

Ю.С. Корнева<sup>1,2</sup>, В.С. Маряхина<sup>3</sup>, А.Е. Доросевич<sup>1,2</sup>

## Применение флуориметрии для дифференциальной диагностики колоректального рака и предраковых процессов на гистологических срезах

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Смоленск

<sup>2</sup>ОГБУЗ «Смоленский областной институт патологии», г. Смоленск

<sup>3</sup>Кумертауский филиал ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», г. Кумертау

Исследование посвящено изучению спектральных характеристик колоректального рака (КРР) и предраковых процессов в различных отделах толстой кишки на гистологических препаратах *ex vivo*. Изучено 78 биопсий с различными патологическими процессами, отражающими основные стадии канцерогенеза КРР. Были определены спектры возбуждения флуоресценции с 220 до 390 нм при длине волны регистрации 410 нм. Спектры имеют 2 максимума: на 260÷270 нм и на 330÷340 нм. Первый максимум определяется триптофан- и фенилаланин-содержащими белками. Второй максимум спектров определяется наличием коллагена и НАДФ в тканях. Полученные результаты отражают не только отличие спектральных особенностей злокачественных опухолей толстой кишки от доброкачественных в зависимости от локализации процесса в толстой кишке, но и объясняют различную склонность аденом к малигнизации в зависимости от их типов. Результаты исследования могут быть использованы для дальнейшего совершенствования дифференциальной диагностики новообразований толстой кишки

**Ключевые слова:** колоректальный рак, аденома, флуориметрия

### Введение

Определение прогностической значимости того или иного патологического процесса особенно актуально для новообразований толстой кишки с учетом доступности органа для обследования и ежегодного увеличения количества новых случаев колоректального рака (КРР). Среди предраковых заболеваний для КРР значимое место занимают аденомы, степень дисплазии которых по данным литературы напрямую коррелирует с риском малигнизации, и злокачественная трансформация наступает после постепенного нарастания дисплазии от I до III степени [15]. Деление аденом на тубулярные

(ТА), тубуло-ворсинчатые (ТВА) и ворсинчатые отражает их тип строения [12]. Эти варианты по данным литературы также имеют различную склонность к злокачественной трансформации. Существует мнение [13], что гистологические варианты аденом проходят цепь событий от ТА через ТВА до ворсинчатой аденомы, трансформируясь в аденокарциному (АК), при этом их роль в канцерогенезе КРР для левых и правых отделов толстой кишки различна [7, 18].

Генетический и фенотипический сдвиги клеток эпителия в сторону озлокачествления отражаются также на их биохимическом составе, что носит название биохимического атипизма. Изменения на молекулярном уровне предшествуют изменениям, видимым на световой микроскопии патоморфологу. Эти метаморфозы могут быть зафиксированы и оценены с помощью спектральных методов за счет их высокой чувствительности и селективности. Изучение сходств и различий спектров свечения тканей с предраковыми изменениями и инвазивной опухолью может использоваться не только для диагностики данных патологических процессов, но и для теоретического обоснования патогенетической значимости вида аденомы для развития КРР.

### Цель исследования

Изучить спектральные характеристики КРР и предраковых процессов в различных отделах толстой кишки, используя гистологические препараты *ex vivo*, для применения флуориметрии как нового метода дифференциальной диагностики в затруднительных для патоморфологов случаях.

### Задачи исследования

1. Сравнить и изучить спектральные особенности нормальной слизистой толстой кишки, доброкачественных и злокачественных эпителиальных новообразований в ультрафиолетовом диапазоне спектра.

2. Сравнить спектральные особенности аденом как проявление их биохимического атипизма при различной степени дисплазии и различных вариантах строения для определения их прогностической роли в канцерогенезе КРР.

3. Выявить закономерности спектральных особенностей нормальной слизистой и новообразований толстой кишки в различных ее отделах в ультрафиолетовом диапазоне спектра.

### Материалы и методы

В исследование включены 73 колонобиопсии от пациентов в возрасте  $64,3 \pm 10,3$  года (мужчины – 31 случай, женщины — 47 случаев) с различными патологическими процессами в толстой кишке, отражающими основные стадии канцерогенеза КРР (работа одобрена решением этического комитета Смоленского государственного медицинского университета). В соответствии с микроскопической картиной случаи были поделены на 3 группы: слизистая толстой кишки с минимальными воспалительными изменениями (принятая за относительную норму), ТА, ТВА и АК (согласно рекомендациям WHO classification of tumors of the digestive system 2010 Lyon аденома, имеющая от 20% до 75% ворсинчатого компонента считается тубуло-ворсинчатой, меньше 20% — тубулярной, больше 80% — ворсинчатой). Дополнительно группа аденом, согласно тем же рекомендациям, была поделена в зависимости от степени дисплазии (high-grade и low-grade); случаи наследственного семейного полипоза и зубчатых аденом были критериями исключения из исследования. Размеры аденом не превышали 2,0 см, поскольку имеются данные [9], что диаметр аденомы более 2,0 см резко повышает риск малигнизации. В соответствии со степенью дифференцировки были выбраны случаи умеренно- и высокодифференцированных АК. Особое внимание было уделено делению случаев в зависимости от локализации в различных отделах толстой кишки. Деление образцов на группы представлено в табл. 1.

**Таблица 1. Распределение случаев по группам в исследовании**

Диагноз	Прямая кишка	Дистальные отделы	Проксимальные отделы
Слизистая оболочка толстой кишки с минимальными воспалительными изменениями	3	5	5
ТА	10	18	8
ТВА	4	4	4
Высокодифференцированная АК	1	3	1
Умереннодифференцированная АК	2	3	2
Итого: 73			

С парафинового блока готовили параллельный срез толщиной 6-7 мкм без окрашивания гематоксилином и эозином, депарафинировали его в гексане в течение 3 мин, помещали на кварцевое стекло, не окрашивая, и измеряли спектры возбуждения флуоресценции с 220 до 390 нм при длине волны регистрации 410 нм на спектрофлуориметре SOLARCM-2203. Свечение регистрировали на площади 1 см<sup>2</sup>. Для детального анализа спектров их раскладывали на составляющие методом Гауссово-Лоренцевых кривых [1]. Каждый максимум спектров ответственен за конкретное

вещество, либо за одну из его молекулярных форм. Поэтому каждый спектр представляет собой алгебраическую сумму спектров каждого из компонентов. Для наглядности все спектры были нормированы на интенсивность света длиной волны 230 нм.

Для статистической обработки данных использовали непараметрические параметры такие как критерий Краскела-Уоллисса (статистика H) для сравнения нескольких несвязанных выборок, критерий Манн-Уитни (статистика U) для сравнения двух выборок. Обработка данных проведена в программе STATISTICA 6.0, результаты считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

#### 1. Изучение и сравнение спектральных характеристик различных патологических процессов в толстой кишке

Как уже было сказано, процессы злокачественной трансформации отражаются на биохимическом составе клеток, что можно зафиксировать спектральными методами. Несмотря на сложный состав биологических тканей, только некоторые вещества (эндогенные флуорофоры) могут флуоресцировать. Регистрация спектров поглощения гистологических срезов затруднительна из-за их высокой оптической плотности. В этом случае могут быть измерены спектры возбуждения флуоресценции, поскольку они являются аналогами спектров поглощения. На рис. 1 представлены усредненные спектры возбуждения флуоресценции исследуемых патологических процессов, независимо от их локализации. Спектры всех исследуемых процессов имеют 2 максимума: на  $265 \div 270$  нм и на  $330 \div 340$  нм.

Первый максимум преимущественно определен триптофан-содержащими белками [9]. Второй максимум определяется коллагеном, содержащимся в строме как здоровых тканей, так и опухолей, а также НАДФ, концентрация которого связана с пролиферативной активностью клеток [17]. На рис. 1 видно, что спектры относительно нормальной слизистой и ТА схожи и имеют значительно меньший второй максимум в сравнении с первым (соотношение между ними равно 3,7). Злокачественное новообразование характеризуется незначительным увеличением первого максимума спектра при выраженном увеличении второго, соотношение между ними для АК становится равным 2,0. Для сравнения соотношения максимумом в группах был применен критерий Краскела-Уоллисса, его значение  $H = 18,52256$  при  $df=5$ ,  $N=73$ ,  $p=0,0010$ , что свидетельствует о наличии значимых различий для данного показателя во всех исследуемых группах. Известно [9], что злокачественные новообразования обладают свойством инвазии, связанным с выделением коллагеназ и разрушением коллагена стромы. Злокачественная транс-

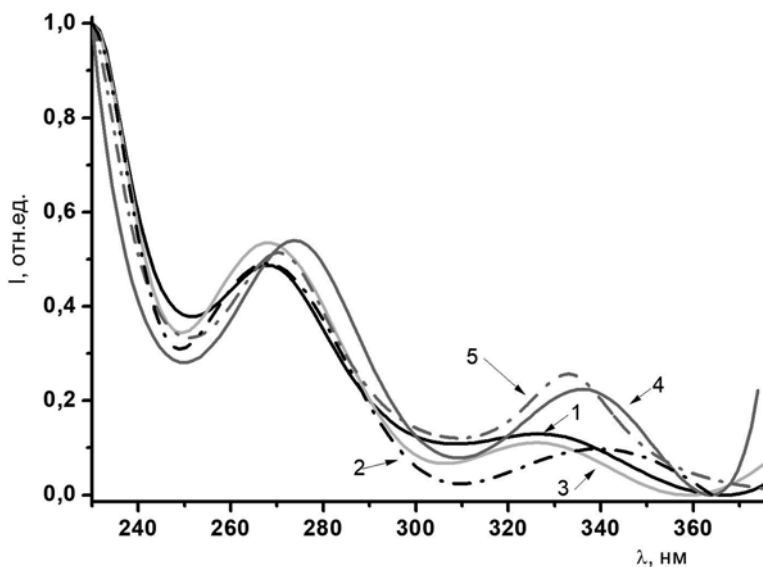


Рис. 1. Типичные спектры возбуждения флуоресценции исследуемых патологических процессов. 1- здоровая слизистая, 2- ТА, 3- ТВА, 4- умеренно-дифференцированная АК, 5- высокодифференцированная АК

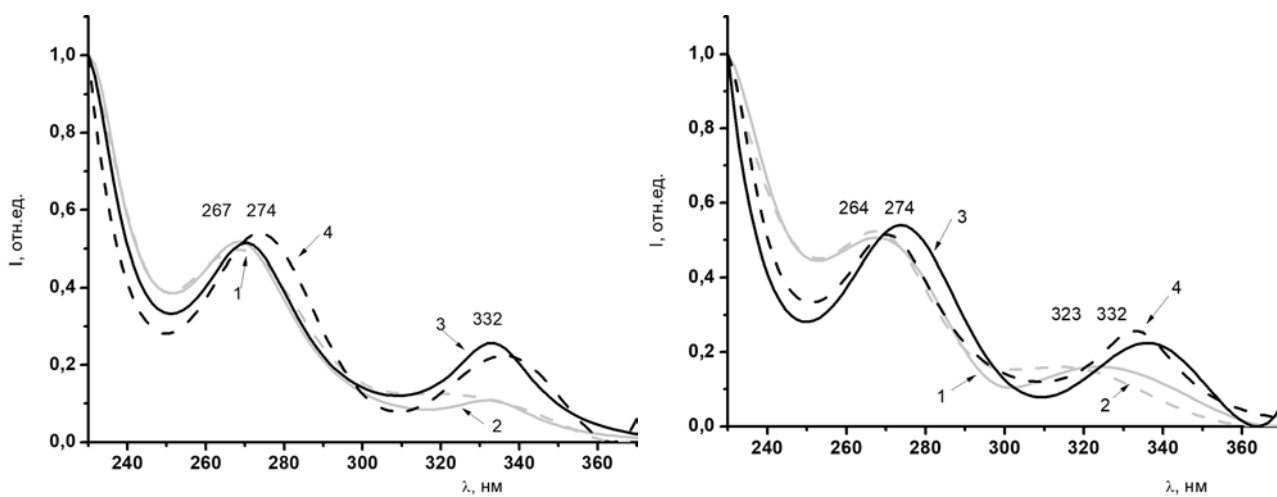


Рис. 2. Типичные спектры возбуждения флуоресценции ТА (а) и ТВА (б) low-grade (1), high-grade (2) дисплазии в сравнении с умереннодифференцированной (3) и высокодифференцированной (4) АК

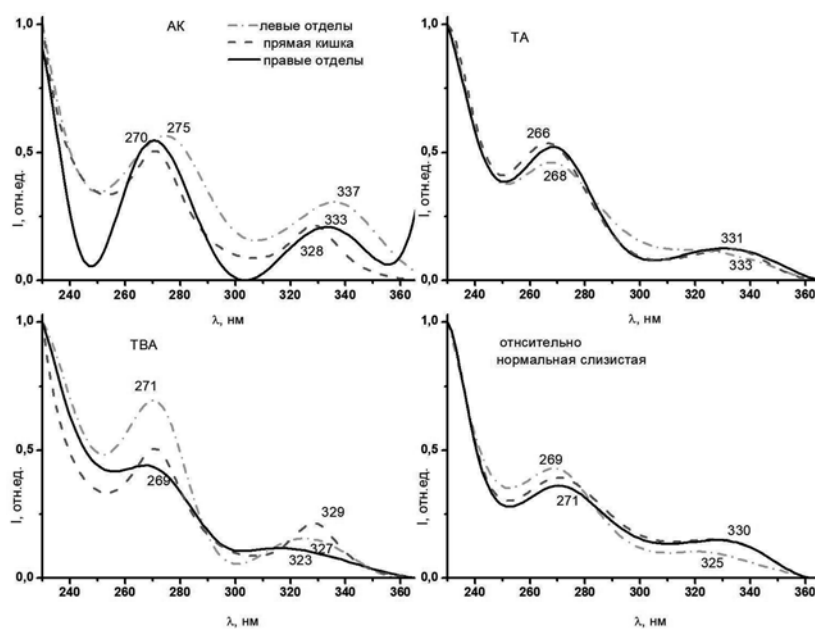


Рис. 3. Типичные спектры возбуждения флуоресценции левых и правых отделов кишечника и прямой кишки при различных патологических процессах

формация слизистой толстой кишки приводит к снижению коллагена в строме и нарастанию концентрации НАДФ в связи с повышением пролиферативной активности клеток, что ранее было подтверждено иммуногистохимическим исследованием с использованием моноклональных антител Ki-67, являющимися маркером пролиферативной активности. Этот же метод показывает более высокую пролиферативную активность в ТВА в сравнении с ТА [11].

По данным литературы [15], ТВА имеет более высокий риск малигнизации, чем ТА, но тем не менее, это также доброкачественная опухоль. Поэтому критерием для дифференциальной диагностики ТВА и АК может быть отсутствие снижения концентрации коллагена (в виду отсутствия такой характеристики, как инвазивный рост), при нарастании концентрации НАДФ, в то время, как для АК второй максимум преимущественно определяется выраженным нарастанием концентрации НАДФ при одновременном снижении коллагена в строме. Статистическая обработка данных с помощью критерия Манн-Уитни выявило значимые различия в спектрах ТВА и АК ( $U=3,55$ ;  $p=0,0004$ ).

Спектры высоко- и умереннодифференцированной АК также несколько отличаются между собой шириной второго максимума — он шире для высокодифференцированной АК, что наводит на мысль, что еще один флуорофор определяется в данном случае. Помимо вышеупомянутого НАДФ, это может быть витамин В6 [15]. Его накопление в ткани опухоли может быть связано с интенсивными метаболическими процессами, и роль в прогрессии злокачественных новообразований пока неясна.

## **2. Изучение спектральных характеристик тканей как одного из проявлений биохимического атипизма аденом различного гистологического строения и степени их дисплазии**

Изучение спектральных характеристик как проявления биохимического атипизма для аденом с различной степенью дисплазии и различного морфологического строения дало неожиданные результаты. Несмотря на существующее мнение о том, что степень дисплазии значимо коррелирует с риском малигнизации, наше исследование показало, что данный факт подтверждается только в группе ТА ( $U=2,5$ ;  $p=0,042$ ), но для ТВА нет существенных различий в спектрах в зависимости от степени дисплазии ( $U=0,01$ ;  $p=0,068$ ) (рис. 2). Суммируя вышеописанные изменения спектральных характеристик в группах ТА и ТВА в сравнении с АК, можно сделать вывод, что тип аденомы более важен для определения риска малигнизации, чем степень дисплазии: ТВА изначально ближе к АК по своим

спектральным характеристикам, причем к умереннодифференцированному варианту. Поэтому патоморфологу следует очень внимательно относиться к тем изменениям, которые под микроскопом воспринимаются как дисплазия: возможно, в определенном проценте случаев подобные изменения, мимикрирующие диспластические, лишь следствие повышенной пролиферативной активности в ответ на постоянную травматизацию выступающего новообразования в просвет кишки каловыми массами, не отражающие реального потенциала для злокачественной трансформации.

## **3. Изучение особенностей спектральных характеристик патологических процессов в различных отделах толстой кишки**

На протяжении многих лет исследователи сравнивают проксимальные и дистальные отделы толстой кишки, используя самые различные подходы. Ранее выполненные исследования показывают, что опухоли, развивающиеся в дистальных и проксимальных отделах толстой кишки, имеют различные молекулярные механизмы канцерогенеза [10], что объясняет их эпидемиологические, биологические и клинические особенности [12]. Эти различия, не видимые патоморфологу на световой микроскопии, могут влиять на результаты спектрального анализа, поскольку даже различия в pH [13] могут отразиться на биохимическом составе тканей. Поэтому об этом стоит помнить, применяя флуориметрию для проведения дифференциального диагноза.

Большинство проведенных исследований показывает схожесть по различным позициям между дистальными отделами толстой кишки с прямой кишкой и их совместное отличие от проксимальных отделов, что прослеживается как в норме, так и в патологии [7, 12, 14, 18]. Однако в нашем исследовании спектры как нормальной слизистой, так и всех исследуемых патологических процессов схожи для прямой кишки и проксимальных отделов толстой кишки и несколько отличаются от спектров одноименных процессов с локализацией в дистальных отделах (рис. 3). Объяснение данного феномена найдено в статье о секретирующих глюкагон энтерохромаффинных клетках, в которой показано их одинаковое количество в проксимальных отделах толстой кишки и прямой кишке [14]. Максимум адсорбции глюкагона, выделяемого энтерохромаффинными клетками, находится на 280 нм [17], и его флуоресценция имеет один широкий пик с максимумом на 360 нм. В связи с этим можно полагать, что выявленные особенности связаны с различным содержанием глюкагона в тканях, зависящим от количества

энтерохромаффинных клеток. Известно также, что энтерохромаффинные клетки могут секретировать серотонин [14], являющийся естественным флуорофором, однако его спектры поглощения и флуоресценции находятся в другом спектральном диапазоне [6]. Поэтому в нашем исследовании серотонин не может быть зафиксирован на выбранной длине волны регистрации флуоресценции.

**Заключение:** таким образом, в данном исследовании впервые показано применение флуориметрии для дифференциальной диагностики гистологических срезов патологически измененных тканей. Полученные результаты могут поменять имеющиеся представления о канцерогенезе КРР. Учитывая высокую чувствительность спектральных методик и их хорошую воспроизводимость, флуориметрический метод может быть использован для дифференциальной диагностики патологических процессов в толстой кишке, в случаях, когда возможности световой микроскопии, применимой в рутинной практике, ограничены.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Маряхина В.С. Оптические методы в химии, биологии и медицине. — М: Флинта: Наука, 2015. — 144 с.
2. Cordani M., Pacchiana R., Butera G., et al. Mutant p53 proteins alter cancer cell secretome and tumour microenvironment: involvement in cancer invasion and metastasis // *Cancer Letters*. — 2016. — Vol. 376 (2). — P. 303-309.
3. Evans D. F., Pye G., Bramley R. et al. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects // *Gut*. — 1988. — Vol. 29(8). — P. 1035-1041.
4. Gratzer W.B., Beven G.H., Rrattle H.W.E., Bradbury E.M. A conformational study of glucagon // *European Journal of Biochemistry*. — 1968. — Vol. 3(3). — P. 276-283.
5. Iacopetta B. Are there two sides to colorectal cancer? // *Int. J. Cancer*. — 2002. — Vol. 101. — P. 403-408.
6. Kishi T., Tanaka M., Tanaka J. Electronic absorption and fluorescence spectra of 5-hydroxytryptamine (serotonin). Protonation in the excited state // *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. — 1977. — Vol. 50(5). — P. 1267-1271.
7. Koestler D.C., Li J., Baron J.A. et al. Distinct patterns of DNA methylation in conventional adenomas involving the right and left colon // *Modern Pathology*. — 2014. — Vol. 27. — P. 145-155.
8. Lee G.H., Malietzis G., Askari A.D. et al. Is right-sided colon cancer different to left-sided colorectal cancer? — A systematic review // *Eur. J. Surg. Oncol.* — 2015. — Vol. 41(3). — P. 300-308.
9. Levene Y., Hutchinson J.M., Tinkler-Hundal E. et al. The correlation between endoscopic and histopathological measurements in colorectal polyps // *Histopathology*. — 2015. — Vol. 66. — № 4. — P. 485-490.
10. Missiaglia E., Jacobs B., D'Ario G. et al. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features // *Ann Oncol.* — 2014. — Vol. 25(10). — P. 1995-2001.
11. Pap Z., Ilyés I.Á., Mocan S.L. Changes in immunoeexpression of p53, Ki-67, Ets-1, APAF-1 and PTEN in serrated and conventional colon adenomas // *Rom J. Morphol. Embryol.* — 2015. — Vol. 56(4). — P. 1389-1396.
12. Šachlová M. Premalignancies of colon // *Klin Onkol.* — 2013. — Vol. 26. — P. S38-43.
13. Short M.W., Layton M.C., Teer B.N., Domagalski J.E. Colorectal cancer screening and surveillance // *Am Fam Physicia.* — 2015. — Vol. 91. — №2. — P. 93-110.
14. Sjolund K., Sanden, G., Hakanson R., Sundler F. Endocrine cells in human intestine: an immunocytochemical study // *Gastroenterology*. — 1983. — Vol. 85(5). — P. 1120-1130.
15. Tischoff I., Tannapfel A. Precancer colorectal tumors *Internist*. — 2013. — Vol. 54. — № 6. — P. 691-698.
16. Udenfriend S., Horecker B., Kaplan N. O., Marmur J. Vitamins, coenzymes and their metabolites in fluorescence assay in biology and medicine. Academic Press, Inc., 1969, pp 219-334.
17. Vyas S., Zaganjor E., Haigis M. C. Mitochondria and Cancer // *Cell*. — 2016. — Vol. 166. — № 3. — P. 555-566.
18. Zare-Mirzaie A., Abolhasani M., Aryamanesh A. Left sided colorectal adenomatous polyps have more risk for high grade dysplasia // *Acta. Med. Iran.* — 2013. — Vol. 51. — № 3. — P. 172-177.

Поступила в редакцию 07.12.2017 г.

*Yu.S. Korneva<sup>1,2</sup>, V.S. Maryakhina<sup>3</sup>, A.E. Dorosevich<sup>1,2</sup>*

#### **Fluorimetry application for differential diagnosis of colorectal cancer and precancerous lesions on histological sections**

<sup>1</sup>Smolensk State Medical University, Department of Pathological Anatomy, Smolensk,

<sup>2</sup>Smolensk Regional Institute of Pathology, Smolensk,

<sup>3</sup>Kumertau branch of Orenburg state university, Kumertau

In the investigation we compared autofluorescence spectra of colon cancer (CC) and precancerous lesions by fluorimetry in different parts of colon. 78 biopsies from different pathological processes in colon, reflecting the basic steps of CC, were investigated. It is shown, that autofluorescence spectra of all types of adenomas as well as adenocarcinomas have two maxima at 260-270 nm and at 330-340 nm. The first maximum is primarily defined by tryptophan- and phenylalanine-containing peptides. The second maximum of the spectra is mainly defined by collagen and NADH presence. The results demonstrate not only peculiarities in spectral characteristics of benign and malignant tumors depending on their localization, but also explain different risk of adenomas to malignant transformation, depending on their type. The obtained results can be used for further improving of differential diagnosis of colonic neoplasia.

Key words: colorectal cancer, adenoma, fluorimetry