

# Alternativne analitičke metode u patologiji

---

Anzić, Lukrecija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:105:178700>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-14**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Lukrecija Anzić**

# **Alternativne analitičke metode u patologiji**

**DIPLOMSKI RAD**



**ZAGREB, 2024.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc.dr.sc. Ane Šepac i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2023./2024.

## Popis kratica

HE,H&E-hematoksin-eozin

PAS-kombinacija perjodne kiseline i Schiffova reagensa (engl. *periodic acid Schiff*)

MGG-May-Gruenwald-Giemsma bojenje

PCR- lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PCR ili RT-PCR-lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real time polymerase chain reaction*)

DNA-deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

RNA-ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

FISH-fluorescentna in situ hibridizacija (engl. *fluorescence in situ hybridization*)

CISH-kromogenska in situ hibridizacija (engl. *chromogenic in situ hybridization*)

m/z-masa/naboj

ESI-elektrosprej ionizacije (engl. *electrospray ionization*)

APCI-kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure chemical ionization*)

LC-MS/MS-tekućinska kromatografija i tandem masena spektrometrija (engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*)

MALDI- matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (engl. *matrix assisted laser desorption/ionization*)

ToF-vrijeme leta (engl. *Time of Flight*)

ToF-MS- *Time of Flight* masena spektrometrija

MS/MS-tandemska masena spektrometrija

SIMS-ToF- Masena spektrometrija sekundarnih iona s vremenskim letom (engl. *Secondary Ion Mass Spectrometry-Time of Flight*)

LMD-MS-laserska mikrodisekcija i masena spektrometrija (engl. *Laser Microdissection and Mass Spectrometry*)

HER2-receptor humanog faktora rasta (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*)

EGF-epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor*)

AFM-mikroskopija atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*)

SFM-mikroskopija skenirajućih sila (engl. *scanning force microscopy*)

TME-tumorski mikrookoliš (engl. *tumor microenvironment*)

HS-AFM-mikroskopija atomskih sila velike brzine (engl. *high speed atomic force microscopy*)

RS-Ramanova spektroskopija (engl. *Raman spectroscopy*)

SERS-površinski pojačana Ramanova spektroskopija (engl. *surface enhanced Raman spectroscopy*)

CRP-C-reaktivni protein

pH-snaga vodika, mjera kiselosti vodenih otopina (lat. *potentia hydrogenii*)

CARS-Koherentna anti-Stokesova Ramanova spektroskopija (engl. *coherent anti-Stokes Raman spectroscopy*)

LIBS-laserska spektroskopija (engl. *laser induced breakdown spectroscopy*)

FFPE-fiksiran formalinom i ugrađen u parafin (engl. *formalin-fixed paraffin-embedded*)

ICPES-plazma emisijska spektroskopija (engl. *inductively coupled plasma emission spectroscopy*)

PCA-analiza principalnih komponenti (engl. *principal component analysis*)

FTIR-infracrvena spektroskopija (engl. *Fourier-transformed infrared spectroscopy*)

ATR-FTIR-infracrvena spektroskopija uz prigušenu totalnu refleksiju (engl. *attenuated total reflection Fourier-transformed infrared spectroscopy*)

WSI-sveobuhvatna slika preparata (engl. *whole slide imaging*)

CNN-konvolucijska neuronska mreža (engl. *convolutional neural network*)

LAG-gen za aktivaciju limfocita (engl. *lymphocyte activating gene*)

MHC-II-receptor glavnog histokompatibilnog kompleksa II (engl. *major histocompatibility complex*)

## SADRŽAJ

<b>Sažetak.....</b>	<b>1</b>
<b>Summary.....</b>	<b>2</b>
<b>1. Uvod.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Masena spektrometrija.....</b>	<b>5</b>
2.1. Princip.....	5
2.2. Načini rada.....	5
2.3. Primjena.....	6
2.3.1. Proteini.....	6
2.3.2. Lipidi.....	7
2.3.3. Amiloidoza.....	7
2.3.4. Karcinom dojke.....	8
2.4. Prednosti i nedostaci.....	9
<b>3. Mikroskopija atomskih sila.....</b>	<b>10</b>
3.1. Princip.....	10
3.2. Načini rada.....	10
3.3. Primjena.....	11
3.3.1. HIV.....	11
3.3.2. Tumori.....	12
3.4. Prednosti i nedostaci.....	12
<b>4. Ramanova spektroskopija.....</b>	<b>13</b>
4.1. Princip.....	13
4.2. Načini rada.....	13
4.3. Primjena.....	14
4.3.1. Ateroskleroza.....	15
4.3.2. Tumori.....	16
4.4. Prednosti i nedostaci.....	16
<b>5. Laserska spektroskopija.....</b>	<b>17</b>
5.1. Princip.....	17
5.2. Načini rada.....	17
5.3. Primjena.....	17
5.3.1. Hepatocelularni karcinom.....	18
5.3.2. Zloćudni tumori kostiju.....	19
5.4. Prednosti i nedostaci.....	19

<b>6. Infracrvena spektroskopija.....</b>	<b>20</b>
6.1. Princip.....	20
6.2. Načini rada.....	20
6.3. Primjena.....	21
6.3.1. Kolorektalni karcinom.....	21
6.3.2. Karcinom pluća.....	21
6.4. Prednosti i nedostaci.....	22
<b>7. Digitalna patologija.....</b>	<b>23</b>
7.1. Princip.....	23
7.2. Načini rada.....	23
7.3. Primjena.....	24
7.3.1. Tumorski mikrookoliš.....	24
7.3.2. Genomske značajke.....	25
7.4. Prednosti i nedostaci.....	25
<b>8. Zaključci.....</b>	<b>26</b>
<b>9. Zahvale.....</b>	<b>27</b>
<b>10. Popis literature.....</b>	<b>28</b>
<b>11. Životopis.....</b>	<b>33</b>



## Sažetak

### Alternativne analitičke metode u patologiji

Autor: Lukrecija Anzić

Patologija je morfološka znanost koja proučava bolesti. Usmjerena je na utvrđivanje uzroka i patofiziološkog mehanizma bolesti radi boljeg razumijevanja kliničke slike i pravovremene primjene najbolje terapije. U dijagnostičkoj patologiji glavnu ulogu imaju laboratorijske metode. Uvriježena patohistološka analiza preparata pod svjetlosnim mikroskopom najčešće se primjenjuje, no kao i sve ostale metode nosi svoje prednosti i mane. Napretkom tehnologije nastale su brojne alternativne metode za tkivnu analizu koje bi mogle postati nadopuna onim uvriježenim. Veliki potencijal pokazuje masena spektrometrija koja prepoznaje molekule na temelju omjera njihovih svojstava; mase i naboja ( $m/z$ ) u složenoj kemijskoj reakciji. Pogodna je za identificiranje lipida i proteina u bolestima, a jedna od prednosti je što je za analizu dostatan jedan tkivni rez. Mikroskopija atomskih sila je visokorezolucijska metoda koja na principu privlačnih ili odbojnih sila između vrha sonde i površine preparata daje informacije o ranim promjenama u elastičnosti tkiva, staničnoj adheziji i topografskom izgledu preparata. Može se koristiti za ispitivanje tumorskog mikrookoliša. Ramanova spektroskopija je prva od tri obrađene spektroskopije koja podatke o molekulama dobiva na temelju neelastičnog raspršenja fotona. Pogodna je za razlikovanje apoptoze i nekroze te utvrđivanje hipoksije. Laserska spektroskopija dobiva informacije o koncentraciji kemijskih spojeva i molekula čak i u debljim tkivima jer se temelji na principu mjerenja razlike između tkiva u pobuđenom stanju odnosno plazme i tkiva u mirovanju. Infracrvena spektroskopija mjeri propuštene spektralne linije kroz tkivo i dobiva precizne informacije o morfološkoj strukturi tkiva. Konačno, princip digitalne patologije zasniva se na skeniranju stakala s uzorcima i njihovom dugotrajnom virtualnom pohranjivanju, višestrukum i kompleksnom analiziranju što otvara nove dijagnostičke mogućnosti te višestrukum dijeljenju što predstavlja veliku novost u edukacijskim mogućnostima i telemedicinskoj suradnji.

**Ključne riječi:** patologija, alternativne metode, analiza, spektrometrija, spektroskopija, mikroskopija, digitalna patologija

## Summary

### Alternative Analytical Methods in Pathology

Author: Lukrecija Anzić

Pathology is a morphological science that studies diseases. It focuses on determining the cause and pathophysiological mechanisms of diseases to better understand the clinical picture and timely prepare the best therapy. In diagnostic pathology, laboratory methods play a crucial role. The conventional pathohistological analysis of specimens under a light microscope is most used, and like all methods, it has its advantages and disadvantages. With the advancement of technology, numerous alternative methods for tissue analysis have emerged that could complement the conventional ones. Mass spectrometry, which identifies molecules based on the ratio of their properties; mass and charge ( $m/z$ ) in a complex chemical reaction, shows great potential. It is suitable for identifying lipids and proteins in diseases, and one of its advantages is that a single tissue section is sufficient for analysis. Atomic force microscopy is a high-resolution method that provides information about early changes in tissue elasticity, cellular adhesion, and the topographic appearance of specimens based on the attractive or repulsive forces between the probe tip and the specimen surface. It can be used to examine the tumor microenvironment. Raman spectroscopy is the first of the three spectroscopies discussed, which obtains data about molecules based on inelastic scattering of photons. It is suitable for distinguishing apoptosis from necrosis and determining hypoxia. Laser spectroscopy obtains information about the concentration of chemical compounds and molecules even in thicker tissues because it is based on measuring the difference between tissue in an excited state (plasma) and tissue at rest. Infrared spectroscopy measures the transmitted spectral lines through tissue and provides precise information about the morphological structure of the tissue. Finally, the principle of digital pathology is based on scanning sample slides and their long-term virtual storage, multiple and complex analyses which open new diagnostic possibilities, and multiple sharing options which represent a significant innovation in educational opportunities and telemedicine collaboration

**Keywords:** pathology, alternative methods, analysis, spectrometry, spectroscopy, microscopy, digital pathology

# 1.Uvod

Patologija je znanost o bolestima. Ona prati tijek i posljedice neke bolesti, dok pokušava odrediti njezin uzrok i patofiziološki mehanizam.(1) U srži je morfološka grana koja na temelju procjene stanica i tkiva određuje dijagnozu.(2) Smatra se povezujućom medicinskom granom jer povezuje temeljne i kliničke medicinske znanosti.(1) Laboratorij je okosnica patologije. On je temelj kako dijagnostičke patologije, tako i patologije kao znanstvene discipline. Otkrivanje novih tehnologija u sklopu tehnološkog napretka od iznimne je važnosti za uspješno djelovanje svakog patologa. U ovom radu nastojat ćemo navesti i opisati alternativne odnosno moderne analitičke metode u laboratorijskoj praksi koje bi se u skorijoj budućnosti mogle više i češće koristiti u patologiji, kako dijagnostičkoj tako i eksperimentalnoj.

Kako bismo uspješno razlikovali nove i one već uvriježene analitičke metode, trebali bismo prvo naglasiti da rutinski dijagnostički rad patologa uključuje suradnju histološkog, imunohistokemijskog, citološkog, elektron-mikroskopskog te laboratorija za molekularnu patologiju. U histološkom se laboratoriju radi priprema tkiva za promatranje svjetlosnim mikroskopom. Najčešće bojenje u patologiji je HE (hematoksilin-eozin) koje služi za prikazivanje unutarstaničnih struktura poput jezgre i citopazme te intercelularne tvari.(2) Ova je metoda od početka primjene u patologiji ostala nepromijenjena te se zbog toga smatra nezaobilaznom u svakidašnjoj praksi.(3) Osim HE, postoje mnogobrojne tehnike bojenja. Neke od najpoznatijih su trikromno bojenje po Malloryu za kolagen, epitel, potporna tkiva i eritrocite, po Gomoryu za prikaz retikulina, po Giemsi za prikaz jezgara u hematopatologiji, PAS odnosno kombinacija perjodne kiseline i Schiffova reagensa koja ističe mukopolisaharide i glikogen te Berlinsko modriilo kao boja za hemoglobinski pigment.

Citološki laboratorij predviđen je za analize eksfolijativnih uzoraka koji su dobiveni obriskom ili ispirkom kože ili sluznice, punkcijskih uzoraka ili otiskom onih odstranjenih kirurški. Standardna bojenja za pregled pod svjetlosnim mikroskopom su bojenje po Papanicolau, primjerice za otkrivanje promjena na vratu maternice ili bojenje May-Gruenwald-Giemsma (MGG), na primjer za promatranje hematoloških uzoraka. U ovom se laboratoriju ponekad primjenjuje i protočna citometrija.(2) Protočna citometrija složena je laboratorijska metoda iz područja biofizike koja se zasniva na promjenjivom lomu zraka laserskog snopa dok prolazi kroz fluidni sustav čestica. Ovaj princip indirektno ukazuje na veličinu, oblik i strukturu ispitivanih čestica. (3) Moguća je analiza velikog broja stanica u kratkom vremenu. Protočna se citometrija koristi i za kvantifikaciju postotka stanica s određenim biljegom ili stanica obilježenih protutijelima.(2)

Imunohistokemijski laboratorij služi kao nadopuna histološkom laboratoriju. Informacije koje se dobiju o tkivu kombinacijom imunohistokemijske analize i promatranja tkiva nakon primjene HE obojenja, ne

mogu se u ovom trenutku zamijeniti ni s jednom drugom dijagnostičkom metodom u patologiji. Praksa ovog laboratorija usmjerena je na princip vezanja antitijela za specifični antigen.(3) Ovom metodom mogu se prepoznati antigeni na citološkim ili histološkim tkivnim preparatima. Protutijela mogu biti monoklonalna ili poliklonalna.(2) Interakcija antigen-antitijelo je visoko specifična. Reakcija je jasno vidljiva pod svjetlosnim mikroskopom zbog obojenog taloga koji je nastao cijepanjem supstrata s kromogenom koji se nalazi u primarnom antitijelu odnosno onom vezanom za antigen. Sekundarno antitijelo sadrži enzim koji katalizira reakciju cijepanja. Navedena metoda ima široku primjenu u tumorskoj patologiji, autoimunim bolestima, vezikulobuloznim bolestima kože, glomerulopatijama te u reakciji odbacivanja transplantata.(3) Važan faktor koji utječe na uspješnost imunohistokemije u postavljanju dijagnoze je kvaliteta fiksacije uzorka.(2)

Elektron-mikroskopija koristi se u anatomske patologiji od 50-ih godina prošlog stoljeća.(3) Danas služi prvenstveno u dijagnostici glomerularnih i neuromuskularnih bolesti te nekih slabo diferenciranih ili rijetkih neoplazmi. Za razliku od svjetlosnog mikroskopa, za rad elektronskog mikroskopa ključan je snop elektrona koji preko sustava elektroničkih leća prolazi kroz tkivo i pada na zaslon na kojem se može promatrati ili fotografirati. Uzorci za ovu vrstu mikroskopije manji su od onih za svjetlosnu i način njihove pripreme je drukčiji.(2)

Postignut je značajan napredak u razvoju molekularne biologije u zadnjih 30 godina te se znanstvena dostignuća iz tog područja rutinski primijenjuju u laboratoriju za molekularnu patologiju.(3) Tehnikama molekularne patologije rutinski se određuju geni i mutacije specifični za određene neoplazme.(2) Ovakve metode daju odgovore na učinkovitost terapijskih opcija i prognozu brojnih tumora.(3) Primijenjuje se lančana reakcija polimerazom (PCR- engl. *polymerase chain reaction*), reakcije sekvenciranja te *in situ* hibridizacijske tehnike. Lančana reakcije polimerazom jednostavna je metoda koja omogućuje beskonačno umnažanje dijela genoma čime pomaže u njegovoj identifikaciji u proučavanom uzorku. Kvantitavni PCR ili RT-PCR (engl. *real time polymerase chain reaction*) koristan je pri identifikaciji više od jedne mutacije u uzorku. Sekvenciranje ima sposobnost identifikacije rijetkih mutacija određivanjem poretka nukleotida u fragmentu DNA. Ako primijenimo sekvenciranje nove generacije ili masivno paralelno sekvenciranje ( engl. *next generation sequencing/massive parallel sequencing*), možemo istodobno dobiti poredak većeg broja genomskih fragmenata. *In situ* hibridizacija omogućuje lokalizaciju traženih promjena u genomu histološkog preparata. Princip nalikuje onom imunohistokemijskom, ali ovdje se radi o vezivanju komplementarne RNA ili DNA probe na dio genoma. Proba može biti obilježena fluorescentnom supstancom i biti prikladna za analizu pod fluorescentnim mikroskopom. Takva *in situ* hibridizacija naziva se fluorescentnom (FISH, engl. *fluorescence in situ hybridization*).

Kromogena in situ hibridizacija (CISH, engl. *chromogenic in situ hybridization*) koristi kromogen za obilježavanje probe. Ova tehnika ne zahtijeva posebnu opremu, dovoljan je svjetlosni mikroskop.(2)

U nastavku pojasnit ćemo alternativne analitičke metode koje tek trebaju zaživjeti u rutinskoj laboratorijskoj praksi patologije. Odabrali smo one metode za koje vjerujemo da imaju veliki dijagnostički potencijal jer značajno povećavaju mogućnosti analize i mogu služiti kao komplementarne već uvriježenim metodama. Alternativne metode prate napredak tehnologije u svim njezinim poljima, a za današnje je znanstveno djelovanje izrazito poticajan izum umjetne inteligencije. Osim primjene digitalne patologije i njezinih alata, ne smijemo zaboraviti ni potencijal masene spektrometrije, različitih vrsta spektroskopije te mikroskopije atomskih sila.

## 2. Masena spektrometrija

### 2.1. Princip

Ideja masene spektrometrije temelji se na stvaranju nabijenih čestica te njihovoj kasnijoj obradi koja uključuje odabir, fragmentaciju i konačno njihovu detekciju. Ova metoda identificira molekule na temelju omjera njihove mase i naboja ( $m/z$ ).  $M$  je molekularna masa mjenog iona u Daltonima, a  $z$  kvantitativno opisuje naboj iona. Proces započinje ionizacijom u izvoru iona, gdje se pozitivno ili negativno nabijeni ioni dobivaju iz neutralnih molekula. Dok ioni putuju kroz područja masenog spektrometra, dolazi do fragmentacije. Fragmentacija je fenomen koji se događa na određenim kemijskim vezama. Budući da jačina fragmentacije ovisi o jakosti kemijske veze, svaka molekula proizvodi jedinstveni spektralni otisak koji indirektno ukazuje na njezinu strukturu. Promatrani se ioni izdvajaju u masenom analizatoru prema njihovim  $m/z$  omjerima, a na kraju se detektiraju na masenom detektoru. Rezultat masene spektrometrije je graf ionskih vrhova, a osi su intenzitet i  $m/z$ . (4)

### 2.2. Načini rada

Pri odabiru instrumenta za masenu spektrometriju, poželjno je obratiti pažnju na rezoluciju uređaja i preciznost pri utvrđivanju mase. Visoka rezolucija povećava preciznost mjerenja mase i smanjuje preklapanja vrhova postižući tako veću specifičnost. Postoje brojne varijacije u ustrojstvu masenih spektrometara. Tipičan maseni spektrometar može se podijeliti na tri već navedena dijela: izvor iona, maseni analizator i maseni detektor. U izvoru iona radi se ionizacija odnosno prvi korak masene spektrometrije. U praksi uvriježene su tehnike meke ionizacije poput elektrosprej ionizacije (ESI, engl. *electrospray ionization*) i kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku (APCI, engl. *atmospheric pressure chemical ionization*) za analizu tekućinskom kromatografijom i tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS, engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*) pri atmosferskom tlaku. ESI je učinkovit za

male molekule, proteine i peptide. APCI se smatra grubljom tehnikom ionizacije jer može doći do gubitka modifikacija ciljnih spojeva, primjerice gubitka glukuronidacije. Navedena tehnika prilagođena je ionizaciji toplinski stabilnih molekula, a posebna prednost je sposobnost uklanjanja sastavnica matriksa pri analizi steroida i lijekova. U kliničkom laboratoriju rabi se još i matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (MALDI, engl. *matrix assisted laser desorption/ionization*). MALDI je vrsta meke ionizacije koja proizvodi jednostruko nabijene ione i može analizirati brojne složene molekule uključujući nukleinske kiseline, peptide i proteine. Maseni analizatori, kao drugi glavni dio svakog instrumenta, razdvajaju i fragmentiraju ione na temelju  $m/z$  omjera kako bi ih potom detektirali. Četverostruki maseni spektrometri najčešće su korišteni maseni analizatori u laboratorijima. Sastoje se od četiri paralelne vodljive šipke koje oblikuju kanal za prolazak iona. Na šipke se djeluje kombinacijom jednosmjernih potencijala s oscilirajućom radiofrekvencijom kako bi ioni unutar uskog  $m/z$  raspona ostali u kanalu, a oni izvan raspona radijalno se izbacili. Četverostruki maseni analizatori zastupljeni su u kliničkoj praksi primjerice za analizu lijekova, steroida, metabolita, kao i peptida i proteina. Osim četverostrukog masenog analizatora, često je korišten analizator vremena leta (ToF, engl. *time of flight*). U ToF analizatorima, ioni "lete" kroz cijev, pod utjecajem potencijala. Vrijeme leta, odnosno vrijeme potrebno da ion stigne do detektora u ovisnosti je o  $m/z$  omjeru. Posljedično, lakši ioni putuju brže i stižu do detektora prije težih iona. ToF-MS ima brojne prednosti: veći dinamički raspon, veću preciznost u određivanju mase i brzinu ukupne analize uz umjerenu rezoluciju i osjetljivost. Važne kliničke primjene ToF-MS uključuju identifikaciju mikroorganizama i genotipizaciju. Ako se masena analiza odvija u seriji, odnosno istodobno se analizira više iona, to se naziva tandemaska masena spektrometrija (MS/MS). Takve tehnike spektrometrije korisne su za strukturnu analizu i kvantifikaciju više spojeva slične strukture i približno iste relativne mase.(4)

## 2.3. Primjena

### 2.3.1. Proteini

U razvoju bolesti jedan od najvažnijih čimbenika je ekspresija proteina. Za razumijevanje patofizioloških mehanizama bolesti, ekspresija proteina je presudna. Analiziranje proteoma važno je za svaku dijagnozu bolesti u kliničkoj praksi. Metoda masene spektrometrije može poslužiti kao nadopuna imunohistokemijskoj analizi u patologiji jer daje odgovor na pitanja ekspresije proteina i otkrivanja novih biomarkera u određenom uzorku krvi, urina ili bioptičkog uzorka tkiva. Dva načina primjene masene spektrometrije kod ekspresije proteina su nazvane prema smjeru analize. Tako razlikujemo *top-down* i *bottom-up* proteomiku. *Top-down* proteomika podrazumijeva analiziranje intaktnih proteina što kod velikog broja proteina slične molekularne mase dovodi do nedovoljne točnosti u njihovom razlikovanju zbog ograničenosti instrumenta. *Bottom-up* proteomika zaobilazi taj

problem i daje bolje rezultate. U *Bottom-up* tehnici dodaje se peptidaza najčešće tripsin koji cijepa proteine u manje peptide. Prije masene spektrometrije, tripsin se uklanja pomoću kromatografije. Analizirani peptidi pokazuju veću međusobnu raznolikost i lakše se prepoznaju.(4)

### 2.3.2. Lipidi

Makromolekule lipida vrlo su važne u staničnom metabolizmu. Lipidi imaju brojne uloge u ljudskom organizmu. Osim što služe kao građevni spojevi staničnih membrana, derivati fosfolipida važni su za međustaničnu signalizaciju. Budući da promjene u staničnoj signalizaciji mogu značiti prisutnost bolesti, analiza lipida je neizostavan dio današnjih istraživanja. Razlog zašto ih se prije nije počelo temeljitije proučavati nalazi se u činjenici da su većini *in situ* analiza nedohvatljivi. Lipidi nerijetko igraju ulogu u karcinogenezi zbog čega bi novije metode njihovog proučavanja bile od iznimne važnosti za bolje razumijevanje, a onda i uspješnije liječenje karcinoma. Prva tehnika masene spektrometrije koja je primjenjena za analizu kolesterola i fosfolipida bila je SIMS-ToF( engl. *Secondary Ion Mass Spectrometry-Time of Flight*), a nedugo kasnije koristio se i MALDI. Masena spektrometrija sekundarnih iona analizira samo sekundarne ione koji su nastali kao posljedica sudara primarnih iona i uzorka odnosno njihovo vrijeme “leta”. Ovom tehnikom uvelike se povećala razlučivost. MALDI je posebno koristan za detaljnu analizu tumorskih tkiva jer istovremeno dobiva informacije o morfologiji tkiva i molekularnom sastavu. Svaki tumor ima svoje strukturalne posebnosti. Strukturalni i molekularni fenotip tumora pomaže u njegovoj adekvatnoj tipizaciji i odabiru učinkovite terapije. Slikovne tehnike masene spektrometrije u tome imaju veliku prednost.(5) O uspješnosti analize MALDI masenom spektrometrijom govori činjenica da je identificirano više podvrsta markera koji su direktno povezani s prognozom karcinoma. Identificirane podvrste markera pripadaju primjerice nesitnostaničnom karcinomu bubrega, karcinomu mozga, dojke, prostate i karcinomu želuca intestinalnog tipa. (6)

### 2.3.3. Amiloidoza

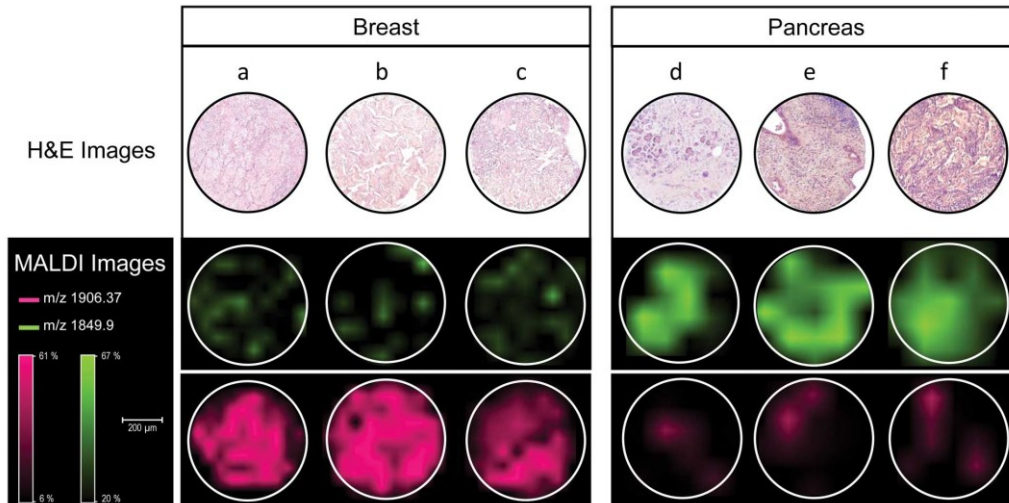
Amiloidoza je skupina bolesti koja nastaje nakupljanjem proteina. Ovi pogrešno smotani proteini nazivaju se amiloidni fibrili i oblikovani su u beta nabrane ploče. Mogu se nakupljati lokalno u izvanstaničnoj tvari ili sistemski. Patogeneza amiloidoze polazi iz ovog prekomjernog nakupljanja koje uzrokuje citotoksičnost, a posljedično i oštećenje organa. Utvrđivanje strukture amiloidnih fibrila iznimno je važno za postavljanje prave dijagnoze jer amiloidoza ima 36 podtipova. O podtipu amiloidoze ovisi vrsta terapije. Za postavljanje dijagnoze, može se koristiti svjetlosni i elektronski mikroskop. Pod svjetlosnim mikroskopom izražena je promjena amiloidnih depozita nakon primjene Kongo crvenog obojenja, a pod elektronskim mikroskopom isti depoziti prikazuju se kao nasumično

posložene, nerazgranate fibrile s promjerom u rasponu od 7 do 14 nm. U slučaju prisutnosti amiloidnih nakupina, daljnji je cilj odrediti podtip amiloidoze. Rutinski se za određivanje podtipa primjenjuju imunohistokemijske tehnike, posebice imunofluorescencija.(4) Imunofluorescencija je imunohistokemijska tehnika kod koje se umjesto konjugiranih antitijela kromogenom, antitijela konjugiraju s fluorescentnom bojom. Takve boje odnosno spojevi od kojih se najčešće izdavaja fluorescein izotiocijanat ime su dobili po sposobnosti fluorescencije. Fluorescencija je sposobnost upijanja ultraljubičastih zraka i emitiranja zraka iz spektra vidljive svjetlosti pod fluorescentnim mikroskopom.(3) Smanjena osjetljivost i specifičnost u imunohistokemijskim nalazima mogu biti posljedica pozadinskog onečišćenja, velikog broja potrebnih antitijela te gubitka epitopa zbog fiksacije formalinom. Moderna tehnika spektrometrije nazvana laserska mikrodisekcija i masena spektrometrija (LMD-MS, engl. *Laser Microdissection and Mass Spectrometry*) kombinira metode laserskog izdvajanja područja interesa na uzorku pod kontrolom svjetlosnog mikroskopa i objašnjenju *bottom-up* tehniku cijepanja proteina na peptide prije tandemске masene spektrometrije. Ovakva metode je vrlo efikasna i dovoljna je za subtipizaciju amiloidoze s visokom osjetljivošću i specifičnošću.(4)

#### 2.3.4. Karcinom dojke

MALDI tehnika primijenjena je na raku dojke u brojnim istraživanjima s iznimnim rezultatima. Došli su do otkrića tri specifična proteina koja su se nalazila u različitim regijama karcinoma dojke. Osim toga, u metastatski promijenjenom limfnom čvoru pronašli su jedinstvene proteinske signale.(7) Uspoređujući karcinome dojke pacijentica s i bez pozitivnih limfnih čvorova, utvrdili su šest različitih proteinskih ekspresija.(8) Ovaj rezultat ukazuje na prediktivni potencijal masene spektrometrije u raku dojke. Masena se spektrometrija eksperimentalno pokazala i kao obećavajuća metoda za određivanje HER2/neu receptora od *in situ* hibridizacije i imunohistokemijskih metoda.(9,10) HER2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*) pripada skupini epidermalnih faktora rasta (EGF, engl. *epidermal growth factor*). Gen za HER2 nalazi se na dugom kraku 17. kromosoma koji kodira navedeni protein dugačak 185 kDa. Prekomjerna ekspresija HER2 prisutna je u 20-30% karcinoma dojke te se veže s agresivnijim oblikom karcinoma odnosno većom stopom recidiva i kraćom stopom preživljenja.(11) Dekker i suradnici uspjeli su uočiti signale stromalne aktivacije u raku dojke koristeći masenu spektrometriju.(12) Casadonte i suradnici su pomoću MALDI tehnike stvorili algoritam koji razlikuje metastaze dojke od metastaza prostate.(13) (Slika 1.)





Slika 1. Usporedba histologije i MALDI rezultata. H&E bojenja su izvedena nakon MALDI analize. Prikazani su H&E obojeni presjeci i maseni spektralni prikazi za uzorke biopsije raka dojke (a–c) i gušterače (d–f). Distribucija dva m/z peptida, 1906.37 (protein toplinskog šoka  $\beta$ -1, HSPB 27) i 1849.9 (protein sličan proteinu bogatom glutaminskom kiselinom koji veže SH3 domenu, SH3L1). Vidljiva je razlika u izraženosti između biopsija jezgri karcinoma dojke i gušterače. Karta gustoće iona HSB 27 proteina pokazuje distribuciju samo u podskupini biopsija dojke (a–c), dok je SH3L1 visoko izražen u biopsijama gušterače (d–f). Preuzeto iz Kriegsmann i sur. (2014). MALDI TOF imaging mass spectrometry in clinical pathology: A valuable tool for cancer diagnostics (Review). *International Journal of Oncology*.46(3):893–906 (6)

#### 2.4. Prednosti i nedostaci

Trenutna istraživanja o primjeni masene spektrometrije u patološkoj dijagnostici izgledaju obećavajuće. MALDI pokazuje brojne analitičke prednosti poput brzine kojom se dolazi do dijagnoze, preciznosti dobivenih podataka te nižoj cijeni postupka. (5) MALDI će se u budućnosti koristiti kao nadopuna patohistološkoj analizi. Najveća prednost MALDI spektrometrije je što je za adekvatnu analizu dovoljan samo jedan tkivni rez, a ostatak uzorka se može iskoristiti za dopunske molekularne metode. Ovaj princip uvelike olakšava pripremu tkiva, a time štedi vrijeme, novac i biološki materijal.(6) Problemi koji još uvijek onemogućavaju primjenu u svakodnevnoj praksi su velika inicijalna cijena, nedostatak osoblja obrazovanog za tu metodu, nedovoljna automatizacija i standardizacija postupka te manjak zakonske regulative.(7) Za rutinsku je primjenu prvenstveno potrebna standardizacija korištenja masene spektrometrije u patologiji i kontrola kvalitete putem međulaboratorijske validacije.(6)

### 3. Mikroskopija atomskih sila

#### 3.1. Princip

Mikroskopija atomskih sila (AFM, engl. *atomic force microscopy*) je metoda skeniranja koja je osmišljena 1986.godine, a ušla je u primjenu 1990. godine.(14) Ova visokorezolucijska metoda naziva se još mikroskopijom skenirajućih sila (SFM, engl. *scanning force microscopy*).(15) Ključni je dio ove vrste mikroskopije sonda oštrog vrha obješena o polugu.(14) Vrh sonde prolazeći po uzorku stvara privlačne ili odbojne sile s površinskim dijelovima uzorka. Prema kemijskoj prirodi najčešće stvorene sile su Van der Waalove, elektrostatske te hidrofilne odnosno hidrofobne sile. Svaka stvorena sila uzrokuje savijanje opruge u određenom smjeru. Laserske se zrake reflektiraju od površine do fotodioda kao posljedica savijanja sonde. Ako dovoljno svjetlosti padne na pojedinačnu fotodiodu, ona stvara izlazni signal pomoću kojeg skener može prilagoditi visinu sonde. Promjene u savijanju sonde na površini služe za trodimenzionalnu topografsku rekonstrukciju mjerenog uzorka.(15)

#### 3.2. Načini rada

Načini rada prilagođeni su vrstama uzoraka. Osim poboljšanja rezolucije prikaza, nerijetko se odabir načina snimanja prilagođava zbog rizika od oštećenja samog uzorka. U kontaktnom načinu rada ostvaren je kontakt između vrha sonde i uzorka tijekom cijelog vremena snimanja, a sile koje prevladavaju su odbojne. Nekontaktni se način rada opisuje suprotno; nema kontakta između sonde i površine, a rezultantna sila je privlačna. Kontaktna metoda korisna je za analizu čvršćih i grubljih struktura. Posebna vrsta kontaktne metode naziva se snimanje u načinu trenja. Kod ove metode detektor osim vertikalnih promjena bilježi i značajke trenja iz torzijskog zakretanja sonde. Nekontaktna metoda često se primjenjuje pri skeniranju biomaterijala jer nema rizika od njegovog oštećenja. Unatoč tome, nekontaktna tehnika ima ograničenu primjenu u analizi biomaterijala jer zahtijeva visoki vakuum za medij. Metoda s najširoom primjenom za mjerenje bioloških uzoraka je metoda tapkanja (engl. *tapping method*). Ova metoda ima alterirajući vrh sonde koji se približava i udaljuje od uzorka u pravilnim vremenskim razmacima. Rezultatna je sila stoga promjenjiva. Metoda tapkanja ima visoku rezoluciju i nježna je prema uzorcima. Postoji i metoda sile (engl. *force method*) pri kojoj se koristi posebno prilagođena sila koja uzrokuje nano ( $1\text{nm}=1\times 10^{-9}\text{ m}$ ) uleknuća u uzorku. Stvorena uleknuća daju informaciju o čvrstoći i elastičnosti tkiva te se pomoću ovog načina mikroskopije može izraditi i Youngov modul elastičnosti za mjereno tkivo.(14) Youngov modul elastičnosti jedan je od najvažnijih modela u mehanici. On opisuje krutost elastičnih tvari, a iskazuje se kao omjer naprezanja i deformacije tvari.(16)

### 3.3. Primjena

AFM rezultati su skenovi koji imaju svoju točnost i specifičnost. Dobre strane metode leže u činjenici da su rezultati mikroskopije atomskih sila u nanometarskim ili subnanometarskim veličinama. AFM pokazuje vrlo dobre rezultate u morfološkoj, mehaničkoj i molekularnoj analizi biomaterijala. Na subnanometarskoj razini može opisati oblik i veličinu strukture te pružiti podatke o njezinoj površinskoj topografiji. Osim toga, opaža strukturne i konformacijske promjene citoskeletnih proteina i membranskih lipida. Sposoban je zamijetiti najranije morfološke promjene koje su najčešće jedan od prvih znakova bolesti te rane morfološke promjene nakon primjene terapije. Promjene u sastavu, hidrataciji i organizaciji izvanstaničnog matriksa dovode do mehaničkih promjena u tkivima. Mijenja se elastičnost tkiva odnosno mekoća koja se može opisati spomenutim Youngovim modulom. Visok Youngov modul elastičnosti nekog tkiva ukazuje na smanjenu mehaničku provodljivost. Elastičnost tkiva slabi starenjem, ali do povećanja čvrstoće često dolazi kao posljedica neke patološke promjene. AFM mikroskopski nalaz očvršnuća tkiva odnosno smanjenja njegove prilagodljivosti može rano otkriti prisutnost bolesti. Osim prilagodljivosti, smanjenje mehaničke adhezije tkiva isto tako upozorava na potencijalnu bolest. Adhezija stanica značajno utječe u regulaciji i komunikaciji stanica. Ovakva interakcija kontrolira stanične funkcije i procese između stanica i izvanstanične tvari.(14)

#### 3.3.1. HIV

AFM metoda dovela je do zamjetnog napretka u dijagnosticiranju virusnih bolesti. Jedan od primjera je virus humane imunodeficijencije (HIV). HIV je omotani retrovirus koji sadrži genetski materijal u obliku jednostruke RNA u ranoj fazi svojeg postojanja. Tijekom sazrijevanja virusa oblikuje se konična kapsida oko RNA. Kapsida se sastoji od kombinacije pentamera i heksamera, a duljina joj je oko 100-120 nm. Kapsida će se u kasnoj fazi sazrijevanja virusa otopiti. Provedena su brojna istraživanja o mehaničkim svojstvima kapside mjereći njezinu krutost AFM tehnikom nanoindentacije. Pang i suradnici došli su do zaključka da pod utjecajem virusnog omotača dolazi do smanjenja u krutosti kapside tijekom sazrijevanja virusa. Drugo istraživanje koje su vodili Kol i suradnici usporedilo je mehanička obilježja zrelih i nezrelih HIV virusa korištenjem AFM nanoindentacije. Konstanta opruge zrelog HIV-1 izračunata je 0,22 N/m, a konstanta opruge nezrelog HIV-1 puno je veća i iznosi 3,15 N/m. Youngovi moduli iznose 0,44 GPa i 0,93 GPa za zreli i nezreli HIV-1. HIV-1 manjeg stupnja sazrijevanja pokazuje veću čvrstoću. Primjena AFM metode uvelike je olakšala predviđanje vremenskog perioda od ulaska HIV-a u organizam do otapanja kapside odnosno do pojave infekcije.(17)

#### 3.3.2. Tumori

Tumorske stanice se od normalnih razlikuju po mnogim obilježjima, ali nerijetko tumori ostanu nezamijećeni. AFM kao veliku prednost ima već spomenutu visoku rezoluciju. Usto, može analizirati tkiva u fiziološkom okruženju odnosno *in vivo*. Optička i fluorescentna mikroskopija daju dobre rezultate u morfologiji tumora, ali zbog visoke rezolucije AFM metode ona daje odgovore na pitanja najsitnije tumorske morfologije, površinske topografije, egzocitoze, interakcija između dviju tumorski promijenjenih stanica ili interakcije tumorske stanice i izvanstanične tvari te proteolitičke aktivnosti tumora. Tumorske se stanice od običnih razlikuju po rastu, beskonačnoj sposobnosti dijeljenja i izbjegavanju apoptoze. Tumori mijenjaju svoj mikrokoliš (TME, engl. *tumor microenvironment*) kako bi poboljšali svoj rast i razvoj. Njihov se mikrokoliš sastoji od krvnih i limfnih žila, stromalnih stanica, faktora rasta i izvanstanične tvari. Maligna transformacija prvenstveno je povezana s promjenom u nanomehaničkim svojstvima. Primjerice, karcinom dojke i prostate pokazuje dezomoplastičnu promjenu pri kojoj zbog prekomjerne proizvodnje izvanstanične tvari dolazi do očvršnuća tumorskog mikrokoliša. Ovaj nalaz ukazuje na sposobnost mikroskopije atomskih sila ne samo da mjeri elastičnost stanice, već i izvanstanične tvari.(17) Značajni morfološki pronalazak u proučavanju invazivnosti glioblastoma pronašli su znanstvenici Chasiotis i Fillmore i njihovi suradnici u dva odvojena istraživanja. Mikroskopijom atomskih sila otkrili su specifična nanoobilježja invadopodija koji imaju veliku ulogu u invazivnosti i sposobnosti glioblastoma da stvori udaljene metastaze.(18,19) Ako govorimo o staničnoj adheziji, korištenjem AFM Laurent i suradnici došli su do zaključka da stanice invazivnijih oblika karcinoma stvaraju čvršće veze s endotelnim stanicama u odnosu na manje invazivne oblike.(20) Lekka i suradnici su u svojem pionirskom istraživanju iz 1999. godine proučavajući karcinom mokraćnog mjehura došli do neočekivanog zaključka da su maligne stanice mekanije od normalnih.(21) Tumori mogu pokazivati i smanjenu mehaničku elastičnost kao posljedicu povećanja koncentracije kolagena I i II u izvanstaničnoj tvari. Od te činjenice polazi mogućnost palpiranja solidnih tumora u čovjeku. Daljnja istraživanja koristeći AFM potvrdila su postojanje dva maksimuma elastičnosti Youngovog modula tumorskih tkiva za razliku od zdravih koji pokazuju samo jedan maksimum. Ovaj rezultat može objasniti dvojnost u mehaničkim svojstvima tumorskih stanica.(17)

#### 3.4. Prednosti i nedostaci

Mikroskopsija atomskih sila je nanoskopska metoda koja s visokom točnošću analizira uzorke. Ima sposobnost snimanja u fiziološkim uvjetima te može primijetiti promjene u međustaničnoj interakciji i one na molekularnoj razini. Primarno se koristi za površinsku topografsku analizu, ali istovremeno ispituje prilagodljivost tkiva i staničnu adheziju. Metoda je vrlo osjetljiva i njome su očite najranije strukturalne promjene koje prethode razvoju neke bolesti. Najveći nedostatak klasične mikroskopije

atomskih sila je vrijeme koje je potrebno da snimi područje uzorka unutar jednog okvira. Za jedan okvir potrebno je otprilike 5 minuta. Novi izum je mikroskopija atomskih sila velike brzine (HS-AFM, engl. *high speed atomic force microscopy*). Za snimanje unutar jednog okvira ovoj metodi potrebno je svega 80 ms. Ovaj izum uvelike ubrzava snimanje i uspješno rješava problem sporosti klasične metode.(17) Kao drugi problem ističe se manjak biokemijskih informacija o tkivu koje ovakva mikroskopija ne pruža.(14)

## 4. Ramanova spektroskopija

### 4.1. Princip

Ramanova je spektroskopija (RS, engl. *Raman spectroscopy*) vrsta spektroskopije koja koristi Ramanovo neelastično raspršenje svjetlosti kao svoj osnovni mehanizam. Laserski snop obasjava uzorak. Kada laserski snop obasja površinu uzorka, fotoni dolaze u dodir s elektronima molekula na površini uzorka. Dolazi do neelastičnog raspršenja fotona kojima se zbog toga promijeni frekvencija. Frekvencija prije interakcije iznosila je  $\nu_0$ , a nakon raspršenja  $\nu_1$ . Na temelju razlike tih frekvencija dobije se rezultatna frekvencija ili spektralna vrpca koja je specifična za svaku molekulu. Spektralna vrpca molekule ili njezin kemijski otisak jednoznačno prepoznaje određenu molekulu prema vibracijskom stanju kemijskih veza u toj molekuli. Neelastično se raspršenje u prirodi puno rjeđe događa od elastičnog raspršenja što uvelike smanjuje osjetljivost Ramanove spektroskopije.(22)

### 4.2. Načini rada

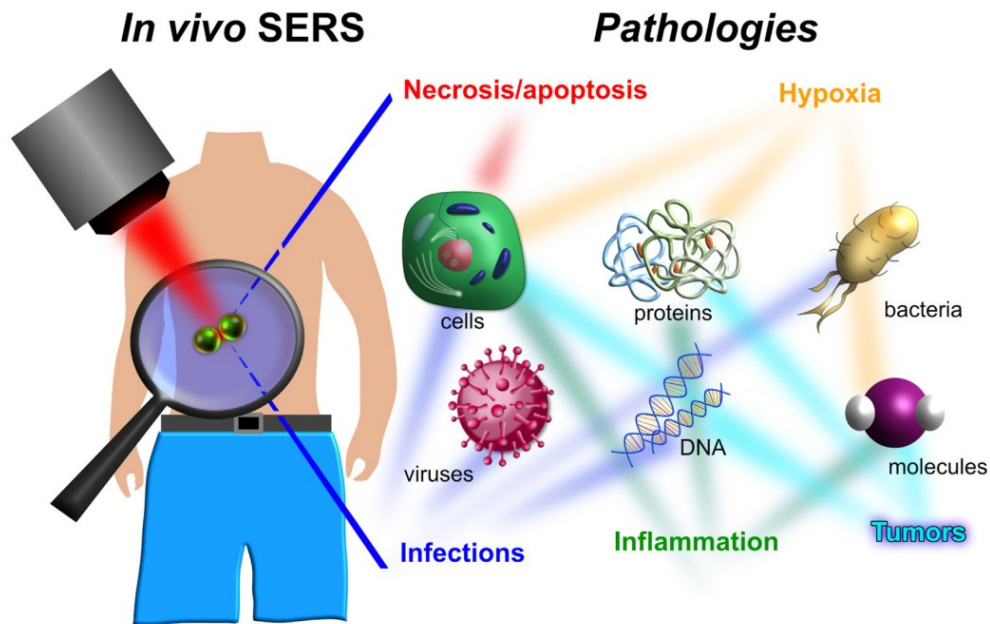
Površinski pojačana Ramanova spektroskopija ili površinski pojačana spektroskopija Ramanovog raspršenja (SERS, engl. *surface enhanced Raman spectroscopy*) pokazuje visoku specifičnost i osjetljivost. Ona zaobilazi ovaj problem zbog dvije nadogradnje. Prvi način nadogradnje ostvaruje se višebrojnim metalnim nanostrukturama koje povećavaju Ramanov signal. Ovakva vrsta pojačanja naziva se elektromagnestko pojačanje, a posljedica je svjetlosnog pobuđivanja ravnomjerno raspoređenog elektronskog plina po nanostrukтури. Nakon pobuđivanja dolazi do preraspodjele elektronskog plina što se naziva plazmonska oscilacija. Ako se uskladi frekvencija elektromagnetskog polja odnosno primjenjene svjetlosti i plazmonske oscilacije, Ramanov signal može se znatno povećati. Osim elektromagnetskog pojačanja, primjenjuje se i kemijsko pojačanje. U kemijskom pojačanju dolazi do optičkog prijelaza zbog hibridizacije metala i molekula. Ovo dovodi do promjena u sposobnosti polarizacije molekula i u relativnoj orijentaciji kompleksa molekula-metal što oboje direktno utječe na jakost Ramanovog signala. Za SERS snimanje koriste se biokompatibilne SERS podloge s nanostrukturama plemenitih metala ili one koloidne s nanočesticama u pufer otopini. Ovakve podloge imaju vruće točke (engl. *hot spots*) u kojima je elektromagnestko polje najjače zbog

čega je poželjno promatrane molekule postaviti u navedene točke. Jedna od varijacija je ubrizgavanje koloidnih otopina s nanočesticama u tkivo kako bi se pojačao Ramanov signal. SERS pokazuje osjetljivost na molekularnoj razini i visoku specifičnost kod promatranja brojnih patoloških stanja poput upalnih staničnih procesa, hipoksije, nekroze, apoptoze te pri dijagnostici tumora.(22) Duboka Ramanova spektroskopija razvija se kao posebna neinvazivna dijagnostička metoda. Omogućuje postavljanje dijagnoze čvrstih organa izvan tijela. Metoda je ograničena na tkiva sa snažnim i jasno razlučivim signalom Ramanovog raspršenja.(23)

#### 4.3 Primjena

SERS ima brojne dobre karakteristike. Njezina uspješnost mjerljiva je jedino s LC-MS metodom, no prednosti su SERS metode nad ovom tehnikom masene spektrometrije kraće vrijeme reakcije i *in vivo* mogućnost mjerenja. (Slika 2.) Ako govorimo o staničnim procesima i stanjima organizma, SERS ima široku primjenu za njihovo prepoznavanje. Postoje dva mehanizma smrti stanice. Apoptoza je način stanične smrti kod koje dolazi do njezinog samouništenja aktiviranjem endogenog genskog programa. Ovaj mehanizam ima enzimsku podlogu i troši zalihe energije u stanici. Nekroza je uvijek patološki proces koji nastaje zbog poremećaja vitalnih procesa stanice ili manjka energije u stanici.(2) Kod apoptoze stanica se cijepa na apoptotička tjelešca koja okolne stanice apsorbiraju, a nakon nekroze iz stanice izlaze medijatori upale i kemotaktični spojevi koji privlače leukocite. Ramanovom se spektroskopijom mogu razlikovati ova dva procesa stanične smrti na temelju razlika intenziteta pojedinih signala. Nekrozu obilježavaju pojačani signali proteina, dok se kod apoptoze oni ne moraju razlikovati od proteinskih signala žive stanice ili mogu biti smanjeni. Pojačanje fosfolipidnih i signala citokroma C ukazuje na apoptozu. Za kasnu apoptozu specifično je i oslabljenje DNA signala. Upala je obrambena reakcija organizma na ozljedu. Uobičajeni su znakovi upale crvenilo, otok, bol, toplina i gubitak funkcije. Pri lokalnoj se upali prvi oslobođeni medijatori upale mogu detektirati pomoću SERS *in situ* metode. Sistemska upala označava širenje medijatora upale u krv. Jedan od glavnih medijatora upale je CRP (C reaktivni protein). CRP se ne može klasičnim metodama zamijetiti u toliko niskoj koncentraciji Koliko se može SERS metodom na zlatnoj podlozi. Ova metoda detektira koncentraciju CRP-a već u koncentraciji  $10^{-17}$  M. Takva rana dijagnostika igra ključnu ulogu u ranoj primjeni terapije. Hipoksija je treći proces povoljan za SERS dijagnostičku metodu. Ovaj proces prati poremećaj dotoka kisika u tkivo zbog čega dolazi do nedovoljne tkivne opskrbe kisikom. Dotok kisika može biti poremećen zbog moždanog udara, aterosklerotskog plaka ili tumorske infiltracije. Hipoksične stanice prolaze promjenu pH u hipoksiji što dovodi do poremećaja u oksidacijsko-redukcijskim procesima unutar stanice. Jedan od primjera je pojačano djelovanje enzima

nitroreduktaze pri čemu SERS metoda prepoznaje slabljenje signala dušikovog oksida ( $\text{NO}_2$ ) zbog redukcije u  $\text{NH}_2$ .(22)



Slika 2. Mogućnosti vizualizacije primjenom SERS metode. Preuzeto iz Kozik i sur.(2021). A review of surface-enhanced Raman spectroscopy in pathological processes. *Analytica Chimica Acta*. (22)

#### 4.3.1. Ateroskleroza

Ateroskleroza je jedna od najučestalijih bolesti krvožilnog sustava koja je uzrokovana prekomjernom tjelesnom težinom i starenjem. Stijenke arterija postaju osjetljive zbog oksidativnog stresa i starenja. U takve stijenke odlažu se masne naslage iz krvi te kristalizirani kalcijevi spojevi, primjerice kalcijev apatit. Ovakvi aterosklerotski plakovi privlače makrofage koji potpomažu razgradnju masti u tkivima. Djelovanje makrofaga dovodi do otoka stijenke i stanične toksičnosti što za posljedicu može imati rupturu arterije.(24) Motz i suradnici su 2006. godine prvi put koristili Ramanovu spektroskopiju za detekciju aterosklerotskih plakova *in vivo* u čovjeku.(25) Sonda je bila postavljena u arteriju okomito na plak. Nakon operacije su kako bi dokazali potencijal Ramanove spektroskopije podvrgnuli odstranjeni plak patohistološkoj analizi za usporedbu. Nedavno, znanstvenici su ponudili multimodalni model kombinacijom Ramanove i CARS spektroskopije za analizu aterosklerotskih plakova.(24) Koherentna anti-Stokesova Ramanova spektroskopija (CARS, engl. coherent anti-Stokes Raman spectroscopy) nelinearna je metoda kod koje se Ramanova koherencija postiže dvama laserima koja kad se ispituje trećim laserom stvara koherentni laserski signal u fazno usklađenom pravcu.(26)

#### 4.3.2. Tumori

Iz mikroskopske perspektive tumor započinje malignom transformacijom jedne stanice. Nakon transformacije jedne tumorske stanice, tumor se širi i mijenja najčešće od prekancerozene promjene do malignog tipa. Tumorske se od zdravih stanica razlikuju po morfologiji i staničnom ustroju te po prekomjernom lučenju određenih spojeva koje nazivamo tumorskim markerima. Jedan od vrlo važnih dijagnostičkih elemenata je potencijal otkrivanja tumora i peritumorskih regija tijekom kirurškog zahvata. Ovdje postoji potencijal za Ramanovu spektroskopiju koja će na temelju razlika koncentracija pojedinih komponenti razlučiti između zdravih i malignih stanica.(24) Primjerice, Stone i suradnici koristili su Ramanovu spektroskopiju za proučavanje karcinoma mokraćnog mjehura i karcinoma prostate. Ramanovom spektroskopijom detektirali su pojačani signal kolesterola koji je povezan s nekrozom te oslabljeni signal kolagena u mokraćnom mjehuru koji ukazuje na proširenje bolesti.(27) Ramanovom su spektroskopijom Bergholt i suradnici 2014. godine s osjetljivošću od 87% i specifičnošću od 84% razlikovali zdravi od Barrettovog jednjaka.(28) Osim navedenih lako dohvatljivih tumora šupljih organa, Ramanova je spektroskopija uspješna i za *ex vivo* mjerenja teško dostupnih organa poput mozga, dojke i jetre.(24) 1996. godine Hawi i suradnici su primjenom Ramanove spektroskopije uspjeli razlikovati zdrave i maligno promijenjene ljudske hepatocite.(29)

#### 4.4. Prednosti i nedostaci

Ramanova se spektroskopija pokazala kao dijagnostička metoda koju se može koristiti za *in vivo* snimanje šupljih organa tijekom endoskopskih postupaka. Neinvazivna je tehnika koja nema nikakvih štetnih učinaka na uzorak odnosno tkivo. Zahtijeva minimalnu pripremu tkiva bez dodatnih obojenja i kemijskih fiksativa čime povoljno utječe na stvaranje medicinskog otpada. Pogodna je za snimanje bioloških uzoraka radi njihove kemijske analize i klasifikacije. Unatoč visokoj specifičnosti, nerijetko je kod analize Ramanovom spektroskopijom osjetljivost preniska. Osim toga, javlja se i problem autofluorescencije pri snimanju.(24) Autofluorescencija je intrinzično svojstvo stanica i tkiva i razlikuje se od fluorescencije jer stanice nisu obilježene fluorescentnim spojevima. Ova pojava nastaje aktivacijom endogenih fluorofora koji fluoresciraju pod djelovanjem ultraljubičaste svjetlosti odgovarajuće valne duljine.(30) Ako je Ramanov signal slab, znatno se produljuje vrijeme snimanja. Osim primjene same Ramanove spektroskopije, obično je potrebna i sofisticirana ponekad dugotrajna analiza podataka za postavljanje točne dijagnoze.



## 5. Laserska spektroskopija

### 5.1. Princip

Spektroskopija izazvana laserskim lomom (LIBS, engl. *laser induced breakdown spectroscopy*) je jedna od atomskih emisijskih spektroskopija koja se temelji na primjeni lasera. Pogodna je za mjerenja uzoraka u svim agregacijskim stanjima; čvrstom, tekućem i plinovitom. Visokoenergetski pulsirajući laser udara o uzorak pri čemu se stvara plazma koja tijekom hlađenja i vraćanja u svoje početno stanje emitira zračenje koje spektrometar bilježi.(31) Detaljnije, LIBS se instrument sastoji od 5 osnovnih dijelova: izvor svjetla, optički sustav, spektrometar, detektor svjetla i računalo. U LIBS spektroskopiji jedan od osnovnih parametara je energija po pulsu koja određuje jakost emitiranog signala i oštećenje tkiva na koje je laser djelovao. Kombinacijom polarizatora i poluvalne ploče omogućeno je prilagođavanje jačine energije oslobođene u jednom impulsu. Konvergencija zraka najbitniji je čimbenik za stvaranje plazme. Kako bi se konvergencija povećala zrake su usmjerene kroz sustav leća i prizmi te fokusirane malo iznad površine tkiva. Za fokusiranje može se koristiti povećanje objektiva, no time osjetljivost pada. Svjetlost koju emitira plazma usmjerava se prema detektorima poput fotomultiplikatora ili kamere. Za bilježenje podataka potrebna je primjena softvera.(32)

### 5.2. Načini rada

Osim dvodimenzionalnog načina snimanja za veće i deblje uzorke biološkog tkiva korisna je primjena trodimenzionalne spektroskopije izazvane laserskim lomom. LIBS ima veliku propusnost zbog čega je moguće snimanje slojeva. Postoje dva načina za trodimenzionalnu analizu ovom metodom. Prvi način ne koristi nikakvu prethodnu pripremu tkiva te se snimanje zasniva na propusnosti metode, a za drugi način tkivo odnosno uzorak se nareže na tanke slojeve koji se analiziraju sloj po sloj. Mjerenjem uzastopnih rezova i usklađivanjem podataka za svaki rez dobiva se informacija o dubinskoj distribuciji intenziteta koja ukazuje na razinu dubinske jednoličnosti tkiva. Ovakva metoda koristi se primjerice za analizu kožnih karcinoma.(33)

### 5.3. Primjena

U patologiji, laserska se spektroskopija može koristiti kao dijagnostički alat bioptičkog uzorka. Ona može prepoznati razlike u sastavu tkiva zbog čega se može koristiti za razlikovanje zdravog od tumorski promijenjenog tkiva. Kvantifikacijskim istraživanjima utvrđeno je da postoji razlika u sastavu elementarnih spojeva između zdravog i bolesnog tkiva. Razlika u koncentraciji raznih kemijskih spojeva poput C,O,H,N,Ca,K,Na,Mg detektabilna je LIBS metodom. Budući da tumorska

tkiva obično imaju veći stupanj kalcifikacije od zdravih, promjene razine kalcija utvrđene LIBS tehnikom od velike su važnosti za rano otkrivanje tumora. Za optimizaciju analitičkog procesa potreban je jedinstveni način obrade podataka dobivenih ovom vrstom spektroskopije. Podaci se zbog toga obrađuju raznim kemometrijskim tehnikama i tehnikama strojnog učenja što smanjuje brzinu i točnost analize rezultata. Usto, većina tkiva koja se snima LIBS metodom su prošla neki process pripreme kako bi se spriječila njihova razgradnja. Ovo može negativno utjecati na detekciju LIBS metodom. Uzorci mogu biti svježi, smrznuti, osušeni na zraku, fiksirani organskim otapalom, ugrađeni u parafin fiksirani formalinom ili uzorci peleta. Kožno se tkivo može sušiti, mljeti i na kraju prešati pod tlakom od 1 T kako bi se dobio pelet. Osim načina fiksacije na uspješnost snimanja veoma djeluje debljina i morfologija uzorka. LIBS signali biološkog tkiva mogu biti narušeni primjerice mekoćom površine, sadržajem vlage, debljinom tkiva i strukturalnim varijacijama u tkivu. Prikladna fiksacija je važna jer može sačuvati morfološka obilježja tkiva i očvrnuti ga za daljnju obradu. LIBS signali smrznutih i debelo rezanih uzoraka tkiva pokazali su dobre rezultate. Fiksiranje formalinom i ugradnja u parafin (FFPE, engl. *formalin-fixed parafin-embedded*) može čuvati tkivo za retrospektivne studije, no tijekom ugradnje u parafin i uklanjanja voska mogu zaostati artefakti. Svježi uzorci pokazuju dovoljnu jakost LIBS signala jedino ako su snimljeni unutar minimalnog eksperimentalnog vremenskog okvira.(34)

### 5.3.1. Hepatocelularni karcinom

Karcinom jetre je najčešće povezan s prethodnom upalom i cirozom jetre. Smatra se za šesto najčešćije primarno sjelo raka u ljudi.(31) Kumar i suradnici LIBS metodom su mjerili tkivo jetre u pasa. Došli su do zaključka da su omjeri koncentracija kalcija (Ca), natrija (Na), bakra (Cu) prema kaliju (K) veći u uzorku karcinoma u usporedbi sa zdravim uzorkom. Plazma emisijska spektroskopija (ICPES, engl. *inductively coupled plasma emission spectroscopy*) potvrdila je rezultate dobivene LIBS metodom.(35) Plazma emisijska spektroskopija je analitička metoda koja koristeći fotofizikalni signal određuje molekularano ustrojstvo uzorka. Plazma emisijska spektroskopija za razliku od laserske koristi aerosolizirane uzorke, a plazmu dobiva od argona.(36) Hinojosa i suradnici su koristili LIBS metodu za razlikovanje kronične ozljede jetre od zdravog jetrenog tkiva miševa. Kronična ozljeda jetre može rezultirati jetrenom fibrozom koja je međustadij do stanja poput ciroze, hepatocelularnog karcinoma ili zatajenja jetre. Hinojosa je sa svojim timom osim uspješnog diferenciranja zdravog od malignog jetrenog tkiva pomoću LIBS metode, uspio i u detaljnijoj klasifikaciji jetrenog tkiva miša analizom LIBS nalaza pomoću PCA metode. Analiza principalnih komponenti (PCA, engl. *principal component analysis*) izračunava principalne komponente odnosno linearne kombinacije onih varijabli koje sadrže najviše svojstava zadanih podataka. Raspodijelio je

uzorke prema patohistološkom sustavu METAVIR za identifikaciju tkiva jetre od F0 pri kojem se ovaj stupanj smatra normalnim do F4 stupnja. METAVIR je zlatni standard za kliničku klasifikaciju fibroze jetre. Osim toga, zaključili su da je povećana koncentracija kalcija (Ca) pronađena u cirozi moguća posljedica pojačanog izvanstaničnog i unutarstaničnog nakupljanja kalcija.(37)

### 5.3.2. Zloćudni tumori kostiju

Kod raka kostiju dolazi do oštećenja zdravog tkiva zbog nekontroliranog rasta malignih stanica u stalnom volumenu.(31) Većina slučajeva raka kostiju otpada na osteosarkom. Gill i suradnici su za proučavanje raka kostiju koristili LIBS tehniku te analizirali razliku LIBS spektara nastalih u femtosekundama. Upoređivali su spektre primarnog tumora kosti, sekundarnog tumora kosti te zdravog koštanog tkiva. Rezultati analize principalnih komponenti pokazali su da se razina vrha magnezija (Mg) (516 nm) povećava u usporedbi s intenzitetom vrha kalcija (Ca) (526 nm) u malignom tkivu kosti. Rezultati PCA modela imaju značajno preklapanje spektara istovrsnih uzoraka što govori u prilog velikoj točnosti analize.(38)

### 5.4. Prednosti i nedostaci

Laserska spektroskopija je pionirska dijagnostička metoda koja se pokazala vrlo uspješnom za razlikovanje zdravog od tumorskog tkiva.(34) Jedna od glavnih prednosti LIBS metode je mogućnost snimanja tkiva bez ikakve prethodne pripreme. Ova tehnika na temelju istraživanja provedenih u zadnjih 20 godina pokazuje ne samo sposobnost razlikovanja maligno promijenjenog od zdravog tkiva, nego i prikaz molekularne i stanične distribucije u tkivima. Postoje i mnogi izazovi koji bi se trebali riješiti u cilju poboljšanja mjerenja laserskom spektroskopijom. Tijekom mjerenja primjerice nerijetko dolazi do efekta samoapsorpcije što dovodi do smanjenja intenziteta signala. Usto, efekti matrice odnosno interakcija signala s okolnim tkivnim elementima može utjecati na dobivene spektre. Osim toga, u mnogim istraživanjima znanstvenici su se fokusirali na najpostojanije spektralne linije, često zanemarujući one slabije što može smanjiti vjerodostojnost dobivenih rezultata. Kako bi se smanjila varijabilnost spektralnih linija, a time i povećao broj spektara uzetih u obzir potrebna je bolja standardizacija laserske spektroskopije. Primjeri standardizacije procesa su bolja kalibracija temperature plazme i gustoće elektronskog plina.(32)

## 6. Infracrvena spektroskopija

### 6.1. Princip

Infracrvena je spektroskopija (FTIR, engl. *Fourier-transformed infrared spectroscopy*) analitička metoda koja se koristi za dobivanje infracrvenog emisijskog ili apsorpcijskog spektra uzorka. Uzorci mogu biti u različitim agregacijskim stanjima; čvrstom, tekućem ili plinovitom.(39) Instrument emitira zračenje valne duljine od 10000 do  $100\text{ cm}^{-1}$  unutar područja infracrvene svjetlosti prema uzorku. Jedan dio poslanog zračenja uzorak upija, a drugi dio prolazi kroz njega. Korisna je metoda za dobivanje visoke rezolucije snimanja zbog širokog spektralnog raspona (između  $4000$  i  $400\text{ cm}^{-1}$ ) propuštenog dijela zračenja koji pada na detektor. Propušteni dio spektra koji se detektira jedinstven je za svaku molekulu zbog čega se ova metoda smatra odličnom za kemijsku identifikaciju. Apsorbirani dio spektra pretvara se u rotacijsku ili vibracijsku energiju molekule.(40) Uloga infracrvene spektroskopije je kvantificirati količinu svjetla koju mjereni uzorak upija.(39)

### 6.2. Načini rada

Infracrvena je spektroskopija uz prigušenu totalnu refleksiju (ATR-FTIR, engl. *attenuated total reflection Fourier-transformed infrared spectroscopy*) metoda kojom se nastoji riješiti problem dubine prodiranja infracrvene svjetlosti do samo nekoliko desetaka mikrometara. Usto, kod klasične FTIR metode nema kuta između izvora svjetlosnog snopa i uzorka što otežava reproduciranje rezultata kod snimanja tekućih uzoraka. ATR-FTIR mjeri reflektirani spektar s uzorka. Kako bi se postigla refleksija, ulazni signal prolazi kroz kristal indeksa loma 45 stupnjeva i postiže potpunu unutarnju refleksiju prije izlaska iz kristala i padanja na uzorak. Dubina prodiranja svjetlosnog snopa ATR-FTIR metode manja je od dubine prodiranja klasične FTIR metode i iznosi oko 200 nm. Usprkos tome, činjenica da se ovom metodom mjeri reflektirajući izlazni snop pogodna je za mjerenje debelih ili uzoraka s jakom apsorpcijskom moći, tankih uzoraka bez posebne pripreme te plinova i tekućina. Mikroskopska FTIR tehnika ili mikro-FTIR koristi svjetlosni mikroskop kao nadopunu FTIR instrumentu. Ovakav mehanizam služi za bolje fokusiranje laserskog snopa na određeno područje uzorka određeno mikroskopom. Najmanja promjena na uzorku ili u snopu može se primijetiti ovom tehnikom. Mikro-FTIR koristi se za snimanje čvrstih ili tekućih tankih filmova te visoko osjetljivo prepoznavanje kondenziranih spojeva.(39)

### 6.3. Primjena

FTIR je neinvazivna analitička metoda koja prepoznaje promjene u stanicama koje se mogu vizualizirati u srednjem infracrvenom području. Ona pruža informacije o molekularnom ustrojstvu tkiva na određenom valnom broju. Molekularno ustrojstvo ili promjena istog povezana je s valnim brojem preko veza između atoma u tom tkivu. Budući da biokemijske promjene između zdravih i tumorski promijenjenih tkiva spadaju u raspon valnih brojeva od 1800 do 950  $\text{cm}^{-1}$ , metoda je dovoljno osjetljiva da razlikuje zdrave i neoplastične stanice. Mikro-FTIR ima dodatnu sposobnost razlikovati zdrava i maligna tkiva uspoređujući spektralne vrhove specifične za fosfate, C–O i CH rastezne vibracijske modove. FTIR metoda zahtijeva minimalne količine uzorka bez ikakve pripreme. FTIR se može kombinirati s kemometrijskim metodama poput analize principalnih komponenti za prikupljanje više informacija iz spektra i pregledno razdvajanje spektralnih linija.(41)

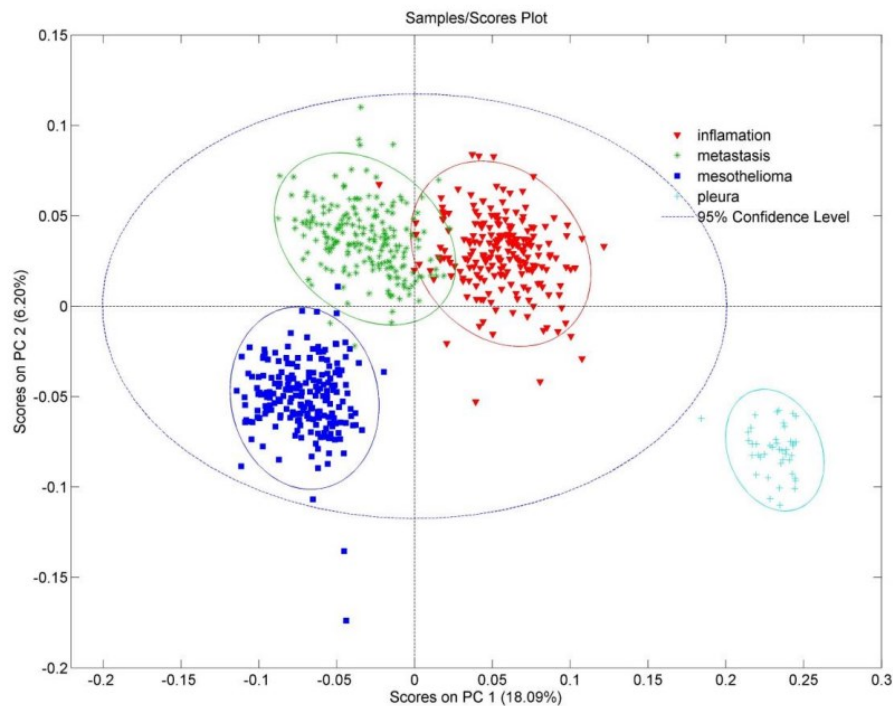
#### 6.3.1. Kolorektalni karcinom

Kolorektalni karcinom ili rak debelog crijeva četvrti je po redu najčešći karcinom po broju oboljelih u svijetu, a treći najčešći uzrok smrti od raka. Njegova prognoza i liječenje ovise o stadiju tumora. Kao dopuna dosad uvriježenim metodama, FTIR se ističe jer može detektirati karcinom debelog crijeva u ranom stadiju.(41) Rezultati zabilježeni pomoću FTIR-a pokazuju očite promjene u spektralnim linijama glavnih strukturnih molekula u malignom tkivu u usporedbi sa zdravim.(42) U drugoj studiji zabilježena je razlika u FTIR spektrima normalnih i maligno promijenjenih tkivnih uzoraka debelog crijeva u spektralnom području od 1800-900  $\text{cm}^{-1}$ . Rezultati nastali kombinacijom ATR-FTIR mikrospektroskopske metode i kemometrijske analize pokazali su točnost od 93,3%, 100%-tnu specifičnost i osjetljivost od 88,2%.(43) Od ostalih pronalazaka, valja istaknuti strukturalne promjene plazme u pacijenata koji boluju od karcinoma koje mogu biti detektirane spektranom analizom(44) te spektralne linije fosfodieterskih i glikogenskih regija u molekulama tumorskog tkiva koje se razlikuju od istovrsnih spektralnih linija zdravog tkiva.(45)

#### 6.3.2 Karcinom pluća

Karcinom pluća vodeća je neoplazma po broju oboljelih u svijetu. Budući da u većini slučajeva dijagnoza ne bude pravovremena, petogodišnje preživljenje je manje od 10%. FTIR metoda počela se istraživati kako bi se dijagnostika ubrzala i analitičke metode unaprijedile. Dosad se FTIR metodom snimao uzorak sputuma, pleuralne tekućine i uzorak plućnog tkiva. Koristeći FTIR mikrospektroskopiju i kemometrijske metode dobiveni su karakteristični spektri za unaprijed identificirane zdrave i tumorske stanice pluća.(41) FTIR analiza stanica sputuma pokazala je visoku osjetljivost i specifičnost u dijagnosticiranju bolesti unutar malog raspona specifičnih valnih brojeva

(46) FTIR metoda otkrila je i biokemijske razlike uzoraka krvi pomoću razlike njihovih spektralnih linija između zdravih i oboljelih pacijenata. Omjer koncentracija nukleinskih kiselina A1080/A1170 detektabilan spektroskopski je koristan za razlikovanje zdravog seruma od seruma pacijenata s karcinomom pluća. Pleuralna tekućina korištena je za utvrđivanje strukturalnih promjena koristeći mikroskopsku FTIR spektroskopiju.(47) Zamjetna spektralna razlika mjerena je između glikogenske i fosfodiesterske skupine nukleinskih kiselina oboljelih pacijenata i zdravih pri omjeru valnih brojeva  $1030$  i  $1080\text{ cm}^{-1}$ . Zhang i suradnici primijetili su da relativni intenzitetni omjeri I1080/I1160, I1240/I1310, I1460/I1400 i I1640/I1550 pridonose lakšem razlikovanju nekanceroznih i kancerogenih tkiva usporedbom FTIR spektra.(48) FTIR se metoda u sprezi s analizom principalnih komponenti pokazala uspješnom i u razlikovanju više vrsta pleuralnih lezija poput mezotelioma, upalnih promjena te metastatskih infiltrata od normalnog pleuralnog tkiva.(49) (Slika 3.)



Slika 3. PCA model za razlikovanje upalnih promjena (crveno), metastatskih infiltrata (zeleno), mezotelioma (tamnoplavo) i normalnog pleuralnog tkiva (svijetloplavo). Preuzeto iz Sadiku-Zehri i sur. (2020). *Differentiating Between Malignant Mesothelioma and Other Pleural Lesions Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Applied spectroscopy* (49)

#### 6.4. Prednosti i nedostaci

FTIR spektroskopija pokazuje veliki potencijal kao neinvazivna metoda u dijagnosticiranju raznih tumora. Ova metoda ne zahtijeva pripremu tkiva i može snimati uzorke koji su u bilo kojem od triju osnovnih agregacijskih stanja.(39) Ima visoku rezoluciju snimanja i prikazuje jasne razlike u

spektralnim linijama proteina, lipida i nukleinskih kiselina u zdravom i tumorski promijenjenom tkivu. Unatoč tome, problematičan je uski omjer spektralnih linija koje ova metoda bilježi u usporedbi sa širokim rasponom spektralnih linija koje se gube zbog autoapsorpcije. Modernizacija metode koja je dobivena razvojem softvera koji analiza FTIR podatke uvelike je pridonijela efikasnosti i brzini dijagnostike.(41)

## 7. Digitalna patologija

### 7.1. Princip

Temelj je digitalne patologije mogućnost digitalizacije uzoraka tkiva na staklenim pločicama.(50) Proces započinje fiksiranjem bioptičkog uzorka i uklapanjem u parafin. Nakon rezanja bloka, rez se stavlja na predmetno staklo te se primjeni željeno obojenje. Obojeni se preparat potom stavlja u skener pločica visoke rezolucije (engl. *slide scanner*).(51) Moguće je linijsko skeniranje ujednačenim i kontinuiranim pomicanjem platforme ili korištenje kamere koja skenira kvadratne dijelove uzorka jedan po jedan. Računalno se skenovi tkivnih presjeka spajaju i stvara se sveobuhvatna slika preparata (WSI, engl. *whole slide imaging*). Putem preglednika slika, slike se mogu pregledavati. Moguće su tehnike uvećanja slike i navigiranja u svakom smjeru.(52) Duboko učenje (engl. *deep learning*) svojevrsna je nadogradnja preparata digitalnim slikama. Ova metoda korisna je jer joj nije potrebno unošenje zahtjeva operatera za izdvajanje varijabli.(50) Primjenjuje sustav konvolucijskih neuronskih mreža (CNN, engl. *convolutional neural network*) za analizu slike. Ovakva višeslojna neuronska mreža podijeljena je u slojeve koji primjenjuju iste lokalne transformacije na različitim mjestima slike. Slojevi su međusobno povezani neuronima koji izračunavaju razliku između slojeva na temelju vektora težine i pomaka te tako dublje analiziraju sliku i donose njezinu novu reprezentaciju.(51)

### 7.2. Načini rada

Tijekom pregledavanja slike u pregledniku, osim orijentacije po slici u svim smjerovima, moguće je i postavljanje oznaka te mjerenje duljine između određenih točaka. Preglednici imaju sposobnost prikazivati nekoliko skenova istovremeno jedan pored drugog što pomaže u uspoređivanju preparata. Osim toga, nekoliko patologa diljem svijeta može istovremeno gledati istu sliku. Slika se može pohraniti u elektronički zdravstveni karton pacijenta što osigurava dugotrajnu pohranu. Ova mogućnost pruža istu kvalitetu prikaza preparata koja ne opada tijekom vremena. Postoje i skeneri koji koriste više objektivna za snimanje više fokusnih linija koje kad se sklope daju trodimenzionalni prikaz preparata. Usto, postoje i posebni skeneri s fluorescentnim optikama koji mogu slikati preparate obilježene fluorescentnim bojanjem. Fluorescentne digitalne slike rješavaju problem

blijeđenja fluorescetne boje tijekom vremena u usporedbi s klasičnim načinom pohrane preparata te su dostupne za automatizirani način obrade slike poput primjene FISH metode.(52)

### 7.3. Primjena

Primjena digitalnih metoda u patologiji može se podijeliti u tri velika područja. Kao prvo područje može se izdvojiti nastava iz patologije na medicinskim fakultetima. Uobičajeno je bilo promatranje preparata pod višeglavnim mikroskopima uživo. Ovakva metoda bila je ograničena na broj mikroskopa, vrijeme nastave te studentske mogućnosti pravilnog podešavanja mikroskopa.

Primjenom WSI metode nastavnici i studenti mogu učiti na daljinu, vrijeme više nije ograničavajući faktor, a metodom označavanja struktura i povezivanja s različitim upitnicima u softveru, nastavnici osiguravaju da studenti sve potrebno uoče na preparatu. WSI metoda zahtijeva pravilan rad softvera kako bi se ova metoda mogla koristiti u nastavi. Drugo značajno polje u kojem digitalna patologija pokazuje poboljšanje je dijagnostika. U dijagnostici, WSI tehnika je razriješila probleme niske rezolucije slike i povećala brzinu skeniranja te lakoću korištenja. Telemedicinskim dijeljenjem digitalnih slika olakšale su se konzultacije za dijagnosticiranje kompliciranijih slučajeva. Za dosadašnje potrebe konzultacija na daljinu preparati su se morali slati poštom. Usto, točnost dijagnosticiranja smrznutih rezova se znatno poboljšala nakon njihove digitalizacije. Digitalne slike omogućile su razvoj raznih programa koji mogu prepoznati češća područja interesa i jednostavnije diferencijalno dijagnostičke razlike što znatno skraćuje vrijeme potrebno za analizu. Osim dijagnostike, isti dosezi primjenjivi su i kod istraživanja. Promjene u arhiviranju preparata ističu se kao treći napredak digitalne patologije. Nije potreban veliki prostor za fizičko arhiviranje ni složena logistika. Preparat se trajno digitalno pohranjuje i dostupan je svima s pristupom u neograničenom vremenu. Kvaliteta digitalne slike je konstatna i ne prijete joj propadanje ili razbijanje kao preparatu na staklu. Digitalna slika se može pohraniti u karton pacijenta što olakšava i sistematizira proces dijagnostike i liječenja.(52)

#### 7.3.1. Tumorski mikrookoliš

Tumorski se mikrookoliš (TME, engl, *tumor microenvironment*) sastoji od složenih molekularnih proces i interakcija koje izravno utječu na tumorski rast i progresiju. Za njegovo proučavanje uobičajene su imunohistokemijske metode određivanja koncentracije i prostornog raspored pojedinih biomarkera. Digitalna se patologija usmjerava na analizu limfocita koji infiltriraju tumor (TIL, *tumor infiltration lymphocytes*) koji pokazuju odgovor imunološkog sustava organizma na rast tumora. Neke imunološke reakcije poput aktivacije makrofaga ili infiltracija solidnih tumora specijaliziranim T regulatornim limfocitima mogu biti dobar prediktivni pokazatelj u tumorskom razvoju. Povećanje



koncentracije CD8<sup>+</sup> limfocita T u tumorskom mikrookolišu isto je znak dobre prognoze za pacijenta. Vežanje receptora i liganda u TME isto je detektabilno korištenjem digitalne patologije. Primjerice, gen LAG-3 za aktivaciju limfocita (LAG, engl. *lymphocyte activating gene*) izražen je na iscrpljenim T limfocitima i veže se za receptor glavnog histokompatibilnog kompleksa II (MHC-II, engl. *major histocompatibility complex*) koji se ispoljava na površini antigen prezentirajućih stanica koje u ovom slučaju prezentiraju tumorske antigene limfocitima. Prostorna analiza tumora mokraćnog mjehura i želuca pokazala je da su gustoća i blizina LAG-3<sup>+</sup> bili značajno veći u slučaju povezanosti s MHC II<sup>+</sup> u usporedbi s MHC II<sup>-</sup> tumorskim stanicama. Ovo svojstvo pokazuje da se iscrpljeni limfociti nakupljaju u blizini MHC II<sup>+</sup> stanica kako bi se vezanjem LAG-3 proteina i MHC II<sup>+</sup> pojačao antitumorski imunološki odgovor.(50)

### 7.3.2. Genomske značajke

Genomska istraživanja nerijetko iziskuju puno financijskih izdataka i vremena te se mogu pokazati neuspješnim zbog strogih propisanih uvjeta i zahtjeva za uzorcima. Kako bi se poboljšala točnost istraživanja i pojednostavila metodologija, moguća je primjena konvolucijskih neuralnih mreža u sklopu dubokog učenja. Kao primjer izdvajamo neuralnu konvolucijsku mrežu koja je na temelju ulaznih podataka o preparatima hepatocelularnog karcinoma obojenih H&E metodom uspješno predvidjela četiri (CTNNB1, FMN2, TP53 i ZFX4) od 10 najučestalijih mutiranih prognostičkih gena.(53) Drugo istraživanje pokazuje još veću uspješnost predviđanja mutiranih gena specifičnih za adenokarcinom pluća jer je neuralna konvolucijska mreža ispravno predvidjela čak njih 6 (STK11, EGFR, FAT1, SETBP1, KRAS i TP53) na temelju prethodnog WSI treninga.(54)

### 7.4. Prednosti i nedostaci

U ovom ćemo odlomku ponoviti neke već navedene prednosti poput mogućnosti pregledavanja digitalnih slika od strane više patologa istovremeno, postojanosti kvalitete takvih slika te lakoće dugotrajnog digitalnog pohranjivanja. Ne smijemo zaboraviti ni stvaranje dubokog učenja odnosno konvolucijskih neuronskih mreža i raznih algoritama za automatiziranu analizu preparata.(50) Kao jedan od važnih nedostataka u edukaciji, ali i kliničkoj praksi nameće se nedostatak vještine korištenja svjetlosnog mikroskopa zbog isključive upotrebe digitalne patologije.(52) Unatoč smanjenju troškova pohrane i pripreme preparata pri čestim ponavljanim promatranjima, digitalna patologija iziskuje mnoga financijska sredstva za kupnju opreme i softvera. Osim toga, razvijanje algoritama i utreniranih neuronskih mreža ponekad zahtijeva mnogo vremena te je ograničeno na veličinu dostupnih baza podataka.(50)

## **8. Zaključci**

Zlatni standard dijagnostičke rutinske prakse u patologiji je patohistološka analiza koja koristi svjetlosni mikroskop kao glavni instrument za vizualizaciju tkiva. Napretkom tehnologije, nastale su brojne alternativne metode prikaza tkiva. Metode poput masene spektrometrije, mikroskopije atomskih sila, Ramanove, laserske i infracrvene spektroskopije pružaju dodatne informacije o uzorcima i ubrzavaju cijeli proces analize. Primjena ovakvih metoda nadopunjuje rutinski način analize. Digitalna se patologija, u sprezi s umjetnom inteligencijom, pokazala kao metoda koja će patohistološku analizu povezati s dodatnim saznanjima, a digitalizirane preparate s mnogim patolozima.

## **9. Zahvale**

Najveće hvala mojoj mentorici doc.dr.sc. Ani Šepac na ukazanom povjerenju i dragocjenom vodstvu tijekom izrade ovog rada.

Posebno hvala prof.dr.sc. Svenu Seiwerthu na nesebičnoj podršci i korisnim savjetima.

Neizmjeno hvala mojim roditeljima jer su takvi kakvi jesu i jer bez njihove ljubavi i truda ne bih bila to što jesam.

Hvala mojim prijateljima jer su mi uljepšavali svaki slobodni trenutak tijekom ovih 6 godina.

## 10. Popis literature

1. Reid R, Roberts F, MacDuff E. Pathology Illustrated E-Book [Internet]. Google Books. Elsevier Health Sciences; 2011 [cited 2024 Jun 17]. Available from: <https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=OWnHAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=1.%09Reid+R>
2. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Patologija. 5. izdanje. Zagreb: 2018.
3. Makki JS. Diagnostic Implication and Clinical Relevance of Ancillary Techniques in Clinical Pathology Practice. Clinical Medicine Insights: Pathology [Internet]. 2016 Jan;9:CPATH.S32784. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4807883/>
4. Fung AWS, Sugumar V, Ren AH, Kulasingam V. Emerging role of clinical mass spectrometry in pathology. Journal of Clinical Pathology. 2019 Nov 5;73(2):61–9.
5. Aichler M, Walch A. MALDI Imaging mass spectrometry: current frontiers and perspectives in pathology research and practice. Laboratory Investigation. 2015 Jan 26;95(4):422–31.
6. Kriegsmann J, Kriegsmann M, Casadonte R. MALDI TOF imaging mass spectrometry in clinical pathology: A valuable tool for cancer diagnostics (Review). International Journal of Oncology. 2014 Dec 4;46(3):893–906.
7. Seeley EH, Caprioli RM. Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008 Sep 5;105(47):18126–31.
8. Seeley EH, Caprioli RM. Imaging mass spectrometry: Towards clinical diagnostics. PROTEOMICS - CLINICAL APPLICATIONS. 2008 Oct;2(10-11):1435–43.
9. Rauser S, Marquardt C, Balluff B, Deininger SO, Albers C, Belau E, et al. Classification of HER2 Receptor Status in Breast Cancer Tissues by MALDI Imaging Mass Spectrometry. Journal of Proteome Research. 2010 Mar 5;9(4):1854–63.
10. Walch A, Rauser S, Deininger SO, Höfler H. MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: a new frontier for molecular histology. Histochemistry and Cell Biology. 2008 Jul 11;130(3).
11. Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. Chemotherapy Research and Practice [Internet]. 2012;2012(743193):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3539433/>
12. Tim, Balluff BD, Jones EA, Schöne CD, Schmitt M, Aubele M, et al. Multicenter Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging (MALDI MSI) Identifies

- Proteomic Differences in Breast-Cancer-Associated Stroma. *Journal of proteome research*. 2014 May 2;13(11):4730–8.
13. Casadonte R, Kriegsmann M, F. Zweynert, Friedrich K, Bretton G, Otto M, et al. Imaging mass spectrometry to discriminate breast from pancreatic cancer metastasis in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. 2014 Mar 5;14(7-8):956–64.
  14. Stylianou A, Kontomaris SV, Grant C, Alexandratou E. Atomic Force Microscopy on Biological Materials Related to Pathological Conditions. *Scanning* [Internet]. 2019 May 12 [cited 2020 May 10];2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6535871/>
  15. 9.2: Atomic Force Microscopy (AFM) [Internet]. *Chemistry LibreTexts*. 2016 Available from: [9.2: Atomic Force Microscopy \(AFM\) - Chemistry LibreTexts](#)
  16. Rabiei M, Palevicius A, Dashti A, Nasiri S, Monshi A, Vilkauskas A, et al. Measurement Modulus of Elasticity Related to the Atomic Density of Planes in Unit Cell of Crystal Lattices. *Materials*. 2020 Oct 1;13(19):4380.
  17. Kii TM, Park S. Nano-scientific Application of Atomic Force Microscopy in Pathology: from Molecules to Tissues. *International Journal of Medical Sciences*. 2020;17(7):844–58.
  18. Chasiotis I, Fillmore HL, Gillies GT. Atomic force microscopy measurement of cytostructural elements involved in the nanodynamics of tumour cell invasion. *Nanotechnology*. 2003 Apr 9;14(5):557–61.
  19. Fillmore HL, Chasiotis I, Cho SW, Gillies GT. Atomic force microscopy observations of tumour cell invadopodia: novel cellular nanomorphologies on collagen substrates. *Nanotechnology*. 2002 Dec 20;14(1):73–6.
  20. Laurent VM, Duperray A, Sundar Rajan V, Verdier C. Atomic Force Microscopy Reveals a Role for Endothelial Cell ICAM-1 Expression in Bladder Cancer Cell Adherence. Pelling A, editor. *PLoS ONE*. 2014 May 23;9(5):e98034.
  21. Małgorzata Lekka, Laidler P, Gil D, Lekki J, Stachura Z, Hryniewicz AZ. Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *European Biophysics Journal*. 1999 Jan 1;28(4):312–6.
  22. Kozik A, Pavlova M, Petrov I, Bychkov V, Kim L, Dorozhko E, et al. A review of surface-enhanced Raman spectroscopy in pathological processes. *Analytica Chimica Acta*. 2021 Dec;1187:338978.
  23. Kallaway C, Almond LM, Barr H, Wood J, Hutchings J, Kendall C, et al. Advances in the clinical application of Raman spectroscopy for cancer diagnostics. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2013 Sep;10(3):207–19.

24. Eberhardt K, Stiebing C, Matthäus C, Schmitt M, Popp J. Advantages and limitations of Raman spectroscopy for molecular diagnostics: an update. Expert review of molecular diagnostics [Internet]. 2015;15(6):773–87. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25872466>
25. Motz J, Fitzmaurice M, Miller A, et al. In vivo Raman spectral pathology of human atherosclerosis and vulnerable plaque. J Biomed Opt 2006;11(2):021003.
26. Roy S, Gord JR, Patnaik AK. Recent advances in coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy: Fundamental developments and applications in reacting flows. 2010 Apr 1;36(2):280–306.
27. Stone N, Hart Prieto M, Crow P, et al. The use of Raman spectroscopy to provide an estimation of the gross biochemistry associated with urological pathologies. Anal Bioanal Chem 2007;387(5):1657-68.
28. Bergholt MS, Zheng W, Ho KY, et al. Fiberoptic confocal raman spectroscopy for real-time in vivo diagnosis of dysplasia in Barrett’s esophagus. Gastroenterology 2014; 146(1):27-32.
29. Hawi SR, Campbell WB, Kajdacsy-Balla A, et al. Characterization of normal and malignant human hepatocytes by Raman microspectroscopy. Cancer Lett 1996; 110(1):35-40.
30. Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications [Internet]. Vol. 11, ScienceDirect. Elsevier; 2005. p. 227–56. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1387265605110072>
31. Khan MN, Wang Q, Idrees BS, Xiangli W, Teng G, Cui X, et al. A review on Laser-induced breakdown spectroscopy in different cancers diagnosis and classification. Front Phys [Internet]. 2022;10. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fphy.2022.821057>
32. Manrique J, Garrido P, Velasco J. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy in Biological Samples: A Review of Experiments with Soft Tissues. Atoms [Internet]. 2024 Apr 1 [cited 2024 Jun 17];12(4):21. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-2004/12/4/21>
33. Kiss K, Šindelářová A, Krbal L, Stejskal V, Mrázová K, Vrábel J, et al. Imaging margins of skin tumors using laser-induced breakdown spectroscopy and machine learning. Journal of Analytical Atomic Spectrometry [Internet]. 2021;36(5):909–16. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/ja/d0ja00469c>
34. Wang Q, Wenting Xiangli, Teng G, Cui X, Wei K. A brief review of laser-induced breakdown spectroscopy for human and animal soft tissues: pathological diagnosis and physiological detection. 2021 Mar 16;56(3):221–41.
35. Kumar A, Yueh FY, Singh JP, Burgess S. Characterization of malignant tissue cells by laser-induced breakdown spectroscopy. Applied Optics. 2004 Oct 1;43(28):5399.

36. Levine M. ICP-OES – ICP Chemistry, ICP-OES Analysis, Strengths and Limitations [Internet]. Analysis & Separations from Technology Networks. 2021. Available from: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/icp-oes-icp-chemistry-icp-oes-analysis-strengths-and-limitations-342265>
37. E. Teran-Hinojosa, Sobral H, C. Sánchez-Pérez, A. Pérez-García, N. Alemán-García, J. Hernández-Ruiz. Differentiation of fibrotic liver tissue using laser-induced breakdown spectroscopy. *Biomedical optics express*. 2017 Jul 24;8(8):3816–6.
38. Gill RK, Smith ZJ, Panchal RR, Bishop JW, Gandour-Edwards R, Wachsmann-Hogiu S. Preliminary fsLIBS study on bone tumors. *Biomedical optics express*. 2015 Nov 16;6(12):4850–0.
39. Fadlelmoula A, Pinho D, Carvalho VH, Catarino SO, Minas G. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to Analyse Human Blood over the Last 20 Years: A Review towards Lab-on-a-Chip Devices. *Micromachines* [Internet]. 2022 Jan 26;13(2):187. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-666X/13/2/187>
40. RTI Laboratories. FTIR Analysis | RTI Laboratories [Internet]. Rtilab.com. 2015. Available from: <https://rtilab.com/techniques/ftir-analysis/>
41. Kumari A, Kaur J, Bhattacharyya S. Application of Fourier Transform-Infrared Spectroscopy as a Tool for Early Cancer Detection. *American journal of biomedical sciences*. 2018 Jul 1
42. Shmuel Argov, Sahu R, E. Bernshtain, Salman A, Shohat G, Udi Zelig, et al. Inflammatory bowel diseases as an intermediate stage between normal and cancer: A FTIR-microspectroscopy approach. 2004 Jan 1;75(5):384–92.
43. Khanmohammadi M, Garmarudi AB, Ghasemi K, Jaliseh HK, Kaviani A. Diagnosis of colon cancer by attenuated total reflectance-fourier transform infrared microspectroscopy and soft independent modeling of class analogy. *Medical Oncology*. 2008 Nov 7;26(3):292–7.
44. Ostrovsky E, Udi Zelig, Gusakova I, Ariad S, Shaul Mordechai, Nisky I, et al. Detection of Cancer Using Advanced Computerized Analysis of Infrared Spectra of Peripheral Blood. *IEEE transactions on bio-medical engineering/IEEE transactions on biomedical engineering*. 2013 Feb 1;60(2):343–53.
45. Wong PT, Wong RK, Caputo TA, Godwin TA, Rigas B. Infrared spectroscopy of exfoliated human cervical cells: evidence of extensive structural changes during carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88(24): 10988-10992.
46. Lewis PD, Lewis KE, Ghosal R, Bayliss S, Lloyd AJ, Wills J, et al. Evaluation of FTIR Spectroscopy as a diagnostic tool for lung cancer using sputum. *BMC Cancer*. 2010 Nov 23;10(1)

47. Wang HP, Wang HC, Huang YJ. Microscopic FTIR studies of lung cancer cells in pleural fluid. *Sci Total Environ* 1997; 204(3): 283- 287.
48. Zhang L, Wang JS, Yang ZL, Xu YZ, Weng SF, Shi JS, Wu JG. The difference of FTIR spectroscopic studies on normal and malignant tissues of lung. *Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese* 2003; 24(12): 2173-2176.
49. Fatlinda Sadiku-Zehri, Ozren Gamulin, Marko Škrabić, Ardita Qerimi-Krasniqi, Filip Sedlić, Šepac A, et al. Differentiating Between Malignant Mesothelioma and Other Pleural Lesions Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Applied spectroscopy*. 2020 May 29;74(7):808–18.
50. Baxi V, Edwards R, Montalto M, Saha S. Digital pathology and artificial intelligence in translational medicine and clinical practice. *Modern Pathology*. 2021 Oct 5;35(1).
51. Acs B, Rantalainen M, Hartman J. Artificial intelligence as the next step towards precision pathology. *Journal of Internal Medicine*. 2020 Mar 3;288(1):62–81.
52. Al-Janabi S, Huisman A, Van Diest PJ. Digital pathology: current status and future perspectives. *Histopathology*. 2011 Apr 11;61(1):1–9.
53. Chen M, Zhang B, Topatana W, Cao J, Zhu H, Juengpanich S, et al. Classification and mutation prediction based on histopathology H&E images in liver cancer using deep learning. *npj Precision Oncology* [Internet]. 2020 Jun 8 [cited 2023 May 13];4(1):1–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41698-020-0120-3>
54. Coudray N, Ocampo PS, Sakellaropoulos T, Narula N, Snuderl M, Fenyö D, et al. Classification and mutation prediction from non–small cell lung cancer histopathology images using deep learning. *Nature Medicine*. 2018 Sep 17;24(10):1559–67.



## **12. Životopis**

Rođena sam 4.8.1999. godine u Zagrebu. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja u V. gimnaziji, upisujem Medicinski fakultet u Zagrebu 2018. godine. Od 2019. do 2022. bila sam demonstrator na Katedri za anatomiju i kliničku anatomiju, a od 2022. do 2023. na Katedri za patofiziologiju. Tijekom studija pisala sam za studentski časopis Medicinar, bila aktivna članica Studentske sekcije Hipokart i držala edukacije u sklopu projekta „Budi mRAK“. Kao pasivni sudionik prisustvovala sam CROSS17 kongresu, a volontirala sam na kongresu CROSS18. Suosnivačica sam i prva predsjednica Studentske sekcije za patologiju. U slobodno se vrijeme bavim plesom i idem u teretanu. Govorim engleski, njemački i talijanski jezik.