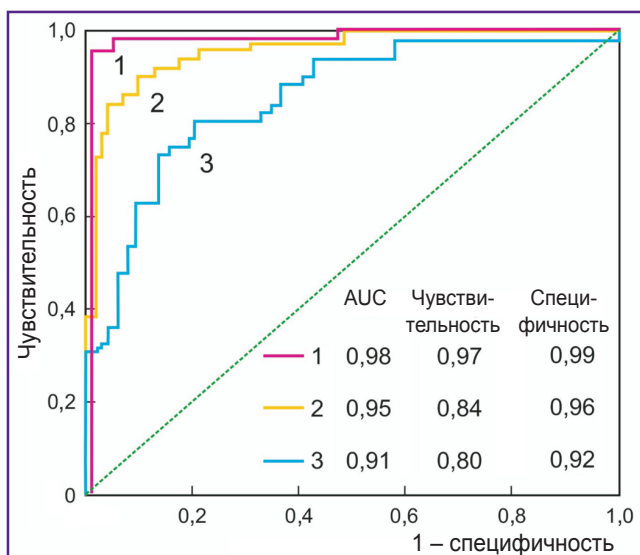


Рис. 3. ROC-кривые для уровней сывороточной опухолевой М2-ПК в дифференцировании пациентов с колоректальным раком с метастазами различных локализаций:

1 — с местно-регионарным колоректальным раком от здоровых обследуемых; 2 — пациентов с метастазами в печень от больных с местно-регионарным колоректальным раком; 3 — пациентов с внепеченочными метастазами от больных с местно-регионарным колоректальным раком

Epidemiological aspects of colorectal cancer. *Medicinskij almanah* 2017; 4: 145–148, <https://doi.org/10.21145/2499-9954-2017-4-145-148>.

2. Pathak S., Pandanaboyana S., Daniels I., Smart N., Prasad K.R. Obesity and colorectal liver metastases: mechanisms and management. *Surg Oncol* 2016; 25(3): 246–251, <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2016.05.021>.

3. Stagnitti A., Barchetti F., Barchetti G., Pasqualitto E., Sartori A., Glorioso M., Gigli S., Buonocore V., Monti M.L., Marini A., Mele C., Stagnitti F., Laghi A. Preoperative staging of colorectal cancer using virtual colonoscopy: correlation with surgical results. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19(9): 1645–1651.

4. Meyerhardt J.A., Mangu P.B., Flynn P.J., Korde L., Loprinzi C.L., Minsky B.D., Petrelli N.J., Ryan K., Schrag D.H., Wong S.L., Benson A.B. 3rd; American Society of Clinical Oncology. Follow-up care, surveillance protocol, and secondary prevention measures for survivors of colorectal cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline endorsement. *J Clin Oncol* 2013; 31(35): 4465–4470, <https://doi.org/10.1200/jco.2013.50.7442>.

5. Hamilton T.D., Leugner D., Kopciuk K., Dixon E., Sutherland F.R., Bathe O.F. Identification of prognostic inflammatory factors in colorectal liver metastases. *BMC Cancer* 2014; 14: 542, <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-542>.

6. Sasaki K., Andreatos N., Margonis G.A., He J., Weiss M., Johnston F., Wolfgang C., Antoniou E., Pikoulis E., Pawlik T.M. The prognostic implications of primary colorectal tumor location on recurrence and overall survival in patients undergoing resection for colorectal liver metastasis. *J Surg Oncol* 2016; 114(7): 803–809, <https://doi.org/10.1002/jso.24425>.

7. Mavros M.N., Hyder O., Pulitano C., Aldrighetti L., Pawlik T.M. Survival of patients operated for colorectal liver metastases and concomitant extra-hepatic disease: external validation of a prognostic model. *J Surg Oncol* 2013; 107(5): 481–485, <https://doi.org/10.1002/jso.23260>.

8. Kim C.W., Kim J.I., Park S.H., Han J.Y., Kim J.K., Chung K.W., Sun H.S. Usefulness of plasma tumor M2-pyruvate kinase in the diagnosis of gastrointestinal cancer. *Korean J Gastroenterol* 2003; 42(5): 387–393.

9. Dombrackas J.D., Santarsiero B.D., Mesecar A.D. Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis. *Biochemistry* 2005; 44(27): 9417–9429, <https://doi.org/10.1021/bi0474923>.

10. Zaccaro C., Saracino I.M., Fiorini G., Figura N., Holton J., Castelli V., Pesci V., Gatta L., Vaira D. Power of screening tests for colorectal cancer enhanced by high levels of M2-PK in addition to FOBT. *Intern Emerg Med* 2017; 12(3): 333–339, <https://doi.org/10.1007/s11739-017-1610-3>.

11. Guan M., Tong Y., Guan M., Liu X., Wang M., Niu R., Zhang F., Dong D., Shao J., Zhou Y. Lapatinib inhibits breast cancer cell proliferation by influencing PKM2 expression. *Technol Cancer Res Treat* 2018; 17: 1533034617749418, <https://doi.org/10.1177/1533034617749418>.

12. Tee S.S., Park J.M., Hurd R.E., Brimacombe K.R., Boxer M.B., Massoud T.F., Rutt B.K., Spielman D.M. PKM2 activation sensitizes cancer cells to growth inhibition by 2-deoxy-D-glucose. *Oncotarget* 2017; 8(53): 90959–90968, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19630>.

13. Kronen A., Jungermann K., Kietzmann T. Cross-talk between the signals hypoxia and glucose at the

glucose response element of the L-type pyruvate kinase gene. *Endocrinology* 2001; 142(6): 2707–2718, <https://doi.org/10.1210/endo.142.6.8200>.

14. Fung K.Y., Tabor B., Buckley M.J., Priebe I.K., Purins L., Pompeia C., Brierley G.V., Lockett T., Gibbs P., Tie J., McMurrick P., Moore J., Ruszkiewicz A., Nice E., Adams T.E., Burgess A., Cosgrove L.J. Blood-based protein biomarker panel for the detection of colorectal cancer. *PLoS One* 2015; 10(3): e0120425, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120425>.

15. Jenkins C.A., Lewis P.D., Dunstan P.R., Harris D.A. Role of Raman spectroscopy and surface enhanced Raman spectroscopy in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol* 2016; 8(5): 427–438, <https://doi.org/10.4251/wjgo.v8.i5.427>.

16. Sankiewicz A., Lukaszewski Z., Trojanowska K., Gorodkiewicz E. Determination of collagen type IV by Surface Plasmon Resonance Imaging using a specific biosensor. *Anal Biochem* 2016; 515: 40–46, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.002>.

17. Jain R., Rawat A., Verma B., Markiewski M.M., Weidanz J.A. Antitumor activity of a monoclonal antibody targeting major histocompatibility complex class I-Her2 peptide complexes. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105(3): 202–218, <https://doi.org/10.1093/jnci/djs521>.

18. Kang Y.R., Byun J.S., Kim T.J., Park H.G., Park J.C., Barange N., Nam K.H., Kim Y.D. Monitoring of the binding between EGFR protein and EGFR aptamer using in-situ total internal reflection ellipsometry. *J Nanosci Nanotechnol* 2016; 16(6): 6445–6449, <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.12123>.

19. Loitsch S.M., Shastri Y., Stein J. Stool test for colorectal cancer screening — it's time to move! *Clin Lab* 2008; 54(11–12): 473–484.

20. Jonkheijm P., Weinrich D., Schröder H., Niemeyer C.M., Waldmann H. Chemical strategies for generating protein biochips. *Angew Chem Int Ed Engl* 2008; 47(50): 9618–9647, <https://doi.org/10.1002/anie.200801711>.

21. Рыхлицкий С.В., Кручинин В.Н., Швец В.А., Спесивцев Е.В., Прокопьев В.Ю. Спектральный плазмон-эллипсометрический комплекс ЭЛЛИПС-СПЭК. Приборы и техника эксперимента 2013; 1: 137–138. Rykhlikskiy S.V., Kruchinin V.N., Shvets V.A., Spesivtsev E.V., Prokop'ev V.Yu. Spectral plasmon-ellipsometric complex ELLIPS-SPEC. *Pribory i tekhnika eksperimenta* 2013; 1: 137–138, <https://doi.org/10.7868/s0032816212060092>.

22. Kikawada M., Ono A., Inami W., Kawata Y. Plasmon-enhanced autofluorescence imaging of organelles in label-free cells by deep-ultraviolet excitation. *Anal Chem* 2016; 88(2): 1407–1411, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04060>.

23. *Handbook of ellipsometry*. Tompkins H.G., Irene E.A. (editors). Springer Berlin Heidelberg; 2005; 789 p., <https://doi.org/10.1007/3-540-27488-x>.

24. Bye W.A., Nguyen T.M., Parker C.E., Jairath V., East J.E. Strategies for detecting colon cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 9: CD000279, <https://doi.org/10.1002/14651858.cd000279.pub4>.

25. Chekulayev V., Mado K., Shevchuk I., Koit A., Kaldma A., Klepinin A., Timohhina N., Tepp K., Kandashvili M., Ounpuu L., Heck K., Truu L., Planken A., Valvere V., Kaambre T. Metabolic remodeling in human colorectal cancer and surrounding tissues: alterations in regulation

of mitochondrial respiration and metabolic fluxes. *Biochem Biophys Res* 2015; 4: 111–125, <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.08.020>.

26. Meng W., Zhu H.H., Xu Z.F., Cai S.R., Dong Q., Pan Q.R., Zheng S., Zhang S.Z. Serum M2-pyruvate kinase: a promising non-invasive biomarker for colorectal cancer mass screening. *World J Gastrointest Oncol* 2012; 4(6): 145–151, <https://doi.org/10.4251/wjgo.v4.i6.145>.

27. Abdullah M., Rani A.A., Simadibrata M., Fauzi A., Syam A.F. The value of fecal tumor M2 pyruvate kinase as a diagnostic tool for colorectal cancer screening. *Acta Med Indones* 2012; 44(2): 94–99.

28. Parente F., Marino B., Ilardo A., Fracasso P., Zullo A.,

Hassan C., Moretti R., Cremaschini M., Ardizzoia A., Saracino I., Perna F., Vaira D. A combination of faecal tests for the detection of colon cancer: a new strategy for an appropriate selection of referrals to colonoscopy? A prospective multicentre Italian study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012; 24(10): 1145–1152, <https://doi.org/10.1097/meg.0b013e328355cc79>.

29. Haug U., Rothenbacher D., Wentz M.N., Seiler C.M., Stegmaier C., Brenner H. Tumour M2-PK as a stool marker for colorectal cancer: comparative analysis in a large sample of unselected older adults vs colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2007; 96(9): 1329–1334, <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603712>.