

Uloga FTIR spektroskopije u ranoj dijagnostici glaukoma

Rudež, Lorena Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:909352>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



Sveučilište u Zagrebu
Medicinski fakultet

Lorena Karla Rudež

ULOGA FTIR SPEKTROSKOPIJE U RANOJ
DIJAGNOSTICI GLAUKOMA



Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad izrađen je u u Laboratoriju za vibracijsku spektroskopiju Zavoda za fiziku i biofiziku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Marka Škrabića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020./2021.

POPIS SKRAĆENICA

CV – unakrsna validacija, eng. *cross validation*

EGS – Europsko glaukomsko društvo, eng. *European Glaucoma Society*

FN – lažno negativan, eng. *false negative*

FP – lažno pozitivan, eng. *false positive*

FTIR – eng. *Fourier Transform Infrared*

HSP – eng. *heat shock protein*

PCA – analiza glavnih komponenata, eng. *principal component analysis*

POAG – primarni glaukom otvorenog kuta, eng. *Primary Open Angle Glaucoma*

STT – Student T-test

SVM – metoda potpornih vektora, eng. *support vector machine*

SVMDA - analiza diskriminante metodom potpornih vektora, eng. *support vector machine discriminant analysis*

TN – ispravno negativan, eng. *true negative*

TP – ispravno pozitivan, eng. *true positive*

SADRŽAJ

<i>SAŽETAK</i>	1
<i>SUMMARY</i>	2
1. UVOD	3
1.1. GLAUKOM	3
1.1.1. PRIMARNI GLAUKOM OTVORENOG KUTA	3
1.2. OČNA VODICA	4
1.3. VIBRACIJSKA SPEKTROSKOPIJA	5
1.3.1. FTIR SPEKTROSKOPIJA	7
2. HIPOTEZA	10
3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	10
4. MATERIJALI I METODE	11
4.1. PRIPREMA UZORAKA OČNE VODICE	11
4.2. SNIMANJE UZORAKA METODOM FTIR SPEKTROSKOPIJE	12
4.3. STATISTIČKA ANALIZA SPEKTARA	13
5. REZULTATI	14
5.1. VALIDACIJA MODELA PREDIKCIJOM NEPOZNATIH UZORAKA	18
6. RASPRAVA	24
7. ZAKLJUČCI	25
8. ZAHVALE	27
9. POPIS LITERATURE	28
10. ŽIVOTOPIS	31

SAŽETAK

ULOGA FTIR SPEKTROSKOPIJE U RANOJ DIJAGNOSTICI GLAUKOMA

Glaukom je jedan od najčešćih uzroka ireverzibilne sljepoće u svijetu. Najbolji ishodi liječenja mogući su samo uz što raniju dijagnozu ove bolesti. Trenutno ne postoje identificirani glaukom-specifični biomarkeri niti adekvatne metode probira glaukoma u populaciji. Stoga smo odlučili analizirati strukturu očnih vodica koristeći FTIR spektroskopiju koja nudi jedinstvenu priliku za istraživanje sastava tvari na molekularnoj razini.

U studiji je sudjelovalo 87 ispitanika, podijeljenih u dvije skupine: 1) 55 pacijenata s glaukomom (158 uzoraka očne vodice) i 2) kontrolna grupa od 32 pacijenta s kataraktom (93 uzorka očne vodice). Svi uzorci očne vodice prikupljeni su na početku operacije glaukoma ili katarakte. Uzorci su posušeni na prozirnim silicijskim pločicama te su njihovi spektri snimljeni FTIR spektroskopijom i potom analizirani metodama statističke analize: STT, PCA i SVM.

Naše je istraživanje pokazalo da FTIR spektroskopija razlikuje strukturu medija očne vodice pacijenata s glaukomom od pacijenata s kataraktom. Izgrađen je i model za prepoznavanje spektara koji se odnose na odgovarajuću patologiju.

Rezultati FTIR spektroskopije analizirani statističkim metodama STT, PCA i SVM pokazali se kao vrlo obećavajuća metoda za uspješno razlikovanje uzoraka očne vodice pacijenata oboljelih od glaukoma i pacijenata oboljelih od katarakte, stoga ova metoda predstavlja osnovu za razvoj nove metode rane dijagnostike glaukoma.

Ključne riječi: glaukom, FTIR, očna vodica

SUMMARY

THE ROLE OF FTIR SPECTROSCOPY IN EARLY DIAGNOSTICS OF GLAUCOMA

Glaucoma is one of the major causes of irreversible blindness in the world. Detecting glaucoma as early as possible ensures the best possible treatment and outcome. Since there are currently no glaucoma-specific biomarkers identified and no glaucoma screening method available, we decided to analyze molecular structure of aqueous humor using FTIR spectroscopy which offers a unique opportunity to investigate the composition of substances on a molecular basis.

The study included 87 age matched subjects, divided into two groups 1) 55 glaucoma patients (158 aqueous humor samples) and 2) a control group comprising 32 patients with cataracts (93 aqueous humor samples). All aqueous humor samples were collected at the start of the glaucoma or cataract surgery. FTIR spectra, of the samples dried on transparent silicon plates, were recorded and analyzed by statistical methods of STT, PCA and SVM. Our study has shown that FTIR spectroscopy can differentiate media structure between the control group and the glaucoma patient group. A model for spectra recognition attributable to a certain type of pathology was established.

Results of FTIR spectroscopy analyzed by statistical methods of STT, PCA and SVM have proven to be a promising method for differentiation of aqueous humor samples between patients with cataract and glaucoma, therefore this method can form the basis for the development of new methods in early diagnostics of glaucoma.

Key words: glaucoma, FTIR, aqueous humor

1. UVOD

1.1. GLAUKOM

Glaukom je široka skupina očnih bolesti karakterizirana progresivnim strukturnim promjenama vidnog živca koje vode do propadanja vidnog polja i gubitka vida (Cerovski i sur.-2015). Uzrokovan je raspadom ganglijskih stanica mrežnice i stanjivanjem sloja živčanih stanica mrežnice. Glaukom je prvi puta kao zasebni entitet opisao Hipokrat oko 400. godine prije Krista, a danas se smatra jednim od najčešćih uzročnika ireverzibilne sljepoće u svijetu (Pascolini i sur.-2012) te najčešćim uzročnikom ireverzibilnog gubitka vidne oštine. Broj pacijenata oboljelih od glaukoma u stalnom je porastu. Meta-analiza provedena 2014. godine pokazala je da je 2013. godine u svijetu bilo 64.3 milijuna pacijenata s ovom dijagnozom, procijenjeno je da će 2020. godine svijetu biti oko 76.0 milijuna oboljelih, a do 2040. godine ta će brojka narasti do 111.8 milijuna pacijenata (Tham i sur.-2014).

Primarni glaukom otvorenog kuta (POAG) najčešći je oblik glaukoma. Početna klinička slika ove bolesti vrlo je nespecifična i često asimptomatska. Najčešće ne izaziva bol, tijekom je vrlo polagan i postupan te se bolesnici s vremenom nesvjesno nauče nositi sa smanjenom sposobnošću vida. Često se tek nakon postavljene dijagnoze pacijenti retrospektivno prisjećaju pojave simptoma (Green i sur.-2002). Iz ovih razloga bolest se ne dijagnosticira sve do odmaklog stadija bolesti, kada se pacijenti javljaju liječnicima zbog pojave ozbiljnijeg oštećenja vida, suženog vidnog polja ili čak sljepoće. Kasna dijagnostika dovodi do lošije prognoze i nepovoljnijeg ishoda liječenja budući da su navedene promjene nepovratnog karaktera. Procjenjuje se da je u samo 10 - 50% pacijenata u svijetu koji boluju od glaukoma dijagnoza i klinički postavljena te su pacijenti svjesni svoje bolesti (Weinreb i sur.-2014). Nedostatak jednostavne i precizne metode dijagnostike glaukoma isključuje mogućnost probira populacije. Upravo zbog ozbiljnih i ireverzibilnih posljedica te poteškoća u pravovremenoj dijagnostici, glaukom se smatra jednim od vodećih javnozdravstvenih problema današnjice.

1.1.1. PRIMARNI GLAUKOM OTVORENOG KUTA

Prema definiciji Europskog glaukorskog društva (EGS), POAG je kronična, progresivna neuropatija s karakterističnim morfološkim promjenama na glavi optičkog živca i u sloju živčanih stanica mrežnice u odsutnosti drugih bolesti ili prirođenih anomalija, a povezuje

se sa progresivnim odumiranjem ganglijskih stanica mrežnice i ispadima vidnog polja (EGS-2017). Budući da je ovo bolest u kojoj je liječenje i prevencija dugoročnog gubitka vida uspješna ukoliko se dijagnosticira u ranim stadijima (Weinreb i sur.-2004), poznavanje rizičnih čimbenika ključno je u prepoznavanju i probiru pacijenata kod kojih treba postaviti sumnju na dijagnozu glaukoma još i prije pojave simptoma (Tham i sur.-2017). Iako je patogeneza ove bolesti još nepotpuno razjašnjena, smatra se da je glavni rizični čimbenik povišeni očni tlak. Starija dob, crna rasa i etničko podrijetlo, pozitivna obiteljska anamneza, pseudoeksfolijacijski sindrom, centralno stanjenje rožnice, miopija i snižena vrijednost očnog perfuzijskog tlaka ostali su čimbenici rizika za nastanak glaukoma otvorenog kuta (EGS-2017). Dob i intraokularni tlak su ujedno i najvažniji prognostički čimbenici, a liječenje se bazira upravo na snižavanju intraokularnog tlaka.

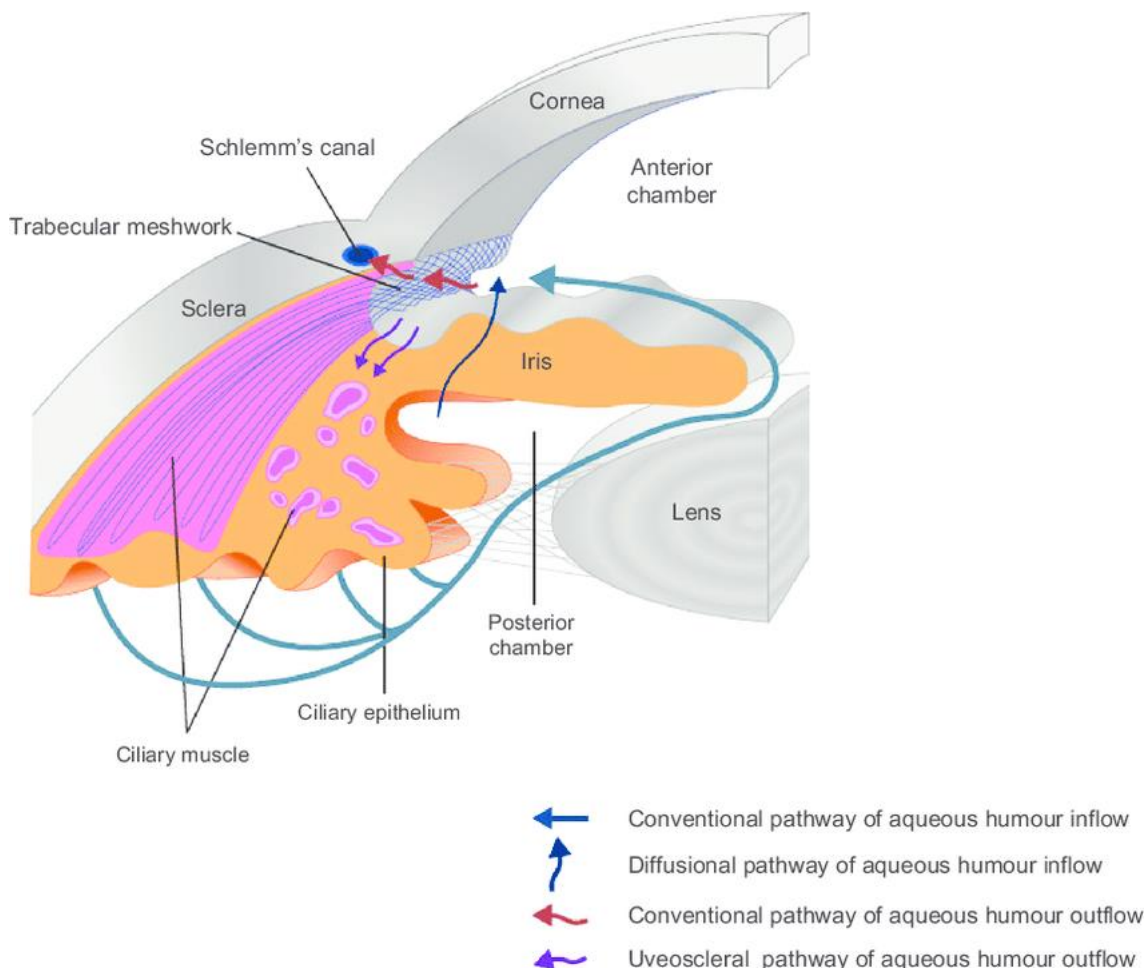
Medikamentna, laserska i kirurška terapija glaukoma uvelike je poboljšala prognozu pacijenata s ovom dijagnozom, no rana, precizna i učinkovita dijagnostika još uvijek ostaje ključna u određivanju tijeka bolesti.

1.2. OČNA VODICA

Očna vodica (lat. *humor aquosus*) prozirna je tekućina koja se nalazi unutar prednje i stražnje očne sobice. Oplahuje avaskularne strukture oka kao što su leća i rožnica, opskrbljuje ih hranjivim tvarima, odnosi metaboličke produkte, prenosi neurotransmitere, stabilizira strukturu oka i pridonosi homeostazi očnih tkiva (Goel i sur.-2010).

Očnu vodicu kontinuirano stvara cilijarni epitel cilijarnog tijela oka unutar stražnje očne sobice, a ona dalje otječe kroz prostor između leće i šarenice te preko zjeničnog otvora dolazi u prednju očnu sobicu. Neka istraživanja navode da postoji i alternativni put kojim očna vodica difuzijom prelazi preko korijena šarenice i dolazi u prednju očnu sobicu (Crawley i sur-2012). U iridokornealnom kutu prednje očne sobice, očna vodica nalazi dva puta kojima otječe u venski sustav oka – konvencionalni i uveoskleralni put. Konvencionalni put odvođenja sastoji se od otjecanja očne vodice kroz trabekularnu mrežicu do Schlemmovog kanala preko kojeg se očna vodica ulijeva u venski sustav oka. Uveoskleralni put opisuje otjecanje očne vodice kroz korijen šarenice i intersticijski prostor cilijarnog mišića do suprakornealnog prostora, koji označava prostor između žilnice i bjeloočnice (Weinreb-2000). Ovakav sustav otjecanja očne vodice iznimno je važan u održavanju normalne razine očnog tlaka. U slučaju poremećaja neke od komponenti otjecanja ili povećane proizvodnje dolazi do povećanog zadržavanja očne vodice u očnim

sobicama i povećanja očnog tlaka, a povišeni očni tlak glavni je rizični čimbenik u pojavi glaukoma (ECS-2017). Također, neka istraživanja pokazuju značajniju promjenu u sastavu očne vodice kao što su pojava posebne vrste protutijela u pacijenata s glaukomom u usporedbi s zdravim pacijentima (Tsai i sur.-2019) ili pojava markera oksidativnog stresa (Goyal i sur.-2014).



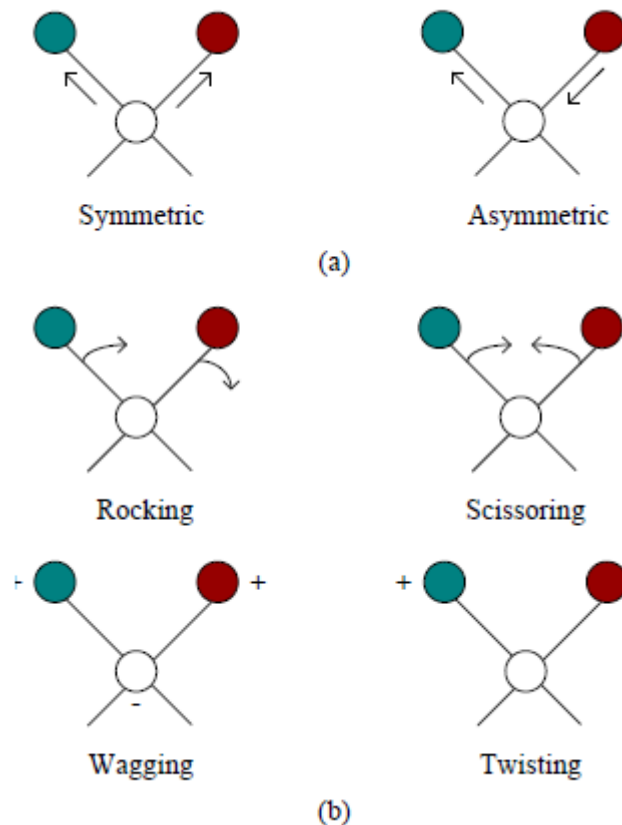
Slika 1. Prikaz otjecanja očne vodice (Crawley i sur-2012).

1.3. VIBRACIJSKA SPEKTROSKOPIJA

Vibracijska spektroskopija je dobro poznata istraživačka metoda koja analizira interakciju elektromagnetskih valova i materije (Moyasaghi i sur.-2008). Uobičajeno se dijeli se na FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) i Ramanovu spektroskopiju, dok je za potrebe ovog rada korištena isključivo FTIR spektroskopija. Infracrveno spektralno područje s valnim brojevima od 4000 do 400 cm^{-1} standardno je područje vibracijske spektroskopije koje sadrži podatke za identifikaciju organskih molekula. Tehnike

vibracijske spektroskopije temelje se na detekciji apsorbiranog, raspršenog ili emitiranog elektromagnetskog zračenja u/na molekulama uzorka, stoga ove metode pomažu u otkrivanju molekularne prirode uzoraka. Molekulske vibracije su kvantizirane, tj. svaka molekula može vibrirati točno određenim frekvencijama koje odgovaraju njenim vibracijskim energijskim stanjima.

Vibracijska spektroskopija koristi se za identifikaciju molekula preko periodičkih promjena u kutu međuatomske veze (vibracije savijanja) i međuatomskih udaljenosti (vibracije istezanja) (Günzler i sur.-2006). Postoji 6 osnovnih modova molekularnih vibracija podijeljenih na temelju vibracija savijanja i istezanja. Dok istezanja mogu biti simetrična (u fazi) ili asimetrična (izvan faze), vibracije savijanja su mahanje (eng. *wagging*), njihanje (eng. *rocking*), škaranje (eng. *scissoring*) i uvijanje (eng. *twisting*).



Slika 2. Prikaz vibracijskih modova molekula: a) Vibracije istezanja i b) Vibracije savijanja (Yu -2019)

Kako bi došlo do apsorbiranja infracrvenog zračenja, vibracija mora uzrokovati promjenu u dipolnom momentu molekule. Što je ta promjena (savijanje ili istezanje) veća to je i

apsorpcijska vrpca intenzivnija. Simetrične molekule, za razliku od nesimetričnih, imaju manje vibracijskih modova koji bi uzrokovali promjenu dipolnog momenta te su stoga njihove vibracije slabije (Stuart -2000). Također, intenzitet apsorpcijske vrpce nekog vibrirajućeg moda određene molekule direktno je proporcionalan koncentraciji te molekule u uzorku, što omogućava i kvantitativna mjerenja ispitivanog uzorka.

1.3.1. FTIR SPEKTROSKOPIJA

FTIR je kvantitativna i kvalitativna metoda analize sastava tvari temeljena na promjeni međuodnosa funkcijskih grupa atoma unutar molekule. Molekule vibriraju kada tvar apsorbira infracrveno zračenje točno odgovarajuće valne duljine i te vibracije svrstavamo u vibracije istezanja i savijanja. Moguće je odrediti funkcijske skupine i sastav molekula prema spektralnom položaju i intenzitetu apsorpcijskih vrpca ako vibracije imaju svoje odgovarajuće apsorpcijske vrpce u infracrvenom spektru (Yu-2019). Infracrvena spektroskopija proučava interakcije tvari sa zračenjem u rasponu valnih brojeva od 12500 cm^{-1} do 10 cm^{-1} , tj. valnih duljina od 780 nm do 1 mm. Valni brojevi ($\bar{\nu}$) mjera su energije zračenja i jednaki su recipročnoj vrijednosti valne duljine (λ):

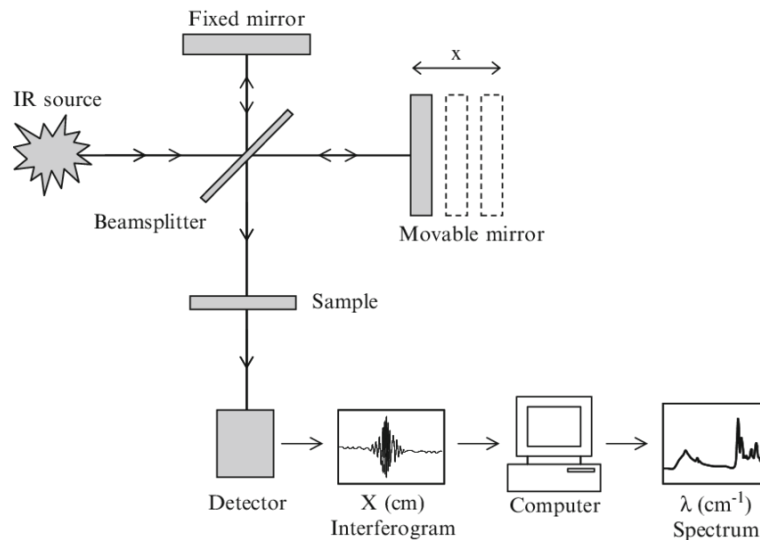
$$\bar{\nu} = 1 / \lambda$$

Infracrveni spektar može se podijeliti u 3 glavna područja: daleko (eng. *far-infrared*) s valnim duljinama od 30 do 1000 μm , srednje (eng. *mid-infrared*) s valnim duljinama od 5 do 30 μm te blisko (eng. *near-infrared*) s valnim duljinama od 780 nm do 5 μm . Najčešće promatrano spektralno područje je srednje infracrveno područje jer je najkorisnije za analizu organskih spojeva (Theophanides-1978), a dijeli se na područje vibracija funkcionalnih skupina ($4000\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$) i područje „otiska prsta“ ($1400\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) karakteristično za pojedini spoj.

Osnovni dijelovi FTIR spektrometra su:

- a) izvor infracrvenog zračenja
- b) interferometar
- c) komora za uzorak
- d) detektor
- e) pojačalo
- f) analogno-digitalni pretvarač

g) računalo



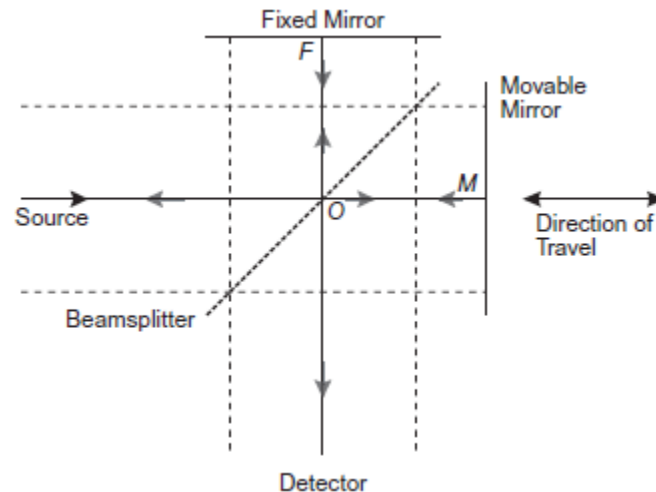
Slika 3. Shema FTIR spektrometra.

FTIR spektroskopija temelji se na interferenciji zračenja između dviju zraka čime se dobiva interferogram. Najčešće korišteni interferometar u FTIR spektroskopiji je Michelsonov interferometar. Zamišljen je s ciljem da pokuša što više umanjiti okolne smetnje koje utječu na mjerenje. Sastoji se od koherentnog izvora svjetlosti, detektora dva zrcala od kojih je jedno pomično u smjeru okomitom na ravninu te od polupropusnog zrcala koje ima ulogu razdjelnika snopa („*beamsplitter*“) jer djelomično propušta, a djelomično reflektira svjetlost. Put zraka svjetlosti u interferometru je sljedeći:

- 1) Koherentna svjetlost iz izvora dolazi do polupropusnog zrcala.
- 2) Dio svjetlosti se reflektira prema nepomičnom zrcalu, a drugi dio prolazi kroz polupropusno zrcalo do pomičnog zrcala.
- 3) Zrcala reflektiraju svjetlost natrag prema polupropusnom zrcalu te dolazi do njihove interferencije.
- 4) Uzorak apsorbira dio zračenja, a ostatak prolazi i bude detektiran na detektoru.

Vrsta nastale interferencije ovisi o putovima koje zrake moraju prevaliti. Kada se putovi razlikuju za cijelu valnu duljinu doći će do konstruktivne interferencije, a ako im se putovi

razlikuju za pola valne duljine dolazi do destruktivne interferencije. Interferogram dobiven ovim načinom mora biti pretvoren iz analognog u digitalni oblik kako bi se provela Fourierova transformacija u konvencionalni spektar (Diem-2015).



Slika 4. Shema Michelsonovog interferometra (Griffiths-2007)

Velike prednost FTIR spektroskopije, kao metode za određivanje molekulske strukture nekog materijala, su njena velika osjetljivost te brzina snimanja spektara. U prošlosti su se FTIR-om mjerili spektri plinova, tekućina i praškastih čvrstih tvari, dok se danas svakodnevno primjenjuje za uzorke svih agregatnih stanja i jako malih veličina (Griffiths-2007).

U medicini se FTIR spektroskopija pokazala kao vrlo vrijedna metoda zbog svoje visoke osjetljivosti u opažanju promjena unutar funkcijskih skupina dijelova tkiva kao što su lipidi, proteini i nukleinske kiseline. Svaka od tih komponenti tkiva može biti prikazana svojim karakterističnim apsorpcijskim vrpčama s specifičnim valnim duljinama unutar istog spektra (Tablica 1.). To znači da, ovisno o njihovom biokemijskom sadržaju, tekućine, stanice ili tkiva različito međudjeluju s infracrvenim zračenjem, što rezultira u različitim infracrvenim spektrima.. Ova razlika između infracrvenih spektara - intenziteta, širina vrpce i njihovih spektralnih položaja, stvara potrebne informacije za razlikovanje normalnih ili abnormalnih stanica i tkiva (Sheng i sur.-2015). Drugim riječima, različite stanice ili čak različita stanja iste stanice stvaraju različite infracrvene spektre, čime se na osnovu različite biokemije njihovih spojeva može identificirati i tip stanice, ali i njeno stanje (Mitchell i sur.-2014). U medicini je FTIR spektroskopija prvi put korištena za razlikovanje malignih od zdravih ljudskih stanica

(Dritsa-2012).. Nakon toga je uspješno primjenjivana za proučavanje raznih ljudskih tkiva poput mineraliziranog tkiva, kože, kolona, hrskavica, pluća, jetre, srca i slezene. .

Tablica 1. Asignacija glavnih apsorpcijskih vrpca FTIR spektra bioloških tkiva. (Lacombe i sur.-2015)

Vrpce (cm ⁻¹)	Asignacije za komponente bioloških tkiva
3300	N–H <i>stretching</i> proteina (amid A vrpca)
3055-3090	=CH <i>stretching</i> lipida
2950-2960	CH ₃ asimetrični <i>stretching</i> lipida
2920-2930	CH ₂ asimetrični <i>stretching</i> lipida
2865-2880	CH ₃ simetrični <i>stretching</i> lipida
2840-2860	CH ₂ simetrični <i>stretching</i> lipida
1730-1760	C=O <i>stretching</i> masnih kiselina
1630-1670	C=O <i>stretching</i> proteina (amid I vrpca)
1515-1570	N–H <i>bending</i> proteina (amid II vrpca)
1460-1470	CH ₂ <i>scissoring</i> : lipidi
1440-1455	CH ₂ <i>bending</i> : uglavnom lipidi s malo doprinosa proteina
1390-1410	COO ⁻ simetrični <i>stretching</i> : masne kiseline
1240	P=O asimetrični <i>stretching</i> nukleinskih kiselina
1170-1120	C–O <i>stretching</i> i C–O–C <i>stretching</i> ugljikohidrata

2. HIPOTEZA

Pretpostavka ovog rada je da se temeljem analize snimljenih vibracijskih spektara očnih vodica mogu razlikovati pacijenti koji boluju od primarnog glaukoma otvorenog kuta od kontrolne skupine pacijenata (pacijenti koji boluju od katarakte).

3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj rada je ustanoviti novu potencijalnu metodu rane dijagnostike glaukoma mjerenjem vibracijskih spektara molekula očne vodice FTIR spektroskopijom.

Specifični ciljevi rada su utvrditi postoje li statistički značajne razlike analiziranih uzoraka očne vodice pacijenata s glaukomom i kataraktom te ukoliko one postoje, približno odrediti odakle one potječu.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. PRIPREMA UZORAKA OČNE VODICE

Očna vodica prikuplja se prilikom kirurških zahvata koji su različiti za kontrolnu (pacijenti s kataraktom) i ispitnu skupinu (pacijenti s glaukomom). Pacijenti s kataraktom podvrgavaju se operaciji fakoemulzifikacije, koja je standardna kirurška terapija i najčešća operacija za uklanjanje katarakte (Boulter i sur.-2019). Nakon izoliranja operativnog područja, dezinfekcije oka i ukapavanja lokalnog anestetika, a prije izvođenja prvog reza inzulinskom iglom uzima se uzorak očne vodice u špricu. Pacijenti s glaukomom podvrgavaju se operaciji trabekulektomije, koja je standardna kirurška terapija i najčešća operacija za uklanjanje glaukoma (Cerovski i sur.-2015). U ovoj vrsti operacije uzorak se uzima nakon formiranja skleralnog poklopca, a prije formiranja filtracijskog jastučića, također inzulinskom iglom u špricu. Kod obje vrste operacija ključno je da se uzme prvi uzorak očne vodice prilikom operacije, kako bi se prikupili svi važni faktori. U suprotnome, može doći do nadomještanja se novostvorenom očnom vodicom ili se miješanja s fiziološkom otopinom i drugim lijekovima koji se primijenjuju prilikom operacije, što uništava kvalitetu uzorka.

Uzorak se premješta u *Eppendorf* epruvetu koja se stavlja u klasičnu epruvetu, a zatim se centrifugira 10 minuta na brzini od 3000 okretaja po minuti. Nakon centrifuge u uzorcima se vidi odvojeni precipitat i supernatant te se oko 100 μL supernatanta prenosi u obilježene *Eppendorf* epruvete. Tako pripremljeni uzorci pohranjuju se na temperaturi od -20°C te se s KBC Sestre milosrdnice, gdje su uzorci prikupljeni i pripremljeni, dopremaju na Medicinski fakultet na suhom ledu na temperaturi od -80°C . Uzorci se odmrzavaju na dan snimanja metodom FTIR spektroskopije te se do samog trenutka snimanja pohranjuju u hladnjak na temperaturu od najviše 4°C .

4.2. SNIMANJE UZORAKA METODOM FTIR SPEKTROSKOPIJE

Za snimanje se koristi uređaj *PerkinElmer Spectrum GX* u FTIR modulu, a postupak snimanja započinje pripremanjem spektrometra ulijevanjem tekućeg dušika u spremnik uređaja kako bi se MCT detektor ohladio. Nakon 30 minuta hlađenja uređaj je spreman za korištenje. Spektrometar je spojen s računalom na kojemu se nalazi softverski program *Spectrum v3.02*. Prije početka mjerenja, sve silicijske pločice, na koje će se nanositi uzorci, operu se destiliranom vodom te se prebrišu vatenim štapićem. Idući korak je pranje stakalaca etanolom uz nježno brisanje mekanim papirom kako bi se otklonio višak tekućine. Za izvođenje snimaka pločice se umeću u stalak koji se zatim uglavljuje u spektrometar. Prvi snimak izvodi se bez uzorka i naziva se 'pozadinski spektar', a on se dobiva usrednjavanjem 500 skenova u *Single beam* opciji u rasponu valnih brojeva 4000 – 450 cm^{-1} . Zatim se uzorci izvade iz hladnjaka temperiranog na 4°C. Mikropipetom se uzorci nanose na silicijske pločice u količini 10 μL točno po sredini pločice. Nanešeni uzorak razmaže se u tanki sloj, tako da promjer uzorka iznosi otprilike 5 mm. Pločice s uzorcima unose se u vakuum pumpu u kojoj se uzorci ostavljaju 7 minuta i 30 sekundi. Ovo vrijeme sušenja određeno je tako što je primijećeno da su nakon tog vremena provedenog u vakuum pumpi uzorci bili potpuno osušeni. Tako osušene pločice s uzorcima umeću se u stalak koji se postavlja u spektrometar. Svaki snimljeni spektar u računalu se automatski pohranjuje te se označava rednim brojem snimke, imenom pacijenta i početnim slovom dijagnoze pacijenta (G – glaukom ili K – katarakta). Na ovaj način generiranom imenu dodaju se slova *a*, *b* ili *c*, budući da su se iz uzorka očne vodice jednog pacijenta (ukupno 33 μL po pacijentu) snimala tri spektra (svaki po 10 μL). Tako je primjer imenovanja uzorka očne vodice *15IvanHorvatKa*. Zatim se u softverskom programu postavlja *Single beam* opcija u rasponu 4000 – 450 cm^{-1} te se usrednjava 250 skenova. Snimanje spektra jednog uzorka traje oko 5 minuta. Nakon snimljene serije od 9 uzoraka (zbog ograničenog broja pločica) silicijske pločice peru se na isti način kao i prije samog početka mjerenja te se postupak ponavlja dok se ne istroše svi uzorci. Na ovaj način ukupno je snimljeno 93 spektra uzoraka očne vodice od 32 pacijenata iz kontrolne skupine (pacijenti koji boluju od katarakte) i 158 spektara uzoraka očne vodice od 55 pacijenata s glaukomom.

4.3. STATISTIČKA ANALIZA SPEKTARA

Rezultati mjerenja statistički su analizirani pomoću programa *Matlab R2010b* (Mathworks, MA, USA) i *PLS_Toolbox* (Eigenvector Research, Manson, WA, USA). Provedeni su Student T-test (STT), multivarijantna metoda analize glavnih komponenti (PCA; eng. *principal component analysis*) i metoda potpornih vektora (SVM, eng. *support vector machine*).

Student t-test je statistički postupak koji se koristi za određivanje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina dvaju nezavisnih skupova uzoraka. Radi se o parametrijskom statističkom testu koji postavlja zahtjev na distribuciju izvornih podataka, u ovom slučaju Studentovu t-distribuciju koja se primjenjuje u računanju intervala pouzdanosti i testiranju hipoteza o razlici između dva uzorka. Karakteriziraju je stupnjevi slobode koji se definiraju kao veličina uzorka umanjena za broj procjenjivanih parametara.

PCA je metoda formiranja novih, umjetnih varijabli koje su linearne kombinacije izvornih varijabli. PCA metoda transformira podatke u novi, nižedimenzionalni potprostor te se njome može efikasno reducirati dimenzija seta podataka na nekoliko onih koji daju najveću varijaciju među podacima (u našem slučaju snimljenim spektrima). Cilj analize glavnih komponenti su sažimanje i analiza linearne povezanosti većeg broja multivarijatno-distribuiranih, međusobno koreliranih varijabli u manji broj komponenti - novih, međusobno nekoreliranih, varijabli, s minimalnim gubitkom informacija. Rezultati PCA se uobičajeno prikazuju u obliku grafičkih prikaza - *plotova*. *Scores plot* projicira podatke u potprostor i služi interpretaciji odnosa između opservabli, tj. uzoraka. Blizina tako prikazanih uzoraka predstavlja njihovu sličnost. *Loadings plot* općenito pokazuje odnos između originalnih varijabli i potprostornih dimenzija, obično u dvije dimenzije, ali kod prikaza spektroskopskih rezultata i ostalih kontinuiranih mjerenja se koristi prikaz u jednoj dimenziji. Varijable koje su blizu imaju visoku korelaciju, a one na suprotnim stranama *plota* su negativno korelirane. *Scores* i *loadings plotovi* su međusobno komplementarni i preklopivi (eng. *superimposable*).

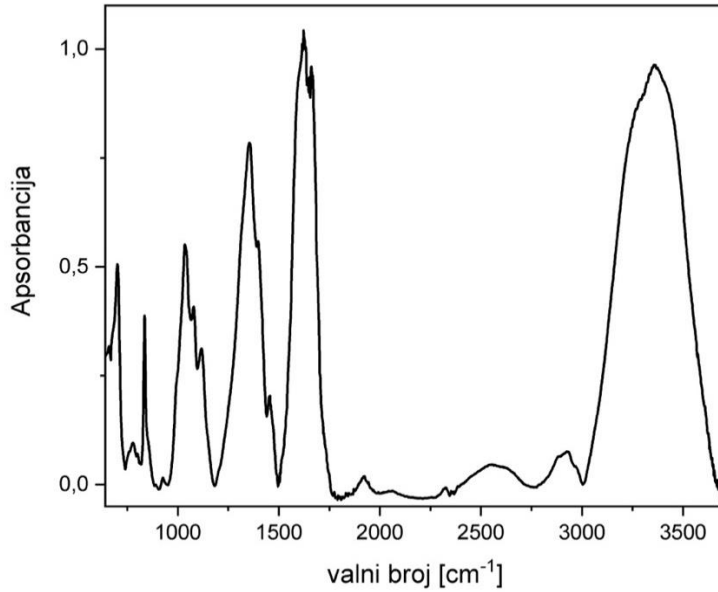
Da bi se izbjegao *overfitting* poželjno je analizu spektroskopskih podataka provesti nekom alternativnom metodom strojnog učenja. Budući da naš klasifikacijski model mora razvrstati podatke u dvije kategorije, idealnom se pokazala metoda SVM (eng. *support vector machine*). SVM je nadgledani algoritam strojnog učenja koji analizira podatke korištene za klasifikaciju i regresijsku analizu. Formalnije, SVM konstruira hiperravninu (ravnina u višedimenzionalnom prostoru) ili skup hiperravnina, koje se mogu koristiti za klasifikaciju ili regresiju odnosno mogu razdvajati dvije skupine podataka. Dobro

razlikovanje dvije skupine podataka postiže se hiperravninom koja ima najveću udaljenost do najbliže točke podatka koji pripada klasama koje želimo razlikovati. Što je ta udaljenost veća (tzv. funkcionalna margina), pogreška klasifikacije SVM modela je manja. Infracrveni spektri sadrže veliku količinu podataka pa je prije primjene nužno reducirati ulazne podatke. U ovom radu to je napravljeno primjenom PCA na FTIR spektrima. Za izgradnju klasifikacijskog modela pomoću SVM zadržano je svega 20 principálnih komponenti koji sadrže preko 95% varijance. Za klasifikaciju pomoću SVM iskorišten je SVMDA (eng. *support vector machine discriminant analysis*) algoritam koji se nalazi u Matlabovom dodatku - *PLS toolboxu*.

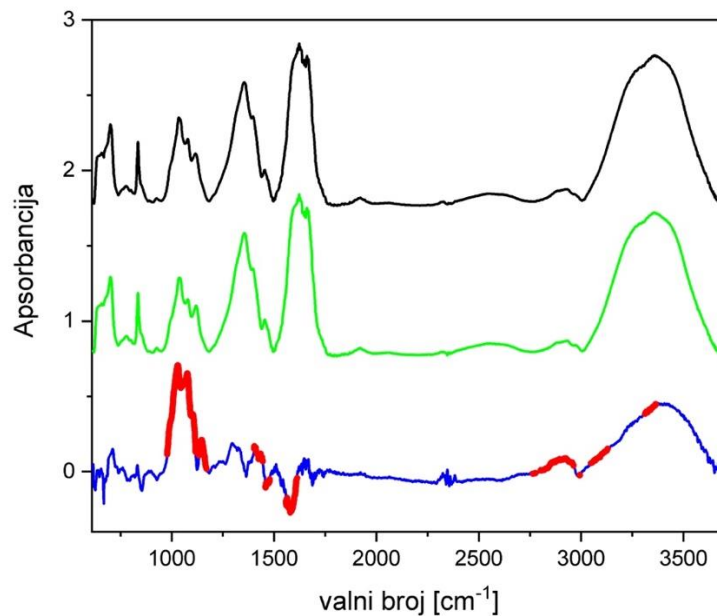
5. REZULTATI

Infracrveni spektar ispitivanih očnih vodica prilično je složen jer se zbog prisutnosti makromolekula (lipidi, proteini, polisaharidi i nukleinske kiseline) sastoji od velikog broja vibracijskih vrpca (Tablica 1.). Približno se može reći da ispitivani uzorci apsorbiraju infracrveno zračenje većinom u dva spektralna područja: od 500 do 1800 cm^{-1} te od 2800 do 3700 cm^{-1} . Kao primjer spomenute složenosti, na Slici 5. prikazan je usrednjeni spektar svih 158 spektara od uzoraka pacijenata s glaukomom.

U statističkoj analizi prvo je napravljen STT na srednjim spektrima očnih vodica pacijenata s kataraktom i glaukomom uz razinu značajnosti $p < 0,05$. STT računa statistički značajnu razliku između intenziteta srednjih spektara naših dvaju tipova uzoraka očnih vodica na svakom valnom broju. Rezultat STT-a prikazan je na Slici 6. gdje crne i zelene linije predstavljaju srednje spektre očnih vodica različitih patologija, dok plavi spektar predstavlja njihovu razliku. Dijelovi diferencijalnog spektra podebljani crvenom bojom predstavljaju valne brojeve sa statistički značajnom razlikom.



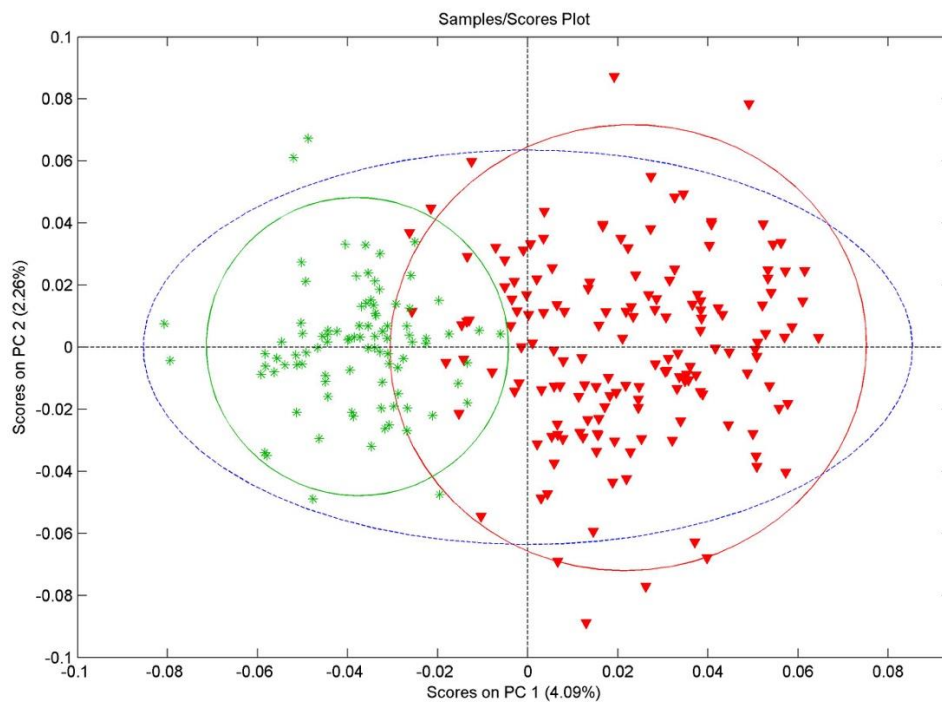
Slika 5. Tipičan izgled apsorpcijskog FTIR spektra očne vodice.



Slika 6. STT na srednjim spektrima svih spektara snimljenih iz uzoraka pacijenata s kataraktom (crna linija) i glaukomom (zelena linija). Plava linija predstavlja njihovu razliku, a statistički relevantni rezultati STT-a označeni su crvenom bojom.

Uočene razlike na Slici 6. ukazivale su na mogućnost izrade PCA modela koji bi mogao razlikovati dvije ispitivane skupine uzoraka očnih vodica i identificirati spektre nepoznatih patologija.

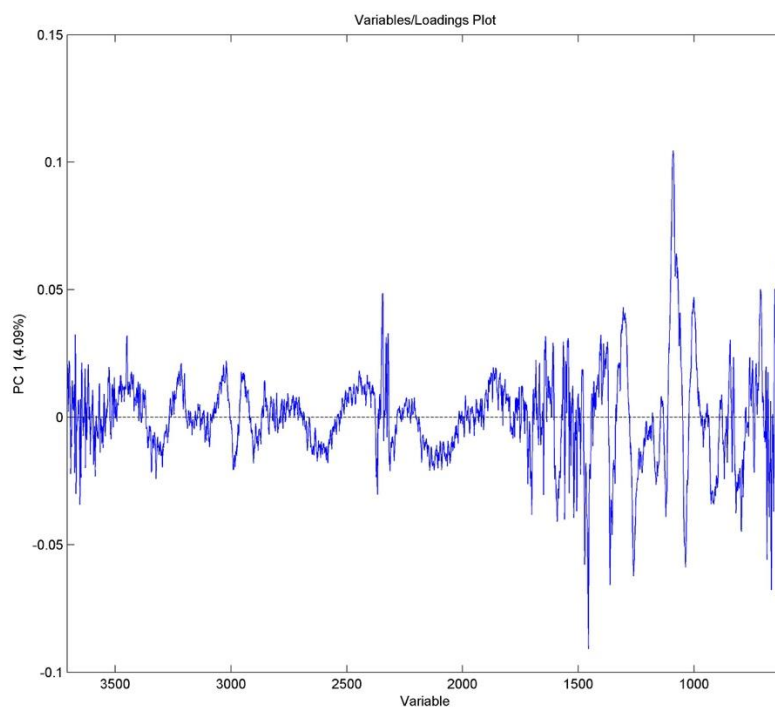
Prema tome, u svrhu identificiranja vrste patologije očnih vodica, pomoću snimljenih spektara kreiran je PCA model. Na Slici 7. prikazana je ovisnost prve dvije glavne komponente svih snimljenih spektara iz dvije skupine uzoraka. Vidljivo je da u PC1-PC2 prostoru postoji razlika između FTIR spektara snimljenih iz uzoraka očnih vodica pacijenata s kataraktom i pacijenata s glaukomom, pa je moguće i razlikovati te dvije patologije. Postoji određeni broj spektara koji se preklapaju ili se nalaze u blizini druge skupine, ali to ne utječe na uspješnost predstavljenog PCA modela.



Slika 7. Scores plot - PC1-PC2 ovisnost. Zeleni simboli označavaju spektre snimljene iz uzoraka pacijenata s kataraktom, a crveni simboli označavaju spektre snimljene iz uzoraka pacijenata s glaukomom.

Na Slici 8. prikazan je *Loadings plot* koji opisuje doprinos svakog valnog broja navedenom grupiranju uzoraka istih patologija, što bi značilo da je moguće otkriti na kojim valnim duljinama postoji najveće razdvajanje prethodno analiziranih uzoraka apsorpcijskih spektara. Prikazani su *loadingsi* samo za prvu glavnu komponentu, s obzirom da je na Slici 7. vidljivo da samo po njoj postoji razdvajanje ispitivanih skupina. Očito je da je *loadings plot* prilično kompliciran jer postoji veliki broj vrhova i u negativnom i u pozitivnom smjeru prve glavne komponente pa su za osnovnu diferencijaciju dvaju promatranih skupina očnih vodica uzeti samo valni brojevi s ekstremnim amplitudama i širinama vrhova. Pokazuje se da za

diferencijaciju najznačajnije vibracijske vrpce u rasponu od 1000 do otprilike 1600 cm^{-1} , uz poseban naglasak na dijelove spektra koji pripadaju amidu II i lipidima.



Slika 8. *Loadings plot* prikaz

U Tablici 2. prikazani su rezultati analize spektara na kojima je prvo proveden PCA, a zatim SVM. U dijelu *Model results* dobiveni su rezultati kada je pomoću SVM izrađivan model, a u dijelu *CV (Cross-Validation) results* je dobiveni model bio podvrgnut dodatnoj *cross-validaciji* kako bi se provjerila točnost modela. Izradom modela (*Model results*) dobiveni su vrlo visoki TP i TN, uz ekvivalentno malene FN i FP, odnosno da model od ukupno 158 uzoraka *Class 1* (glaukom) ispravno prepoznaje njih 150, dok od ukupno 93 uzoraka *Class 2* (katarakta) ispravno prepoznaje njih 92. U *cross-validaciji* izrađenog modela TP za *Class 1* i TN za *Class 2* ostaju vrlo visoki, od ukupno 158 uzoraka pacijenata s glaukomom (*Class 1*) validacijom je detektirano njih 149. No, vidi se smanjenje TN za *Class 1* i TP za *Class 2*. Ovo smanjenje je prikazano i pomoću *Confusion table (CV)* jer je od ukupno 93 uzoraka pacijenata s kataraktom (*Class 2*) validacijom detektirano njih 72.

Tablica 2. SVM/PCA prikaz modela

MODEL RESULTS

Confusion Matrix:

Class:	TP	FP	TN	FN
Class 1	0.94937	0.01075	0.98925	0.05063
Class 2	0.98925	0.05063	0.94937	0.01075

Confusion Table:

	Actual Class	
	Class 1	Class 2
Predicted as Class 1	150	1
Predicted as Class 2	8	92

CV RESULTS

Confusion Matrix (CV):

Class:	TP	FP	TN	FN
Class 1	0.94304	0.22581	0.77419	0.05696
Class 2	0.77419	0.05696	0.94304	0.22581

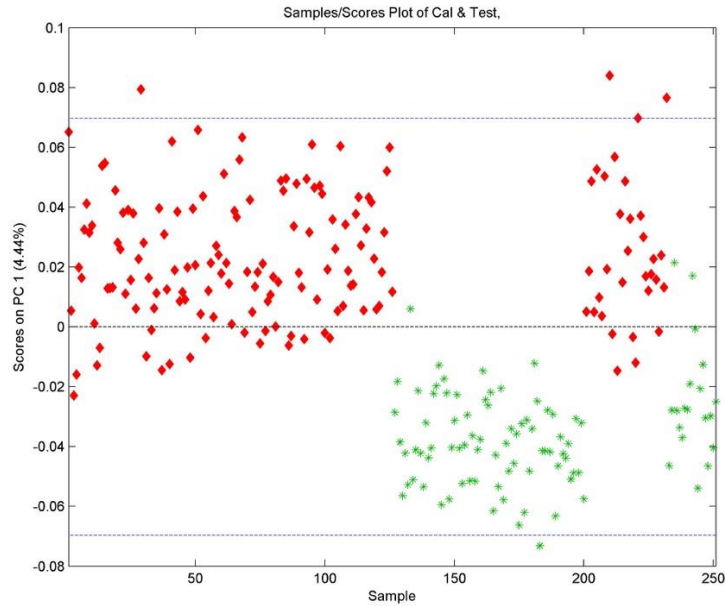
Confusion Table (CV):

	Actual Class	
	Class 1	Class 2
Predicted as Class 1	149	21
Predicted as Class 2	9	72

5.1. VALIDACIJA MODELA PREDIKCIJOM NEPOZNATIH UZORAKA

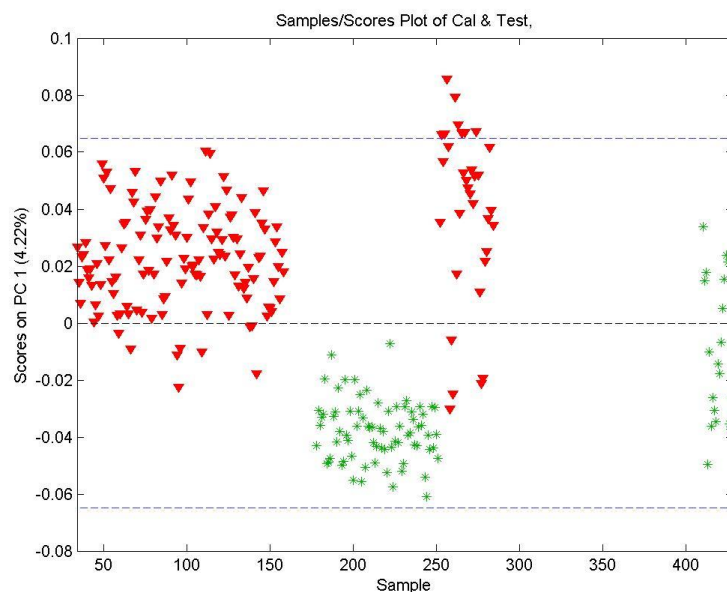
Validacijom modela predikcijom provjerava se može li izgrađeni model ispravno pridružiti nepoznate uzorke odgovarajućim skupinama tj. prepoznati patologiju nepoznatih uzoraka. U tu je svrhu napravljeno nekoliko modela koji su validirani na različite načine (Bro i sur.-2008).

U prvom načinu validacije predikcijom nasumičnim je odabirom izdvojeno oko 20% uzoraka („nepoznati spektri“) od svih snimljenih spektara te je od ostalih oko 80% uzoraka („poznati spektri“) izgrađen model prikazan na Slici 9. Na njoj je vidljivo grupiranje spektara korištenih za izradu PCA modela (do oznake ~200 na x-osi) po PC1 komponenti. Model je testiran pomoću „nepoznatih spektara“ (iza oznake 200 na x-osi) te je vidljivo da su uzorci istih patologija zajedno grupirani. Vidljivo je također malo preklapanje dvaju skupina, ali može se reći da je više od 90% validacijskih spektara pravilno identificirano. Stoga možemo zaključiti da je novi model, izgrađen iz nasumično odabranih spektara, potvrđen s više od 90% sigurnosti.



Slika 9. Validacija unutar PCA modela predikcijom – nasumično odabrani spektri. Zeleni simboli označavaju spektre uzoraka pacijenata s kataraktom, a crveni simboli spektre uzoraka pacijenata s glaukomom. Poznati spektri nalaze se do oznake 200, a spektri korišteni za validaciju nakon oznake 200 na x-osi.

Budući da validacija modela predikcijom s nasumično odabranim spektrima podrazumijeva da se uzorci istih pacijenata koriste i u izradi modela i u njegovoj validaciji, povećava se mogućnost lažnih pozitivnih rezultata. Prema tome, da bismo provjerili naše rezultate, izvršena su i dodatna dva različita postupka. U prvom postupku napravljen je novi set za testiranje, stvoren izdvajanjem svih spektara snimljenih na uzorcima 20% nasumično odabranih pacijenata („nepoznati spektri“), te je ponovljen postupak PCA modeliranja i validacije. Na Slici 10. prikazani su rezultati tako dobivenog modela. Vidljivo je grupiranje „poznatih spektara“ (otprilike do oznake 250 na x-osi) prema PC1 komponenti, validiranih pomoću „nepoznatih spektara“ (iza oznake 250 na x-osi) koji su ispravno grupirani u skupine, čime je ponovno dokazana valjanost našeg PCA modela.



Slika 10. Validacija unutar PCA modela predikcijom– nasumično odabrani pacijenti. Zeleni simboli označavaju spektre uzoraka pacijenata s kataraktom, a crveni simboli spektre uzoraka pacijenata s glaukomom. Poznati spektri nalaze se do oznake 250, a spektri korišteni za validaciju nakon oznake 250 na x-osi.

Drugi način dodatne validacije prethodno izgrađenih modela predikcijom izveden je pomoću SVMDA (eng. *support vector machine discriminant analysis*). U Tablici 3. u dijelu *Model results* prikazani su rezultati izrađenog modela nakon nasumičnog izdvajanja 33 pacijenata s glaukomom i njihovih pripadajućih uzoraka te 19 pacijenata s kataraktom i njihovih pripadajućih uzoraka. Dobiveni su vrlo visoki TP i TN za obje klase, uz ekvivalentno malene FN i FP, odnosno da model od ukupno 125 uzoraka *Class 1* (glaukom) ispravno prepoznaje svih 125, dok od ukupno 74 uzoraka *Class 2* (katarakta) ispravno prepoznaje njih 73. U *cross-validationi* izrađenog modela TP i TN za obje klase ostaju visoki, no nešto manji nego u *Model results*. Od ukupno 125 uzoraka pacijenata s glaukomom (*Class 1*) validacijom je detektirano njih 115, dok od ukupno 74 uzoraka *Class 2* (katarakta) ispravno prepoznaje njih 65. Zatim je provedena predikcija pomoću prethodno izdvojenih uzoraka (*Prediction results*) u kojoj je model ispravno grupirao svih 33 nepoznatih uzoraka pacijenata s glaukomom (*Class 1*) te 11 od 19 nepoznatih uzoraka pacijenata s kataraktom (*Class 2*).

Tablica 3. SVMDA prikaz validacije modela predikcijom. Ovaj testni set izrađen je nasumičnim izdvajanjem 33 pacijenata s glaukomom i njihovih pripadajućih uzoraka te 19 pacijenata s kataraktom i njihovih pripadajućih uzoraka.

```

MODEL RESULTS
Confusion Matrix:
  Class:      TP      FP      TN      FN
  Class 1    1.00000  0.01351  0.98649  0.00000
  Class 2    0.98649  0.00000  1.00000  0.01351

Confusion Table:
                Actual Class
                Class 1 Class 2
Predicted as Class 1  125     1
Predicted as Class 2    0     73

CV RESULTS
Confusion Matrix (CV):
  Class:      TP      FP      TN      FN
  Class 1    0.92000  0.12162  0.87838  0.08000
  Class 2    0.87838  0.08000  0.92000  0.12162

Confusion Table (CV):
                Actual Class
                Class 1 Class 2
Predicted as Class 1  115     9
Predicted as Class 2   10    65

PREDICTION RESULTS
Confusion Matrix:
  Class:      TP      FP      TN      FN
  Class 1    1.00000  0.57895  0.42105  0.00000
  Class 2    0.42105  0.00000  1.00000  0.57895

Confusion Table:
                Actual Class
                Class 1 Class 2
Predicted as Class 1   33    11
Predicted as Class 2    0     8

```

U Tablici 4. u dijelu *Model results* prikazani su rezultati izrađenog modela nakon nasumičnog izdvajanja 15% svih izmjerenih spektara prije modeliranja (24 spektra uzoraka glaukoma i 15 spektara uzoraka s kataraktom). Dobiveni su vrlo visoki TP i TN za obje klase, uz ekvivalentno malene FN i FP, odnosno da model od ukupno 134 uzoraka *Class 1* (glaukom) ispravno prepoznaje njih 133, dok od ukupno 79 uzoraka *Class 2* (katarakta) ispravno prepoznaje svih 79. U *cross-validaciji* izrađenog modela TP i TN za obje klase ostaju visoki, no nešto manji nego u *Model results*. Od ukupno 134 uzoraka pacijenata s glaukomom (*Class 1*) validacijom je detektirano njih 128, dok od ukupno 79 uzoraka *Class 2* (katarakta) ispravno prepoznaje njih 65. Zatim je provedena predikcija pomoću prethodno izdvojenih uzoraka (*Prediction results*) u

kojoj je model ispravno grupirao svih 24 nepoznatih uzoraka pacijenata s glaukomom (*Class 1*) te 12 od 14 nepoznatih uzoraka pacijenata s kataraktom (*Class 2*).

Tablica 4. SVMDA prikaz validacije modela predikcijom. Ovaj nezavisni testni set izrađen je nasumičnim izdvajanjem 15% svih izmjerenih spektara prije modeliranja (24 spektra uzoraka glaukoma i 15 spektara uzoraka s kataraktom).

MODEL RESULTS

Confusion Matrix:

Class:	TP	FP	TN	FN
Class 1	0.99254	0.00000	1.00000	0.00746
Class 2	1.00000	0.00746	0.99254	0.00000

Confusion Table:

	Actual Class	
	Class 1	Class 2
Predicted as Class 1	133	0
Predicted as Class 2	1	79

CV RESULTS

Confusion Matrix (CV):

Class:	TP	FP	TN	FN
Class 1	0.95522	0.17722	0.82278	0.04478
Class 2	0.82278	0.04478	0.95522	0.17722

Confusion Table (CV):

	Actual Class	
	Class 1	Class 2
Predicted as Class 1	128	14
Predicted as Class 2	6	65

PREDICTION RESULTS

Confusion Matrix:

Class:	TP	FP	TN	FN
Class 1	1.00000	0.14286	0.85714	0.00000
Class 2	0.85714	0.00000	1.00000	0.14286

Confusion Table:

	Actual Class	
	Class 1	Class 2
Predicted as Class 1	24	2
Predicted as Class 2	0	12

U Tablici 5. u dijelu *Model results* prikazani su rezultati izrađenog modela nakon nasumičnog izdvajanja 20% svih izmjerenih spektara prije modeliranja (32 spektra uzoraka glaukoma i 19 spektara uzoraka s kataraktom). Dobiveni su stopostotni TP i TN za obje klase, uz nepostojeće FN i FP, odnosno da model od ukupno 126 uzoraka *Class 1* (glaukom) ispravno prepoznaje svih 126, dok od ukupno 74 uzoraka *Class 2* (katarakta) ispravno prepoznaje svih 74. U *cross-validaciji* izrađenog modela TP i TN za *Class 1* (glaukom) ostaju visoki, no nešto manji nego

u *Model results*, dok su za *Class 2* (katarakta) izrazito smanjeni. Od ukupno 126 uzoraka pacijenata s glaukomom (*Class 1*) validacijom je detektirano njih 118, dok od ukupno 74 uzoraka *Class 2* (katarakta) ispravno prepoznaje njih 41. Zatim je provedena predikcija pomoću prethodno izdvojenih uzoraka (*Prediction results*) u kojoj je model ispravno grupirao 31 od ukupno 32 nepoznata uzorka pacijenata s glaukomom (*Class 1*) te 18 od 19 nepoznatih uzoraka pacijenata s kataraktom (*Class 2*).

Tablica 5. SVMDA prikaz validacije modela predikcijom. Ovaj nezavisni testni set izrađen je nasumičnim izdvajanjem 20% svih izmjerenih spektara prije modeliranja (32 spektra uzoraka glaukoma i 19 spektara uzoraka s kataraktom).

MODEL RESULTS

Confusion Matrix:

Class:	TP	FP	TN	FN
Class 1	1.00000	0.00000	1.00000	0.00000
Class 2	1.00000	0.00000	1.00000	0.00000

Confusion Table:

	Actual Class	
	Class 1	Class 2
Predicted as Class 1	126	0
Predicted as Class 2	0	74

CV RESULTS

Confusion Matrix (CV):

Class:	TP	FP	TN	FN
Class 1	0.93651	0.44595	0.55405	0.06349
Class 2	0.55405	0.06349	0.93651	0.44595

Confusion Table (CV):

	Actual Class	
	Class 1	Class 2
Predicted as Class 1	118	33
Predicted as Class 2	8	41

PREDICTION RESULTS

Confusion Matrix:

Class:	TP	FP	TN	FN
Class 1	0.96875	0.05263	0.94737	0.03125
Class 2	0.94737	0.03125	0.96875	0.05263

Confusion Table:

	Actual Class	
	Class 1	Class 2
Predicted as Class 1	31	1
Predicted as Class 2	1	18

6. RASPRAVA

Glaukom je bolest koja zahtjeva ranu dijagnostiku da bi bila uspješno liječena te kako bi se prevenirao trajni gubitak vida (Weinreb i sur.-2004), za koju trenutno ne postoji jednostavna i precizna metoda pravovremene dijagnostike.

Posebnost ovog rada je u korištenju FTIR spektroskopije u analizi molekularnog sastava očne vodice pacijenata s glaukomom što, po našem saznanju, dosad nije korišteno u tu svrhu. FTIR spektroskopija pokazala se kao dovoljno osjetljiva metoda koja omogućuje izgradnju multivarijabilnih modela za razlikovanje sastava očne vodice pacijenata oboljenih od glaukoma i pacijenata kontrolne skupine. Spektri analizirani metodom PC analize pokazuju jasno grupiranje na *Scores* plotu, kao i u validaciji istih, upućujući na razliku između naših dviju skupina uzoraka.

Općenito, FTIR spektri gotovo svih bioloških tkiva su slični, te su bitne razlike često prekrivene šumom i spektralnim promjenama uzrokovanim malim, ali neizostavnim varijacijama pripreme uzoraka, što je istinito i u našem slučaju očnih vodica. Stoga, kako bi se prepoznale spektralne promjene nastale uslijed određenih patologija, koje su u ovom ispitivanju katarakta i glaukom, i uzorci razdvojili u diskretne skupine, potrebne su snažnije statističke analize od standardnih spektroskopskih vizualnih usporedbi.

Iz rezultata STT-a prikazanih na Slici 6. i *loadings* *plota* prikazanom na Slici 8. te na temelju Tablice 1. može se procijeniti da su spektralna područja koja pripadaju vibracijskim vrpčama lipida i amida ona koja najviše doprinose razlikama u spektrima između ispitivanih očnih vodica, iako postoje određene statistički značajne razlike i u još nekim dijelovima spektra. Prema tome, Student T-test ukazao je na postojanje određene statistički značajne razlike između srednjih spektra promatranih patologija, što je otvorilo mogućnost upotrebe multivarijabilnih metoda za diferencijaciju uzoraka. U ovom radu korištena je PCA te je iz izgrađenog modela prikazanog na Slici 7. očito da dobiveni podaci, koji uključuju razlike u intenzitetu te širini i položaju vibracijskih vrpci između snimljenih spektara, mogu stvoriti model koji klasificira nepoznate uzorke očnih vodica u kategorije različitih patologija, no vidljiv je i određen broj spektara koji se preklapaju. Moguće objašnjenje preklapanja spektara između promatranih uzoraka različitih patologija vjerojatno leži u malim razlikama u uvjetima snimanja ili postupku uzorkovanja. Ipak, broj preklapajućih spektara nije toliko velik, stoga bi se ti spektri mogli isključiti iz modela bez daljnjih posljedica na njegovu preciznost. Također, pretpostavljamo da bi se njihov broj mogao i smanjiti preciznijim definiranjem postupka pripreme uzorka i postupka snimanja spektra.

Rezultati SVMMDA potvrđuju zaključke dobivene PC analizom. Algoritam prepoznaje razlike u spektrima između skupine s glaukomom i skupine s kataraktom. *Confussion matrix* dobiven iz modela kod svih promatranih kombinacija spektara pokazuje vrlo visok postotak točnog prepoznavanja promatranih klasa. Slične rezultate imamo i kod *cross-validacije*. *Confussion matrix* CV-a pokazuje da je uspješnost točnog prepoznavanja klasa u većini kombinacija veća od 80 %. Vjerojatnost prepoznavanja manja je kod modela kod kojeg je 20 % spektara izdvojeno za predikciju u usporedbi s modelom kod kojeg je 15 % spektara izdvojeno za predikciju. Lošije rezultate CV-a možemo pripisati činjenici da je za izgradnju modela upotrijebljen manji broj spektara. Ukupan broj spektara je konačan i relativno mali pa izdvajanje većeg broja spektara za predikciju smanjuje broj spektara za izgradnju modela što mu smanjuje točnost. Predikcijski skup podataka sastavljen je na dva načina. Jedan skup je napravljen izdvajanjem infracrvenih spektara određenih pacijenata, a drugi nasumičnim odabirom infracrvenih spektara iz skupa svih snimljenih spektara. Točnost predikcije kod skupa nastalog izdvajanjem pacijenata nešto je manja od predikcije nasumičnim skupom. To je očekivani rezultat jer svaki pacijent ima svoje specifičnosti koje se odražavaju u spektru. Ako ni jedan spektar jednog pacijenta nije u skupu za modeliranje onda možemo očekivati da će te specifičnosti stvarati dodatan šum u modelu koji će smanjivati njegovu točnost. Taj problem može se riješiti povećanjem broja pacijenata odnosno infracrvenih spektara s kojima gradimo model. Veći broj različitih pacijenata uključenih u model obuhvatit će i veći broj razlika između pacijenta koje utječu na spektre te će ih model lakše prepoznavati. Unatoč razlikama u točnosti za dva različita pristupa generiranju predikcijskih skupova oba skupa daju zadovoljavajuću točnost.

7. ZAKLJUČCI

Snimljeni spektri uzoraka očne vodice pacijenata s glaukomom i pacijenata s kataraktom analizirani su statističkim metodama STT, PCA i SVM, a rezultati su dodatno validirani predikcijama unutar PCA modela i pomoću SVMMDA.

Pokazano je da se metodom FTIR spektroskopije uz korištenje naprednih matematičko-statističkih algoritama mogu razlikovati uzorci očnih vodica pacijenata s glaukomom i pacijenata s kataraktom. STT je pokazao koji dijelovi spektara statistički značajno utječu na razlikovanje uzoraka očnih vodica različitih patologija te je ukazao na mogućnost korištenja PCA modela. Izradom PCA modela i njegovom validacijom predikcijom

pokazalo se kako se u vrlo visokom postotku mogu identificirati uzorci različitih patologija. SMVDA validacijom modela predikcijom također je pokazano vrlo uspješno preklapanje nepoznatih spektara s patologijom kojoj pripadaju.

Može se zaključiti da bi prikazana metoda FTIR spektroskopije zajedno s odgovarajućim statističkim metodama analize, mogla biti temelj za stvaranje nove metode ranog probira pacijenata s glaukomom zbog svoje inherentne brzine snimanja spektara i pokazane visoke učinkovitosti u predikciji nepoznatih uzoraka.

8. ZAHVALE

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za fiziku i biofiziku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr.sc. Marka Škrabića.

Prvenstveno zahvaljujemo našem mentoru, dr.sc. Marku Škrabiću, koji nam je s mnogo strpljenja, razumijevanja i podrške pomogao u provođenju istraživanja i u pisanju ovog rada.

Predstojniku Zavodu za fiziku i biofiziku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, izv.prof.dr.sc. Ozrenu Gamulinu, ujedno i voditelju predloženog projekta IP-2020-02-4554 „Identifikacija biomarkera vibracijskom spektroskopijom u bolesnika s glaukomom“, u sklopu kojeg je ovaj rad i izrađen, zahvaljujemo na velikoj pomoći prilikom statističke obrade dobivenih podataka i njihove interpretacije.

Teni Križ, dr.med., voditeljici istraživanja „Povezanost moždanog neurotrofnog čimbenika s oštećenjima vidnog živca u bolesnika s glaukomom i očnom hipertenzijom“, dio kojega je i ovaj rad, i prof. dr.sc. Zoranu Vataavuku, voditelju Klinike za Očne bolesti KBC Sestre Milosrdnice, zahvaljujemo što su nam osigurali uzorke očnih vodica te na pomoći u oftalmološkom dijelu našeg rada.

Predstojnici Zavoda za kemiju i biokemiju prof.dr.sc. Jasni Lovrić te osoblju Zavoda za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu zahvaljujemo što su nam osigurali adekvatno skladištenje uzoraka te pomogli u dopremi uzoraka.

9. POPIS LITERATURE

1. Boulter T, Bernhisel A, Mamalis C, Zaugg B, Barlow WR, Olson RJ, et al. Phacoemulsification in review: Optimization of cataract removal in an in vitro setting. *Survey of Ophthalmology*. 2019 Nov 1;64(6):868–75.
2. Bro R, Kjeldahl K, Smilde AK, Kiers H a. L. Cross-validation of component models: a critical look at current methods. *Anal Bioanal Chem*. 2008 Mar;390(5):1241–51.]
3. Cerovski B, Jukić T, Juratovac Z, Juri Mandić J, Kalauz M, Katušić D, Kordić R, Kuzman T, Masnec S, Perić S, Petriček I, Popović-Suić S, Škegro I, Vidović T, Vukojević N. *Oftalmologija i optometrija, sveučilišni udžbenik*. Zagreb: Manualia universitas studiorum Zagrabiensis; 2015. Str. 139-152
4. Crawley L, Zamir SM, Cordeiro MF, Guo L. Clinical Options for the Reduction of Elevated Intraocular Pressure. *Ophthalmology and Eye Diseases*. 2012 Jan;4:OED.S4909.
5. Diem M. *Modern Vibrational Spectroscopy and Micro-Spectroscopy: Theory, Instrumentation and Biomedical Applications*. Wiley; 2015.
6. Dritsa V. *FT-IR Spectroscopy in Medicine*. U: Theophanides T. ur. *Infrared Spectroscopy - Life and Biomedical Sciences*. InTech; 2012
7. European glaucoma society terminology and guidelines for glaucoma, 4th edition - Chapter 2: Classification and terminology Supported by the EGS Foundation: Part 1: Foreword; Introduction; Glossary; Chapter 2 classification and terminology. *British Journal of Ophthalmology*. 2017 May 1;101(5):73–127.
8. Goel M, Picciani RG, Lee RK, Bhattacharya SK. Aqueous Humor Dynamics: A Review. *The Open Ophthalmology Journal*. 2010 Sep 22;4(1):52–9.
9. Goyal A, Srivastava A, Sihota R, Kaur J. Evaluation of oxidative stress markers in aqueous humor of primary open angle glaucoma and primary angle closure glaucoma patients. *Current Eye Research*. 2014;39(8):823–9.
10. Green J, Siddall H, Murdoch I. Learning to live with glaucoma: A qualitative study of diagnosis and the impact of sight loss. *Social Science and Medicine*. 2002;55(2):257–67.
11. Griffiths, PR, De Haseth JA. *Fourier transform infrared spectrometry*. Vol. 171. John Wiley & Sons, 2007.
12. Günzler H, Gremlich HU, *Uvod u infracrvenu spektroskopiju (preveli prof. dr. sc. Z. Meić i dr. sc. G. Baranović)*, Školska knjiga, Zagreb, 2006.

13. Lacombe C, Untereiner V, Gobinet C, Zater M, Sockalingum GD, Garnotel R. Rapid screening of classic galactosemia patients: a proof-of-concept study using high-throughput FTIR analysis of plasma. *Analyst*. 2015;140(7):2280–2286.
14. Mitchell AL, Gajjar KB, Theophilou G, Martin FL, Martin-Hirsch PL. Vibrational spectroscopy of biofluids for disease screening or diagnosis: translation from the laboratory to a clinical setting. *J Biophotonics*. 2014 Apr;7(3–4):153–65.
15. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman DI ur. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl Spectrosc Rev*. 2008 Feb 1;43(2):134–79
16. Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. *British Journal of Ophthalmology*. 2012 May;96(5):614–8.
17. Sheng D, Xu F, Yu Q, Fang T, Xia J, Li S, Wang X. A study of structural differences between liver cancer cells and normal liver cells using FTIR spectroscopy. *J mol str*. 2015;1099:18-23
18. Stuart, B. Infrared spectroscopy. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*; 2000.
19. Tham YC, Cheng CY. Associations between chronic systemic diseases and primary open angle glaucoma: an epidemiological perspective. Vol. 45, *Clinical and Experimental Ophthalmology*. Blackwell Publishing; 2017. p. 24–32.
20. Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: A systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* [Internet]. 2014 Nov 1 121(11):2081–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24974815>
21. Theophanides, T. "Infrared and Raman Spectra of Biological Molecules. NATO Advanced Study Institute, D." (1978).
22. Tsai T, Reinehr S, Maliha AM, Joachim SC. Immune Mediated Degeneration and Possible Protection in Glaucoma. Vol. 13, *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2019.
23. Weinreb RN. Uveoscleral outflow: the other outflow pathway. 2000; Available from: https://journals.lww.com/glaucomajournal/Citation/2000/10000/Uveoscleral_Outflow_The_Other_Outflow_Pathway.1.aspx
24. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The pathophysiology and treatment of glaucoma: A review. Vol. 311, *JAMA - Journal of the American Medical Association*. American Medical Association; 2014. p. 1901–11.

25. Weinreb RN, Tee Khaw P. Primary open-angle glaucoma. In: *Lancet*. Lancet; 2004. p. 1711–20.
26. Yu, Huanan, et al. "Impact of ultraviolet radiation on the aging properties of SBS-modified asphalt binders." *Polymers* 11.7 (2019): 1111.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu 4. lipnja 1997. Pohađala sam V. gimnaziju u Zagrebu koju sam završila 2015. godine, kada sam i upisala Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. U dva mandata bila sam član Studentskog zbora Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U tijeku studija bila sam demonstrator na Zavodu za fiziku i biofiziku, sudjelovala sam na brojnim znanstvenim skupovima i kongresima te sam sudjelovala u organizaciji nekoliko studentskih kongresa. Nagrađena sam Dekanovom nagradom za najuspješnijeg studenta prve godine (ak. god. 2015./2016.), Rektorovom nagradom za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici (ak. god. 2018./2019.) te Dekanovom nagradom za najbolji znanstveni rad (ak. god. 2019./2020.).