Analiza infracrvenih spektara krvne plazme kao personaliziranog markera u dijagnostičko-terapijskom praćenju tumora dječje dobi

Martinović, Slavica

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:865524

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







Sveučilište u Zagrebu

Medicinski fakultet

Slavica Martinović

Sara Novak

ANALIZA INFRACRVENIH SPEKTARA KRVNE PLAZME KAO PERSONALIZIRANOG MARKERA U DIJAGNOSTIČKO-TERAPIJSKOM PRAĆENJU TUMORA DJEČJE DOBI

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je u laboratoriju za spektroskopiju doc. dr. sc. Maja Balarin Zavoda za fiziku i biofiziku u okviru znanstvene suradnje sa Zavodom za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc.dr. sc. Ane Katušić Bojanac i dr.sc. Kristine Serec i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2017/2018.

POPIS KRATICA

ALL	akutna limfoblastična leukemija
AML	akutna mijeloična leukemija
CNS	središnji živčani sustav, prema eng. *central nervous system*
CT	kompjuterizirana tomografija, prema eng. *computed tomography*
DNA	dezoksiribonukleinska kiselina, prema eng. *deoxyribonucleic acid*
EU	Europska unija, prema eng. *European union*
FTIR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom, prema engl. *FourierTtransform Infrared*
IR	infracrveno zračenje, prema engl. *infrared radiation*
MCT	živa kadmij telurij, prema engl. *MercuryCadmiumTelluride*
MID-IR	srednje infracrveno područje, prema engl. *MidddleInfraRed*
PCA	analiza glavnih komponenti, prema engl. *principal component analysis*
PCR	regresijska analiza komponenti, prema eng. *principal component regression*
RH	Republika Hrvatska
RNA	ribonukleinska kiselina, prema eng. *ribonucleic acid*

SADRŽAJ

1. UVOD..... 1

1.1 *Infracrvena spektroskopija*..... 1

1.2 *FTIR spektroskopija*..... 2

1.3 *Analiza spektra*..... 3

1.4 *Leukemije dječje dobi – oblici, pojavnost i liječenje*..... 4

1.5 *Krvna plazma*..... 6

1.6 *Neinvazivna analiza krvne plazme u dijagnostici tumora s naglaskom na IR spektroskopiju*..... 6

2. HIPOTEZA..... 7

3. OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI RADA..... 8

4, MATERIJALI I METODE..... 8

4.1 *Priprema uzorka*..... 8

4.2 *Priprema uzorka za analizu*..... 9

4.3 *Analiza uzorka pomoću infracrvene spektroskopije*..... 9

4.4 *Statistička analiza*..... 9

5. REZULTATI..... 10

5.1 *Prikaz apsorpcijskih spektara*..... 10

5.2 *Dvodimenzionalni prikaz rezultata PCA i analiza metodom PC regresije s unakrsnim vrednovanjem*..... 11

6. Rasprava..... 14

7. Zaključci..... 18

8. Zahvale..... 18

9. Popis literature..... 19

10 Životopis..... 21

11. Sažetak..... 22

12. Summary..... 23

Prilog..... 24

1. UVOD

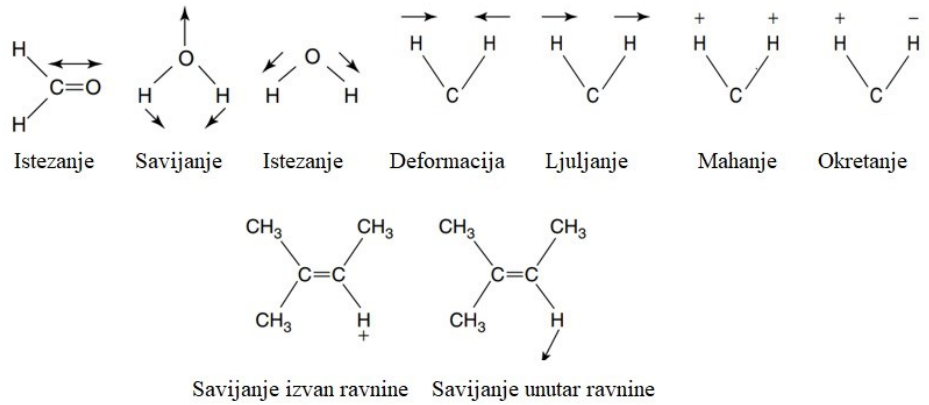
1.1 Infracrvena spektroskopija

Infracrvena spektroskopija danas se smatra jednom od najvažnijih analitičkih metoda u znanosti, no u zadnje vrijeme nalazi i svoju translacijsku primjenu u medicinskoj dijagnostici. Glavna joj je prednost što ne zahtijeva kompliciranu obradu uzorka, a analizira gotovo svaki uzorak u svim agregacijskim stanjima. Sami spektroskopi su bili dostupni na tržištu jos 40-ih godina prošloga stoljeća kada je disperzni element bila prizma, no pravu popularnost je stekao umetanjem interferometra umjesto prizme te korištenjem matematičkog procesa Fourierove transformacije koji su značajno ubrzali proces snimanja te podigli kvalitetu samih snimki.

Infracrvena spektroskopija je tehnika koja se temelji na vibracijama atoma molekule. Spektar se dobiva prolaskom infracrvenog zračenja kroz uzorak te određivanjem udjela početnog zračenja koje se apsorbiralo u određenoj energiji. Dobivene energije za određeni „vršak“ (engl„peak“) u apsorpcijskom spektru odgovara frekvenciji vibracije dijela uzorka.

Infracrveno zračenje zajedno sa ultrazvučnim, mikro valovima, radio valovima, X zračenjem, γ zračenjem i vidljvim zračenjem spada u elektromagnetsko zračenje. Svako od tih zračenja ima određene karakteristike. Tako IR zračenje označava područje valnih duljina (λ) od 0,7 do 500 μm. Ako uzmemo u obzir da je brzina svjetlosti u vakuumu (c) konstanta onda koristeći izraz $\nu = c/\lambda$ možemo izračunati frekvenciju pri određenoj valnoj duljini. Još jedan opće prihvaćen način izražavanja je preko valnog broja ($\tilde{\nu}$) koji odgovara recipročnoj vrijednosti valne duljine (λ), a izražen je formulom $\tilde{\nu}=1/\lambda$. Iz toga proizlazi izraz $E=hc\tilde{\nu}$ gdje je energija elektromagnetskog zračenja (E) proporcionalna vrijednosti valnog broja ($\tilde{\nu}$), c je brzina svjetlosti u vakumu, a h označava Planckovu konstantu.

Da bi molekula mogla apsorbirati IR svjetlo mora doći do promjene električnog dipolnog momenta tijekom vibracije odnosno gibanja unutar same molekule određenom frekvencijom. Na jačinu dipolnog momenta utječe polarnost samih molekula koje su u interakciji, njihove mase, jačina i vrsta veze među njima kao i utjecaj dipolnih momenata okolnih molekula te temperatura pri kojoj se sve to događa. Sama gibanja unutar molekule mogu biti simetrična i asimetrična, a osnovna gibanja uključuju istezanje i savijanje. Osim njih mogući su i ljuljanje, mahanje, okretanje, savijanje unutar i izvan ravnine.

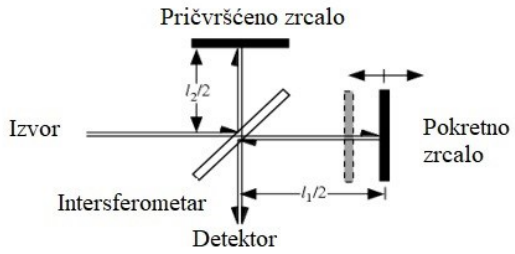


Slika 1. Različitost gibanja veza unutar molekula (B. Stuart, 2004.)

U slučaju kada su vibracije unutar molekule simetrične i vremenski se poklapaju njihov dipolni moment se neće mijenjati. Nazivamo ih stoga IR neaktivnim molekulama, za razliku od slučaja kada molekularne vibracije mijenjaju dipolni moment gdje govorimo o IR aktivnim molekulama (K.Serec, 2016.)

1.2 FTIR spektroskopija

Infracrvena spektroskopija sa Fourierovom transformacijom (FTIR) je metoda mjerenja koja se temelji na ideji interferencije zračenja dvaju snopova iz kojih se dobiva interferogram. Osnovne komponente spektrometra su izvor IR zračenja, Michelsonov interferometar, kućište za uzorak, detektor i računalo za obradu. Intertransformator razdvaja upadno zračenje na 2 odvojena vala mijenjajući optički put prije nego se ponovno sastanu i prođu kroz uzorak koji će dio spektra apsorbirati, a dio će proći do detektora. Nakon pojačavanja signala u kojem se visokofrekventni doprinosi uklone filterom, podaci se pretvaraju iz analognog u digitalni oblik te matematičkom formulom Fourierove transformacije izračunava se spektar uzorka.



S*lika 2.* Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (WolframResearch)

1.3 Analiza spektra

Jedan od ključnih koraka u metodi spektrofotometrije je precizna analiza dobivenih spektara. Infracrveni spektar poliatomne molekule vrlo je složen i nije moguće potpuno određivanje svih prisutnih vrpci. Kako spektar mjeri vibracije atoma, iz njega se može odrediti koje funkcionalne skupine nalazimo unutar neke molekule. Naime, proučavanjem infracrvenih spektara brojnih spojeva s uobičajenim skupinama atoma, pronađeno je da te skupine apsorbiraju energiju u nekom uskom frekvencijskom području, neovisno od ostalog dijela molekule, a te se frekvencije nazivaju frekvencijama funkcionalnih skupina (eng. *group frequencies*). To bi trebalo značiti da se svaka vrpca u spektru može pripisati određenoj deformaciji molekule, kretanju grupa atoma, savijanju ili istezanju određenih veza. To vrijedi za mnoge vrpce, osobito one karakterizirane istezanjem trostrukih veza koje se „dobro ponašaju“.

U pravilu, srednji infracrveni elektromagnetski spektar (4000-400 cm^{-1}) uobičajeno se dijeli na 4 regije, a priroda frekvencije skupine je određena regijom u kojoj je smještena. Zna se da se unutar srednjeg spektra nalazi takozvana regija otiska prsta (eng. *bio-fingerprint, fingerprint*) regija (Martin F.L. i sur., 2010) s rasponom od 1800-900 cm^{-1} koja sadrži temeljne vibracije energetski absorpcijskih frekvencija mnogih interesantnih biološki značajnih molekula.

Važno je reći da su pozicije i inteziteti absorpcijskih vrpci određene prirodom i koncentracijom bioloških molekula te ne slijede obrazac ponašanja anorganskih molekula. Tako se vrpce molekula u regiji otiska prsta mogu se razlikovati za stotine valnih brojeva, čak i za slične molekule. Tu opažamo da mali sterički ili elektronski efekti u molekuli dovode do velikih pomaka u poziciji spektra. U regiji otiska prsta, proteini tako pridonose takozvanom

Amid I vršku (eng. *peak*) na frekvenciji od 1650 cm^{-1} (C=O istezanje), Amid II vršak na 1540 cm^{-1} (N-H savijanje). Lipidi pridonose apsorpciji od 1740 cm^{-1} (C=O istezanje), a PO_2 vibracije DNA su obično locirane u regiji 1080 cm^{-1} (simetrično istezanje) ili 1240 cm^{-1} (asimetrično istezanje) (Kelly J.G. i sur.,2011.)

Ostale tri regije su su sljedeće: X-H istezanja (4000-2500 cm^{-1}), istezanja trostruke veze (2500-2000 cm^{-1}), istezanja dvostruke veze (2000-1500 cm^{-1}). Osnovne su vibracije u X-H regiji posljedica O-H, C-H i N-H istezanja. O–H istezanje radi široku vrpcu u razmaku od 3700-3600 cm^{-1}. Za usporedbu, N–H istezanje najčešće se oštrije opaža između 3400-3300 cm^{-1}. Vrpca C–H istezanja alifatskih spojeva se očituje u razmaku od 3000-2850 cm^{-1}. Ako je C-H veza povezana s drugom molekulom dvostrukom vezom ili aromatskim prstenom, apsorpcija za C–H istezanje se poveća na 3000-3100 cm^{-1}. Apsorpcija trostruke veze nalazi se u području između 2500-2000 cm^{-1} radi konstantnih jakih sila unutar veze. Apsorpcija C≡C veze je između 2300-2050 cm^{-1}, dok je nitrilna skupina (C≡N) između 2300-2200 cm^{-1}. Ove dvije grupe se mogu razlikovati jer je C ≡ C je vrlo slabog intenziteta, dok je C≡N srednjeg. Osnovne vrpce treće regije (2000-1500 cm^{-1}) posljedica su C=C i C=O veza, a karbonilno istezanje je najlakše vidjeti u infracrvenom spektru jer se obično ističe kao najintenzivnija vrpca (1830-1650 cm^{-1}).

Analiza spektra producira kvalitativne i kvantitativne informacije o promjenama vrška, širina i intenziteta prikazanih vrpci kako bismo dobili strukturalne i funkcionalne informacije o analiziranom materijalu. U biološkom smislu podaci se mogu koristiti za detekciju promjena staničnih komponenti. (A. Dogan i sur., 2007.). Stoga nalaze svoju primjenu i u medicini.

1.4 Leukemije dječje dobi – oblici, pojavnost i liječenje

Leukemije pripadaju zloćudnim novotvorinama koje nastaju malignom proliferacijom matičnih hematopoetičkih stanica ili stanica prekursora u koštanoj srži. Leukemične stanice infiltriraju čitavu koštanu srž, ulaze u perifernu krv te mogu infiltrirati sva tkiva u tijelu. Prema zrelosti stanica leukemije se dijele na akutne, koje se sastoje većinom od nezrelih, slabo diferenciranih stanica (blasta) i na kronične kod kojih su stanice zrelije.

U dječjoj dobi, leukemija je najčešća zloćudna bolest. Najčešći oblik jest akutna limfoblastična leukemija (ALL) (SK.Ma i sur., 1999.) koja se javlja tri puta češće od akutne mijeloične leukemije (AML). ALL je neoplazma prekursorskih B ili T limfocita. U 80-85%

slučajeva tumorske su stanice B-limfocitnog podrijetla, a u 15% oboljelih proliferiraju prekursori limfocita T i vrlo rijetko prekursori nul-stanica. Vršna incidencija je između 2. i 10. godine života (I. Damjanov, 2017.)

Terapija ALL-a dijeli se u 4 faze: indukcija remisije, profilaksa prožimanja CNS-a, konsolidiranje nakon remisije, održavanje. Negativni prognostički čimbenici su kariotip s urednim brojem kromosoma ali abnormalnom morfologijom, nazočnost Philadelphia kromosoma t(9;22) te proširenost bolesti na CNS.

AML je drugi najčešći oblik leukemije u djece, najčešće u starijoj dječjoj dobi (od 15 godine). Nastaje zbog neoplastične klonalne proliferacije hematopoetskih matičnih stanica (blasti). Nalaze se u koštanoj srži i perifernoj krvi te čine više od 20% svih hematopoetskih stanica. Faze liječenja su: indukcija remisije, intenzifikacija, obično bez profilakse prožimanja CNS-a. (REF) Negativni prognostički čimbenici su kariotip t(15;17), t(8;21) i inv16(p13;q22).

Prema zadnjim podacima Registra za rak RH, u RH je 2014. godine od malignih bolesti oboljelo 123 djece (62 djevojčice) u dobi od 0 – 14 godina odnosno 175 djece (90 djevojčica) u dobi od 0 – 19 godina (https://www.hzjz.hr). Od toga, 63 je bilo u dobi od 0-4 godine, 28 u dobi od 5-9 godina, 32 u dobi od 10-14 godina, te 52 u dobi od 15-19 godina.
Prema zadnjim podacima o umrlim osobama, 2016. je od malignih bolesti umrlo 18 djece (7 djevojčica) u dobi od 0 – 14 godina, odnosno 30 djece (8 djevojčica) u dobi od 0 – 19 godina. (https://www.hzjz.hr).

Ako gledamo preživljenje oboljelih od raka u kontekstu izliječenja, recentni podaci iz velikog svjetskog opservacijskog istraživanja CONCORD-3 iz 2018. Godine pokazuju da je petogodišnje preživljenje od malignih bolesti djece u Hrvatskoj iznad prosjeka EU, te za limfome u dječjoj dobi iznosi 95 %, akutne limfatične leukemije 85 %, a za tumore mozga 73 % (C. Allemani i sur., 2018).

Ako gledamo podtipove, ALL u djece ima dobru prognozu s petogodišnjim preživljenjem od 85%. AML je podložna manjem broju lijekova od ALL i ima lošiju prognozu. Petogodišnje preživljenje se u djece kreće između 60 i 70%.

Na kraju , upravo najčešće dijagnoze malignih bolesti u djece (0-19) su bile leukemije (41; 35 u dobi od 0-14), zatim maligni tumori mozga i leđne moždine (27; 22 od 0-14) te limfomi (23; 12 od 0-14 godina). Stoga je rano postavljanje dijagnoze i pravovremeno liječenje nužno za povećanje preživljenja oboljelih pacijenata.

1.5 Krvna plazma

Periferna se krv sastoji od plazme i eritrocita, leukocita i trombocita. Plazma je tekuća komponenta krvi koja se dobiva centrifugiranjem krvi pri čemu se krvne stanice odvoje. Izdvajanjem faktora zgrušavanja iz plazme dobiva se serum.

U krvnoj se plazmi nalaze brojni proteini različitih funkcija koji se mogu podijeliti u 3 glavne skupine: albumini, globulini i fibrinogen. Tu nalazimo i nestaničnu DNA (engl.*cell free* DNA) koja može potjecati od raspadnutih krvnih ili drugih stanica, pa čak i tumorskih. U novije vrijeme, doznalo se da plazma sadrži brojne RNA molekule različitih funkcija i veličina, pa tako nalazimo mikroRNA molekule (eng. *microRNA*, miRNA), mRNA, duge nekodirajuće RNA molekule (eng. *long non-coding RNA, lncRNA*) itd. Novija istraživanja koja se baziraju na detekciji promjena u tjelesnim tekućinama vezanim za neko patološko stanje (npr. tumori), naglašavaju analizu plazme kao važan dijagnostički postupak za dijagnozu i praćenje tijeka bolesti.

1.6 Neinvazivna analiza krvne plazme u dijagnostici tumora s naglaskom na IR spektroskopiju

Rana dijagnoza zloćudnih bolesti i rani početak liječenja su ključni za poboljšanje stope preživljenja. Zbog toga je važan razvoj novih metoda koje omogućuju brzu i objektivnu dijagnozu.

Danas su glavne dijagnostičke metode analiza periferne krvi, citokemijska evaluacija i aspiracija koštane srži koja je invazivna i nosi rizik za pacijenta. (B.D. Cheson i sur., 2003.)
Iako je genotipizacija trenutno najvažnija metoda za kategorizaciju tumora, za analizu tumorskih tkiva potrebne su invazivne metode i dugotrajna analiza. Također, s obzirom na to da tumori vrlo često tijekom terapije razviju rezistenciju na lijekove, potrebno je pratiti pojavu specifičnih tumorskih mutacija i tome prilagoditi terapiju. Takvom personaliziranom medicinom moguće je ostvariti najbolje rezultate liječenja. Zbog toga je izuzetno važno razvijanje novih brzih, jeftinih, neinvazivnih i preciznih metoda identifikacije tumorskih biomarkera kojima bi se pacijenti mogli pratiti tijekom liječnja. Budući da je nestanična tumorska DNA potencijalna zamjena za analizu čitavog tumorskog genoma, analiza nestanične DNA u sklopu tekuće biopsije je obećavajuća metoda čiji je dodatni razvoj hitno potreban. (E. Heitzer i sur., 2015.)(A. Buder i sur., 2016.)

Brojne studije su pokazale da je koncentracija nestanične (eng. cell-free) DNA u plazmi pacijenata oboljenih od malignih bolesti viša nego u zdravih pojedinaca iz kontrolne skupine. (A.Kamat i sur., 2010.). Fragmenti nestanične DNA u zdravih pojedinaca su mali i uniformni, i većinom nastaju normalnom staničnom apoptozom. U oboljelih od malignih bolesti, fragmenti nestanične DNA su nepotpuni, različitih duljina i nastaju nekrozom tumorskih stanica. (M. van der Vaart i sur., 2007.)

Zbog potrebe za neinvazivnim metodama otkrivanja i praćenja bolesti, recentno je nađeno da se FTIR spektroskopijom mogu otkriti biokemijske promjene u plazmi pacijenta. Kad se FTIR spektroskopijom analizira plazma pacijenata, dobivaju se informacije o sadržaju lipida, proteina i nukleinskih kiselina. Primjećena je razlika u spektrima između zdravih osoba i oboljelih od zloćudnih bolesti, što je naglasilo njenu dijagnostičku važnost u analizi i detekciji promjene na molekularnoj razini u karcinomima. (K. Yano i sur., 2000.). Također, FTIR spektroskopija se pokazala kao obećavajući alat za monitoriranje efektivnosti lijekova tijekom kemoterapije u djece. (J.Ramesh i sur., 2003.)

Osim za analizu plazme kod oboljelih od leukemije, FTIR spektroskopija se može koristiti i za analizu plazme oboljelih od solidnih tumora. Obećavajući rezultati su dobiveni u analizi karcinoma pluća (H.P. Wang i sur., 1997.), karcinoma kolona (Q. B. Li i sur., 2005.), karcinoma dojke (R.K. Dukor i sur., 1998.) i karcinoma vrata maternice. (A. Staib i sur., 2001.)

2. HIPOTEZA

Novija istraživanja ukazuju na činjenicu da se iz ljudske plazme može saznati puno više o zdravstvenom stanju osobe nego što se do sada mislilo pa tako i postojanje maligne bolesti uzrokuje molekularne promjene u stanicama i sastavu plazme koje se mogu detektirati posebnim metodama kao što je FTIR spektroskopija. Uzimanje uzorka plazme za analizu je minimalno invazivan postupak i samim time lako dostupan te manje opasan za pacijenta od konvencionalnih metoda praćenja pacijenata poput CT-a.

Hipoteza našeg rada jest da će se promjena u homeostazi stanica i krvi, tj. pojavnost leukemije iskazati u promjeni FTIR spektara plazme pacijenata u odnosu na zdrave pojedince, a također će se u promjeni spektra nazrijeti učinak terapije.

3. OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći je cilj rada ispitati mogućnost uporabe FTIR spektroskopije u analizi krvne plazme pacijenata oboljelih od leukemije, tijekom perioda njihovog liječenja za procjenu njihovog stanja u odnosu na kontrolu i tijeka bolesti, odnosno terapije.

Specifični ciljevi su:

1. Odrediti najpogodniju metodu snimanja infracrvenih spektara krvne plazme i način pripreme uzoraka.

2. Utvrditi postoje li razlike u infracrvenim spektrima medija između kontrolne skupine i skupine s leukemijom.

3. Utvrditi postoje li razlike u infracrvenim spektrima medija u ovisnosti o fazi bolesti/tj. terapije kod istog pacijenta.

4. MATERIJALI I METODE

4.1 Priprema uzorka

Ispitivani uzorak je arhivski materijal dobiven je u sklopu suradnje s doc. dr. sc. Gordanom Jakovljević iz Klinike za dječje bolesti. Ispitivani uzorak obuhvaća arhivske uzorke plazme 7 pacijenata oboljelih od leukemije od čega ih je 6 s ALL-om i 1 s AML-om (u daljnjem tekstu oboljeli) te arhivske uzorke plazme 8 zdrave djece (kontrolna skupina).

Analizirano je ukupno 27 uzorka krvi djece oboljele od leukemije. S obzirom na individualizaciju u kliničkom tijek bolesti i odgovoru na terpaiju, nisu svi pacijenti imali isti broj uzoraka. Broj je varirao između 3 i 6. Obrađivani uzorci su svim pacijentima uzimani 1. dan bolesti tj, pri postavljanju dijagnoze, 15. te 33. dan kao dio rutinskog kontroliranja tijekom primanja kemoterpaija. Jedan pacijent je nakon 33. dana liječenja ušao remisiju te ga stoga prestajemo pratiti. Četiri pacijenta prestajemo pratiti nakon prikupljenog četvrtog uzorka, od toga 3 pacijenta jer su u tom trenutku ušla u remisiju, a jednog jer je egzitirao. Jedan pacijent se radi smrtnog ishoda prestaje pratiti nakon petog uzorka, a jednog nakon šestog radi ulaska u remisiju. Osim toga smo analizirano je i 8 uzoraka kontrolne skupine dobivenih od 8 različitih pojedinaca.

Epruvete s uzorcima označene su šifrom pacijenta i datumom kada je uzet uzorak te pohranjene na -20 ^{o}C.

4.2 Priprema uzorka za analizu

Prije mjerenja uzorak se odmrzava na sobnoj temperaturi 30 min te se prije svakog pipetiranja protrese radi dobivanja jednake homogene smjese za svako mjerenje. Potom se mikropipetom otpipetira 2 μL uzorka koji se nanese na silicijev prozor optičke kvalitete. Da bi se iz spektara uklonile izrazite apsorpcijske vrpce nastale zbog vibracija i rotacija molekula vode, prozore s uzorcima se suši 15 min na sobnoj temperaturi. Silicijevi prozori s uzorkom se stavljaju na nosač u odjeljku za uzorke spektrometra. Tim je postupcima minimizirana mogućnost pojave artefakata u spektrima.

4.3 Analiza uzorka pomoću infracrvene spektroskopije

Mjerenja su se izvodila PerkinElmer GX spektrometrom (Waltham, MA, SAD) koji je opremljen MID-IR izvorom koji emitira u području od 10 cm^{-1} do 15600 cm^{-1}. Pri snimanju rabio se MCT detektor koji se hladi tekućim dušikom. Da bi se isključio utjecaj silicijevog prozora na mjerenja uzoraka potrebno je izmjeriti spektar samog prozora koji se pohranjuje u instrumentu kao pozadina i automatski oduzima od snimljenog spektra uzorka. Nova je pozadina snimljena prije svakog novog uzorka tj. nakon snimljena 24 spektra. Od svakog uzorka snimljena su po 24 spektra u rasponu valnog broja od 4000 cm^{-1} do 650 cm^{-1}. Zatim se spektri svakog uzorka uprosječuju. Za dobivanje spektara pozadine, snimano je 35 spektra, a za spektre uzoraka 840 spektara pri rezoluciji 4 cm^{-1} u transmisijskom modu. Svako mjerenje traje 1 minutu, a mjerenje pozadine 2 minute. Svi snimljeni spektri se spremaju na računalu u elektronskom obliku i nakon toga obrađivani u MATLAB-u i eSpectri.

4.4 Statistička analiza

Rezultati mjerenja su statistički obrađivani analizom principalnih komponenti (PCA, prema engl. principal component analysis). PCA metodom se može učinkovito reducirati dimenzija seta podataka na nekoliko onih koji daju najveću varijaciju među snimljenim spektrima. Kada se analiziraju spektri u tom nisko dimenzionalnom PCA prostoru uočava se stvaranje klastera uzoraka sa sličnim metaboličkim „otiskom prsta“ (prema engl. fingerprint

region). Za statističku analizu rabio se programski paket MATLAB, proizvođača MathWorks (Natick, MA, SAD) s dodatkom programskog alata PLS-Toolbox, kupljen od tvrtke Eigenvector Research, Inc. (Wenatchee, WA, SAD). U izradi i prikazu snimljenih vrci korišten je Essential FTIR v3.50. Ovaj program je pogodan za detaljnu analizu indidualihh vrpci, stvaranje srednjih vrpci te međusobno uspoređivanje valnih brojeva među snimljenim uzorcima.

5. REZULTATI

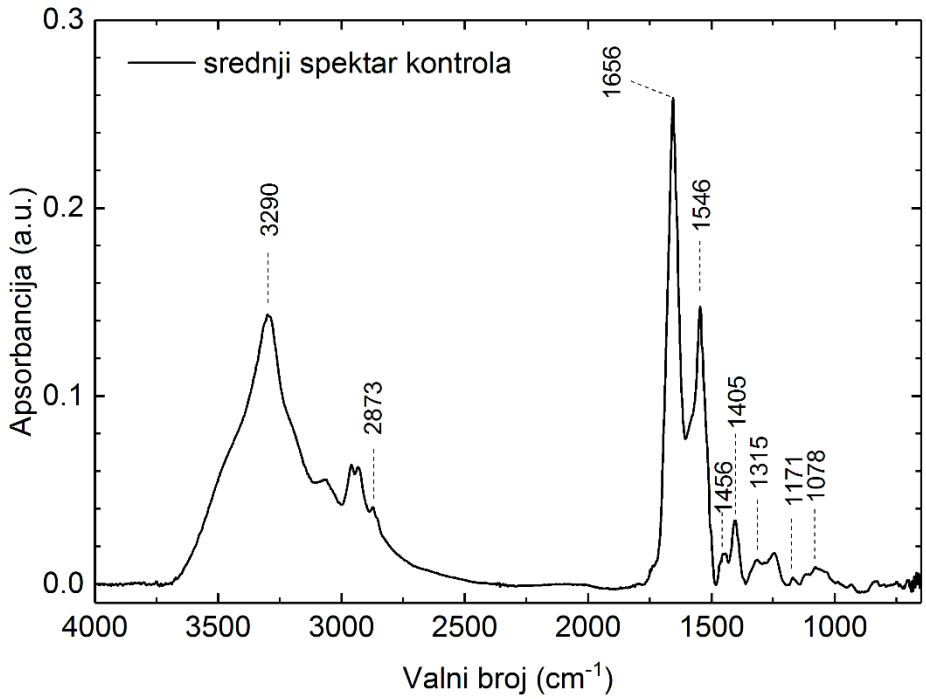
5.1 Prikaz apsorpcijskih spektara

Svi uzorci plazme pokazuju vrpce tipične za prisutnost bioloških molekula u plazmi. Slika 3. prikazuje primjer apsorpcijske vrpce snimanih uzoraka kontrolne skupine. Generalno se uzorci sastoje od lipida, proteina i ugljikohidrata koji čine karakteristične vrpce na IR spektru u području valnih brojeva 3300 – 2800 cm^{-1}, 1700-1400 cm^{-1} and 1400-900 cm^{-1}. Postoje dva jako istaknuta amidna apsorpcijska vrška (eng. *peak*). Prvi vršak je smješten na 1656 cm^{-1} i nastao je radi C=O simetričnog istezanja te odgovara području Amid I vrpce, i drugi na 1546 cm^{-1} nastao zbog jakog N-H istezanja i odgovara Amid II vrpci. Navedene vibracije povezuju se s postojanjem proteinima u uzorku. Jak karakteristični vršak vrpce na 3290cm^{-1} nastao uslijed N-H simetričnog istezanja potvrda je postojanja aminokiselinske skupine. Sljedeća vrpca nalazi se na 2873cm^{-1} i posljedica je asimetričnog i simetričnog istezanja CH_3 grupe koja predstavlja lipidnu skupinu. Od ostalih bitnih vršaka vrpce valja spomenuti one na 1405 cm^{-1} i 1456 cm^{-1} nastalih uslijed C=O simetričnog istezanja COO- i asimetričnog C-H sječenja -CH3 skupine koje označavaju prisutnost amino skupine. Konačno, slaba vrpca na 1315 cm^{-1} simbolizira prisutnos Amid III skupine nastale zbog C-H deformacije van ravnine savijanja, dok karakteristične vrpce na 1171 cm^{-1} i 1078 cm^{-1} predstavljaju postojanje glukoze a nastaje zbog C-O i C-C simetričnog istezanja.

Apsorpcijski spektri oboljelih pacijenata daju jednak prikaz apsorpcijskih vrpci čije se međusobne razlike uočavaju tek statističkim metodama obrade podataka (Kanagathara N. I sur., 2011.).

Tablica 1. Prikaz asignacije vibracijskih vrpci.

Frekvencija/ cm^{-1}	Opis	Komponenta grupe
3290	N-H simetrično istezanje	Amino skupina
2873	C-H simetrično istezanje CH_3 skupine	Lipidi
1656	C=O simetrično istezanje	Amid I
1546	N-H istezanje	Amid II
1456	Asimetrično C-H sjenčanje CH_3 skupine	Amino skupina
1405	C=O simetrično istezanja COO-	Amino skupina
1315	C-H deformacija	Amid III
1171	C-O simetrično istezanje	Ugljikohidrati
1078	C-O simetrično istezanje regije glukoze	Ciklopropan



Slika 3. Prikaz vrpce prosječnih apsorpcijskih spektara kontrolne skupine

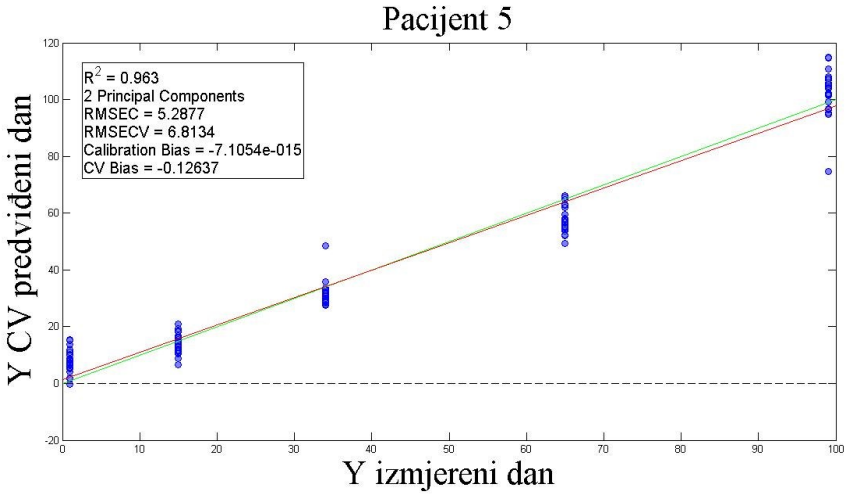
5.2 Dvodimenzionalni prikaz rezultata PCA i analiza metodom PC regresije s unakrsnim vrednovanjem

Da bismo uočili fine razlike u spektrima kontrolne i oboljele skupine napravljena je multivarijantna PCA analiza.

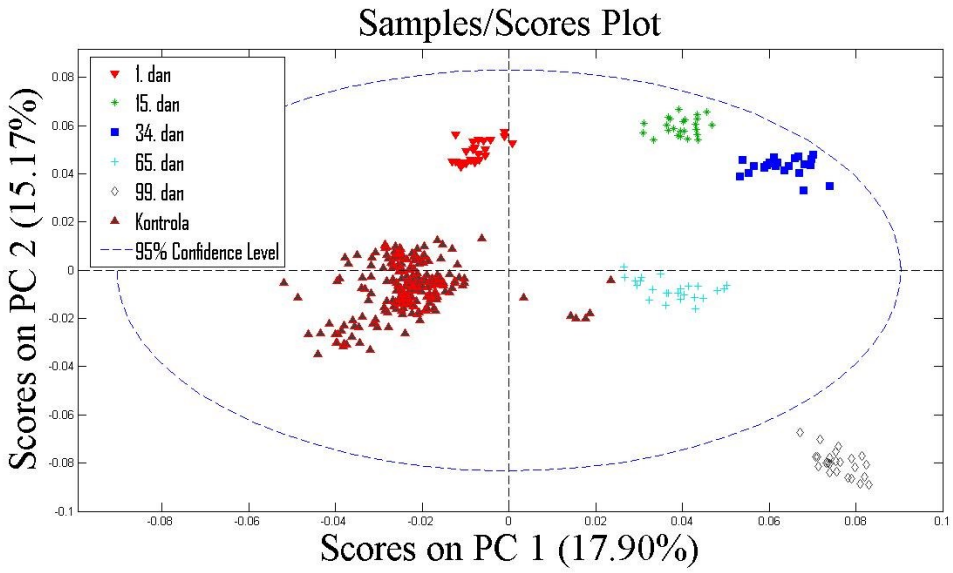
U prvom redu dokazano je da se spektri uzoraka kontrolne skupine i oboljelih pacijenata prikupljenih istog dana (dan dijagnoze) grupiraju u 2 zasebne skupine i međusobno grupiraju prema dvije principalne komponente. Nadalje, uzorci oboljelih jasno se razdvajaju od kontrolnih uzoraka. Da bi došli do saznanja o modelu uzroka razdvajanja, koristili smo statističku metodu PC regresije s unakrsnim vrednovanjem. Obrađivali smo svakog pacijenta posebno i uspoređivali ga sa kontrolnom skupinom radi različitih faza bolesti i individualiziranog kliničkog tijeka liječenja (slika 4 a i prilog 1).

Za svakog pacijenta vidljivo je da se uzorci pojedinih dana liječenja jasno razdvajaju i ne preklapaju s kontrolnom skupinom.

Regresijski pravac analiziranih spektara pacijenata 5 po danima pokazuje sljedeće rezultate: R^2 =0,963; RMESC= 5,2877; RMESCV= 6,8134. Ovako visoki koeficijent korelacije upućuju da se iz spektra oboljelog može dobro odrediti dan i pratiti tijek liječenja (slika 4.a). To se također može vidjeti i pratiti na prikazu dobivenom multivarijantnom PC analizom gdje se svaki dan liječenja grupira zasebno i ističemo - uvijek različito od kontrola čiji se spektri grupiraju uvijek na istome mjestu. (slika 4.b)



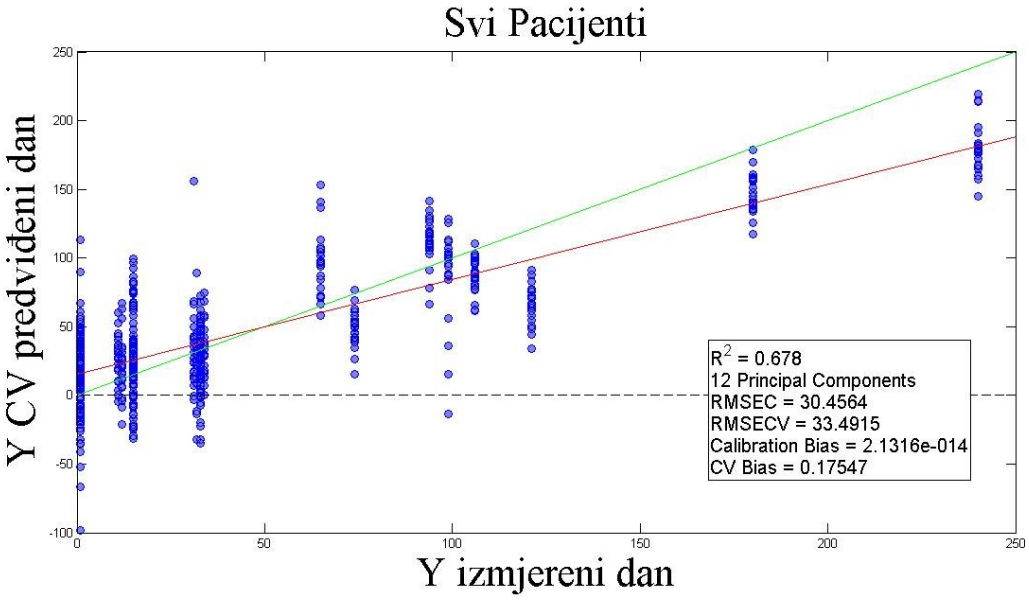
Slika 4.a Prikaz rezultata PC regresije s unakrsnim vrednovanjem za jednog oboljelog (pacijent 5) po danima liječenja.



Slika 4.b Prikaz rezultata multivarijantne PCA za jednog od oboljelih (pacijent 5) po danima liječenja u usporedbi sa kontrolama.

Regresijski pravci za ostale pacijente također pokazuju sličan obrazac ponašanja kao prikazani oboljeli s rasponom koeficijenata regresijskih pravaca (R^2) od 0,856 do 0,987 što upućuje na dobru korelaciju prediktivnosti dana liječenja i stvarne faze liječenja. Također i prikazi dobiveni dvodimenzionalnom PC analizom potvrđuju ranije prikazani model grupiranja pojedinih dana liječenja i njihovo odvajanje od grupiranih kontrola (Prilog 1).

Kad gledamo sve oboljele, regresijski pravac spektara svih oboljelih pokazuje koeficijent korelacije R^2= 0.678; RMSEC= 30,4564; RMSECV=33,4915. R^2 je značajno manji od koeficijenta korelacije za zasebne promatrane pacijente. To ukazuje na to da s jedne strane su oboljeli na početku liječenja bili u različitim fazama bolesti, a s druge strane da svaki oboljeni ima individualni obrazac odgovora na kemoterapiju i klinički tijek bolesti (slika 5).



Slika 5. Prikaz rezultata PC regresije s unakrsnim vrednovanjem za sve pacijente

6. RASPRAVA

Leukemije su najčešća zloćudna bolest koje zahvaćaju djecu te su stoga i predmet velikog zanimanja kako istraživača radi prirode nastajanja i tijeka bolesti tako i kliničara koji liječe te pacijente. Kao što je ranije navedeno danas su glavne dijagnostičke metode analiza periferne krvi, citokemijska evaluacija i aspiracija koštane srži koja je invazivna i nosi rizik za pacijenta te je stoga pronalazak minimalno invazivnog postupka za dijagnosticiranje i praćenje takvih pacijenata, a koji će istovremeno bit dovoljno osjetljiv i specifičan, od neizmjerne važnosti za liječenje i ishod tih pacijenata.

FTIR spektroskopijska analiza se trajno koristi u kliničkoj biokemiji te je primjenjiva i kao metoda medicinske dijagnostike. (H.U. Gremlich i sur., 2001.).

Trend uporabe FTIR spektroskopije u istraživanjima bioloških uzorkaka, rastao je paralelno s trendom uporabe kemometrijskih ili multivarijacijskih statističkih metoda za analizu spektara. Infracrveni apsorpcijski spektri tjelesnih tekućina predstavljaju jedinstveni biokemijski status pacijenta, poput „otiska prsta”. Prednost je to što se multipli parametri

proteoma, lipidoma i metaboloma registriraju i spremaju u isto vrijeme čime se znatno štedi vrijeme (G. Hosxafçı i sur., 2007.). FTIR spektroskopija omogućuje izuzetno razumijevanje biokemijskih procesa, posebno kada postoji potreba za simultanom analizom proteina i lipida (P. Joanne, 2009.).

Dosad, vrlo recentno, provedeno je nekoliko istraživanja u kojima su se FTIR spektroskopijom analizirale tjelesne tekućine oboljelih od malignih bolesti.

Članak objavljen u Lancetu 2001. istražuje FTIR spektroskopiju kao najnoviju metodu za dijagnostiku zloćudnih bolesti. Autori članka predlažu korištenje FTIR spektroskopije u sklopu analize biomarkera povezanih s malignim bolestima, u svrhu ranog otkrivanja bolesti.

Zaključuju da je FTIR spektroskopija obećavajuća metoda, ali da je potreban oprez jer testovi za rano otkrivanje zloćudne bolesti zahtijevaju veliku specifičnost (Pothur R Srinivas i sur., 2001.).

Kao što je već navedeno, FTIR spektroskopija je istraživana kao metoda u dijagnostici i praćenju solidnih tumora. J. Dudala i suradnici su 2015. u časopisu Analyst opisali primjenu FTIR spektroskopije u biokemijskoj karakterizaciji tumora nadbubrežne žlijezde. Razlikovanje benignih i malignih lezija nadbubrežne žlijezde je često kompliciranо i nije potpuno pouzdano tijekom histološke analize. Kao jednu od metoda za razlikovanje malignih i benignih lezija autori predlažu FTIR spektroskopiju koja omogućuje analizu biomolekularnog sastava suspektnog tkiva. Na 300 spektara iz 3 grupe tumora s obzirom na vrstu lezije nađena je razlika u spektrima između 3 skupine, a posebice između feokromocitoma, gdje je nađeno znatno više proteina, i adenoma i hiperplastičnog tkiva koji su bogati mastima (Dudala J. i sur., 2015.).

Jako malo radova od FTIR spektroskopiji postoji kad se radi o hematološkim bolestima, a uglavnom se istraživao spektar seruma. 2013. je u Spectrochimica Acta objavljen članak u kojem je analizirana razlika između spektara seruma zdravih osoba i osoba oboljelih od leukemije. Korišteni su uzorci seruma 30 pacijenata i 19 zdravih osoba čiji su uzorci služili kao kontrola. Spektri oboljelih od leukemije su bili slični spektrima kontrola. Kako bi se točno identificirala razlika između 2 skupina, analizirani su omjeri H1075/H1542, H1045/1467 i H2959/H2931. H295/H2931 je pokazao najveću značajnu razliku između tih omjera i pa se predlaže kao važan analitički faktor za diferencijaciju seruma zdravih osoba i osoba oboljelih od leukemije (D. Sheng. i sur., 2012.).

2006. je u časopisu Vibrational Spectroscopy objavljen rad u kojem se analizira razlika između uzoraka plazme osoba oboljelih od kronične limfocitne leukemije i zdravih osoba. Rezultati su pokazali značajnu razliku između spektara. U uzorcima oboljelih osoba je nađena znatna redukcija spektralnih vršKova (eng. peak) na 1056, 1270 i 1592 cm-1 koji su bili normalne razine i pozicije u zdravih osoba. Analiza je pokazala potpunu korelaciju sa kliničkom slikom te se navedeni parametri mogu koristiti za detekciju i identifikaciju kronične limfocitne leukemije (V. Erukhimovitch i sur., 2006).

U našem istraživanju smo se fokusirali na najčešću malignu bolest dječje dobi: akutnu limfoblastičnu leukemiju koja dosad spektroskopijom nije istražena. Posebnost ovog rada je upravo validacija spektroskopske metode u analizi malignih bolesti dječje dobi, gdje se stremi neinvazivnim postupcima kojima bi se pratila terapija. U radu se testiralo postoji li razdvajanje spektara maligno oboljelih od zdravih te značajnost praćenja promjena u kliničkom tijeku bolesti kroz apsorpcijske vrpce uzoraka plazme.

Kvalitetan protokol pripreme uzoraka za snimanje zamrznute human plazme istražen je i definiran u ovom radu pokazavši da daje zadovoljavajuće rezultate izgleda spektra, a definiran je i broj potrebnih snimanja spektara koji daju najbolju preciznost.

U radu je istraženo nekoliko metoda analize spektara. eSpectra metoda, koja kvalificira poznate molekule uspoređujući pomake u valnim brojevima i apsorpciji među vrpcama spektara, obrade podataka pokazala se lošijom za analizu spektara plazme što je i za očekivati zbog kompleksnosti sastava plazme kao biološkog sustava. Primijenile su se multivarijacijske statističke metode (PCA, PC regresija) koje klasificiraju spektar molekula prema uvjetima ili stanju. S ovakvim kemometrijskim metodama ne kvalificiraju se samo poznate molekule, nego se gledaju sve odjednom. PCA je pokazala grupiranje spektara uzoraka kontrola. Spektar kontrola uvijek je odvojen od uzoraka bolesnih pacijenata, i kod dijagnoze i kod svih točaka liječenja (15., 33. dan te kasnije faze). Ti rezultati govore u prilog tome da se iz FTIR spektara plazme može odrediti koja plazma pripada zdravom, a koja bolesnom pojedincu, i to u svakoj fazi bolesti/liječenja.

Regresijska analiza svakog pacijenta ponaosob u pojedinim točkama liječenja ukazala je da postoji značajan i visok koeficijent korelacije regresijskog pravca spektara u svim odabranim točkama što znači da se iz spektra može očitati faza liječenja, odnosno dan terapije. Ipak, kad se svi pacijenti združe u regresijskoj analizi, koeficijent korelacije je nešto niži. Ovo smanjenje upućuje na potrebu za proširenjem broja pacijenata, no poglavito na

nužnost personaliziranog pristupa pacijentu. Smanjenje koje nastaje združivanjem spektara pacijenata naglašava činjenicu da se ne nalaze se svi u istoj fazi bolesti kod postavljanja dijagnoze. Iako, unatoč toj različitosti, koeficijent korelacije kod tijeka bolesti u svih ostaje visok.

Svi analizirani pacijenti, uspoređivani međusobno i sa kontrolama ukazuju dakle na činjenicu da je u mjerenim spektrima plazme sadržan podatak o razlici u molekulama između kontrolne i bolesne skupine, što se poklapa sa našom hipotezom. Također se mogu pratiti u fazama liječenja, koje se zasebno grupiraju. To znači da analiza ljudske plazme FTIR spektroskopijom, kao brzom, jednostavnom, minimalno invazivnom i jeftinom metodom, ima velike mogućnosti u probiru maligno oboljelih pacijenata i praćenju njihovog tijeka bolesti, kao i za dijagnozu eventualnog povrata bolesti. Daljnja analiza vrpci infracrvenih spektara pokazala bi obrazac ponašanja u samome tijeku bolesti s obzirom na reakciju na terapiju te njihovu korelaciju s drugim, ranije navedenim, metodama praćenja pacijenata. Uspješni rezultati ove pilot studije, zahtijevaju daljnje analize s uključenjem većeg broja pacijenata i drugih dijagnoza (npr. solidni tumori kod djece) što se planira provesti u budućnosti.

7. ZAKLJUČCI

1. Pokazano je da se metodom FTIR spektroskopije mogu razlikovati plazme zdravih i bolesnih pacijenata.

2. Utvrđeno je da spektroskopska analiza plazme sadrži podatak o razlici u stadijima liječenja i tijeku same bolesti.

3. Utvrđeno je da se poznato multisistemno djelovanje leukemije očituje u promjeni plazme, što se može pratiti FTIR spektoskopijom.

4. Rezultati ovog rada ukazuju da FTIR spektroskopska analiza plazme može biti novi model za probir maligno oboljenih pojedinaca.

8. ZAHVALE

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za fiziku i biofiziku doc. dr. sc. Maja Balarin Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ane Katušić Bojanac i komentorstvom dr. sc. Kristine Serec.

Zahvaljujemo našim mentoricama koje su nas vodile kroz sve faze ovog rada i svojim savjetima učinile da ovaj rad bude što bolji. Osim pomoći pri eksperimentalnoj izradi rada vrlo su važne bili i plodonosni sastanci s diskusijama pri interpretaciji dobivenih rezultata.

Predstojniku Zavoda doc. dr. sc. Ozrenu Gamulinu zahvaljujemo se što nam je stavio na raspolaganje sve resurse potrebne za izradu ovog rada. Također, zahvaljujemo asistentima sa Zavoda: Marinu Kosoviću, prof. i Marku Škrabiću, dipl. ing. na pomoći pri korištenju instrumenata i obradi podataka.

Posebno se zahvaljujemo dr. Gordani Jakovljević iz zavoda za onkologiju i hematologiju Klinike za dječje bolesti Zagreb koja nam je osigurala uzorke s kojima je ovaj rad izrađen.

9. POPIS LITERATURE

1. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M, Bonaventure A, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. Lancet. 2018 17;391(10125):1023-1075. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33326-3. Epub 2018 Jan 31
2. Buder A, Tomuta C, Filipits M.: The potential of liquid biopsies. Curr Opin Oncol. 2016 Mar;28(2):130-4.
3. Cheson B.D., J.M. Bennett, K.J. Kopecky, T. Büchner, C.L. Willman, E.H. Estey,C.A. Schiffer, H. Doehner, M.S. Tallman, T.A. Lister, F.L. Coco, R. Willemze, A.Biondi, W. Hiddemann, R.A. Larson, B. Lōwenberg, M.A. Sanz, D.R. Head, R.Ohno, C.D. Bloomfield, J. Clin. Oncol. 21 (2003) 4642–4649.
4. CONCORD Working Group: Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. Lancet 2018 Mar 17;391(10125):1023-1075.
5. Damjanov I., Seiwerth S., Jukić S., Nola M.: Patologija, Medicinska naklada, 2017.
6. Dogan A, Ergen K, Budak F, Severcan F. Evaluation of disseminated candidiasison an experimental animal model: a fourier transform infrared study. Appl.Spectrosc 2007;61:199–203.
7. Dudala J. , M. Bialas 2 , A. Surowka 1 , M. Bereza-Buziak 3 , A. Hubalewska-Dydejczyk ,A. Budzynski et al.: Biomolecular characterization of adrenal gland tumors by means of SR-FTIR. Analyst 2015 Apr 7;140(7):2101-6.
8. Dukor R.K., M.N. Liebman, B.L. Johnson, Cell Mol. Biol. 44 (1998) 211.
9. V. Erukhimovitch, M. Talyshinsky, Y. Souprun, M. Huleihel: FTIR spectroscopy examination of leukemia patients plasma. Vibrational Spectroscopy 40 (2006) 40–46
10. Gremlich H.-U. and B. Yan, Infrared and Raman spectroscopy of biological materials, M. Dekker, New York, 2001
11. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB.: Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. Clin Chem. 2015 Jan;61(1):112-23.
12. Hosxafçı G., O. Klein, G. Oremek and W. Mantele: FTIR spectroscopy of biofluids revisited: an automated approach to spectral biomarker identification. Anal. Bioanal. Chem., 2007, 387, 1815–1822.

13. Joanne, P. et al. (2009) Comparative study of two plasticins: specificity, interfacial behavior, and bactericidal activity. Biochemistry 48, 9372– 9383
14. Kalaskar P, Anand A, Panchal H, Patel A, Parikh S, Shah S.:A comparative study of bloodstream infections in acute myeloid leukemia according to different phases of treatment: Can we predict the organism? South Asian J Cancer. 2017 Jul-Sep;6(3):132-133.
15. Kamat AA, Baldwin M, Urbauer D, et al: Plasma cell-free DNA in ovarian cancer: an independent prognostic biomarker. Cancer 116: 1918-1925, 2010.
16. Kanagathara N, M Thirunavukkarasu , Esther Jeyanthi C, P.Shenbagarajan: Ftir and UV-visible spectral study on nomal blood samples. IJPBS, 2011.Volume 1| Issue 2
17. Kelly J.G. , J. Trevisan, A. D. Scott, P. L. Carmichael,H. M. Pollock, P. L. Martin-Hirsch and F. L. Martin: Biospectroscopy to metabolically profile biomolecular structure: a multistage approach linking computational analysis with biomarkers. J. Proteome Res., 2011, 10, 1437–1448.
18. Li Q.B., Z. Xu, N.W. Zhang, L. Zhang, F. Wang, L.M. Yang, J.S. Wang, S. Zhou, Y.F. Zhang, X.S. Zhou, J.S. Shi, J.G. Wu: *In vivo* and *in situ* detection of colorectal cancer using Fourier transform infrared spectroscopy. World J. Gastroenterol. 11 (2005) 327
19. Ma SK, Wan TSK, Chan LC.: Cytogenetics and molecular genetics of childhood leukemia. Hematol Oncol. 1999;17:91 – 105.
20. Martin FL, Kelly JG, Llabjani V, Martin-Hirsch PL, Patel II, Trevisan J, Fullwood NJ, Walsh MJ Distinguishing cell types or populations based on the computational analysis of their infrared spectra. Nat Protoc. *5* (2010) 1748–1760
21. Pothur R Srinivas, Barnett S Kramer, and Sudhir Srivastava: Trends in biomarker research for cancer detection. Lancet Oncol. 2001 Nov;2(11):698-704. Review.
22. Ramesh J, Huleihel M, Mordehai J, Moser A, et al.: Preliminary results of evaluation of progress in chemotherapy for childhood leukemia patients employing Fourier-transform infrared microscopy and cluster analysis. J Lab Clin Med 2003;141(6):385–94.
23. Serec K. - Vibracijska dinamika tankih filmova soli deoksiribonukleinske kiseline – doktorski rad 2016.
24. Sheng D. X.Liu, W.Li, Y.Wang, X.Chen, X. Wang.:Distinction of leukemia patients' and healthy persons' serum using FTIR spectroscopy. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2013 Jan 15;101:228-32.

25. Staib A., B. Dolenko, D.J. Fink, J. Fruh, A.E. Nikulin, M. Otto, M.S. Pessin-Minsley, et al. Clin. Chim.: Disease pattern recognition testing for rheumatoid arthritis using infrared spectra of human serum. Acta 308 (2001) 79.
26. Stuart, Barbara H., Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications, Wiley, 2004.
27. van der Vaart M and Pretorius PJ: The origin of circulating free DNA. Clin Chem 53: 2215, 2007.
28. Wang H.P., H.C. Wang, Y.J. Huang: Fate and removal of typical pharmaceuticals and personal care products by three different treatment processes. Sci. Total Environ. 204 (1997) 2837.
29. WolframResearch
30. Yano K, Ohoshima S, Gotou Y, Kumaido K, Moriguchi T, Katayama H.: Direct measurement of human lung cancerous and noncancerous tissues by fouriertransform infrared microscopy: can an infrared microscope be used as a clinical tool? Anal Biochem 2000;287:218–25.

10. ŽIVOTOPISI

SLAVICA MARTINOVIĆ

Rođena sam u Splitu 1. srpnja 1994. godine. Pohađala sam II. gimnaziju u Zagrebu koju sam završila 2013. Iste godine upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Trenutno sam studentica pete godine. Od druge godine sam demonstratorica na Zavodu za fiziku i biofiziku. Obnašala sam dužnost potpredsjednice Studentske sekcije za kirurgiju u sklopu koje smo organizirali različite tečajeve praktičnih vještina i predavanja koja su držali liječnici specijalisti.

SARA NOVAK

Rođena sam 20.8.1992.godine u Zagrebu. Nakon završene OŠ Dragutina Domjanića, pohađala sam Gimnaziju Lucijana Vranjanina. 2011. sam upisala Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Trenutno sam studentica pete godine. Tijekom studija sudjelovala sam u radu Studentske pedijatrijske sekcije i pohađala predavanja i radionice.

11. SAŽETAK

Slavica Martinović i Sara Novak

ANALIZA INFRACRVENIH SPEKTARA KRVNE PLAZME KAO PERSONALIZIRANOG MARKERA U DIJAGNOSTIČKO-TERAPIJSKOM PRAĆENJU TUMORA DJEČJE DOBI

Suvremena medicina danas stremi ka korištenju neinvazivnih kemijskih analiza tjelesnih tekućina kao što su krvna plazma, likvor, urin i druge. Traže se fine analitičke metode koje bi u idealnom slučaju uputile na dijagnozu i još važnije, prediktirale tijek bolesti u tjelesnim tekućinama. U ovom originalnom translacijskom istraživanju FTIR spektroskopijom su obrađeni arhivski uzorci krvne plazme pacijenata s dijagnozom pedijatrijske leukemije te u fazama terapije. Definirana je metoda snimanja i broj potrebnih spektara koji su potom analizirani statističkim metodama PCA i PC regresije. Spektri pacijenata uspoređeni sa spektrima arhivskih uzoraka plazme kontrolne skupine. Rezultati uvijek pokazuju jasno razdvajanje spektara pacijenata pri dijagnozi u usporedbi s spektrima kontrolne skupine. U kontroli, spektri svih pojedinaca grupiraju se u jednu skupinu. Spektri pacijenata međusobno su odvojeni što upućuje na različitost u stadiju prilikom postavljanja dijagnoze. Nadalje, analizom spektara svakog pacijenta zasebno uočen je statistički značajan obrazac protokola liječenja, koji se smanjuje pri puliranju spektara svih pacijenata. Rezultati upućuju na nužnost personaliziranog pristupa liječenju i naglašavaju važnost dubljeg translacijskog istraživanja FTIR spektroskopije i sličnih metoda u finom probiru zdravih i bolesnih te otkrivanju odgovora na terapiju.

Ključne riječi: FTIR, plazma, leukemija, dječji tumori

12. SUMMARY

Slavica Martinovic and Sara Novak

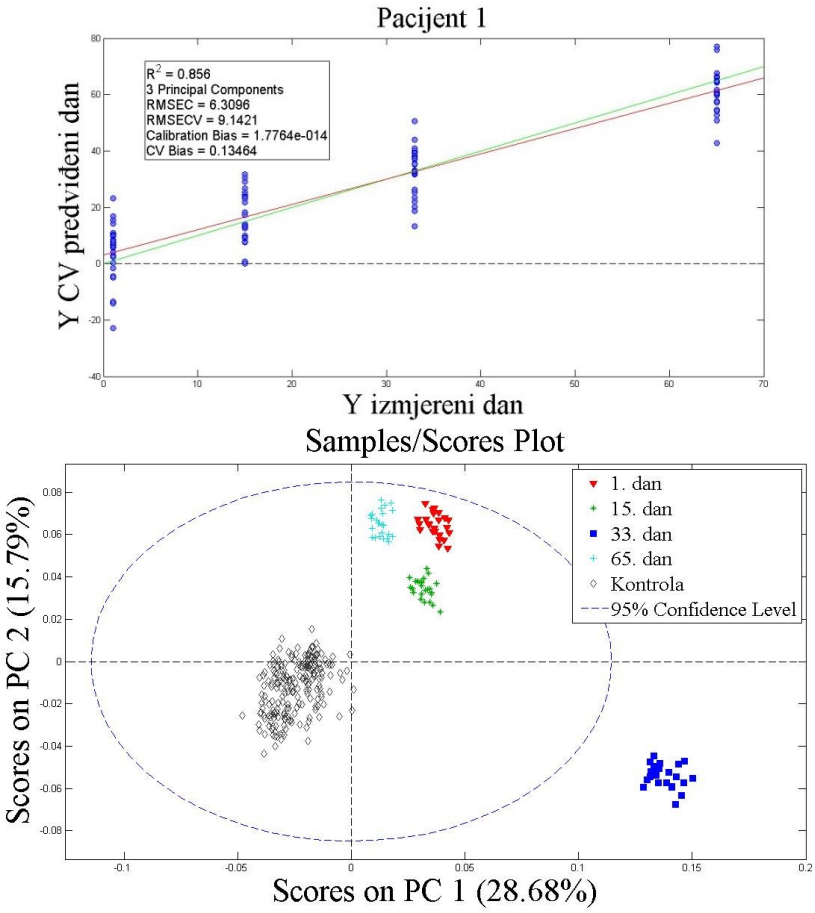
ANALYSIS OF BLOOD PLASMA INFRARED SPECTRUM AS A PERSONALIZED MARKER IN DIAGNOSTIC-THERAPEUTIC MONITORING OF PEDIATRIC CANCER

Nowadays, a modern medicine tends to use non-invasive chemical analyses of body fluids such as blood plasma, liquor, urine, and others. For those, fine analytical methods are required which could ideally set up the diagnosis and, more importantly, detect the progress of the disease in body fluids. In this original translational study, by FTIR spectroscopy we have analyzed the archive blood plasma samples of patients with pediatric leukemia diagnosis and in the treatment phases. We had optimized the spectral recording method and defined the optimal number of spectra for every sample, and the spectra were then analyzed by statistical methods of PCA and PC regression. Patients' spectra were compared with the spectra of archive plasma samples of the control group. The results always showed a clear separation of patient's spectra in the time of diagnosis when compared to the control group. In controls, the spectra of all individuals were fitted into one group. The spectra of each patients were separated from others, which indicates the existing difference in the disease stage in the time of diagnosis. Furthermore, by analyzing the spectra of individual patient, a statistically significant predictable pattern of treatment protocol was visible separately, which was less visible when the spectra of all patients are fitted together. The results indicate the necessity of a personalized treatment approach and emphasize the importance of a deeper translational research of usage of the FTIR spectroscopy and similar methods in fine screening of healthy and sick persons and in the detection of the therapy response.

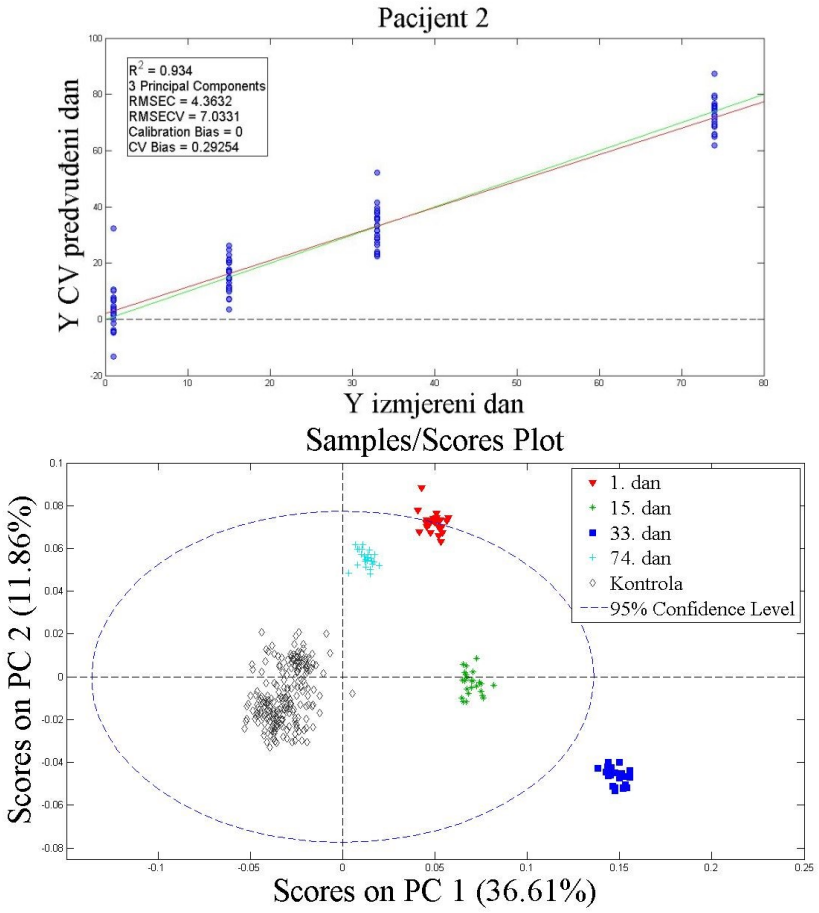
Keywords: FTIR, plasma, leukemia, pediatric cancer

PRILOG

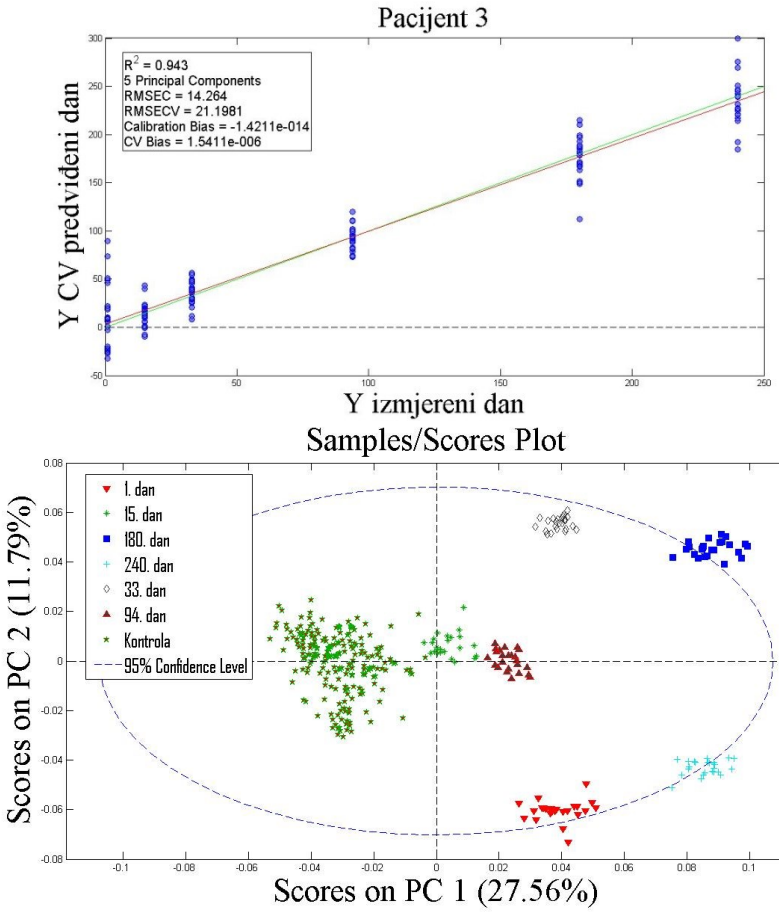
Prilog 1. Prikaz rezultata PC regresije s unakrsnim vrednovanjem i multivarijantne PCA za ostalih 6 pacijenata (a-P1, b-P2, c-P3, d-P4, e-P6, f-P7).



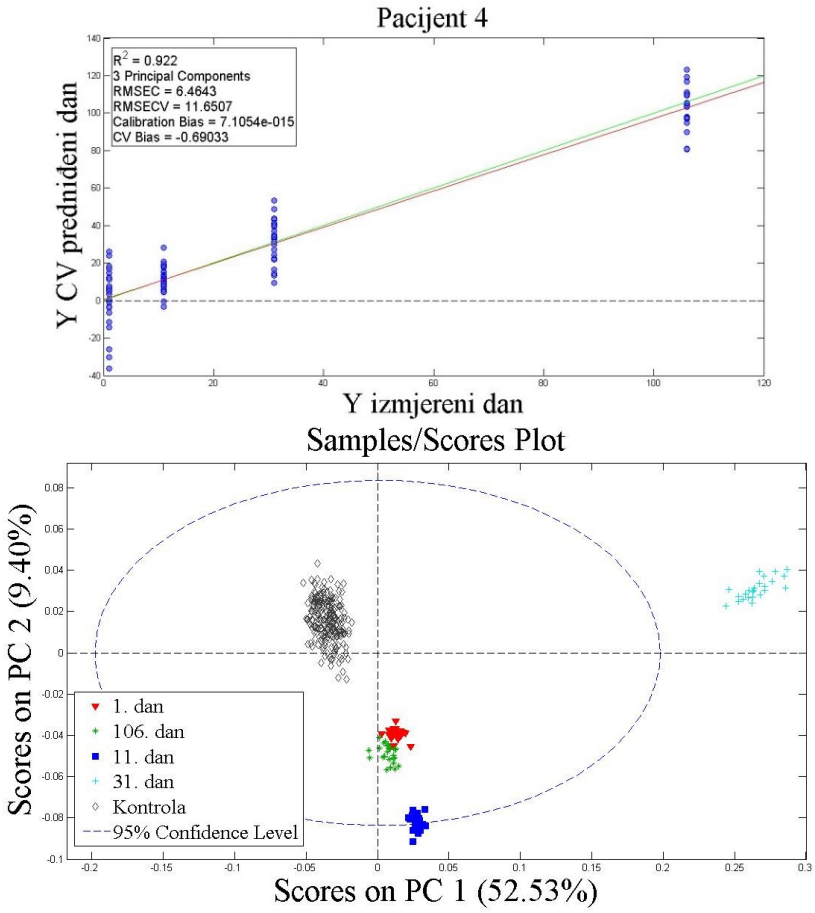
a) Pacijent 1.


Pacijent 2
R2 = 0.934
3 Principal Components
RMSEC = 4.3632
RMSECV = 7.0331
Calibration Bias = 0
CV Bias = 0.29254
Y CV predvudeni dan
Y izmjereni dan
Samples/Scores Plot
1. dan
15. dan
33. dan
74. dan
Kontrola
95% Confidence Level
Scores on PC 2 (11.86%)
Scores on PC 1 (36.61%)

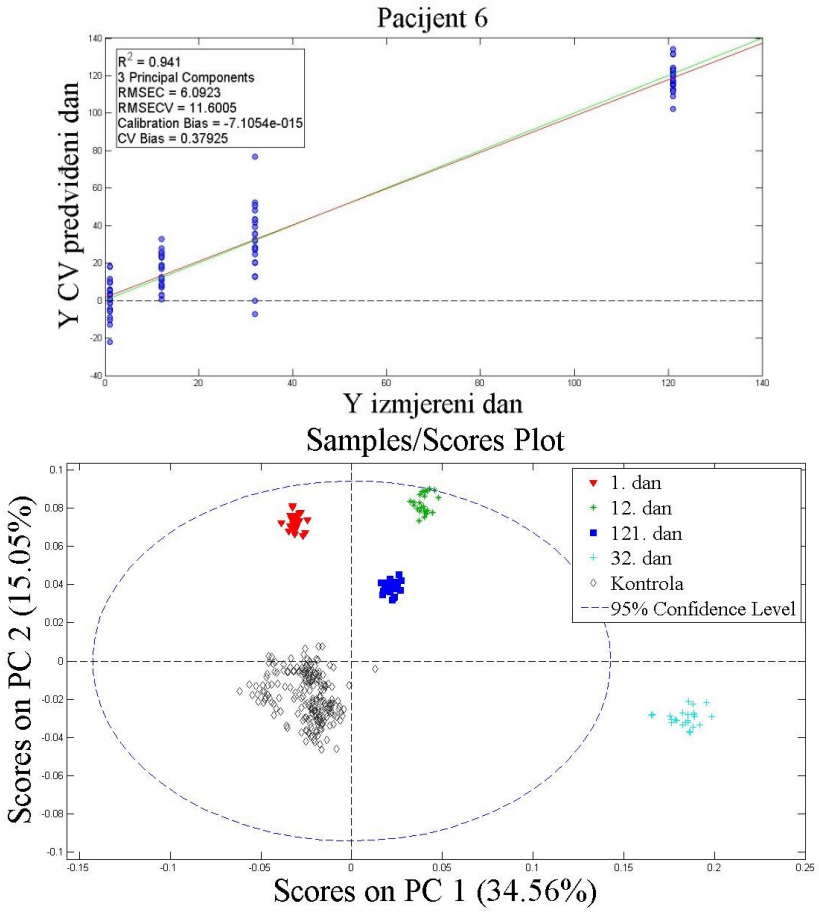
b) Pacijent 2.


Pacijent 3
R2 = 0.943
5 Principal Components
RMSEC = 14.264
RMSECV = 21.1981
Calibration Bias = -1.4211e-014
CV Bias = 1.5411e-006
Y CV predvideni dan
Y izmjereni dan
Samples/Scores Plot
1. dan
15. dan
180. dan
240. dan
33. dan
94. dan
Kontrola
95% Confidence Level
Scores on PC 2 (11.79%)
Scores on PC 1 (27.56%)

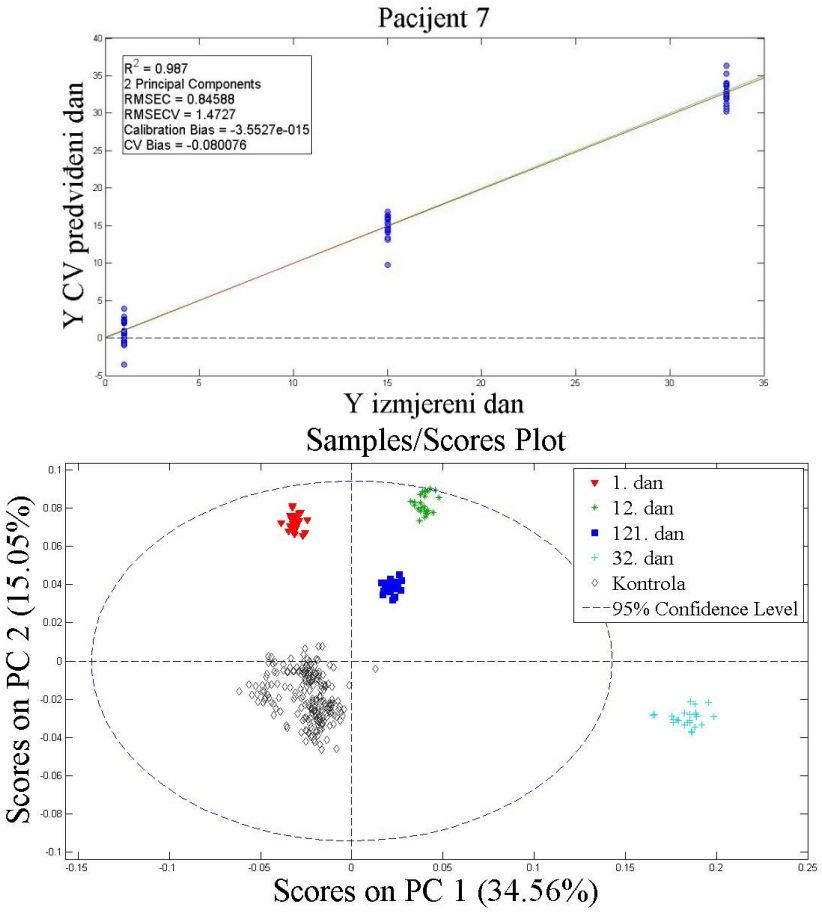
c) Pacijent 3.


Pacijent 4
R2 = 0.922
3 Principal Components
RMSEC = 6.4643
RMSECV = 11.6507
Calibration Bias = 7.1054e-015
CV Bias = -0.69033
Y CV predvideni dan
Y izmjereni dan
Samples/Scores Plot
1. dan
106. dan
11. dan
31. dan
Kontrola
95% Confidence Level
Scores on PC 2 (9.40%)
Scores on PC 1 (52.53%)

d) Pacijent 4.


Pacijent 6
R² = 0.941
3 Principal Components
RMSEC = 6.0923
RMSECV = 11.6005
Calibration Bias = -7.1054e-015
CV Bias = 0.37925
Y CV predvideni dan
Y izmjereni dan
Samples/Scores Plot
1. dan
12. dan
121. dan
32. dan
Kontrola
95% Confidence Level
Scores on PC 2 (15.05%)
Scores on PC 1 (34.56%)

e) Pacijent 6.


Pacijent 7
R2 = 0.987
2 Principal Components
RMSEC = 0.84588
RMSECV = 1.4727
Calibration Bias = -3.5527e-015
CV Bias = -0.080076
Y CV predvideni dan
Y izmjereni dan
Samples/Scores Plot
1. dan
12. dan
121. dan
32. dan
Kontrola
95% Confidence Level
Scores on PC 2 (15.05%)
Scores on PC 1 (34.56%)

f) Pacijent 7.