

Sveučilište u Zagrebu
Medicinski fakultet

Lukrecija Anžić

Usporedba tipičnih i atipičnih karcinoida korištenjem vibracijske spektroskopije

Zagreb, 2024.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za patologiju i Zavodu za fiziku i biofiziku pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof.dr.sc. Svena Seiwertha i doc.dr.sc. Kristine Serec i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2023./2024.

Popis i objašnjenje kratica

NET-neuroendokrini tumor

MEN1-sindrom multiple neuroendokrine neoplazije tip 1

NF1-neurofibromatoza tip 1

TSC-engl. *tuberous sclerosis complex*

VHL-bolest Von Hippel-Lindau

GI-gastrointestinalni

CT-engl. *computed tomography*

PET-engl. *positron emission tomography*

MR-magnetska rezonancija

FTIR-engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*

YAG-engl. *yttrium aluminium garnet*

APC-engl. *argon plasma coagulation*

KBC-klinički bolnički centar

KNN-engl. *k-nearest neighbours*

SVMDA-engl. *support vectore machine discriminant analysis*

eFTIR-engl. *essential Fourier-transform infrared spectroscopy, infracrvena spektroskopija*

PCA-engl. *principal component analysis*

TP-engl. *true positive*

TN-engl. *true negative*

FP-engl. *false positive*

FN-engl. *false negative*

CA19-9-engl. *carbohydrate antigen 19-9*

CA125-engl. *cancer antigen 125*

PSA-engl. *prostate-specific antigen*

Cg-A-engl. *chromogranin-A*

Ki-67-engl. *antigen Kiel 67*

CD56-engl. *neural cell adhesion molecule 1*

H&E-hemalaun i eozin

PLS-DA-engl. *partial least squares discriminant analysis*

SADRŽAJ RADA

1. Uvod.....	1
1.1. Karcinoidi.....	1
1.2. Patogeneza.....	1
1.3. Epidemiologija.....	1
1.4. Klasifikacija.....	1
1.5. Plućni karcinoidi.....	2
1.6. Dijagnostika.....	2
1.7. Liječenje.....	3
1.8. FTIR spektroskopija.....	3
2. Hipoteza.....	4
3. Opći ciljevi rada.....	4
4. Specifični ciljevi rada.....	4
5. Materijali i metode.....	4
5.1. Patohistološka priprema.....	5
5.2. FTIR spektroskopija.....	6
5.3. Analiza podataka.....	6
6. Rezultati.....	8
6.1. FTIR spektri s asignacijom.....	8
6.2. Analiza principalnih komponenti.....	11
6.3. KNN i SVM DA analiza.....	13
7. Rasprava.....	16
8. Zaključci.....	19
9. Zahvale.....	19
10. Popis literature.....	20
11. Sažetak.....	23
12. Summary.....	24

1.UVOD

1.1. Karcinoidi

Karcinoidi su tumori koji su nastali iz neuroendokrinih stanica. Pripadaju u obitelj neuroendokrinih tumora (NET). Naziv *Karzinoidi* osmislio je Oberndorfer 1907. kako bi opisao tumore koji su indolentniji od „adenokarcinoma“. (Kulke i sur., 1999.) Pod elektronskim mikroskopom, u citoplazmama karcinoida vidljive su neurosekretorne granule obavijene membranom. U granulama nalaze se biološki aktivni spojevi koje ovi tumori proizvode. Najčešći spojevi koji se luče su serotonin, kortikotropin, histamin i dopamin. Neki od njih djeluju vazoaktivno zbog čega dovode do karcinoidnog sindroma. (Kulke i sur., 1999.) On je posljedica lučenja serotonina, histamina, prostangladina...Karakteriziran je crvenilom, proljevom, teleangiektazijama, pelagrom,opstrukcijom uretera te ishemijom i opstrukcijom crijeva. (Gade i sur., 2020.)

1.2.Patogeneza

Rizični faktori za nastanak karcinoida nedovoljno su istraženi. NET-ovi su i dio nekih nasljednih sindroma poput MEN1, NF1, TSC i bolesti Von Hippel Lindau(VHL).(Cleveland Clinic, 2016.)

1.3. Epidemiologija

Incidencija karcinoida je populacijska te se procjenjuje na 4/100 000 ljudi.(Cleveland Clinic, 2016.) Karcinoidi se najčešće dijagnosticiraju kod ljudi u dobi 50-60 god. Pripadnici crne rase imaju veći rizik od ostalih rasa za dobivanje većine karcinoida osim karcinoida apendiksa i onih respiratornog trakta. Prema podacima američkog registra za rak, žene obolijevaju češće od muškaraca(55%). Najučestalije sjelo ovih tumora je GI trakt (74%). Karcinoidi pokazuju sporiji rast od adenokarcinoma. Budući da je 40-60% pacijenata godinama asimptomatsko, nerijetko se karcinoid dijagnosticira nakon 20 godina od nastanka. (Schnirer i sur., 2003.)

1.4. Klasifikacija

Karcinoidi se mogu jednostavno podijeliti prema anatomskoj lokalizaciji. Najčešći su u probavnom sustavu, a nakon toga u respiratornom sustavu iako se mogu naći praktički na bilo kojem mjestu. Drugi način podjele je prema histološkim obilježjima. Histološki se dijele na tipične i atipične. Tipični karcinoidi građeni su od jednoličnih stanica sa okruglim ili ovalnim jezgrama i eozinofilnom citoplazmom. Stanice tipičnih karcinoida oblikuju trabekularne, organoidne ili solidne nakupine unutar organa. Mitoze su rijetke; manje od 2 na 10 vidnih polja velikog povećanja (2mm²). Nekroza nije prisutna. Atipični su karcinoidi agresivni i rjeđi od tipičnih. Nalikuju tipičnim, kao atipične karcinoide klasificira se tumore s 2-10 mitozama na 10

vidnih polja velikog povećanja (2mm²). Nekroza je učestala.(Damjanov i sur., 2018.) Osim toga, svi karcinoidi se nakon ove podjele još dijele prema TNM sustavu. Ne postoji poseban TNM sustav za plućne karcinoide, već se oni klasificiraju prema TNM sustavu za karcinome pluća.(American Cancer Society, www.cancer.org)

1.5. Plućni karcinoidi

Udio plućnih karcinoida u tumorima pluća je 2%. Smatra se da su nastali transformacijom Kulchitskyjevih stanica lokaliziranih u bronhalnoj mukoznoj membrani. (Kulke i sur., 1999.) Tipični se plućni karcinoidi obično pojavljuju u 5.desetljeću života. Većina tih tumora nalazi se perihilarno u plućima. Neki od simptoma kojima se mogu prezentirati su učestale pneumonije, kašalj, hemoptiza i bol u prsima. Neuroendokrini simptomi poput Cushingove bolesti zbog ekskrecije kortikotropina ili akromegalije kao posljedice lučenja hormona rasta vrlo su rijetki; zabilježeni su u samo 5% slučajeva. Tipični karcinoidi metastaziraju u manje od 15% slučajeva i to prvenstveno u mediastinalne limfne čvorove, jetru, kožu i kosti. Na prognozu najviše utječu pristnost simptoma i nodalna invazija. Unatoč tome, petogodišnje preživljenje je vrlo dobro i iznosi 90% za tipične karcinoide. Aproksimativno svega jedna trećina plućnih karcinoida otpada na atipične koji imaju agresivniji klinički tijek. Atipični se pojavljuju kasnije od tipičnih, obično u šezdesetogodišnjaka. Oni u pravilu narastu veći i rašireni su na perifernom dijelu pluća. Metastaziraju u 30 do 50% slučajeva, a petogodišnje preživljenje je tek 40-60%.(Schnirer i sur., 2003.)

1.6. Dijagnostika

Postojanje tumora vidljivo je slikovnim dijagnostičkim metodama; Rendgen, CT, MR ili tijekom bronhoskopije. Zlatni standard za postavljanje dijagnoze tumora, tako i karcinoida je biopsija te patohistološka analiza bioptata. Histokemijski mogu se metodama impregnacije srebrom obojiti neuroendokrine granule karcinoida, a imunohistokemijski mogu se koristiti razni markeri za neuroendokrine stanice; neuron-specifična enolaza, sinaptofizin, kromogranin te CD56. Elektronskim mikroskopom vidljive su neurosekretorne granule obavijene membranom. Te granule u nekih karcinoida luče hormone i vazoaktivne tvari čiji metaboliti u urinu mogu pomoći pri kliničkoj diferencijalnoj dijagnozi, odnosno u praćenju bolesnika. Najučestaliji metabolit je 5-hidroksiindoloctena kiselina.(Nooreldeen i sur., 2021.; Kulke i sur., 1999.) Osim njega, karcinoidi još mogu lučiti razne peptide poput atrijalnog natriuretskog peptida, alfa-1-antitripsina, neurotenzina, somatostatina, motilina, kalikreina te neuropeptida K. (Pinchot i sur., 2008.)

1.7. Liječenje

U liječenju plućnih karcinoida postoje brojne kirurške opcije. Prema težini i opsegu uklonjenog tkiva dijele se na ekstirpaciju, atipičnu resekciju, lobektomiju i pulmektomiju. Endoskopske metode poput primjene YAG ili diodnog lasera, krioterapije, elektroresekcije ili argon-plazma koagulacije (APC) u nekim su slučajevima adekvatna alternativa klasičnom operativnom zahvatu. YAG laser (engl. yttrium aluminium garnet) sastoji se od jitrin aluminij garneta; sintetskog kristala koji je za potrebe korištenja legiran s ionima neodimija (Nd^{3+}). Oni djeluju kao aktivni laserski medij nakon pubuđivanja vanjskim izvorom i emitiraju svjetlost valne duljine infracrvenog područja. Zbog svoje visoke snage i učinkovitosti, ovaj se laser primjenjuje u znanosti, medicini i proizvodnji. (Connor, 2023.) Argon-plazma koagulacija monopolarna je elektrokirurška tehnika koja koristi plazmu koja nastaje ioniziranjem argona. Plazma ima sposobnost površinskog prijenosa velike topline na tkivo zbog čega dolazi do koagulacije tkiva. Nakon koagulacije slijedi nekroza zahvaćenog tkiva. Ovaj princip primjenjuje se u odstranjivanju tumora i zaustavljanju krvarenja. (Zenker, 2008.) Analozni somatostatina su uz operativni zahvat uvriježeni način liječenja plućnih karcinoida. (Prinzi i sur., 2021.)

1.8. FTIR spektroskopija

Uloga infracrvena spektroskopija (FTIR, engl. *Fourier-transformed infrared spectroscopy*) je dobivanje apsorpcijskog spektra tvari u infracrvenom rasponu. Pogodna je za mjerenje tvari u svim trima agregacijskim stanjima. (Fadlelmoula i sur., 2022.) FTIR šalje svjetlosni snop valnih duljina infracrvenog raspona od $10\,000\text{ cm}^{-1}$ do 100 cm^{-1} prema uzorku. Neki dio zračenja uzorak apsorbira, a drugi emitira. Apsorbirajuće zračenje postaje rotacijska odnosno vibracijska energija molekula u uzorku. Rezultirajući signal koji pada na detektor je najčešće u rasponu od 4000 cm^{-1} do 400 cm^{-1} te on predstavlja molekularni „otisak prsta“ uzorka. (Rtilab.com, 2015.) Frekvencija svjetlosti koju tkivo apsorbira ovisi o vrsti kemijskih veza između atoma tkiva, vrsti samih atoma te vibracijskom spektru. Količina svjetlosti koju neka vibracijska veza apsorbira ovisi o koncentraciji promatranog tkiva. Ta koncentracija ustvari oslikava kemijsku kompoziciju tkiva te zbog toga FTIR spektroskopija može razlikovati zdravu od tumorske stanice. Potencijal vibracijske spektroskopije odnosno infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom u detekciji karcinoma je velik. (Pijanka i sur., 2010.) Najveći nedostatak FTIR spektroskopije je dubina tkivnog prodiranja infracrvene svjetlosti koja je ograničena na nekoliko desetaka mikrometara. (Fadlelmoula i sur., 2022.)

2. Hipoteza

Postoji razlika između vibracijskih spektara tipičnih i atipičnih karcinoida. Ova pojava možda bi se mogla koristiti i u dijagnostičke svrhe.

3. Opći cilj

Usporedba tipova karcinoida i njihovih vibracijskih spektara korištenjem vibracijske spektroskopije.

4. Specifični ciljevi

Uspoređivanje vibracijskih spektara tipičnih i atipičnih karcinoida obzirom na njihove morfološke i epidemiološke pokazatelje te biološko ponašanje (recidiv, metastaza).

Analiziranje potencijala vibracijske spektroskopije kao dodatnog dijagnostičkog alata.

5. Materijali i metode

U ovom smo istraživanju uspoređivali vibracijske spektre 25 pacijenata, s tim da smo kod 3 pacijenta snimali dva uzorka zbog ponovljenih biopsija karcinoida, tako da je broj ukupno analiziranih uzoraka bio 28. (Tablica 1.) U istraživanje su uvršteni svi bolesnici kojima je od 2011. godine do 2018. godine na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KBC Zagreb dijagnosticiran karcinoid pluća (ukupno 23) te sve uzorke koji su u razdoblju od 2011. godine do 2018. godine dijagnosticirani i obrađeni na Zavodu za patologiju MEF Zagreb (ukupno 2). Vremenski okvir istraživanja je postavljen tako da su bolesnici praćeni najmanje pet godina nakon dijagnoze.

Iz Bolničkog informacijskog sustava je osoba s odgovarajućim ovlastima (prof.dr.sc. Sven Seiwerth) izdvojila podatke o bolesnicima koji su zatim anonimizirano uvršteni u tablicu koja se koristila u ovom istraživanju (podatci od stupca dva prema desno). Primjer tablice s istraživanim parametrima dan je pod Tablica 2.

Nakon toga sakupili smo pripadajuće parafinske kocke i stakla s preparatima navedenih biopsija tih pacijenata sa KBC-a Zagreb i Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Tablica 1. Sažeti pregled materijala

	Broj
Pacijenti	25
Biopsije	28
Uzorci-ukupno	140
Uzorci tipičnih karcinoida	60
Uzorci atipičnih karcinoida	80

Tablica 2. Pregled istraživanih parametara

Kod (broj biopsije)	Interni kod istraživanja	Spol	Dob u trenutku dijagnoze	Tipični/Atipični	Dodatne dijagnoze	Zadnja nalaz	Recidiv	Metastaze	Kemoterapija	Vrsta zahvata	TNM	Posebne osti

5.1. Patohistološka priprema

Pregledom stakala najprije je dijagnoza verificirana od strane patologa koji ima iskustvo u plućnoj patologiji, a zatim su izdvojeni parafinski blokovi s najpogodnijim materijalom. Na histološkom preparatu bojenom HE označili smo područje karcinoida. Parafinski blokovi prvo su ohlađeni na ledu da bi se mogli narezati. Od svake je kocke na kliznom mikrotomu izrezano 5 preparata debljine 10 mikrometara. Dobili smo ukupno 140 preparata/rezova iz 28 biopsija od 25 pacijenata. Opisani rezovi su se potom postavili u hladnoj vodenoj kupelji i na silicijske pločice i onda u toplu vodenu kupelj na 45 stupnjeva C. Stavili smo ih zatim mokre u kivete koje smo ostavili u termostatu na 66 stupnjeva C sat vremena. Nakon sat vremena, zapisali smo naziv preparata te se započeli postupak deparafinizacije. Preparat smo postavili u ksilol na 20 minuta, potom smo ga provlačili kroz alkoholne otopine sa proporcionalno sve nižom koncentracijom alkohola. 10 puta smo ga uranjali u 100% etanol, 10 puta u 90% i na kraju također 10 puta u 70% etanol. Proces završavamo ispiranjem 10 puta u destiliranoj vodi. Nastojali smo u roku od 24 sata snimiti pripremljeni preparat; kad to nije bilo moguće ostavili bismo preparate pokrivene u hladnjaku. 120 preparata snimili smo unutar 24h, 10 preparata unutar 48h, a 10 zbog iznimnih okolnosti unutar 120 sati.

5.2. FTIR spektroskopija

Svaki od 140 preparata korišten je za spektroskopiju. Višak vode odnosno sušenje preparata postiglo se dehidracijom u velikom eksikatoru prije snimanja. Posebna se pozornost obraćala dehidraciji jer je FTIR spektroskopija osjetljiva na vodu. Dehidriralo se po 10 preparata u trajanju od 10 minuta u vakuumu eksikatora. Nakon dehidracije snimali bi set od 10 preparata, odnosno 2 vrste bioptičkih uzoraka. Vibracijski spektri snimani su uporabom PerkinElmer Spectrum GX opremljenog MCT detektorom. Prije snimanja svakog seta preparata uvijek bi se snimilo 64 skena pozadinskog spektra prazne silicijske pločice istovjetne onima na kojima su preparati. Ta pozadina (engl. *background*) automatski je oduzeta od spektara uzorka. Snimljeno je 32 skena svakog uzorka u rasponu valnih brojeva $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ s rezolucijom $3,98\text{ cm}^{-1}$. Nakon snimanja bismo pločice očistili papirom za brisanje i destiliranom vodom te po potrebi etanolom te ih ponovno koristili. Svi spektri su korigirani i uklonjena im je pozadina uzrokovana raznim artefaktima. Dobiveni vibracijski spektri posljedica su svih značajki tkiva koje imaju karakteristične apsorpcijske vrpce za različite valne brojeve. Vibracijski spektri oblikuju se na temelju interakcija biokemijske strukture tkiva i infracrvenih zraka. Rezultati FTIR spektroskopije prikazuju se kao vibracijski spektri koji grafički opisuju apsorpciju infracrvene svjetlosti u funkciji valnog broja. Na vibracijskim spektrima vidljiva je promjena intenziteta apsorpcije infracrvene svjetlosti u različitim valnim brojevima. Spektri sadrže vrhove (intenzitete apsorpcije) koji odgovaraju vibracijama kemijskih veza. Nakon pronalaska odgovarajućih funkcionalnih skupina za svaki vrh, dobivamo podatke o strukturi snimljenog tkiva.

5.3 Analiza podataka

Za obradu vibracijskih spektara korišteni su Matlab R2010b (Mathworks, MA, USA) i PLS_Toolbox (Eigenvector Research, Manson, WA, USA). Provedena multivarijantna analiza glavnih komponentata (engl. *Principal component analysis, PCA*), metoda diskriminativne analize potpornih vektora (engl. *Support Vector Machine Discriminant Analysis, SVMDA*) i algoritam k najbližih susjeda (engl. *K-nearest neighbour, KNN*). Izračun srednjih spektara i asignacija obavljani su u Essential FTIR (eFTIR) programu. Za prikaz asigniranih spektara koristili smo OriginPro (OriginLab). PCA je metoda formiranja novih, umjetnih varijabli koje su linearne kombinacije onih izvornih. PCA metodom može se efikasno reducirati dimenzija seta podataka na manji broj onih koji daju najveću varijaciju među podacima. Svrha analize principalnih komponenti su sažimanje i dobivanje linearne povezanosti većeg broja multivarijatno posloženih, međusobno povezanih varijabli u manji broj neovisnih komponenti bez znatnijeg gubitka podataka. Rezultati PCA analize uobičajeno se prikazuju u obliku grafičkih prikaza. Grafički prikaz ili engl. *Plot* projicira podatke u prostor i služi prikazivanju odnosa između uzoraka. Blizina tako prikazanih uzoraka predstavlja njihovu sličnost, a udaljenost postojanje značajne razlike. Za izradu klasifikacijskih

modela koristili smo SVMDA I KNN algoritme strojnog učenja. Prvi model strojnog učenja koji smo upotrijebili je KNN.(Rudež, 2021.) Njegova ideja je da identificira nove objekte na temelju zadanih atributa i unesenih podataka. Za pronalaženje tog novog objekta na temelju unesenog podatka koji je najbliže novom podatku koristi Euklidovu formulu udaljenosti.(Okfalisa i sur., 2017.) Drugi korišteni model bio je SVMDA. Ovaj algoritam također se često koristi u izradi klasifikacijskih modela. Uloga SVMDA je konstruiranje hiperravnine ili skupa hiperravnina, koje se mogu koristiti za klasifikaciju ili regresiju odnosno mogu razdvojiti skupine podataka. Razlikovanje dvije skupine podataka postiže se onom hiperravninom koja ima najveću udaljenost od najbliže točke u kojoj se nalazi podatak koji pripada klasama koje želimo razdvojiti. Ta udaljenost i pogreška SVM klasifikacije su obrnuto proporcionalne. (Rudež, 2021.) Napravili smo brojne modele podataka, ali prikazali smo samo onaj s najboljim prediktivnim rezultatom; koji najbolje razvrstava unesene karcinoide prema atipiji na temelju baze podataka za trening. Nasumičnim odabirom izabrani su spektri koje smo razvrstali u dvije skupine. Tako smo dobili sasvim nasumični poredak spektara te razdvojili prvih 100 za trening, a zadnjih 40 za validaciju i koristili ih za KNN i SVMDA analizu. Kao pokazatelj uspješnosti modela koristili smo termine pravi pozitivni (TP, *engl. true positive*), lažno pozitivni (FP, *engl. false positive*), pravi negativni (TN *engl. true negative*) i lažno negativni(FN, *engl. false negative*). Matrica konfuzije izračunala je stope (*engl. rates*) prethodno navedenih termina prema navedenim formulama.

$$\text{TPR(stopa pozitivnih slučajeva koji su ispravno identificirani, } \textit{engl. true positive rate})} = \frac{TP}{TP+FN}$$

$$\text{FPR(stopa negativnih slučajeva koji su pogrešno klasificirani kao pozitivni, } \textit{engl. false positive rate})} = \frac{FP}{FP+TN}$$

$$\text{TNR(stopa negativnih slučajeva koji su ispravno klasificirani, } \textit{engl. true negative rate})} = \frac{TN}{TN+FP}$$

$$\text{FNR(stopa pozitivnih slučajeva koji su pogrešno klasificirani kao negativni, } \textit{engl. false negative rate})} = \frac{FN}{FN+TP}$$

Potom smo izračunali mjere evaluacije:

$$\text{Točnost} = \left(\frac{TP+TN}{TP+TN+FP+FN} \right) \times 100 \quad (\text{da Silva i sur., 2023.})$$

$$\text{Osjetljivost} = \left(\frac{TP}{TP+FN} \right) \times 100 \quad (\text{da Silva i sur., 2023.})$$

$$\text{Specifičnost} = \left(\frac{TN}{TN+FP} \right) \times 100 \quad (\text{da Silva i sur., 2023.})$$

$$F\text{-ocjena} = \left(\frac{2 \times \text{osjetljivost} \times \text{specifičnost}}{\text{osjetljivost} + \text{specifičnost}} \right) \quad (\text{da Silva i sur., 2023.})$$

$$G\text{-ocjena} = \sqrt{\text{osjetljivost} \times \text{specifičnost}} \quad (\text{da Silva i sur., 2023.})$$

$$\text{Klasifikacijska pogreška} = 1 - \text{točnost} = \frac{FP + FN}{TP + TN + FP + FN}$$

$$\text{Preciznost} = \frac{TP}{TP + FP}$$




$$F_1\text{-ocjena} = \frac{2 \times TP}{2 \times TP + FP + FN}$$

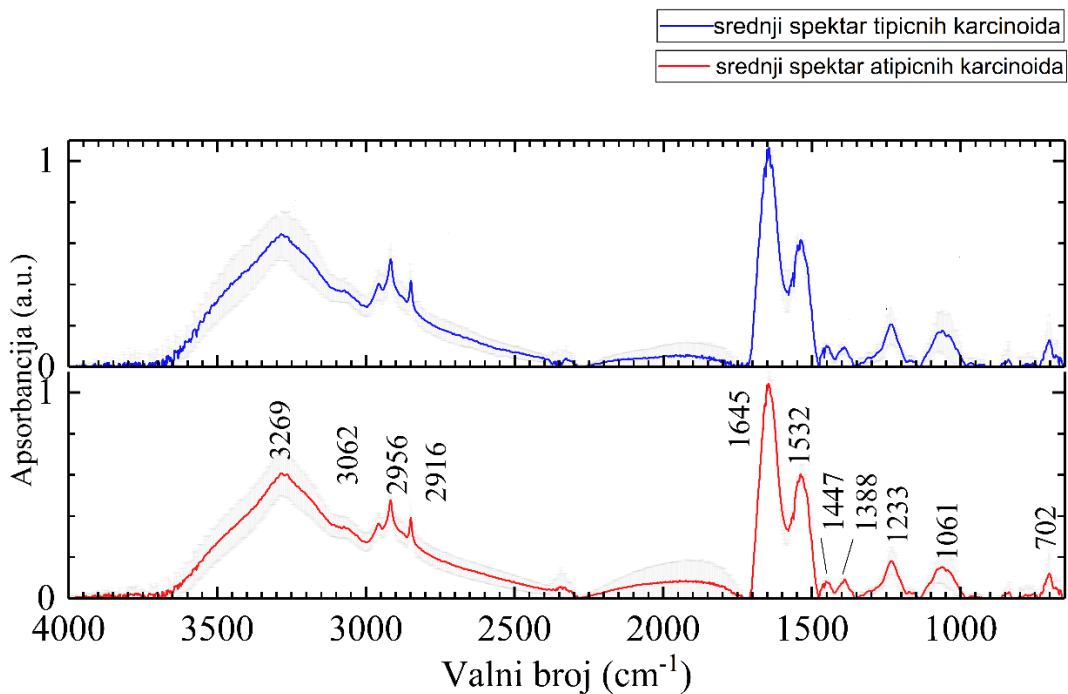
6. Rezultati

6.1. FTIR spektri s asignacijom

Uzeli smo svih 140 spektara te ih prvo korigirali po baznoj liniji (engl. *baseline correction*). Zatim smo ih podijelili prema atipiji u dvije skupine. Imali smo 12 slučajeva tipičnih odnosno 60 preparata/rezova i 16 slučajeva atipičnih odnosno 80 preparata/rezova. Za tipične i atipične karcinoide definirali smo prosječni spektar jer su se čak i spektri istog slučaja razlikovali prema intenzitetu zbog vanjskih faktora koji utječu na snimanje te raznolikosti u morfologiji karcinoida. Budući da snop infracrvene zrake prolazi kroz karcinoide heterogene strukture, dolazi do varijacija u spektrima istog slučaja. Svi spektri jedne skupine pridonose prosječnom spektru koji se dobiva kao kolekcija svih spektara podijeljena s brojem spektara. Identificirali smo apsorpcijske vrpce za najizraženije vrhove prosječnog spektra atipičnih karcinoida (Slika 1.) i povezali ih s funkcionalnim skupinama. (Tablica 3.)

Tablica 3. Povezivanje apsorpcijskih vrpci FTIR spektara sa funkcionalnim skupinama

Valni broj (cm ⁻¹)	Spoj	Asignacija	Referenca
~1650- 1644		Amid I	Movasaghi i sur., 2008; Ji i sur., 2020.
~1540		Amid II	Movasaghi i sur., 2008.; Ji i sur., 2020.
~1532	C55N, C55C	Citokrom	Movasaghi i sur., 2008.
~1449	CH3	Asimetrični bending metilne skupine proteina	Movasaghi i sur., 2008.
~1235	 (Amid III)	Amid III i fosfatna vibracija nukleinskih kiselina	Movasaghi i sur., 2008.; Ji i sur., 2020.
~1060	C-O	Stretching C-O deoksiriboza	Movasaghi i sur., 2008.

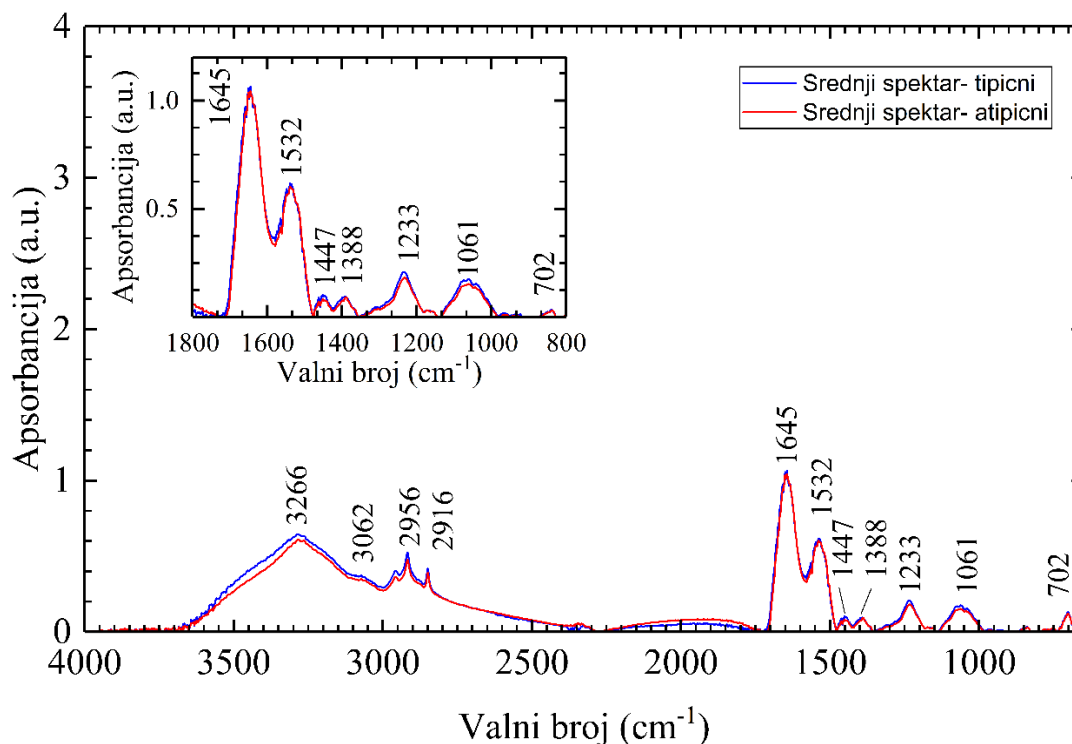


Slika 1. Srednji spektri tipičnih i atipičnih karcinoida sa standardnom devijacijom

Svjetlosivo polje oko linija prikazuje standardnu devijaciju. Dodijelili smo apsorpcijske vrpce prema najizraženijim vrhovima srednjeg spektra atipičnih karcinoida.

Standardna devijacija odraz je individualnih strukturalnih posebnosti karcinoida. Promjer infracrvene prolazne zrake je 1cm. Budući da ovaj uzak snop prolazi kroz karcinoide, dolazi do varijacija u spektrima istog slučaja. Svi spektri jedne skupine pridonose prosječnom spektru koji se dobiva kao kolekcija svih spektara podijeljena s brojem spektara. Standardna devijacija uzima u obzir sve spektre te iz toga proizlazi njezino odstupanje od prosječnih spektara kao što je vidljivo na slici 1.

Prikazana standardna devijacija posljedica je individualnih strukturalnih posebnosti karcinoidnog tkiva. Važno je naglasiti da za iste uzorke nema razlika u poziciji apsorpcijskih vrpca.

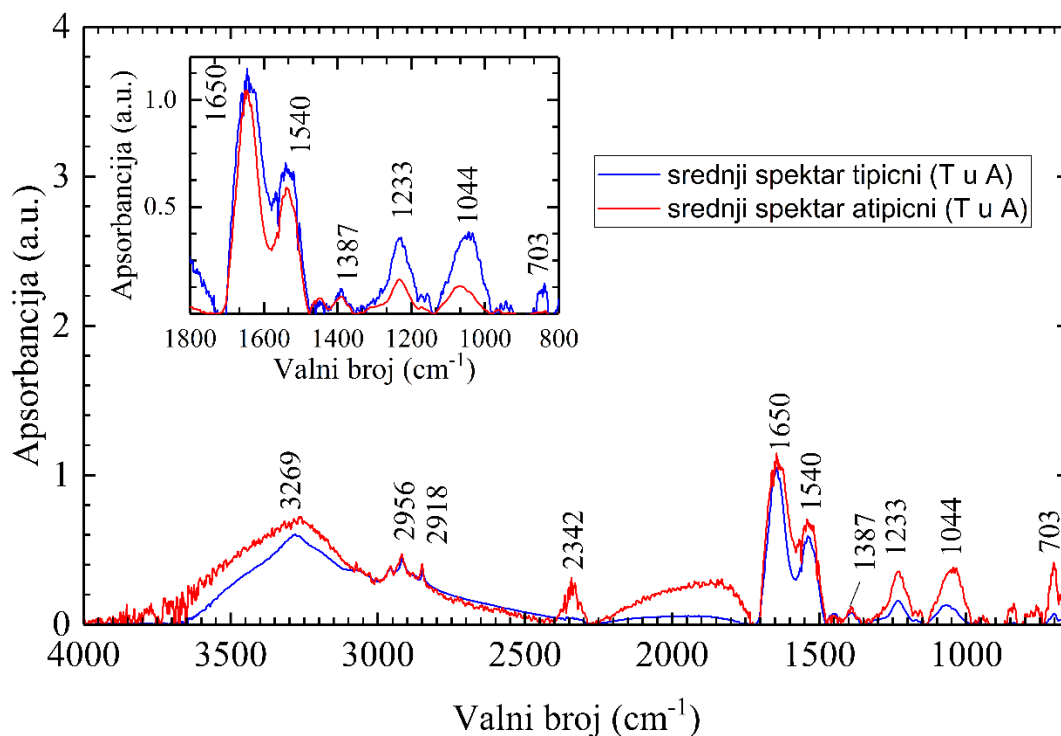


Slika 2. Usporedba srednjih spektara tipičnih i atipičnih karcinoida

Graf usporedbe prikazuje „golim okom“ nedovoljnu razliku između tipičnih i atipičnih karcinoida u apsorpcijskim vrpca u rasponu od 4000 do 650 cm⁻¹. Dodijelili smo apsorpcijske vrpce prema najizraženijim vrhovima srednjeg spektra atipičnih karcinoida. Apсорpcijske vrpce posljedica su raznih

molekula i kemijskih spojeva od kojih su neki navedeni u Tablici 3. One su odraz individualnih strukturalnih posebnosti karcinoida odnosno njihovih prosječnih vrijednosti.

U uvodu smo naveli da smo odabrali 25 pacijenata, ali da smo od troje pacijenata uzeli 2 uzorka. Jednu takvu pacijenticu odlučili smo prikazati i izdvojenu. Ova pacijentica je prema biopsiji iz 2011. godine godine imala tipični karcinoid, dok biopsija iz 2013. pokazuje atipični. Ova pojava ukazuje na transformaciju njezinog karcinoida u razdoblju od dvije godine iz tipičnog u atipični. Prikazujemo srednje spektre njezinog tipičnog karcinoida iz 2011. i atipičnog iz 2013. (Slika 3.) Takav slučaj je jedini slučaj u ovom radu, ostala dva pacijenta imala su istovrsne karcinoide na prvoj i ponovljenoj biopsiji. Dodijelili smo apsorpcijske vrpce prema najizraženijim vrhovima srednjeg spektra atipičnog karcinoida na drugoj biopsiji.

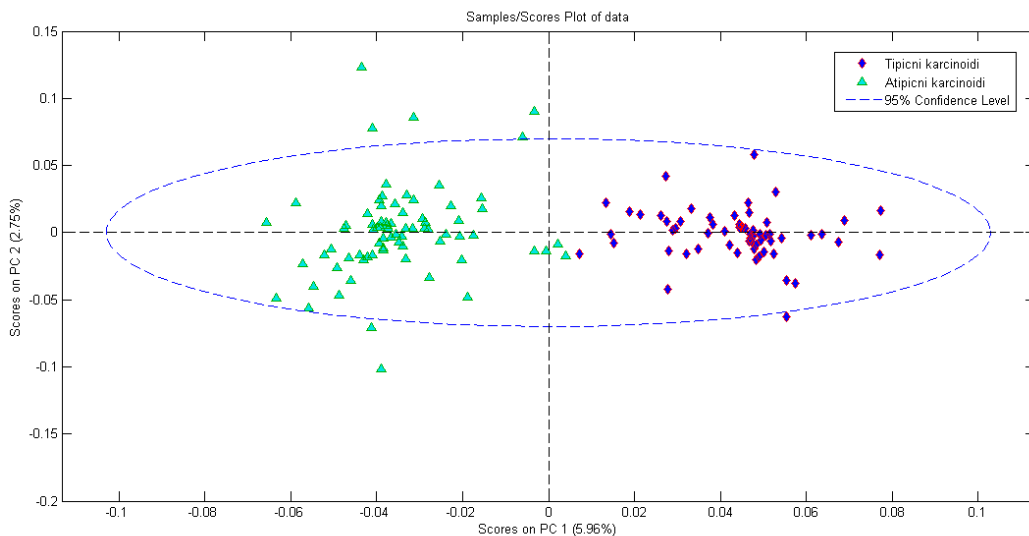


Slika 3. Srednji spektra tipičnog i atipičnog karcinoida pacijentice

6.2. Analiza principalnih komponenti

Promatranjem grafa usporedbe srednjih spektara tipičnih i atipičnih karcinoida (slika 2.), uvidjeli smo otežano razlikovanje dviju apsorpcijskih linija. Spektri su bogati vrpcoma, ali promatranjem „golim okom“ ne uočavaju se spektralne razlike. Budući da razlike nisu očite, napravili smo PCA model koji je uspješniji u vizualnom odvajanju tih tumora. Prije PCA analize sve spektre smo normalizirali po baznoj

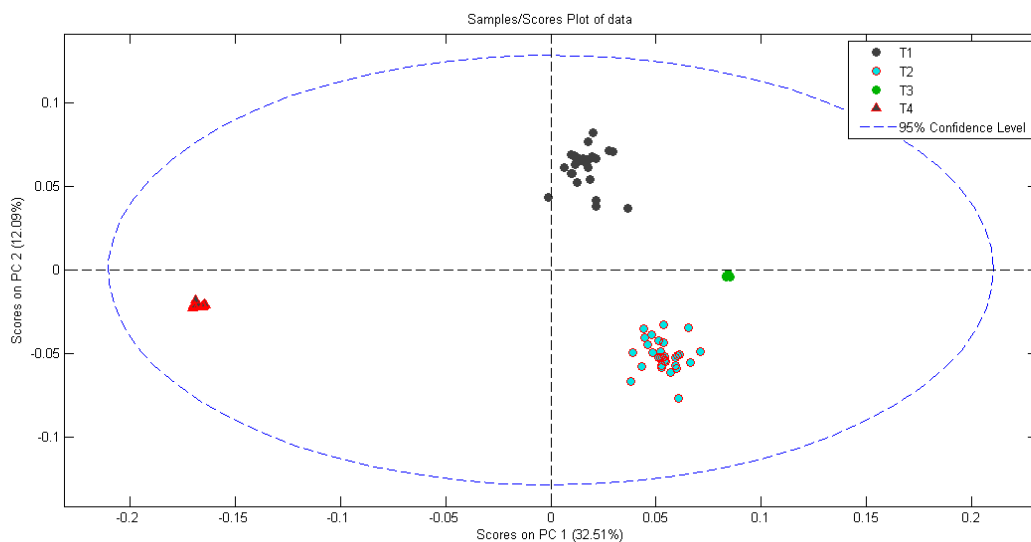
liniji. Prvo smo generirali prikaz spektara tipičnih i atipičnih karcinoida u prostoru između prve i druge principalne komponente. (Slika 4.) Prikazali smo PCA model sa spektrima koji se najbolje razdvajaju.



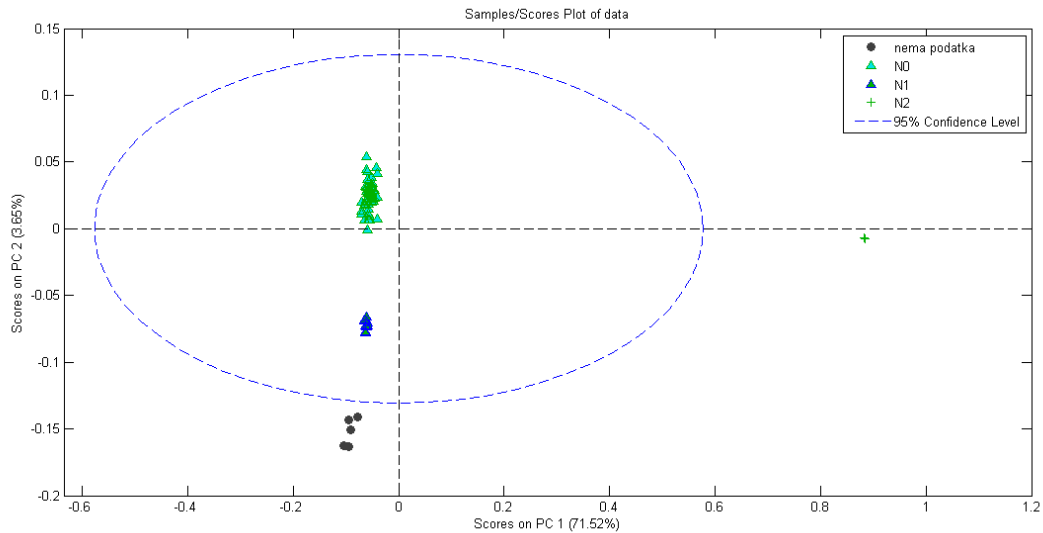
Slika 4. PCA model razdvajanja prema atipiji

Model principalnih komponenti jasno razdvaja tipične od atipičnih karcinoida.

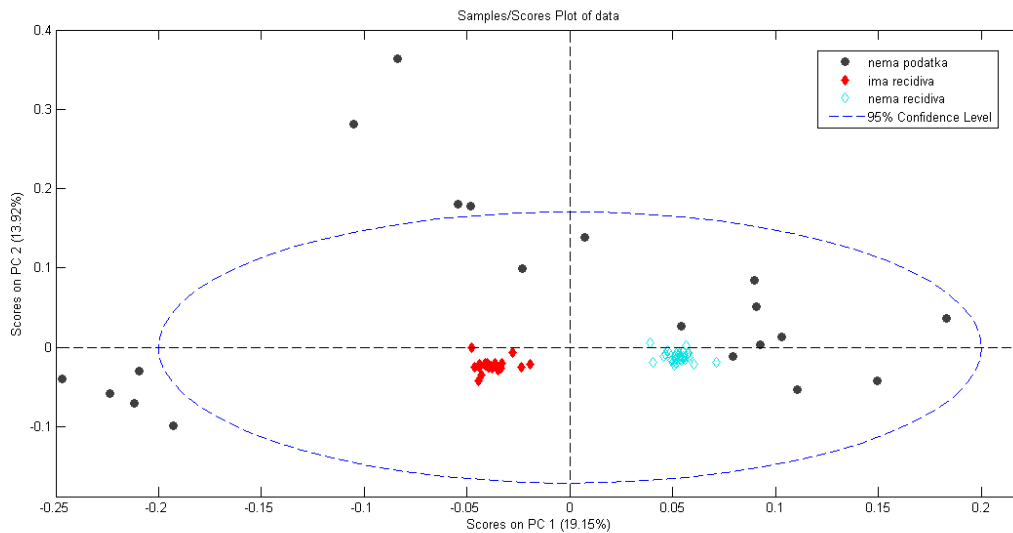
Osim razdvajanja po atipiji, analizom principalnih komponenti prikazali smo razdvajanja prema veličini (T1-T4) za atipične (slika 5.), invaziji u limfni čvor (N0-N2) za atipične (slika 6.) te prema recidivu za atipične (slika 7.). Nijedan pacijent nije imao udaljene metastaze.



Slika 5. PCA model razdvajanja atipičnih karcinoida prema veličini



Slika 6. PCA model razdvajanja atipičnih karcinoida prema invaziji u limfne



Slika 7. PCA model razdvajanja atipičnih karcinoida prema recidivu

Na prikazanim PCA modelima (Slika 5.-Slika 7.) uočavamo značajno razdvajanje promatranih varijabli. Spektri za koje nemamo podataka za određenu varijablu razumljivo odskaču iz intervala pouzdanosti.

6.3. KNN i SVMDA analiza

PCA model na slici 4. jasno razdvaja karcinoide prema atipiji. Željeli smo ispitati mogućnost strojnog učenja u razlikovanju tipičnih od atipičnih karcinoida. Odabrali smo tehniku kros validacije u SVMDA i

KNN algoritmima. Stvorili smo brojne modele podataka, ali prikazat ćemo samo onaj s najboljim dobivenim prediktivnim potencijalom.

Prikazujemo prvo prediktivne rezultate KNN i SVMMDA analize za nasumični model podataka. Napravili smo brojne modele podataka, ali prikazali smo ispod samo onaj s najboljim prediktivnim rezultatom. Nasumičnim odabirom izabrani su spektri koje smo razvrstali u dvije skupine. Tako smo dobili sasvim nasumični poredak spektara te razdvojili prvih 100 za trening, a zadnjih 40 za validaciju i koristili ih za KNN i SVMMDA analizu. Kao pokazatelj uspješnosti modela koristili smo termine pravi pozitivni (TP, *engl. true positive*), lažno pozitivni (FP, *engl. false positive*), pravi negativni (TN *engl. true negative*) i lažno negativni(FN, *engl. false negative*)

Od 40 spektara korištenih za validaciju, 21 spektar pripadao je tipičnim karcinoidima, a 19 spektara atipičnim. U tablici 4. prikazali smo idealni rezultat prediktivnog modela. Idealni prediktivni rezultat značio bi da su ispravno svrstani svi spektri odnosno da su TPR i TNR 100%, a FPR i FNR 0%. Ovakav princip preslikan je u tablici 3. Prediktivni model bi svaki od 15 spektara tipičnih karcinoida svrstao u tipične, a svaki od 10 atipičnih u atipične, dakle pogrešno svrstanih bilo bi 0. Dokaz da su svi spektri točno svrstani u tablici 3. pokazuje crvena dijagonala kojom su povezane nule.

Tablica 4. Idealni prediktivni rezultat

KNN-nasumično/SVMMDA-nasumično	Stvarni tip	
	Tipični	Atipični
Predviđeno kao Tipični	15	0
Predviđeno kao Atipični	0	10

U tablicama 5. i 6. prikazujemo dobivene rezultate prediktivnih modela.

Tablica 5. KNN prediktivni model

KNN-nasumično	Stvarni tip	
	Tipični	Atipični
Predviđeno kao Tipični	16	4
Predviđeno kao Atipični	5	15

Tablica 6. SVMDA prediktivni model

SVMDA-nasumično	Stvarni tip	
	Tipični	Atipični
Predviđeno kao		
Tipični	16	2
Atipični	5	17

U prvom stupcu „Tipični“, možemo vidjeti koliko dobro model predviđa tipične karcinoide. Od ukupno 21 spektra, model je točno svrstao 16 spektara, a 5 spektara je netočno svrstao u atipične. Od 19 spektara atipičnih karcinoida, KNN model točno je svrstao njih 15, a SVMDA njih 17. Unatoč tome, zadovoljni smo dobivenim rezultatima u tablicama 4. i 5. jer je očito da ima značajno više točno svrstanih od krivo svrstanih karcinoida.

Kako bismo kvantificirali točnost prediktivnih modela, prikazali smo rezultate matrica konfuzije za KNN i SVMDA algoritme.

Tablica 7. Rezultat matrice konfuzije za KNN prediktivni model

KNN-nasumično	TPR	FPR	TNR	FNR
Tipični	0,76190	0,21053	0,78947	0,23810
Atipični	0,78947	0,23810	0,76190	0,21053

Tablica 8. Rezultat matrice konfuzije za SVMDA prediktivni model

SVMDA-nasumično	TPR	FPR	TNR	FNR
Tipični	0,76190	0,10526	0,89474	0,23810
Atipični	0,89474	0,23810	0,76190	0,10526

Uočavamo da TPR prelazi u oba slučaja 70%. TNR je u oba slučaja još bolji od TPR, dok su FPR i FNR zanemarivi. Kako bismo plastičnije pokazali potencijal prediktivnih modela, izračunali smo mjere evaluacije pomoću rezultata iz tablica 7. i 8.

Tablica 9. Mjere evaluacije za predikciju tipičnih karcinoida

Tipični	KNN	SVMDA
Točnost	77,5%	82,5%
Osjetljivost	76,1905%	76,1905%
Specifičnost	78,9474%	89,4737%
F-ocjena	77,5445	82,2996
G-ocjena	77,5567	82,5654
Klasifikacijska pogreška	0,225	0,175
Preciznost	0,8	0,8889
F ₁ -ocjena	0,7805	0,8205

Tablica 10. Mjere evaluacije za predikciju atipičnih karcinoida

Atipični	KNN	SVMDA
Točnost	77,5%	82,5%
Osjetljivost	78,9474%	89,4737%
Specifičnost	76,1905%	76,1905%
F-ocjena	77,5445	82,2996
G-ocjena	77,5567	82,5654
Klasifikacijska pogreška	0,225	0,175
Preciznost	0,75	0,7727
F ₁ -ocjena	0,7692	0,8293

Vidimo da je SVMDA nešto precizniji u razlikovanju tipičnih od atipičnih karcinoida jer je veći postotak točnosti; 82,5% u usporedbi s 77,5%. Dokazao se kao bolja opcija od KNN algoritma. Osim toga, uspoređujući tipične i atipične, za atipične analiza pokazuje bolju osjetljivost u oba algoritma, a za tipične specifičnost.

7. Rasprava

Neuroendokrine neoplazme predstavljaju u mnogoćemu specifičnu grupaciju tumora. Javljaju se u različitim organskim sustavima no najčešća im je lokalizacija probavni sustav te pluća. Pitanja oko njihove točne dijagnostike te klasifikacije još uvijek nisu riješena u potpunosti. Prema klasičnoj podjeli možemo ih podijeliti na dvije kategorije – jasno maligne karcinome i one s ne sasvim predvidivim tijekom – karcinoide. Karcinoidi se pak dijele na tipične i atipične. U zadnjih petnaestak godina sve veću popularnost je postigao koncept neuroendokrinih tumora koji sustavom od tri stupnja zamjenjuje dosadašnji. Ovaj sustav je zaživio u probavnom sustavu dok se u plućima sporo probija. Obzirom da mogu biti sekretorno aktivni, neuroendokrini biomarkeri su 5-hidroksiindolactena kiselina u urinu ili Cg-A u krvi. Algoritam dijagnostike ovih tumora, bez obzira na sjelo kao prvi korak predviđa patohistološku analizu na rezovima bojenim HE te zatim imunohistokemijski dokaz neuroendokrino porijekla tj.

prisustvo ili odsustvo reakcija na kromogranin A, sinaptofizin, a proširena patohistološka analiza uključuje i prisustvo biljega CD56.(Baudin i sur., 2021.) U klasičnoj podjeli karcinoidi ne pokazuju nekrozu i imaju do 2 mitoze na 2mm², atipični imaju do 10 mitozu, a iznad toga su mikrocelularni karcinomi. Obzirom da ta podjela ne reflektira u potpunosti očekivano biološko ponašanje, nova podjela koja dijeli te tumore na NET G1-3 bazirana je na Ki-67 indeksu koji ilustrira proliferativnu sposobnost određenog tumora. Iako je preklapanje klasične i nove klasifikacije veliko, ipak se na razini individualnog tumora javljaju razlike. Nova WHO klasifikacija karcinoida uzima zato u obzir oba pristupa. Praktično značenje ove podjele leži u očekivanom stupnju agresivnosti ponašanja tumora (od vrlo rijetkih lokalnih recidiva do brzo metastazirajuće maligne bolesti (Rekhtman i sur., 2021). Ki-67 indeks smatra se da ima veću dijagnostičku i prognostičku ulogu od ostalih te je zlatni standard pri dijagnosticiranju neuroendokrinih tumora probavnog trakta. Prema nekim autorima pokazao se jednako učinkovitim kod plućnih karcinoida.(Centonze i sur., 2023.) Mitotski indeks, prisutnost nekroze i Ki-67 dobivaju se patohistološkom analizom. S obzirom da je patohistološka analiza potpomognuta imunohistokemijom uvriježena metoda i zlatni standard za sve neuroendokrine tumore, ovim istraživanjem htjeli smo razmotriti FTIR spektroskopiju kao moguću nadopunu ili možda čak i zamjenu za patohistološku dijagnostiku. Jedan od glavnih problema kod karcinoida je da se oni u svom ponašanju ne drže sasvim očekivanih „pravila“. Tako postoje tipični karcinoidi koji recidiviraju i metastaziraju, a postoje atipični koji se ponašaju sasvim dobroćudno.

Želja nam je bila koristeći mikroskopiju izvan vidljivog spektra (konkretno infracrvenu) usporediti različite tipove standardno dijagnosticiranih karcinoida i ustanovit u kojoj mjeri se tako dobiveni parametri poklapaju sa klasičnom morfološkom dijagnostikom odnosno sa stvarnim biološkim ponašanjem tumora,

U ovom radu prezentirali smo učinkovitost FTIR spektroskopije u razdvajanju tipičnih od atipičnih karcinoida koji su prije patohistološki analizirani. Na temelju njihove tkivne morfologije odnosno na temelju apsorpcijskih vrpca različitih molekula poput amida, nukleinskih kiselina i ugljikovih spojeva, uspješno smo razdvojili tipične od atipičnih plućnih karcinoida. (slika 4.) Prikazali smo na istom principu razlike apsorpcijskih vrpca između tipičnih i atipičnih i razdvajanje po veličini (slika 5.), invazivnosti u limfni čvor (slika 6.) te recidivu za atipične karcinoide (slika 7.). Zaključili smo da se prema zadanim parametrima atipični jasno grupiraju. Kod njih je odvajanje u elipse koje predstavljaju polja s 95% istog tkiva očito. Također smo prikazali slučaj jedne pacijentice kod koje je došlo do transformacije karcinoida iz tipičnog u atipični. (slika 3.) Ovakva je pojava vrlo rijetka i smatramo da je od znanstvene važnosti izolirano prikazati prosječne spektre njene dvije biopsije. Dobivene rezultate možemo usporediti s radom koji je FTIR spektroskopijom mjerio uzorke pleuralnog tkiva.(Sadiku-Zehri i sur., 2020.) Infracrvenom su spektroskopijom u navedenom radu snimljeni uzorci pleuralnih lezija poput mezotelioma, metastatskih

infiltrata i upalno promijenjenog pleuralnog tkiva te zdravog pleuralnog tkiva. Analizom principalnih komponenti dobivene su razlike u spektralnim linijama 4 tipa uzoraka te je napravljen PCA model koji jasno odijeljuje svaki tip uzorka s intervalom pouzdanosti od 95%. Postoji neznatno preklapanje između spektara upalno promijenjene pleure i one infiltrane metastazama. Možemo zaključiti da su rezultati njihovog PCA modela koji prikazuje spektralne razlike između pleuralnih lezija vrlo slični našim PCA modelom razgraničavanja tipičnih od atipičnih plućnih karcinoida.

Vođeni ovako dobrim PCA modelima, htjeli smo testirati i potencijal prediktivnih KNN i SVMMDA modela s nasumičnim poretkom podataka. Kros validacija pokazala se uspješnom i u KNN i u SVMMDA analizi za nasumičan model podataka. SVMMDA analiza pokazala se uspješnijom od KNN analize. Točnost SVMMDA analize je 82,5%, a KNN 77,5%. Uspoređujući tipične i atipične karcinoide, za atipične analiza pokazuje bolju osjetljivost u oba algoritma, a za tipične specifičnost. Točnost SVMMDA analize prediktivnog modela za tipične (tablica 8.) i atipične (tablica 9.) je 82,5%. Ako za usporedbu uzmemo istraživanje objavljeno u časopisu *Nature* (da Silva i sur., 2023.) koje smo koristili za objašnjenje izračuna mjera evaluacije, SVMMDA analiza za njihov prediktivni model pokazuje točnost od 89%, a za naš 82,5%. Smatramo da je ovo pokazatelj koliko su dobri naši rezultati jer je ovo tek *proof of concept* rad. Razlike su već očite, a moguća je optimizacija analize poput izbacivanja pojedinih spektara iz prediktivnog modela, selekcija valnih brojeva, optimizacija predobrade primjerice Savitzky Golay *smoothing* te unaprjeđivanje laboratorijske procedure. Zanimljiva je metoda dijagnostike pomoću strojnog učenja zbog prije spomenutih razilaženja u klasifikaciji karcinoida. Također će biti potrebno identificirati one tumore koji odskaču od očekivanog u modelu te ih detaljnije analizirati koristeći dodatne metode.

Prikazat ćemo dva istraživanja koja pokazuju preciznost FTIR spektroskopije u dijagnostici patoloških promjena pluća. Oba istraživanja nastojala su FTIR spektroskopijom razlikovati zdravo plućno tkivo od plućnog karcinoma. U prvom istraživanju analizirao se serum zdravih i oboljelih osoba. Rezultati spektroskopije pokazali su veću koncentraciju proteina, lipida i nukleinskih kiselina u usporedbi sa serumom zdravih osoba. Rezultati PLS-DA modela pokazuju osjetljivost od 80%, specifičnost od 91,89% i točnost od 87,1%. (Yang i sur., 2021.) Drugo istraživanje je isto nastojalo ispitati vrijednost FTIR spektroskopije pri razlikovanju zdravog od pluća s karcinomom. Njihovi uzorci su rezani iz parafinskih kocki kao i naši, ali na debljinu od 5 mikrometara. Za potvrdu dijagnoze, uzorci su slani dvama patolozima na klasičnu patohistološku analizu H&E bojanjem. Kao i u prvom istraživanju FTIR spektroskopijom dobili su karakteristične apsorpcijske vrpce za amide, lipide i nukleinske kiseline te su razlikovali tkivo karcinoma od zdravog s osjetljivošću od 97.73%, specifičnošću od 92.45%, točnošću od 94.85% i pozitivnom prediktivnom vrijednošću od 91.49%. Zaključili su da bi FTIR spektroskopija mogla biti saveznik H&E metodi. (Bangaoil i sur., 2020.) Naši rezultati su neznatno slabiji u usporedbi s

gore navedenim radovima; osjetljivost SVMDA analize za prediktivni model tipičnih karcinoida iznosi 76,1905%, specifičnost je 89,4737%, a točnost 82,5%. SVMDA analiza za prediktivni model atipičnih karcinoida pokazuje osjetljivost od 89,4737%, specifičnost od 76,1905% jednaku točnosti; 82,5%. Ako odaberemo rezultate PLS-DA modela iz istraživanja Yanga i suradnika te SVMDA model za tipične karcinoide razlika u iznosima triju navedenih mjera evaluacije: osjetljivosti, specifičnosti i točnosti ne prelazi 5%. Vrijednost FTIR spektroskopije već je istražena u ponekim radovima o neuroendokrinim tumorima poput onih GI trakta (Chen i sur., 2022.), plućnih karcinoma, no ovim istraživanjem nastojali smo povezati prethodna saznanja i ponuditi uvid i u njen potencijal kod plućnih karcinoida. Smatramo da smo našim kros validacijskim modelom dali odgovore ima li strojno učenje potencijal da u budućnosti na temelju FTIR spektara točno razvrstava karcinoide po atipiji. Ova metoda mogla bi unaprijediti patohistološku dijagnostiku karcinoida, odnosno otvoriti mogućnost boljeg razumijevanja njihove biologije.

8. Zaključci

1. FTIR spektroskopija i PCA model jasno razdvajaju tipične od atipičnih karcinoida. Razlike između atipičnih karcinoida mogu se produbiti po veličini, invazivnosti i recidivu.
2. FTIR spektroskopija razdvaja tipične i atipične karcinoide na temelju apsorpcijskih vrpca njihovih amida, nukleinskih kiselina i ugljika koji se koncentracijski razlikuju kod tipičnih i atipičnih.
3. Precizni prediktivni modeli plućnih karcinoida na temelju kros validacije su mogući.
4. FTIR spektroskopija zbog prediktivnih modela ima veliki potencijal kao dijagnostički parameter budućnosti pri eventualnoj automatiziranoj dijagnostici plućnih karcinoida.
5. Negativna strana ove metode su varijabilni uvjeti snimanja tako da je potrebna bolja standardizacija procesa. Te relativno velika investicija u nabavu opreme te vrijeme potrebno za informatičku analizu rezultata spektrometrije.

9. Zahvale

Najveće hvala mojem dugogodišnjem mentoru prof.dr.sc. Svenu Seiwerthu na pomoći, trudu i potpori tijekom ovog istraživanja.

Veliko hvala mojoj komentorici doc.dr.sc. Kristini Serec na strpljenju i pomoći kod ovog istraživanja.

Posebno hvala gđi Đurđi Poljan na izdvojenom vremenu, ljubaznosti i pomoći kod patohistološke pripreme.

10. Popis literature

1. Bangaoil R, Santillan A, Angeles LM, Abanilla L, Lim A, Ramos MaC, et al. ATR-FTIR spectroscopy as adjunct method to the microscopic examination of hematoxylin and eosin-stained tissues in diagnosing lung cancer. Garini Y, editor. PLOS ONE. 2020 May 29;15(5):e0233626
2. Baudin E, Caplin M, Garcia-Carbonero R, Fazio N, Ferolla P, Filosso PL, et al. Lung and thymic carcinoids: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up☆. *Annals of Oncology*. 2021 Apr;32(4):439–51
3. Centonze G, Maisonneuve P, Simbolo M, Lagano V, Grillo F, Prinzi N, et al. Ascl1 and OTP tumour expressions are associated with disease-free survival in lung atypical carcinoids. *Histopathology*. 2023 Feb 21;82(6):870–84
4. Chen YT, Huang PY, Wang JY, Lee YC, Chai CY. An innovative diagnosis in gastrointestinal neuroendocrine neoplasms using Wax-Physisorption-Kinetics-based FTIR Imaging. *Scientific Reports* [Internet]. 2022 Oct 13 [cited 2024 Apr 30];12(1):17168. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-22221-0>
5. Connor N. Yttrium Aluminum Garnet | Formula, Properties & Application [Internet]. *Material Properties*. 2023 [cited 2024 May 20]. Available from: https://material-properties.org/yttrium-aluminum-garnet/?utm_content=cmp-true
6. da Silva TG, Morais CLM, Santos MCD, de Lima LAS, de Medeiros Freitas RV, Guerra RO, et al. Spectrochemical analysis of blood combined with chemometric techniques for detecting osteosarcopenia. *Scientific Reports* [Internet]. 2023 Jun 15 [cited 2024 May 7];13(1):9686. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-023-36834-6>
7. Damjanov I, Seiwert S, Jukić S, Nola M. *Patologija*. 5. izdanje. Zagreb: 2018
8. Fadlelmoula A, Pinho D, Carvalho VH, Catarino SO, Minas G. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to Analyse Human Blood over the Last 20 Years: A Review towards Lab-on-a-Chip Devices. *Micromachines* [Internet]. 2022 Jan 26;13(2):187. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-666X/13/2/187>
9. Gade AK, Olariu E, Douthit NT. Carcinoid Syndrome: A Review. *Cureus*. 2020 Mar 5
10. Ji Y, Yang X, Ji Z, Zhu L, Ma N, Chen D, et al. DFT-Calculated IR Spectrum Amide I, II, and III Band Contributions of N-Methylacetamide Fine Components. *ACS Omega*. 2020 Apr 8;5(15):8572–8
11. Kulke MH, Mayer RJ. Carcinoid Tumors. *New England Journal of Medicine*. 1999 Mar 18;340(11):858–68

12. Lung Carcinoid Tumor & Lung Cancer Tumors | Cleveland Clinic [Internet]. Cleveland Clinic. 2016. Available from: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/14783-carcinoid-tumors-of-the-lungs>
13. Lung Carcinoid Tumor Stages | Staging Lung Neuroendocrine Tumors [Internet]. www.cancer.org. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/types/lung-carcinoid-tumor/detection-diagnosis-staging/staging.html>
14. Movasaghi Z, Rehman S, ur Rehman DrI. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2008 Feb;43(2):134–79
15. Nooreldeen R, Bach H. Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2021 Aug 12;22(16):8661 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8395394/>
16. Okfalisa, I. Gazalba, Mustakim and N. G. I. Reza. "Comparative analysis of k-nearest neighbor and modified k-nearest neighbor algorithm for data classification." 2017 2nd International conferences on Information Technology, Information Systems and Electrical Engineering (ICITISEE). Yogyakarta, Indonesia. 2017: 294-298
17. Pijanka JK, Sockalingum GD, Achim Köhler, Yang Y, Draux F, Parkes G, et al. Synchrotron-based FTIR spectra of stained single cells. Towards a clinical application in pathology. *Laboratory Investigation*. 2010 May 1;90(5):797–807
18. Pinchot SN, Holen K, Sippel RS, Chen H. Carcinoid Tumors. *The Oncologist*. 2008 Dec 1;13(12):1255–69
19. Prinzi N, Rossi RE, Proto C, Leuzzi G, Raimondi A, Torchio M, et al. Recent Advances in the Management of Typical and Atypical Lung Carcinoids. *Clinical Lung Cancer*. 2021 May;22(3):161–9
20. Rekhtman N. Lung neuroendocrine neoplasms: recent progress and persistent challenges. *Modern Pathology* [Internet]. 2021 Oct 18 [cited 2021 Nov 17];1–15 Available from: <https://www.nature.com/articles/s41379-021-00943-2>
21. RTI Laboratories. FTIR Analysis | RTI Laboratories [Internet]. Rtilab.com. 2015. Available from: <https://rtilab.com/techniques/ftir-analysis/>
22. Rudež LK. Uloga FTIR spektroskopije u ranoj dijagnostici glaukoma [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2021
23. Sadiku-Zehri F, Gamulin O, Škrabić M, Qerimi-Krasniqi A, Sedlić F, Šepac A, et al. Differentiating Between Malignant Mesothelioma and Other Pleural Lesions Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Applied spectroscopy*. 2020 May 29;74(7):808–18.

24. Schnirer II, Yao JC, Ajani JA. Carcinoid--a comprehensive review. *Acta Oncologica* (Stockholm, Sweden) [Internet]. 2003 [cited 2023 Apr 26];42(7):672–92 .Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14690153/>
25. Yang X, Ou Q, Qian K, Yang J, Bai Z, Yang W, et al. Diagnosis of Lung Cancer by ATR-FTIR Spectroscopy and Chemometrics. *Frontiers in Oncology*. 2021 Sep 30;11
26. Zenker M. Argon plasma coagulation. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* [Internet]. 2008 Nov 3;3(1):Doc15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2831517/>

13. Sažetak

Usporedba tipičnih i atipičnih karcinoida korištenjem vibracijske spektroskopije

Autor: Lukrecija Anzić

Karcinoidi odnosno neuroendokrini tumori su specifična grupa tumora čije ponašanje i obilježja još uvijek nisu sasvim istraženi. Kad pričamo o plućnim karcinoidima, dijelimo ih u dvije velike skupine. Tipični se plućni karcinoidi od atipičnih razlikuju prema mnogim čimbenicima poput mitotskog indeksa, prisutnosti atipije, Ki-67 indeksa...Navedena patohistološka dijagnostika sa bojanjem H&E, imunohistokemijskim bojilima te nabrojenim indeksima zasad je zlatni standard pri postavljanju dijagnoze. Ovaj rad istražuje potencijal FTIR spektroskopije i PCA modela za razlikovanje tipičnih i atipičnih karcinoida. Obrađeno je 28 biopsija te uzeto 140 uzoraka poznate patologije. 140 uzoraka snimljeno je FTIR spektroskopijom te je na temelju toga stvoren PCA model koji pokazuje zamjetno razdvajanje tipičnih od atipičnih karcinoida te analizu atipičnih karcinoida prema veličini, invazivnosti i recidivu. Prediktivni model stvoren je pomoću KNN I SVMDA analiza. Preciznost prediktivnog modela u obje analize ukazuje na potencijal infracrvene spektroskopije kao dijagnostičkog alata za plućne karcinoide.

Ključne riječi: pluća, tipični karcinoid, atipični karcinoid, FTIR spektroskopija

14. Summary

Comparison of typical and atypical carcinoids using vibrational spectroscopy

Author: Lukrecija Anzić

Carcinoids or neuroendocrine tumors are a specific group of tumors whose clinical behavior and characteristics are still not fully understood. When discussing pulmonary carcinoids, they are normally divided into two major groups. Typical pulmonary carcinoids differ from atypical ones in many factors such as mitotic index, presence of atypia, Ki-67 index... The mentioned histopathological diagnosis with staining using H&E, immunohistochemical dyes and the previously mentioned indices is currently the standard procedure in diagnostics. This study explores the potential of FTIR spectroscopy and the PCA models to differentiate between typical and atypical carcinoids. Twenty-eight biopsies were processed and 140 samples of known pathology were collected. 140 samples were recorded by FTIR spectroscopy, and based on that, a PCA model was created, which shows noticeable separation between typical and atypical carcinoids, as well as analysis of atypical carcinoids according to size, invasiveness, and recurrence. A predictive model was created using KNN and SVM DA analyses. The accuracy of the predictive model in both analyses indicates the potential of infrared spectroscopy as a diagnostic tool for pulmonary carcinoids.

Key words: lungs, typical carcinoid, atypical carcinoid, FTIR spectroscopy