

DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-4-32-41

УДК: 616.34-006.6-073

Для цитирования: Кручинина М.В., Прудникова Я.И., Курилович С.А., Громов А.А., Кручинин В.Н., Атучин В.В., Наумова О.В., Спесивцев Е.В., Володин В.А., Пельтек С.Е., Шувалов Г.В., Генералов В.М. Возможности эллипсометрии, РАМАН-спектроскопии, КНИ-нанопроволочного биосенсора в диагностике колоректального рака. Сибирский онкологический журнал. 2017; 16 (4): 32–41. – DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-4-32-41.

For citation: Kruchinina M.V., Prudnikova Ya.I., Kurilovich S.A., Gromov A.A., Kruchinin V.N., Atuchin V.V., Naumova O.V., Spesivtsev E.V., Volodin V.A., Peltek S.E., Shuvalov G.V., Generalov V.M. Ellipsometry, RAMAN spectroscopy and SOI- nanowire biosensor in diagnosis of colorectal cancer. Siberian Journal of Oncology. 2017; 16 (4): 32–41. – DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-4-32-41.

ВОЗМОЖНОСТИ ЭЛЛИПСОМЕТРИИ, РАМАН-СПЕКТРОСКОПИИ, КНИ-НАНОПРОВОЛОЧНОГО БИОСЕНСОРА В ДИАГНОСТИКЕ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

**М.В. Кручинина^{1,5}, Я.И. Прудникова¹, С.А. Курилович¹, А.А. Громов¹,
В.Н. Кручинин², В.В. Атучин^{2,4}, О.В. Наумова², Е.В. Спесивцев²,
В.А. Володин^{2,4}, С.Е. Пельтек³, Г.В. Шувалов⁵, В.М. Генералов⁶**

ФГБУН «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины» – филиал
ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, Россия¹

630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1. E-mail: kruchmargo@yandex.ru¹

ФГБУН «Институт физики полупроводников» СО РАН, г. Новосибирск, Россия²

630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 13²

ФГБУН «Институт цитологии и генетики» СО РАН, г. Новосибирск, Россия³

630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10³

Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, Россия⁴

630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2⁴

ФГУП «Сибирский научно-исследовательский институт метрологии», г. Новосибирск, Россия⁵

630004, г. Новосибирск-4, пр. Димитрова, 4⁵

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Ново-
сибирская область, Россия⁶

630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово⁶

С помощью спектральной эллипсометрии вблизи условий наблюдения поверхностного плазмонного резонанса (ППР) экспериментально установлены различия констант скоростей специфических взаимодействий опухолевой M2-пируваткиназы (Tumor M2-PK) сыворотки крови (СК) пациентов с колоректальным раком (КРР) разных стадий и с различной локализацией метастазов с высокоспецифичными моноклональными антителами, нанесенными слоями на поверхности биочипов (AUC 0,89). Методом сканирующей эллипсометрии обнаружено значимое увеличение эффективной толщины покрытия биомолекул в результате специфического взаимодействия «антиген–антитело» в группе пациентов с вне- и печеночными метастазами по сравнению с группой здоровых лиц ($p < 0,001–0,042$). Специфичность взаимодействия подтверждена методом флуоресцентной оптической спектрометрии. В спектрах комбинационного рассеяния света (Raman) образцов СК выявлены различия в интенсивности пиков в области $1005–1520 \text{ см}^{-1}$ в тех же группах пациентов ($p < 0,0001–0,05$), с предсказательной точностью метода 90 % для ранних стадий развития заболевания. Проведены пилотные эксперименты с КНИ (кремний на изоляторе) – нанопроволочным биосенсором для индикации специфических белков (на примере Tumor M2-PK), – которые продемонстрировали высокую чувствительность ($10^{-13}–10^{-15} \text{ М}$) и специфичность в определении антигенов в образцах СК пациентов с КРР. Полученные результаты перспективны для разработки методов ранней диагностики КРР, выявления метастазов различных локализаций и рецидивов заболевания.

Ключевые слова: диагностика, колоректальный рак, эллипсометрия, флуоресцентная оптическая спектрометрия, поверхностный плазмонный резонанс, Raman-спектроскопия, КНИ-нанопроволочный биосенсор, опухолевая M2 пируваткиназа.

В мире рак толстой кишки занимает четвертое место среди наиболее часто выявляемых опухолей [1]. В настоящее время предоперационное определение стадий у пациентов с колоректальным раком (КРР) включает радиографические исследования, в том числе компьютерную томографию [2]. Гистологическое исследование хирургических образцов зачастую приводит к изменению первоначально установленной стадии. В частности, во время операции определяются глубина опухолевой инвазии и вовлеченность лимфатических узлов. Однако occultные метастазы могут быть пропущены современными методами диагностики. В послеоперационном периоде проводится мониторинг пациентов для выявления признаков прогрессирования заболевания, поскольку раннее выявление рецидива и/или отдаленных метастазов улучшает прогноз и эффективность лечения [3].

Руководство American Society of Clinical Oncology [4] рекомендует проведение ежегодного исследования с помощью компьютерной томографии, а также определение раково-эмбрионального антигена в сыворотке крови (РЭА) каждые 3 мес после радикальной операции при КРР II–III стадии в течение не менее 3 лет, если пациент может являться кандидатом на хирургическое вмешательство или химиотерапию при развитии метастатической болезни [5–7].

Таким образом, биомаркеры, которые облегчают обнаружение occultных метастазов до или после операции, будут улучшать уточняющую диагностику КРР, что потенциально влияет на тактику лечения. Пируваткиназа Тumor M2-РК является веществом, которое при определенном содержании в организме свидетельствует о наличии новообразований [8]. В нормальных клетках она находится в нескольких формах: L, R, M1, M2, – которые соответственно локализуются в почках и печени, эритроцитах, мозге и мышцах, легких. Они обладают высокой специфичностью.

Цель исследования – определить возможности современных высокочувствительных неинвазивных физико-химических методов в диагностике колоректального рака у пациентов с различной локализацией метастазов. Для этого с помощью методов спектральной эллипсометрии вблизи наблюдения поверхностного плазмонного резонанса, флуоресцентной оптической спектроскопии, Раман-спектроскопии и КНИ-нанопроволочного (кремний на изоляторе) биосенсора проведена детекция опухолевой M2-пируваткиназы (Tumor M2-РК) сыворотки крови пациентов с помощью высокоспецифичных моноклональных антител, выступающих в качестве зонда к детектируемому белковому маркеру.

В настоящем исследовании использована сыворотка крови пациентов, поскольку появились исследования [9], показывающие недостаточную эффективность исследования опухолевой пируваткиназы кала.

Материал и методы

В исследование включены 68 человек: 19 условно здоровых лиц (средний возраст – 53 ± 8 лет) без онкологической патологии и заболеваний внутренних органов и 49 пациентов (средний возраст – 52 ± 9 лет, 22 женщины, 27 мужчин) с КРР различных локализаций: поперечно-ободочная кишка ($n=3$), нисходящие отделы толстой кишки ($n=3$), сигмовидная кишка ($n=9$), ректо-сигмоидный переход ($n=6$), прямая кишка ($n=22$), первично-множественные опухоли толстой кишки ($n=6$). Гистологически у всех пациентов верифицирована аденокарцинома различной степени дифференцирования. Диагноз был установлен на основе комплексного клинично-инструментального обследования (УЗИ, мультиспиральная компьютерная томография, колоноскопия, гистологические исследования) в условиях онкологического стационара.

Пациенты были разделены на 3 группы в зависимости от распространенности опухоли:

– 1-я группа: 15 пациентов с местнораспространенным КРР (у 7 – II стадия, у 8 – III стадия заболевания);

– 2-я группа: 18 больных КРР IV стадии с метастазами только в печень (у 12 – одиночные метастазы, у 6 – множественные, диаметром от 16 до 92 мм);

– 3-я группа: 16 пациентов КРР IV стадии с внепеченочными метастазами (надключичные лимфоузлы, легкие, кости, головной мозг).

Адьювантная полихимиотерапия в течение 3 мес была проведена в первой группе 3 (20 %) пациентам, во второй – 6 (33 %), в третьей – 11 (69 %) больным.

Использовалась сыворотка крови обследуемых, полученная центрифугированием цельной крови, взятой натощак, со скоростью 2000 об/мин в течение 20 мин. Для дальнейших исследований сыворотка крови при необходимости разбавлялась фосфатным буфером.

Иммобилизацию антител Anti-РKM2 antibody [EPR10138(B)] (Abcam RabMab, USA) осуществляли на предварительно обработанные карбонилдиимидазолом поверхности кремния (сканирующая эллипсометрия, КНИ-биосенсор) и золота (~40 нм, нанесенного тонким слоем на кремний, ППР-исследования), согласно методике, описанной в работе [10]. Разработана и апробирована методика детекции биологических макромолекул малой концентрации с помощью спектрального эллипсометрического ППР-комплекса «Эллипс-СПЭК» (ИФП СО РАН) [11].

Параллельно исследованию методом спектральной эллипсометрии реакцию опухолевой M2 пируваткиназы в сыворотках крови здоровых людей и больных с колоректальным раком с высокоспецифичными моноклональными антителами проводили на поверхности сенсорных чипов GLC

при помощи прибора ProteOn XPR36 (BioRad), принцип действия которого также основан на эффекте ППР. Исследовано связывание сыворотки, разведенной в PBST в 10, 50, 250, 1250 и 6250 раз. Для скрининга были выбраны концентрации 1/50 и 1/250, при которых наиболее четко выявляются различия между образцами.

С помощью сканирующего эллипсометра высокого разрешения «Микроскан» (ИФП СО РАН) [12] был исследован отклик поверхности кремниевых пластин, на которые предварительно были нанесены моноклональные антитела к Tumor M2-РК в реакции взаимодействия сыворотки крови пациентов с КРР и здоровых лиц. Считывание эллипсометрических углов ν и α осуществлялось в центральных областях кремниевых пластин 15×15 мм² с шагом по осям «х» и «у» 0,1 мм. Угол падения луча света на образец составлял 60°. С помощью программного обеспечения прибора (пакет «AnResG») проводили статистическую обработку и систематизирование результатов измерений в целях очищения от случайного шума и выделения полезной информации в виде конечных значений концентрации биомолекул на поверхности биочипа.

Специфичность взаимодействия Tumor M2-РК сыворотки крови с высокоспецифичными моноклональными антителами подтверждена методом флуоресцентной оптической спектроскопии. Флуоресцентный анализ осуществлялся на сканере «ScanArray Express 2.0» фирмы «PerkinElmer Life Sciences» (США) при длине волны возбуждающего лазера, равной 543 нм. Изображение анализировали с использованием программы «ScanArray Express», входящей в математическое обеспечение сканера. На модельном чипе содержались зонды к опухолевой M2-РК – меченые высокоспецифичные моноклональные антитела к M2-РК, а также октагидромидаз, содержащий флуоресцентный краситель TAMRA, используемый в качестве стандарта [13, 14].

Для проведения пилотных экспериментов с КНИ-нанопроволочным биосенсором [15, 16] использован полевой транзистор КНИ, основу которого составляет сенсорный элемент, на поверхность которого предварительно иммобилизовали зонды – высокоспецифичные моноклональные

антитела к Tumor M2-РК. Растворы сывороток крови здоровых обследуемых и больных КРР тестировались в различных разведениях (от 10^{-3} до 10^{-15} М).

Спектры комбинационного рассеяния света жидких сывороток крови пациентов записывались с помощью спектрометра с тройным монохроматором T64000 (Horiba Jobin Yvon, France) при комнатной температуре. Для возбуждения использовалась линия Ag^+ лазера с длиной волны 514,5 нм, спектральное разрешение составляло $1,5$ см⁻¹. В качестве детектора использовалась кремниевая матрица фотоприемников, охлаждаемая жидким азотом. Применялась приставка для микроскопических исследований комбинационного рассеяния света. Мощность лазерного пучка, доходящего до образца, составляла 2–3 мВт (размер пятна 5–6 мкм).

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы методом сканирующей эллипсометрии установлено значимое увеличение эффективной толщины покрытия биомолекул в результате специфического взаимодействия «антиген–антитело» в группах пациентов с КРР в отличие от группы здоровых лиц (рис. 1) ($p < 0,001–0,042$). Толщина слоя заметно увеличивается при местнораспространенном КРР, далее – при наличии метастазов в печень, достигая максимальных значений при наличии внепеченочных метастазов (табл. 1).

Поскольку метод эллипсометрии имеет особенность, связанную с параллельной детекцией примесей, способных к неспецифической сорбции на поверхности, для подтверждения наличия специфического взаимодействия была использована флуоресцентная оптическая спектроскопия. На рис. 2 приведены результаты сканирования участков поверхности со спотами, при этом участки с более высокой интенсивностью свечения светлее других – строки 1 и 6, соответствующие флуоресцентному маркеру 5-TAMRA-TTTTTTTT-3 (контроль), а также строка 2, отражающая результат добавления сыворотки здоровых лиц, в ходе которого сохраняется высокая концентрация флуоресцентного маркера. Интенсивность флуоресценции снижалась в строке 3 (сыворотка пациентов с местнораспространенным КРР), резко уменьшалась в строке

Таблица 1

Средние значения эффективной толщины сканограмм в результате взаимодействия Tu M2-РК сыворотки крови с высокоспецифичными моноклональными антителами

Группы обследованных	Среднее значение эффективной толщины слоя, нм	От группы сравнения	p	
			От 1 группы	От 2 группы
Здоровые лица (группа сравнения)	5,73 ± 0,63	–	–	–
Местнораспространенный КРР (1-я группа)	8,98 ± 0,26	0,042	–	–
Больные КРР с метастазами в печень (2-я группа)	11,63 ± 0,37	0,015	0,029	–
Больные КРР с внепеченочными метастазами (3-я группа)	26,49 ± 0,48	0,001	0,001	0,002

4 (сыворотка пациентов с КРР с метастазами в печень) и практически не выявлялась у пациентов с КРР с внепеченочными метастазами (строка 5). Гистограмма значений относительной интенсивности флуоресценции представлена на рис. 3.

Следует отметить, что флуоресцентная спектрометрия фиксирует только те биомолекулы, которые помечены флуоресцентной меткой, причем интенсивность флуоресцентного сигнала пропорциональна содержанию (концентрации) этих фрагментов и обратно пропорциональна уровню специфического взаимодействия типа «антиген–антитело», при котором «метки экранируются». Полученные результаты свидетельствуют о нарастающих концентрациях опухолевой М2 пируваткиназы от группы больных с местнораспространенным КРР до пациентов с внепеченочными метастазами. Таким образом, методом флуоресцентной оптической спектрометрии был подтвержден факт наличия специфического взаимодействия Tu M2-РК сыворотки крови с высокоспецифичными моноклональными антете-

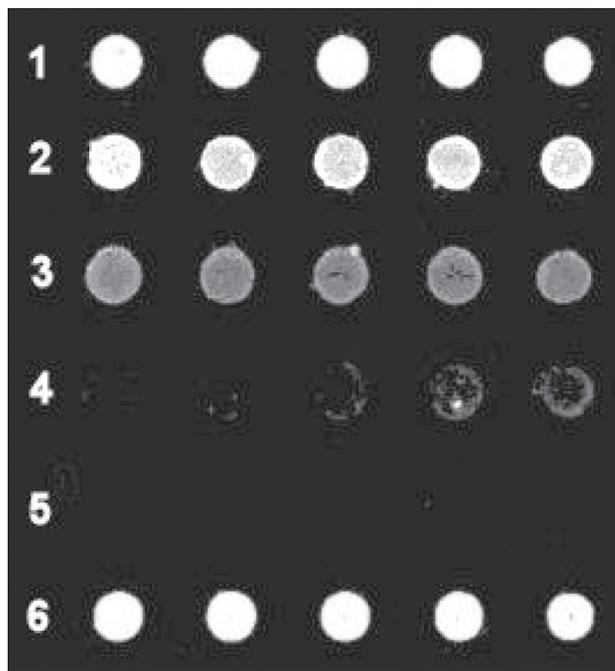


Рис. 2. Эффективная толщина сканирования биочипа после взаимодействия Tu M2-РК сыворотки крови с мечеными высокоспецифичными моноклональными антителами к Tu M2-РК (флуоресцентная спектрометрия, сканер «ScanArray Express 2.0»). Цифрами на рисунке обозначены: 1, 6 – флуоресцентный маркер 5-TAMRA-ТТТТТТТТ-3 (контроль); взаимодействие с зондом сыворотки; 2 – у здоровых лиц; 3 – у больных с местнораспространенным КРР; 4 – у больных с метастазами в печень; 5 – у больных с внепеченочными метастазами

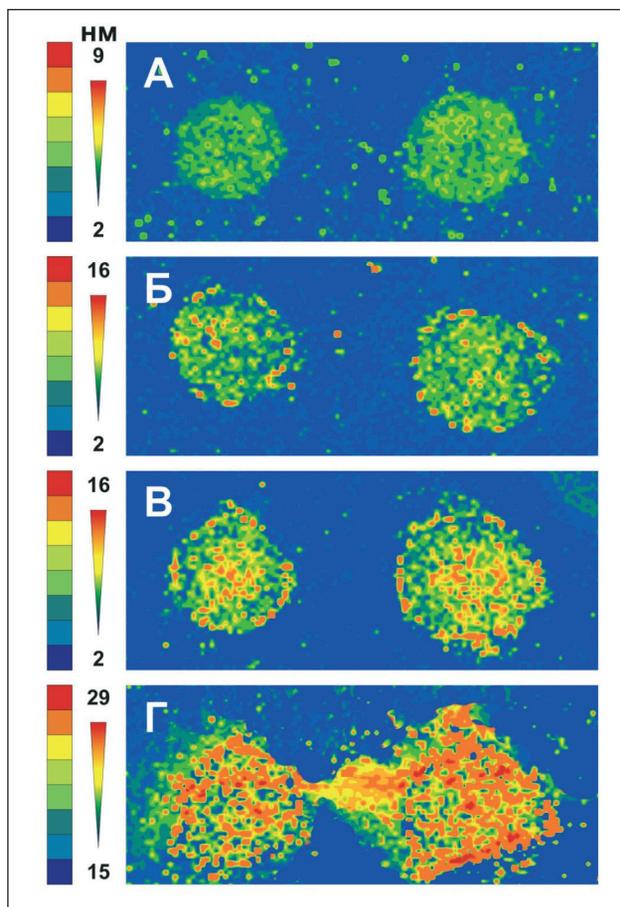


Рис. 1. Сканогаммы (зависимости эффективной толщины поверхности пленок, полученные с помощью «Микроскана» в результате специфического взаимодействия антигенов сыворотки крови с Tu M2-РК: А – у здоровых обследуемых; Б – у пациентов с местнораспространенным КРР; В – с метастазами в печень; Г – с внепеченочными метастазами. Слева показаны значения эффективной толщины слоя

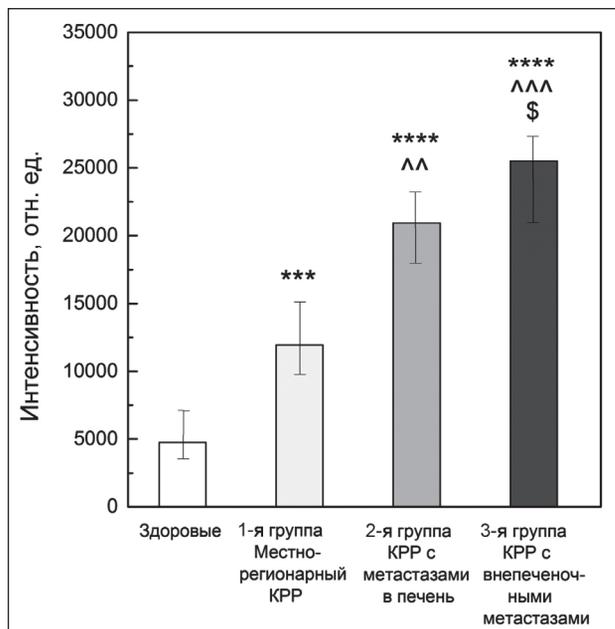


Рис. 3. Гистограмма средних значений относительной интенсивности флуоресценции в группах. Примечание: значимость различий:

* – от группы сравнения (*** – $p < 0,001$, **** – $p < 0,0001$);
 ^ – от 1-й группы (^ – $p < 0,01$, ^^ – $p < 0,0001$);
 \$ – от 2-й группы ($p < 0,05$)

лами, причем полученные данные сопоставимы с таковыми, полученными методом сканирующей эллипсометрии (в нем эффективная толщина слоя пропорциональна общему количеству иммобилизованных молекул). При этом метод эллипсометрии при высокой чувствительности не требует предварительной модификации образца (использование флуоресцентных меток).

На рис. 4 представлена кинетика взаимодействия Tumor M2-РК в сыворотках крови пациентов в исследуемых группах с высокоспецифичными моноклональными антителами методом спектральной эллипсометрии вблизи условий наблюдения ППР.

Средний уровень сывороточной Tu M2-РК, определенной в группе здоровых обследуемых, составил $11,6 \pm 4,5$ RU (1 RU ~ 1 пг белка) и не зависел от пола ($p=0,51$) и возраста ($p=0,61$), что согласуется с данными ряда исследований [17, 18]. Средний сывороточный уровень Tu M2-РК среди пациентов с местнораспространенным КРР (1-я группа) оказался равным $77,4 \pm 5,8$; среди больных с КРР с метастазами в печень (2-я группа) – $192,5 \pm 12,8$; у больных с внепеченочными метастазами (3-я группа) – $284,2 \pm 14,6$ ($p < 0,0001-0,05$), отличаясь в ~ 6–23 раза от такового в группе здоровых. С. Tonus et al. также выявили корреляции уровня фекальной Tu M2-РК со стадией заболевания согласно классификациям TNM и Duke's [19].

Низкие уровни сывороточной Tu M2-РК среди здоровых обследуемых и отсутствие выраженных вариаций значений в связи с полом и возрастом обусловлены связью данного фермента с опухолевым метаболизмом [20]. Полученные ассоциации сывороточного уровня Tu M2-РК со стадией за-

болевания согласно классификациям TMN Duke's подтверждаются рядом клинических исследований [21, 22].

Диагностическая чувствительность определения сывороточного уровня Tu M2-РК для выявления различия случаев КРР от здоровых лиц составила 100 %, что сопоставимо с данными W. Meng et al. (2012) [18]. Это значительно выше, чем при использовании колоноскопии, исследовании кала на скрытую кровь и определении фекальной опухолевой M2 пируваткиназы [23, 24]. В случае, когда cut-off уровень сывороточной Tu M2-РК составлял $11,6 \pm 4,5$ RU, не было пропущено ни одного случая пациентов с КРР и можно было бы избежать 43,4 % проведенных колоноскопий. Диагностическая чувствительность для всех случаев колоректальных поражений возрастала при снижении cut-off уровня сывороточной Tu M2-РК.

Таким образом, полученные с помощью спектрального эллипсометрического ППР-комплекса «Эллипс-СПЭК» данные свидетельствуют о перспективности предложенного подхода для диагностики ранних стадий КРР; данные оказались сопоставимы с результатами, измеренными на приборе ProteOn XPR36 (BioRad, USA), не уступали им по чувствительности (~ $10^{-11}-10^{-12}$ М) и точности при существенно более низкой стоимости аппаратуры [11].

Вместе с тем отмечены возможности оптических методов в определении метастазов различных локализаций. При проведении ROC-анализа по выявлению метастазов при КРР величина AUC для сывороточной Tu M2-РК составила 0,89 (0,84; 0,94), 95 % доверительный интервал (рис. 5). Пред-

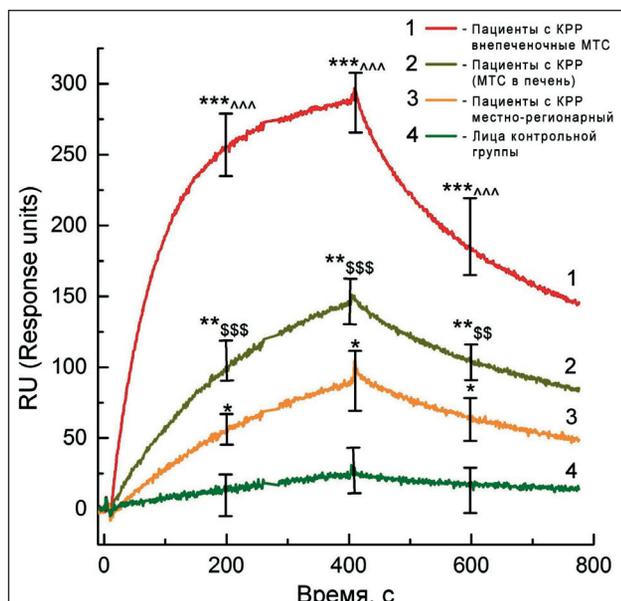


Рис. 4. Сенсограммы связывания и распада комплексов при взаимодействии антигенов сыворотки крови и высокоспецифичных моноклональных антител к Tumor M2-РК у пациентов с КРР и лиц группы сравнения при разбавлении сыворотки крови 1:250

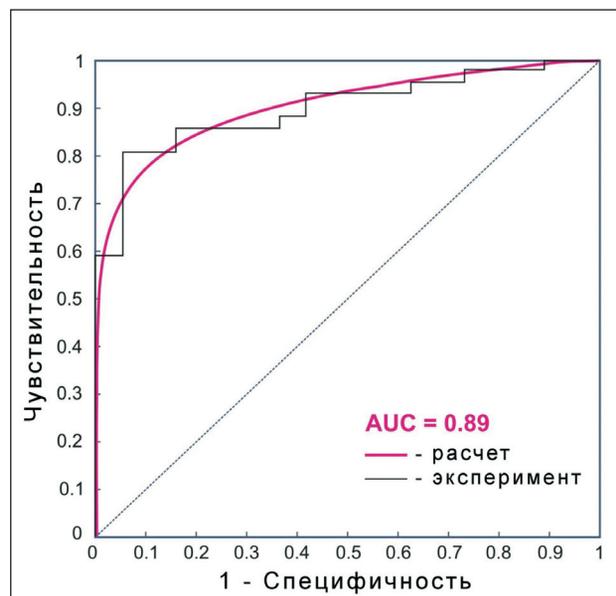


Рис. 5. ROC-кривая для уровней сывороточной Tu M2-РК в дифференцировании больных КРР с метастазами

Таблица 2

Площадь пиков комбинационного рассеяния света у больных с КРР с различной локализацией метастазов и в группе сравнения

Положение пика, см ⁻¹	Площадь пика, усл. ед.			
	Здоровые лица (группа сравнения)	Местнораспространенный КРР (1 группа)	Больные КРР с метастазами в печень (2 группа)	Больные КРР с внепеченочными метастазами (3 группа)
1005	990 ± 84	557 ± 103*	387 ± 90***^	129 ± 78***^^^\$\$
1157	2570 ± 301	2004 ± 264*	908 ± 115***^	712 ± 132***^^^\$\$
1520	3258 ± 190	2404 ± 162**	714 ± 135***^^^	474 ± 108***^^^\$\$

Примечание: статистическая значимость различий по сравнению со здоровыми лицами: * – p<0,05, ** – p<0,02, *** – p<0,0001; статистическая значимость различий по сравнению с 1-й группой: ^ – p<0,05, ^^ – p<0,02, ^^ – p<0,0001; статистическая значимость различий по сравнению со 2-й группой: \$ – p<0,05, \$\$ – p<0,01.

сказательная точность использования данного метода составила 85, 90, 94, 96 % сыворотки здоровых лиц, пациентов с местнораспространенным КРР, КРР с метастазами только в печень, КРР с внепеченочными метастазами соответственно.

Различная интенсивность пиков спектров комбинационного рассеяния света в определенной степени отражает существующие различия в интегральных метаболомических профилях сывороток крови пациентов с КРР [25]. Площади пиков (1005–1520 см⁻¹) Раман-спектров оказались достоверно ниже у больных КРР по сравнению со здоровыми (p<0,0001–0,05) (табл. 2, рис. 6), коррелируя со стадией процесса (r = –0,68, p<0,001) и наличием метастазов (r = –0,57, p<0,003). Метаболомический профиль изменяется в зависимости от места локализации опухоли, и ответ хозяина на опухоль может меняться при метастазировании [26]. Метастатическая болезнь биологически отлична от рака, не выходящего за пределы органа. Многие другие агрессивные опухоли провоцируют более (или менее) бурный ответ хозяина [27], который может также отличаться из-за локального воздействия опухоли. Например, опухоль может оказывать множество паракринных эффектов на микроокружение, кроме того, метаболические или

воспалительные ответы окружающих нормальных тканей могут отличаться при локализации метастазов в печени и в других местах [28].

Следующим этапом исследования, направленным на повышение чувствительности выявления биомолекул в ультрамалых концентрациях, были пилотные эксперименты с КНИ-нанопроволочным биосенсором [15, 16]. Среди различного вида сенсорных устройств [29], разработанных в последнее время на основе нанотехнологий, наиболее перспективными считаются электронные детекторы, где в качестве сенсорных элементов (преобразователей) используются кремниевые нанопроволочные транзисторы, поскольку эти приборы удовлетворяют сразу следующей совокупности требований:

- отсутствие маркеров («label-free» детекция);
- высокая чувствительность (в пределе – одна частица на сенсорный элемент);
- измерения в реальном масштабе времени;
- мультиплицирование сенсорных элементов (обеспечивает детекцию разных маркеров на разных сенсорных элементах в одном биочипе по одной пробе биожидкости человека);
- совместимость с КМОП-технологией (обеспечивает возможность организации промышленного производства приборов для широкого круга пользователей без требований их специальной подготовки).

Принцип действия таких сенсоров основан на полевом эффекте – изменении концентрации носителей заряда в приповерхностном слое полупроводника под воздействием внешнего электрического поля. Изменение концентрации носителей заряда в полупроводнике приводит к изменению его проводимости, что и фиксируется в режиме реального времени при адсорбции целевых частиц на поверхность сенсорного элемента [15, 16]. В исследованиях G.-J. Zhang et al. (2012), F. Yang et al. (2014) представлены результаты использования КНИ-нанопроволочных биосенсоров в целях диагностики ряда патологий [30, 31] с акцентом на межмолекулярные взаимодействия, в которых в качестве тестируемого аналита использованы специфические антигены.

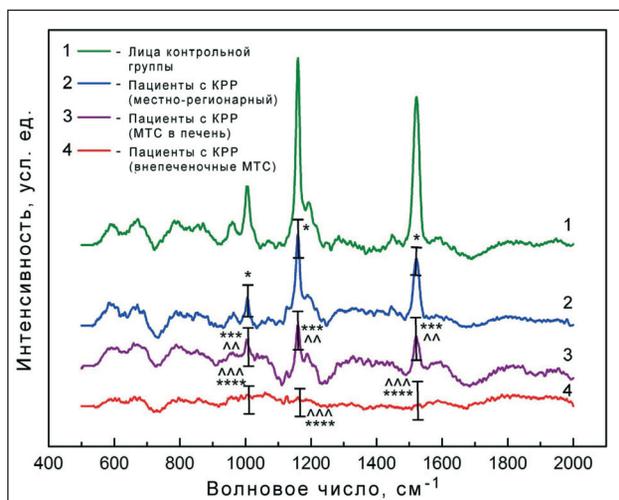


Рис. 6. Спектры комбинационного рассеяния света жидких сывороток крови больных КРР и лиц группы сравнения

В настоящем пилотном исследовании протестирована сыворотка (представляющая собой сложную смесь органических соединений, антигенов) здоровых людей и пациентов с КРР, что является важным аспектом в разработке данного подхода диагностики. Для придания сенсору специфичности выявления определенных биомолекулярных маркеров (Tu M2-РК) в образце на поверхность кремниевых сенсорных элементов ковалентно иммобилизовали высокоспецифичные моноклональные антитела к Tu M2-РК, выступающие в качестве зонда к детектируемому белковому маркеру. Тестировались растворы сывороток крови здоровых и больных с колоректальным раком, при этом оптимизированы условия подготовки поверхности сенсоров для воспроизводимого получения результатов с максимальным откликом [32].

Рис. 5а демонстрирует временную зависимость тока сенсорного элемента, измеренную в буферном растворе и в растворах сывороток крови обследуемых. Стационарные значения тока в растворах сывороток меньше, чем в чистом буфере PBS ($p < 0,05$). Это означает увеличение отрицательного заряда на поверхности сенсора. Относительные изменения тока (отклик сенсора) на неспецифическое взаимодействие (~33%, N1) достоверно меньше, чем на специфическое (52–56 %, N2) ($p < 0,001$). Отклик сенсора увеличивается при увеличении концентрации аналита (Tu M2-РК, N2) в растворе ($p < 0,01$).

Для сравнения представлен отклик сенсора на сыворотку крови здорового человека (~const) в широком 10^{-15} – 10^{-3} М диапазоне концентраций сыворотки в буфере PBS (рис. 5б). Отклик сенсора на неспецифическое взаимодействие остается практически неизменным в диапазоне концентраций 10^{-15} – 10^{-3} М сыворотки в PBS ($p = 0,78$).

Таким образом, данные этого пилотного исследования демонстрируют возможность экспресс-анализа сыворотки крови, высокие чувствительность (~ 10^{-13} – 10^{-15} М) и специфичность,

перспективность дальнейших исследований в области диагностики онкологических заболеваний, в том числе на ранних стадиях. Эти данные согласуются с результатами, полученными при выявлении раково-эмбрионального антигена, простатического специфического антигена [30].

Заключение

Методом сканирующей эллипсометрии установлено значимое увеличение эффективной толщины покрытия биомолекул в результате специфического взаимодействия «антиген–антитело» в группе пациентов с вне- и печеночными метастазами по сравнению с группой здоровых лиц ($p < 0,001$ – $0,042$). Специфичность взаимодействия подтверждена методом флуоресцентной оптической спектроскопии. С помощью спектрального эллипсометрического ППР-комплекса «Эллипс-СПЭК» (ИФП СО РАН, Россия) с подтверждением результатов на ProteOn XPR36 (BioRad, USA) экспериментально установлены различия констант скоростей специфических взаимодействий моноклональных высокоспецифических антител к опухолевой M2-пируваткиназе (Tumor M2-РК) на поверхности биочипов сыворотки крови пациентов с колоректальным раком разных стадий и с различной локализацией метастазов (AUC 0,89).

Методом спектроскопии комбинационного рассеяния света (Raman) сыворотки крови выявлены различия в интенсивности пиков в области 1005 – 1520 см⁻¹ в тех же группах пациентов ($p < 0,0001$ – $0,05$) с предсказательной точностью метода 90 % для ранних стадий заболевания.

Проведены пилотные эксперименты с КНИ-нанопроволочным биосенсором для индикации специфических белков (на примере Tumor M2-РК), которые продемонстрировали высокую чувствительность (10^{-13} – 10^{-15} М) и специфичность в определении антигенов в сыворотке крови больных КРР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Thun M.J. Cancer statistics, 2009. CA Cancer J Clin. 2009 Jul-Aug; 59 (4): 225–49. doi: 10.3322/caac.20006.
2. Cai S.R., Zhang S.Z., Zhu H.H., Huang Y.Q., Li Q.R., Ma X.Y., Yao K.Y., Zheng S. Performance of a colorectal cancer screening protocol in an economically and medically underserved population. Cancer Prev Res (Phila). 2011 Oct; 4 (10): 1572–9. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0377.
3. Pawlik T.M., Scoggins C.R., Zorzi D., Abdalla E.K., Andres A., Eng C., Curley S.A., Loyer E.M., Muratore A., Mentha G., Capussotti L., Vauthey J.N. Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. Ann Surg. 2005; 241: 715–22. doi: 10.1097/01.sla.0000160703.75808.7d.
4. Meyerhardt J.A., Mangu P.B., Flynn P.J., Corde L., Loprinzi C.L., Minsky B.D., Petrelli N.J., Ryan K., Schrag D.H., Wong S.L., Benson A.B. 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 Dec 10; 31 (35): 4465–70. doi: 10.1200/JCO.2013.50.7442.
5. Bathe O.F., Ernst S., Sutherland F.R., Dixon E., Butts C., Bigam D., Holland D., Porter G.A., Koppel J., Dowden S. A phase II experience with neoadjuvant irinotecan (CPT-11), 5-fluorouracil (5-FU) and leucovorin (LV) for colorectal liver metastases. BMC Cancer. 2009; 9: 156–67. doi:10.1186/1471-2407-9-156.
6. Pawlik T.M., Schulick R.D., Choti M.A. Expanding criteria for resectability of colorectal liver metastases. Oncologist. 2008; 13: 51–64. doi: 10.1634/theoncologist.2007-0142.
7. Shah S.A., Bromberg R., Coates A., Rempel E., Simunovic M., Gallinger S. Survival after liver resection for metastatic colorectal carcinoma in a large population. J Am Coll Surg. 2007; 205: 676–83. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2007.06.283.
8. Wild N., Andres H., Rollinger W., Krause F., Dilba P., Tacke M., Karl J. A combination of serum markers for the early detection of colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2010; 16: 6111–21. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0119.
9. Shastri Y.M., Stein J.M. Faecal tumour pyruvate kinase M2: not a good marker for the detection of colorectal adenomas. Br J Cancer. 2008 Sep 30; 99: 1366, author reply 1367. doi: 10.1038/sj.bjc.6604656.
10. Jonkheijm P., Weinrich D., Schroder H., Niemeyer C.M., Waldmann H. Chemical Strategies for Generating Protein Biochips. Angew Chem Int Ed Engl. 2008; 47: 9618–47. doi: 10.1002/anie.200801711.
11. Рыхлицкий С.В., Кручинин В.Н., Швец В.А., Снесивцев Е.В., Прокопьев В.Ю. Спектральный плазмон-эллипсометрический комплекс «Эллипс-СПЭК». Приборы и техника эксперимента. 2013; 1: 137–138. doi: 10.7868/S0032816212060092.
12. Снесивцев Е.В., Рыхлицкий С.В., Назаров Н.И. Автоматический сканирующий микроэллипсомер. Автометрия. 1997; 1: 100–5.

13. Власов В.В., Сияжков А.Н., Пышный Д.В., Рыхлицкий С.В., Кручинин В.Н., Спесивцев Е.В., Пышная И.А., Костина Е.В., Дмитриенко Е.Д., Бессмелцев В.П. Эллипсометрический мониторинг в микрочиповых label-free биотехнологиях. *Автометрия*. 2011; 47 (5): 67–71.
14. Dmitrienko E., Naumova O., Fomin B., Kupryushkin M., Volkova A., Amirkanov N., Semenov D., Pyshnaya I., Pyshnyi D. Surface modification of SOI-FET sensors for label-free and specific detection of short RNA analyte. *Nanomedicine*. 2016; 11 (16): 2073–2082.
15. Иванюк Ю.Д., Плевакова Т.О., Козлов А.Ф., Мальсагова К.А., Крохин Н.В., Кайшева А.Л., Шумов И.Д., Попов В.П., Наумова О.В., Фомин Б.И., Насимов Д.А., Асеев А.Л., Арчаков А.И. КНИ-нанопроволочный транзистор для детекции молекул D-NFATc1. *Автометрия*. 2013; 49 (5): 119–126.
16. Naumova O.V., Popov V.P., Safronov L.N., Fomin B.I., Nasimov D.A., Latyshev A.V., Aseev A.L., Ivanov Yu.D., Archakov A.I. Ultra-Thin SOI Layer Nanostructuring and Nanowire Transistor Formation for Femto-Mole Electronic Biosensors. *ECS Transactions*. 2009; 25 (10): 83–87. doi: 10.1149/1.3241580.
17. Demir A.S., Erdenen F., Muderrisoglu C., Toros A.B., Bektas H., Gelisgen R., Tabak O., Altunoglu E., Uzun H., Erdem Hug G., Aral H. Diagnostic and prognostic value of tumor M2-pyruvate kinase levels in patients with colorectal cancer. *Turk J Gastroenterol*. 2013; 24(1): 36–42. doi: 10.4318/tjg.2013.0607.
18. 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 June 15; 4 (6): 145–51. doi: 10.4251/wjgo.v4.i6.145.
19. Tonus C., Neupert G., Sellinger M. Colorectal cancer screening by non-invasive metabolic biomarker fecal tumor M2-PK. *World J Gastroenterol*. 2006; 12 (43): 7007–11. doi: 10.3748/wjg.v12.i43.7007.
20. Kaura B., Bagga R., Patel F.D. Evaluation of the Pyruvate Kinase isoenzyme tumor (Tu M2-PK) as a tumor marker for cervical carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res*. 2004; 30 (3): 193–96. doi: 10.1111/j.1447-0756.2004.00187.x.
21. Mazurek S., Boschek C.B., Hugo F., Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol*. 2005; 15: 300–8. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.04.009.
22. Christofk H.R., Vander Heiden M.G., Harris M.H., Ramanathan A., Gerszten R.E., Wei R., Fleming M.D., Schreiber S.L., Cantley L.C. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*. 2008; 452: 230–33. doi: 10.1038/nature06734.
23. Walkowiak J., Banasiewicz T., Krokowicz P., Hansdorfer-Korzon R., Drews M., Herzig K.H. Fecal pyruvate kinase (M2-PK): a new predictor for inflammation and severity of pouchitis. *Scand J Gastroenterol*. 2005; 40 (12): 1493–4. doi: 10.1080/00365520500319112.
24. Helm J., Choi J., Sutphen R., Barthel J.S., Albrecht T.L., Chirikos T.N. Current and evolving strategies for colorectal cancer screening. *Cancer Control*. 2003; 10: 193–204.
25. Feng S., Wang W., Tai I.T., Chen G., Chen R., Zeng H. Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy for detection of colorectal cancer and precursor lesions using blood plasma. *Biomed Optics Express*. 2015; 6 (9): 3494–3502. doi: 10.1364/BOE.6.003494.
26. Zhou Q., Peng R.Q., Wu X.J., Xia Q., Hou J.H., Ding Y., Zhou Q.M., Zhang X., Pang Z.Z., Wan D.S., Zeng Y.X., Zhang X.S. The density of macrophages in the invasive front is inversely correlated to liver metastasis in colon cancer. *J Transl Med* 2010; 8: 13 (1–9). doi: 10.1186/1479-5876-8-13.
27. Giusca S.E., Zugun F.E., Tarcoveanu E., Carasevici E., Amalinei C., Caruntu I.D. Immunohistochemical study of colorectal cancer liver metastases: the immune/inflammatory infiltrate. *Rom J Morphol Embryol*. 2010; 51 (1): 73–79.
28. Meyerhardt J.A., Tepper J.E., Venook A. Special Series: Advances in GI Cancer. *J Clin Oncol*. 2015 Jun 1; 33 (16): 1717–20. doi: 10.1200/JCO.2015.60.8661.
29. Карякин А.А., Уласова Е.А., Вагин М.Ю., Карякина Е.Е. Биосенсоры: устройство, классификация и функциональные характеристики. *Сенсор*. 2002; 1: 16–24.
30. Zhang G.J., Ning Y. Silicon nanowire biosensor and its applications in disease diagnostics: a review. *Anal Chim Acta*. 2012; 749: 1–15. doi: 10.1016/j.aca.2012.08.035.
31. Yang F., Zhang G.J. Silicon nanowire-transistor biosensor for study of molecule-molecule interactions. *Rev Anal Chem*. 2014; 33 (2): 95–110. doi: 10.1515/revac-2014-0010.
32. Наумова О.В., Фомин Б.И. Оптимизация отклика нанопроволочных биосенсоров. *Автометрия*. 2016; 52 (5): 21–25.

Поступила 2.04.17

Принята в печать 26.06.17

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кручинина Маргарита Витальевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины» (г. Новосибирск, Россия). E-mail: kruchmargo@yandex.ru. SPIN-код: 5881-3315.

Прудникова Яна Игоревна, аспирант, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины» (г. Новосибирск, Россия). E-mail: dr.prudnikova@mail.ru.

Курилович Светлана Арсентьевна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины» (г. Новосибирск, Россия). E-mail: kurilovich@yandex.ru. SPIN-код: 7468-5800.

Громов Андрей Александрович, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины» (г. Новосибирск, Россия). E-mail: gromov.center@rambler.ru.

Кручинин Владимир Николаевич, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, ФГБНУ «Институт физики полупроводников» СО РАН (г. Новосибирск, Россия). E-mail: vladd.kruch@yandex.ru. SPIN-код: 2768-4372.

Атучин Виктор Валерьевич, кандидат физико-математических наук, заведующий лабораторией, ФГБНУ «Институт физики полупроводников» СО РАН (г. Новосибирск, Россия). E-mail: atuchin@isp.nsc.ru. SPIN-код: 3930-1190.

Наумова Ольга Викторовна, доктор физико-математических наук, заведующая лабораторией, ФГБНУ «Институт физики полупроводников» СО РАН (г. Новосибирск, Россия). E-mail: naumova@isp.nsc.ru.

Спесивцев Евгений Васильевич, кандидат технических наук, старший научный сотрудник, ФГБНУ «Институт физики полупроводников» СО РАН (г. Новосибирск, Россия). E-mail: evs@isp.nsc.ru. SPIN-код: 8724-4552.

Володин Владимир Алексеевич, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник, ФГБНУ «Институт физики полупроводников» СО РАН (г. Новосибирск, Россия). E-mail: volodin@isp.nsc.ru. SPIN-код: 1259-8724.

Пельтек Сергей Евгеньевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией, Институт цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия). E-mail: peltek@bionet.nsc.ru. SPIN-код: 2827-1324.

Шувалов Геннадий Владимирович, кандидат технических наук, директор института, ФГУП «Сибирский научно-исследовательский институт метрологии» (Новосибирск, Россия). E-mail: shuvalov@sniim.ru.

Генералов Владимир Михайлович, доктор технических наук, ведущий научный сотрудник, ФБНУ «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» (п. Кольцово, Новосибирская область, Россия). E-mail: general@vector.nsc.ru. SPIN-код: 2578-4290.

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о котором необходимо сообщить

ELLIPSOMETRY, RAMAN SPECTROSCOPY AND SOI- NANOWIRE BIOSENSOR IN DIAGNOSIS OF COLORECTALCANCER

M.V. Kruchinina^{1,5}, Ya.I. Prudnikova¹, S.A. Kurilovich¹, A.A. Gromov¹,
V.N. Kruchinin², V.V. Atuchin^{2,4}, O.V. Naumova², E.V. Spesivtsev²,
V.A. Volodin^{2,4}, S.E. Peltek³, G.V. Shuvalov⁵, V.M. Generalov⁶

Research Institute of Internal and Preventive Medicine - Branch of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia¹

175/1, B. Bogatogo Str., 630089-Novosibirsk, Russia.

E-mail: kruchmargo@yandex.ru¹

Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, SB RAS, Novosibirsk, Russia²

13, Academician Lavrentiev Prospect, 630090-Novosibirsk, Russia²

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia³

10, Academician Lavrentiev Prospect, 630090-Novosibirsk, Russia³

Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia⁴

2, Pirogova Str., 630090-Novosibirsk, Russia⁴

Siberian Scientific Research Institute for Metrology, ROSSTANDART, Novosibirsk, Russia⁵

4, Dimitrova Prospect, 630004-Novosibirsk, Russia⁵

State Research Center of Virology and Biotechnology «VECTOR», Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia⁶
Koltsovo-630559, Novosibirsk region, Russia⁶

Abstract

Differences in the rate constants of specific interactions between serum tumor M2-pyruvate kinase (Tumor M2-PK) and highly specific monoclonal antibodies deposited on the surface of biochips were found in colorectal cancer patients using surface plasmon resonance enhanced ellipsometry. Scanning ellipsometry revealed a significant increase in the biomolecular layer thickness caused by antigen-antibody reaction in patients with hepatic and extra-hepatic metastases compared to that in healthy subjects ($p < 0.001-0.042$). The specificity of the interaction was confirmed by fluorescence optical spectrometry. The Raman spectra of serum samples revealed differences in the intensity of peaks appeared at $1005-1520 \text{ cm}^{-1}$ in the same groups of patients ($p < 0.0001-0.05$) with a predictive accuracy of 90 % for early-stage disease. The pilot experiments with a nanowire biosensor based on SOI (silicon on insulator), for example Tumor M2-PK, were carried out. High sensitivity ($10^{-13}-10^{-15} \text{ M}$) and specificity in identifying antigens in serum samples of patients with colorectal cancer were demonstrated. The results obtained were useful for detecting early-stage disease, metastases and recurrence as well as for monitoring the quality of treatment in colorectal cancer patients.

Key words: diagnosis, colorectal cancer, ellipsometry, surface Plasmon resonance, fluorescence optical spectrometry, Raman spectroscopy, SOI nanowire biosensor, tumor M2 pyruvate kinase.

REFERENCES

1. Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Thun M.J. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009 Jul-Aug; 59 (4): 225-49. doi: 10.3322/caac.20006.
2. Cai S.R., Zhang S.Z., Zhu H.H., Huang Y.Q., Li Q.R., Ma X.Y., Yao K.Y., Zheng S. Performance of a colorectal cancer screening protocol in an economically and medically underserved population. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011 Oct; 4 (10): 1572-9. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0377.
3. Pawlik T.M., Scoggins C.R., Zorzi D., Abdalla E.K., Andres A., Eng C., Curley S.A., Loyer E.M., Muratore A., Mentha G., Capussotti L., Vauthey J.N. Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg.* 2005; 241: 715-22. doi: 10.1097/01.sla.0000160703.75808.7d.
4. Meyerhardt J.A., Mangu P.B., Flynn P.J., Corde L., Loprinzi C.L., Minsky B.D., Petrelli N.J., Ryan K., Schrag D.H., Wong S.L., Benson A.B. 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 Dec 10; 31 (35): 4465-70. doi: 10.1200/JCO.2013.50.7442.
5. Bathe O.F., Ernst S., Sutherland F.R., Dixon E., Butts C., Bigam D., Holland D., Porter G.A., Koppel J., Dowden S. A phase II experience with neoadjuvant irinotecan (CPT-11), 5-fluorouracil (5-FU) and leucovorin (LV) for colorectal liver metastases. *BMC Cancer.* 2009; 9: 156-67. doi:10.1186/1471-2407-9-156.
6. Pawlik T.M., Schulick R.D., Choti M.A. Expanding criteria for resectability of colorectal liver metastases. *Oncologist.* 2008; 13: 51-64. doi: 10.1634/theoncologist.2007-0142.
7. Shah S.A., Bromberg R., Coates A., Rempel E., Simunovic M., Gallinger S. Survival after liver resection for metastatic colorectal carcinoma in a large population. *J Am Coll Surg.* 2007; 205: 676-83. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2007.06.283.
8. Wild N., Andres H., Rollinger W., Krause F., Dilba P., Tacke M., Karl J. A combination of serum markers for the early detection of colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2010; 16: 6111-21. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0119.
9. Shastri Y.M., Stein J.M. Faecal tumour pyruvate kinase M2: not a good marker for the detection of colorectal adenomas. *Br J Cancer.* 2008 Sep 30; 99: 1366, author reply 1367. doi: 10.1038/sj.bjc.6604656.
10. Jonkheijm P., Weinrich D., Schroder H., Niemeyer C.M., Waldmann H. Chemical Strategies for Generating Protein Biochips. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2008; 47: 9618-47. doi: 10.1002/anie.200801711.
11. Rykhlytsky S.V., Kruchinin V.N., Shvets V.A., Spesivtsev E.V., Prokop'ev V.Yu. Spectral plasmon-ellipsometric complex «Ellips-SPEC». Devices and technics of experiment. 2013 Apr 11; 1: 137-138. doi: 10.7868/S0032816212060092. [in Russian]
12. Spesivtsev E.V., Rykhlytsky S.V., Nazarov N.I. Automatic scanning microellipsometer. *Autometry.* 1997; 1: 100-5. [in Russian]
13. Vlasov V.V., Sinyakov A.N., Pyshnyi D.V., Rykhlytsky S.V., Kruchinin V.N., Spesivtsev E.V., Pyshnaya I.A., Kosyina E.V., Dmitrienko E.D.,

Bessmeltsev V.P. Ellipsometric monitoring in microchip label-free biotechnologies. *Autometry*. 2011; 47(5): 67–77. [in Russian]

14. *Dmitrienko E., Naumova O., Fomin B., Kupryushkin M., Volkova A., Amirkhanov N., Semenov D., Pyshnaya I., Pyshnyi D.* Surface modification of SOI-FET sensors for label-free and specific detection of short RNA analyte. *Nanomedicine*. 2016; 11 (16): 2073–2082.

15. *Ivanov Yu.D., Pleshakova T.O., Kozlov A.F., Malsagova K.A., Krokhin N.V., Kaisheva A.L., Shumov I.D., Popov V.P., Naumova O.V., Fomin B.I., Nasimov D.A., Aseev A.L., Archakov A.I.* SOI-nanoware transistor for D-NFATc1 molecules detection. *Autometry*. 2013; 49 (5): 119–126. [in Russian]

16. *Naumova O.V., Popov V.P., Safronov L.N., Fomin B.I., Nasimov D.A., Latyshev A.V., Aseev A.L., Ivanov Yu.D., Archakov A.I.* Ultra-Thin SOI Layer Nanostructuring and Nanowire Transistor Formation for Femto-Mole Electronic Biosensors. *ECS Transactions*. 2009; 25 (10): 83–87. doi: 10.1149/1.3241580.

17. *Demir A.S., Erdenen F., Muderrisoglu C., Toros A.B., Bektas H., Gelisgen R., Tabak O., Altunoglu E., Uzun H., Erdem Huq G., Aral H.* Diagnostic and prognostic value of tumor M2-pyruvate kinase levels in patients with colorectal cancer. *Turk J Gastroenterol*. 2013; 24(1): 36–42. doi: 10.4318/tjg.2013.0607.

18. *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 June 15; 4 (6): 145–51. doi: 10.4251/wjgo.v4.i6.145.

19. *Tonus C., Neupert G., Sellinger M.* Colorectal cancer screening by non-invasive metabolic biomarker fecal tumor M2-PK. *World J. Gastroenterol*. 2006; 12 (43): 7007–11. doi: 10.3748/wjg.v12.i43.7007.

20. *Kaura B., Bagga R., Patel F.D.* Evaluation of the Pyruvate Kinase isoenzyme tumor (Tu M2-PK) as a tumor marker for cervical carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res*. 2004; 30 (3): 193–96. doi: 10.1111/j.1447-0756.2004.00187.x.

21. *Mazurek S., Boschek C.B., Hugo F., Eigenbrodt E.* Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol*. 2005; 15: 300–8. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.04.009.

22. *Christofk H.R., Vander Heiden M.G., Harris M.H., Ramanathan A., Gerszten R.E., Wei R., Fleming M.D., Schreiber S.L., Cantley L.C.* The M2

splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*. 2008; 452: 230–33. doi: 10.1038/nature06734.

23. *Walkowiak J., Banasiewicz T., Krokowicz P., Hansdorfer-Korzon R., Drews M., Herzig K.H.* Fecal pyruvate kinase (M2-PK): a new predictor for inflammation and severity of pouchitis. *Scand J Gastroenterol*. 2005; 40 (12): 1493–4. doi: 10.1080/00365520500319112.

24. *Helm J., Choi J., Sutphen R., Barthel J.S., Albrecht T.L., Chirikos T.N.* Current and evolving strategies for colorectal cancer screening. *Cancer Control*. 2003; 10: 193–204.

25. *Feng S., Wang W., Tai I.T., Chen G., Chen R., Zeng H.* Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy for detection of colorectal cancer and precursor lesions using blood plasma. *Biomed Optics Express*. 2015; 6 (9): 3494–3502. doi: 10.1364/BOE.6.003494.

26. *Zhou Q., Peng R.Q., Wu X.J., Xia Q., Hou J.H., Ding Y., Zhou Q.M., Zhang X., Pang Z.Z., Wan D.S., Zeng Y.X., Zhang X.S.* The density of macrophages in the invasive front is inversely correlated to liver metastasis in colon cancer. *J Transl Med* 2010; 8: 13 (1–9). doi: 10.1186/1479-5876-8-13.

27. *Giusca S.E., Zugun F.E., Tarcoveanu E., Carasevici E., Amalinei C., Caruntu I.D.* Immunohistochemical study of colorectal cancer liver metastases: the immune/inflammatory infiltrate. *Rom J Morphol Embryol*. 2010; 51 (1): 73–79.

28. *Meyerhardt J.A., Tepper J.E., Venook A.* Special Series: Advances in GI Cancer. *J Clin Oncol*. 2015 Jun 1; 33 (16): 1717–20. doi: 10.1200/JCO.2015.60.8661.

29. *Karyakin A.A., Ulasova E.A., Vagin M.Yu., Karyakina E.E.* Biosensors: A device classification and functional characteristics. *Sensor*. 2002; 1: 16–24. [in Russian]

30. *Zhang G.J., Ning Y.* Silicon nanowire biosensor and its applications in disease diagnostics: a review. *Anal Chim Acta*. 2012; 749: 1–15. doi: 10.1016/j.aca.2012.08.035.

31. *Yang F., Zhang G.J.* Silicon nanowire-transistor biosensor for study of molecule-molecule interactions. *Rev Anal Chem*. 2014; 33 (2): 95–110. doi: 10.1515/revac-2014-0010.

32. *Naumova O.V., Fomin B.I.* Optimization of nanowire biosensors response. *Autometry*. 2016; 52 (5): 21–25. [in Russian]

Received 2.04.17
Accepted 26.06.17

ABOUT THE AUTHORS

Kruchinina Margarita V., Professor, Leading Researcher, Institution of Internal and Preventive Medicine (Novosibirsk, Russia). E-mail: kruchmargo@yandex.ru. SPIN-code: 5881-3315.

Prudnikova Yana I., Post Graduate, Institution of Internal and Preventive Medicine (Novosibirsk, Russia). E-mail: dr.prudnikova@mail.ru.

Kurilovich Svetlana A., Professor, Head of Laboratory, Institution of Internal and Preventive Medicine (Novosibirsk, Russia). E-mail: kurilovich@yandex.ru. SPIN-code: 7468-5800.

Gromov Andrey A., PhD, Head of Laboratory, Institution of Internal and Preventive Medicine (Novosibirsk, Russia). E-mail: gromov.center@rambler.ru.

Kruchinin Vladimir N., PhD, Senior Scientist, Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, SB RAS (Novosibirsk, Russia). E-mail: vladd.kruch@yandex.ru. SPIN-code: 2768-4372.

Atuchin Viktor V., PhD, Head of Laboratory, Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, SB RAS (Novosibirsk, Russia). E-mail: atuchin@isp.nsc.ru. SPIN-code: 3930-1190.

Naumova Olga V., Professor, Head of Laboratory, Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, SB RAS (Novosibirsk, Russia). E-mail: naumova@isp.nsc.ru.

Spesivtsev Evgeny V., PhD, Senior Scientist, Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, SB RAS (Novosibirsk, Russia). E-mail: evs@isp.nsc.ru. SPIN-code: 8724-4552.

Volodin Vladimir A., Professor, Leading Researcher, Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, SB RAS (Novosibirsk, Russia). E-mail: volodin@isp.nsc.ru. SPIN-code: 1259-8724.

Peltek Sergey E., PhD, Head of Laboratory, Institute of Cytology and Genetics, SB RAS (Novosibirsk, Russia). E-mail: peltek@bionet.nsc.ru. SPIN-code: 2827-1324.

Shuvalov Gennadiy V., PhD, Director of Institute, Siberian Scientific Research Institute for Metrology, ROSSTANDART (Novosibirsk, Russia). E-mail: shuvalov@sniim.ru.

Generalov Vladimir M., Professor, Leading Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology «VECTOR» (Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia). E-mail: general@vector.nsc.ru. SPIN-code: 2578-4290.

Authors declare lack of the possible conflicts of interests