

# IR-spektroskopska analiza seruma bolesnica s karcinomom dojke

---

**Vučičević, Vita**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:022097>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-09**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Vita Vučićević  
0058217302**

**IR-spektroskopska analiza seruma bolesnica s  
karcinomom dojke**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Instrumentalna analiza**

**Mentor: prof. dr. sc. Lidiya Barišić**

**Zagreb, 2022.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

## IR-spektroskopska analiza seruma bolesnica s karcinomom dojke

Vita Vučićević, 0058217302

**Sažetak:** Karcinom dojke najučestalija je vrsta karcinoma među ženama diljem svijeta. Najčešće korištene metode za identifikaciju karcinoma dojke su mamografija, ultrazvučni pregled te biopsija. IR-spektroskopska analiza seruma karcinoma dojke ima brojne prednosti pred navedenim metodama. Zahvaljujući svojoj jednostavnosti, brzini, točnosti, niskoj cijeni, mogućnosti automatizacije te jednostavnoj pripremi uzoraka, IR-spektroskopija smatra se obećavajućom metodom za dijagnosticiranje i praćenje razvoja karcinoma dojke. IR-spektroskopija primijenjena je kao nova dijagnostička metoda za razlikovanje kancerogenih uzoraka od zdravih, kao i različitih vrsta karcinoma, uz visoku točnost, specifičnost i osjetljivost. U kombinaciji s Ramanovom spektroskopijom te različitim kemometrijskim pristupima, IR-spektroskopija omogućuje brzo dijagnosticiranje bolesti u ranim fazama razvoja, kao i daljnje praćenje bolesti i primijenjenog tretmana. Otkrićem nove i učinkovite dijagnostičke metode povećava se vjerojatnost izlječenja pacijentica, a povećavaju se i mogućnosti same terapije.

**Ključne riječi:** karcinom dojke, IR-spektroskopija, serum

**Rad sadrži:** 31 stranica, 12 slika, 2 tablice, 50 literaturnih navoda, 1 prilog

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Lidija Barišić

**Datum obrane:** 7. rujna 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry  
Laboratory for Organic Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

### IR-spectroscopic analysis of serum of breast cancer patients

Vita Vučićević, 0058217302

**Abstract:** Breast cancer is the most common type of cancer among women worldwide. The most commonly used methods for identifying breast cancer are mammography, ultrasound and biopsy. IR-spectroscopic analysis of breast cancer serum has numerous advantages over the methods mentioned above. Owing to its simplicity, rapidness, accuracy, low cost, possibility of automation and simple preparation of samples, IR-spectroscopy is considered a promising method for diagnosing and monitoring the development of breast cancer. IR-spectroscopy has been applied as a new diagnostic method for distinguishing cancerous samples from healthy ones, as well as different types of cancer, with high accuracy, specificity and sensitivity. In combination with Raman spectroscopy and various chemometric approaches, IR-spectroscopy enables rapid diagnosis of the disease in the early stages of development, as well as further monitoring of the disease and the applied treatment. With the discovery of a new and effective diagnostic method, the probability of healing patients increases, as well as the possibilities of the therapy itself.

**Keywords:** breast cancer, IR-spectroscopy, serum

**Thesis contains:** 31 pages, 12 figures, 2 tables, 50 references, 1 supplement

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Lidiya Barišić

**Thesis defended:** September 7, 2022

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. PRIMJENA IR-SPEKTROSKOPIJE.....	2
2.1. IR-SPEKTROSKOPIJA U DIJAGNOSTICIRANJU KARCINOMA.....	2
2.2. IR-SPEKTROSKOPIJA S FOURIEROVOM TRANSFORMACIJOM (FT-IR SPEKTROSKOPIJA) .....	3
2.3. KARCINOM DOJKE I VAŽNOST PRIMJENE IR-SPEKTROSKOPIJE U NJEGOVOM DIJAGNOSTICIRANJU.....	5
3. ANALIZA SERUMA KARCINOMA DOJKE.....	6
3.1. PRIMJENA RAMANOVE I IR-SPEKTROSKOPIJE U IDENTIFIKACIJI KARCINOMA DOJKE.....	6
3.1.1. Metode i materijali.....	7
3.1.2. Rezultati istraživanja.....	7
3.1.3. Rasprava i zaključak istraživanja.....	13
3.2. IR-SPEKTROSKOPIJA I KEMOMETRIJSKI PRISTUP U KARAKTERIZACIJI KARCINOMA DOJKE...	14
3.2.1. Metode i materijali.....	15
3.2.2. Rezultati istraživanja.....	15
3.2.3. Rasprava i zaključak istraživanja.....	24
4. ZAKLJUČAK.....	26
5. POPIS LITERATURE .....	28
6. PRILOG	

## 1. UVOD

Karcinom dojke najučestalija je vrsta karcinoma među ženama diljem svijeta. Svake godine u svijetu se dijagnosticira 1,67 milijuna novih slučajeva, a više od 500 000 žena umre od iste bolesti. [1] Iz tog razloga od iznimne je važnosti brza i rana dijagnoza kako bi se primjenom odgovarajućih terapija spriječilo daljnje napredovanje bolesti, a stopa preživljenja pacijenata uvelike povećala.

Najčešće korištene metode za identifikaciju karcinoma dojke su mamografija i ultrazvučni pregled, a "zlatni standard" u metodama je biopsija (medicinska tehnika koja uključuje uzimanje stanica ili tkiva radi postavljanja dijagnoze). [2]

Posljednjih godina infracrvena (IR, eng. *Infrared*) spektroskopija doživjela je veliki napredak te se počela primijenjivati u dijagnosticiranju različitih bolesti uključujući i karcinom dojke. Zbog svoje jednostavnosti, brzine, točnosti, niske cijene i mogućnosti automatizacije, IR-spektroskopija smatra se obećavajućom metodom za dijagnosticiranje i praćenje razvoja karcinoma dojke.

IR-spektroskopija jedna je od najčešće korištenih spektroskopskih tehnika za detekciju, odnosno identifikaciju funkcijskih skupina prisutnih u organskim spojevima. Kada govorimo o IR-spektroskopiji, podrazumijevamo infracrveno područje spektra elektromagnetskog zračenja u rasponu od 800-10<sup>6</sup> nm. Infracrveni fotoni uzrokuju pojačanu vibraciju grupa atoma ovisno o prirodi njihovih međusobnih veza. Različite vibracije odgovaraju različitim energijama pa tako molekule apsorbiraju infracrveno zračenje pri točno određenim valnim duljinama, odnosno frekvencijama. Razlikujemo dvije vrste vibracija, rastezne i deformacijske. Rastezne vibracije događaju se uz samu liniju veze uzrokujući promjenu duljine veze, dok se deformacijske vibracije ne događaju uzduž veze, ali uzrokuju promjenu veznog kuta (svijanje veze). IR-spektar je snimka apsorbiranog svjetla kao funkcija valne duljine. U apsorpcijskim IR-spektrima umjesto frekvencije koristi se srodna fizikalna veličina, tzv. valni broj ( $\tilde{\nu}$ ) izražen u cm<sup>-1</sup>, a predstavlja omjer frekvencije ( $\nu$ ) i brzine svjetlosti ( $c$ ). Molekule apsorbiraju samo ono svjetlo čija frekvencija točno odgovara frekvenciji jedne od vibracija veze, odnosno frekvencija zračenja i vibracije moraju biti jednake da bi došlo do apsorpcije. Apsorbirana energija povećava amplitudu vibracije te se eksperimentalnim određivanjem valnog broja apsorbirane energije može ustanoviti koju vrstu veza sadrži promatrana molekula. [3]

Cilj ovog preglednog Završnog rada bio je opisati IR-spektroskopsku analizu uzoraka seruma pacijentica s karcinomom dojke s ciljem provođenja što uspješnijeg liječenja.

## 2. Primjena IR-spektroskopije

### 2.1. IR-spektroskopija u dijagnosticiranju karcinoma

IR-spektroskopija jedna je od najčešće korištenih instrumentalnih metoda te pronalazi široku primjenu u biotehnologiji, medicini, biologiji, prehrambenoj industriji te u mnogim drugim područjima. Koristi se za određivanje funkcijskih skupina prisutnih u organskim molekulama te praćenje promjena unutar molekula nastalih uslijed kemijskih i fizikalnih modifikacija pri čemu dolazi do nestanka nekih od postojećih skupina i pojave novih. U prehrambenoj industriji koristi se za praćenje mikrobioloških promjena organskih uzoraka nastalih kao rezultat kvarenja, a u biotehnologiji se primijenjuje za praćenje promjena na kulturama stanica zaraženih različitim virusima i bakterijskim sojevima. [3] U novije vrijeme sve je veći broj provedenih istraživanja o primjeni IR-spektroskopije u probiru i dijagnosticiranju različitih bolesti uključujući i karcinom. Nedostatak visoko specifičnih i osjetljivih metoda za rano dijagnosticiranje karcinoma, koje je od presudne važnosti za daljnje uspješno liječenje, potaknulo je pronalaženje novih inovativnih metoda, među koje se ubraja i IR-spektroskopija. [4] Današnje metode koje se najčešće primjenjuju za dijagnosticiranje karcinoma većinom se izvode kada su kancerogene i predkancerogene lezije vidljive i već sadrže značajne genetske promjene. Neke od dijagnostičkih metoda su invazivne, imaju ograničenu osjetljivost, zahtijevaju mnogo vremena za izvođenje, kao i specijaliziranu stručnu osobu za izvođenje dijagnostičke pretrage. Također su moguće i pogrešne dijagnoze s lažno pozitivnim ili lažno negativnim rezultatima. [5] Klasične kliničke analize za dijagnosticiranje karcinoma ispituju pojedinačne parametre koji uključuju tumorske markere, kao što su karcinoembrijski antigen (CEA), karcinom antigen 15-3 (CA 15-3), tkivni polipeptidni antigen (TPA), receptor za epidermalni faktor rasta (HER-2) i prostata specifični antigen (PSA). No, specifičnost i selektivnost navedenih markera vrlo je niska. [6,7] Stoga su nedostatak visoko osjetljivih i specifičnih biomarkera za karcinom, kao i ograničen broj neinvazivnih i komercijalno pristupačnih metoda nametnuli potrebu za novim i učinkovitijim biomarkerima i dijagnostičkim metodama. [4]

Optičke metode, uključujući spektroskopske tehnike, kroz godine su se pokazale kao izrazito korisne dijagnostičke metode za praćenje kancerogenih promjena. [8] Spektroskopske tehnike relativno su brze te omogućuju *in vivo* ispitivanja što smanjuje vrijeme uzorkovanja i pripreme uzoraka za analizu. Također, omogućuju dijagnosticiranje bolesti u ranim stadijima razvoja kao i praćenje daljnjeg razvoja bolesti i primijenjene terapije. [9] Od spektroskopskih tehnika

posebno se ističe vibracijska spektroskopija budući da i vrlo složene biomolekule poput proteina, šećera, masti i nukleinskih kiselina daju karakteristične apsorpcijske spektre koji pružaju informacije o strukturi ispitanih molekula. Vibracijska spektroskopija uključuje Ramanovu spektroskopiju i IR-spektroskopiju. [10]

Ramanova spektroskopija je tehnika pomoću koje se istražuju vibracijska svojstva materije u čvrstom, tekućem i plinovitom stanju. Za prikupljanje spektroskopskih podataka koristi se neelastičnim raspršenjem svjetla prouzročenim vibracijama i vrtnjom ispitivanih molekula. [11] Primarne prednosti Ramanove spektroskopije u usporedbi s drugim spektroskopskim tehnikama su mogućnost provođenja analize u uvjetima koji ne zahtijevaju vakuum, prisutnost inertnog plina niti specifičnu pripremu uzoraka, uključujući primjenu egzogenih markera. Ramanova spektroskopija komplementarna je IR-spektroskopiji te je njihovim kombiniranjem i analizom dobivenih vibracijskih spektara moguće dobiti informaciju o kemijskom sastavu ispitivanog tkiva. [12] Prednosti kao što su brzina, točnost, niska cijena, sigurnost pacijenata i visoka rezolucija, navedene spektroskopske metode čine sve atraktivnijima. [13] Značajna prednost istraživanja provedenih primjenom IR-spektroskopije je i mogućnost indikacije bioloških molekula bez upotrebe bioloških markera čime se smanjuje cijena analize. Uzorci koji se ispituju, a dobiveni su bez bojanja te nisu podvrgnuti dodatnim kemijskim tretmanima, mogu se gotovo izravno analizirati. Sve navedene značajke spektroskopskih metoda dovode do širokog interesa znanstvenika diljem svijeta za primjenom IR-spektroskopije u dijagnosticanju karcinoma. [9,14,15]

## **2.2. IR-spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FT-IR spektroskopija)**

Mnogi kemičari tradicionalno su koristili infracrvenu spektroskopiju s Fourierovom transformacijom (FT-IR) za karakterizaciju molekulskih struktura. Posljednjih desetljeća prepoznat je potencijal FT-IR spektroskopije za analizu bioloških uzoraka karcinoma. FT-IR spektroskopija visoko je reproducibilna analitička tehnika za ispitivanje strukture i konformacije biomolekula. [3] Značajne prednosti ove metode su njezina jednostavnost, nedestruktivnost prema uzorcima, visoka rezolucija ( $\leq 0,01 \text{ cm}^{-1}$ ), ne zahtijeva primjenu reagensa te je potrebna mala količina uzorka (nanogrami do mikrogrami) uz minimalnu pripremu. FT-IR spektroskopija ima veliki potencijal za kliničke primjene koje uključuju probir, dijagnozu i prognozu karcinoma, kao i kontinuirano praćenje liječenja, progresije ili regresije bolesti. Kako bi se otkrili što bolji načini za dijagnosticiranje i liječenje karcinoma, pomoću FT-IR spektroskopije proučavane su različite vrste bioloških materijala poput krvi,



tkiva, ekstracelularnih vezikula, urina, žuči i sline. [4]

Nadalje, provedena su istraživanja u kojima je FT-IR spektroskopija primijenjena za analizu uzoraka tkiva na molekularnoj razini prije pojave morfoloških promjena. Na taj način moguće je rano otkrivanje karcinoma, kao i objektivna procjena analiziranog uzorka čime se smanjuju moguća neslaganja u tumačenju različitih patologa.

Primjenom FT-IR spektroskopije moguće je identificirati molekulske konformacije, vrste veza, funkcijske skupine i međumolekulske interakcije u biološkom uzorku te tako odrediti biokemijski sastav nukleinskih kiselina, proteina, lipida i ugljikohidrata. Budući da svaka molekula ima jedinstveni IR-spektar ovisno o valnoj duljini i količini apsorbiranog infracrvenog zračenja, primjenom IR-spektroskopije nastaju apsorpcijski IR-spektari s apsorpcijskim vrpama karakterističnima za ispitani uzorak. Promjene koje se događaju u apsorpcijskim IR-spektrima karakteristične su za molekulske promjene kod specifičnih bolesti. Vidljive promjene u IR-spektrima različitih uzoraka pružaju značajne informacije o zdravstvenom stanju svakog pacijenta. Budući da biološki materijali apsorbiraju energiju u srednjem IR području elektromagnetskog spektra ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ), za ispitivanje uzoraka obično su mjerenja provedena u području otiska prsta ( $1450-600\text{ cm}^{-1}$ ) te u području amida I i II ( $1700-1500\text{ cm}^{-1}$ ). Područje viših valnih brojeva ( $3500-2550\text{ cm}^{-1}$ ) odgovara rasteznim vibracijama C–H, O–H, N–H i S–H, dok područje nižih valnih brojeva odgovara savijanju i vibracijama ugljikovodikovog lanca. [16] U tablici 1. prikazane su tipične apsorpcijske vrpce identificirane u biološkim IR-spektrima. [17-19]

Tablica 1. Prikaz tipičnih apsorpcijskih vrpca u biološkim IR-spektrima. [17-19]

Valni broj ( $\text{cm}^{-1}$ )	Organske skupine
3080-2800	Asimetrična i simetrična istezanja C–H veza u proteinima i lipidima.
1745-1725	Esterske karbonilne skupine iz lipida.
1700-1500	Amidne I i II skupine u peptidnim vezama proteina.
1270-1080	Asimetrična i simetrična C–O i P–O područja u DNA, RNA i fosfolipidima.
1200-900	Vibracije veza u glukozi, fruktozi i glikogenu.

Pokazalo se da je FT-IR spektroskopija potencijalno nova dijagnostička metoda za razlikovanje

kancerogenih uzoraka od zdravih, kao i različitih vrsta karcinoma, uz visoku točnost, specifičnost i osjetljivost. Backhaus i sur. (2010.) [20] u svojem su istraživanju proveli analizu uzorka seruma karcinoma dojke primjenom FT-IR spektroskopije u kombinaciji s dvije statističke metode (klaster analiza (eng. *Cluster analysis*, CA) i umjetna neuronska mreža (eng. *Artificial neural networks*, ANN)), uz postizanje 98%-tne osjetljivosti i 100%-tne specifičnosti. Važno je napomenuti da je ovim istraživanjem dokazana i sposobnost FT-IR spektroskopije za razlikovanje karcinoma dojke od drugih vrsta karcinoma, ali i drugih bolesti poput Alzheimerove bolesti, hepatitisa C te koronarnih srčanih bolesti. [4]

### **2.3. Karcinom dojke i važnost primjene IR-spektroskopije u njegovom dijagnosticiranju**

Karcinom dojke smatra se najraširenijim malignim tumorom u žena diljem svijeta. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization*, WHO) 2020. godine evidentirano je 2,3 milijuna žena s dijagnosticiranim karcinomom dojke te 685 000 smrtnih slučajeva. Do kraja 2020. godine zabilježeno je 7,8 milijuna žena s dijagnosticiranim karcinomom dojke u razdoblju od 5 godina. [1,21]

Tumori dojke mogu biti zloćudni (maligni) i dobroćudni (benigni). Karcinom (rak) dojke zloćudni je tumor koji nastaje nekontroliranim diobama stanica u različitim dijelovima dojke. Karcinom dojke može se podijeliti na invazivni i neinvazivni. Invazivni karcinom dojke je karcinom koji se proširio izvan mliječnih kanalića ili režnjića dojke. Može se podijeliti na duktalni invazivni karcinom dojke (čini 80 % svih invazivnih karcinoma) i lobularni invazivni karcinom dojke (čini 10-15% svih invazivnih karcinoma). Neinvazivni karcinom dojke (karcinom *in situ*), za razliku od invazivnog, nema potencijal za širenje po okolnom tkivu, odnosno za metastaziranje izvan tkiva dojke. Ovoj skupini karcinoma pripadaju duktalni karcinom *in situ* (DCIS) i lobularni karcinom *in situ* (LCIS). [22]

Osim navedene podjele karcinomi dojke mogu se klasificirati prema karakterističnim proteinskim receptorima na površini tumorskih stanica. Vezani proteini imaju važnu ulogu u razvoju tumora jer tumorskim stanicama daju poticaj za rast i dijeljenje. Vrsta karcinoma dojke identificira se prisutnošću ili odsutnošću triju receptora koji mogu biti vezani na površini tumorskih stanica, a to su receptor estrogena (ER), receptor progesterona (PR) i humani epidermalni faktor rasta (HER2). Pri određivanju vrste karcinoma postavlja se pozitivna ili negativna dijagnoza na jedan ili više navedenih receptora. [1]

Hormonski (HR) pozitivan karcinom najčešći je karcinom dojke te je prisutan u 80% slučajeva. Karcinom dojke smatra se HR pozitivnim kada tumorske stanica proizvode abnormalne

količine receptora za hormone estrogen i/ili progesteron. HER2 pozitivan karcinom dojke karakterizira prekomjerna količina HER2 proteina vezanog na površini kancerogenih stanica, a javlja se u 20% slučajeva. Najagresivnijom vrstom karcinoma dojke smatra se trostruko negativan karcinom dojke (TNBC). Javlja se u samo 10-20% slučajeva, a karakterističan je po tome što na površini kancerogenih stanica nisu prisutni estrogenski i progesteronski receptori niti prekomjerne količine HER2 proteina. Mehanizmi koji ovu vrstu karcinoma potiču na rast i dijeljenje su nepoznati pa je liječenje ove vrste karcinoma izrazito teško. [1]

Najveći problem u liječenju karcinoma dojke predstavlja postavljanje odgovarajuće dijagnoze. Otkrivanjem vrste karcinoma dojke pacijentici se može pomoći odabirom najučinkovitije terapije za otkrivenu vrstu karcinoma, a moguće je i predvidjeti vjerojatan tijek bolesti i samog liječenja. Budući da karcinom dojke može biti rani i uznapredovali od iznimne je važnosti što ranije otkrivanje karcinoma i postavljanje odgovarajuće dijagnoze. Karcinom dojke koji je dijagnosticiran u ranom stadiju, prije nego što se proširio u okolno tkivo, potencijalno je izlječiv, a u tom je slučaju prognoza bolesti znatno bolja. S ciljem primjene što učinkovitije terapije prilikom postavljanja dijagnoze određuje se stadij karcinoma koji se odnosi na veličinu tumora i na njegovu proširenost, ukoliko se proširio. [1]

Postoji mnogo metoda koje se koriste za dijagnosticiranje karcinoma dojke, no niti jedna od njih nije 100% točna u otkrivanju karcinoma u ranim fazama njegovog razvoja. U uporabi su metode poput mamografije, ultrazvuka, elastografije, magnetske rezonancije, pozitronske emisijske tomografije te histopatološke, biološke i optičke metode. No, svaka od ovih metoda ima određena ograničenja. Iz tog razloga važno je otkriće IR-spektroskopije kao dijagnostičke metode. IR-spektroskopija omogućuje brzo dijagnosticiranje bolesti u ranim fazama razvoja, kao i daljnje praćenje bolesti i primijenjenog tretmana. Na taj se način povećava vjerojatnost izlječenja pacijentica te se povećavaju mogućnosti same terapije. [9]

### **3. Analiza seruma karcinoma dojke**

U nastavku su prikazana istraživanja provedena na uzorcima biološkog materijala, seruma pacijentica oboljelih od karcinoma dojke. Cilj provedenih istraživanja bio je identificirati karcinom dojke, provesti usporedbu kanceroznog i zdravog tkiva te ispitati učinkovitost primijenjene terapije za liječenje bolesti. [9, 31]

#### **3.1. Primjena Ramanove i IR-spektroskopije u identifikaciji karcinoma dojke**

Ramanova i IR-spektroskopija pružaju informacije o kemijskim česticama kroz spektralnu

analizu i identifikaciju funkcijskih skupina. Osim toga, omogućuju kvalitativnu i kvantitativnu analizu kemijskih tvari u uzorku. Obje spektroskopske metode često se koriste u biologiji i medicini za dijagnosticiranje bolesti i praćenje odgovarajuće terapije.

Cilj istraživanja kojeg su proveli Joanna Depciuch i sur. (2015.) bio je provesti usporedna spektroskopska mjerenja zdravog tkiva, kanceroznog tkiva prije i nakon kemoterapije, kao i tkiva iz područja oko karcinoma. Također su mjerene kvalitativne i kvantitativne promjene između promatranih tkiva. U provedenom istraživanju Ramanova i IR-spektroskopija pokazale su se kao izvrstan dijagnostički alat koji bi mogao značajno pridonijeti u ranoj dijagnozi i praćenju različitih patoloških stanja. [9]

### **3.1.1. Metode i materijali**

Kao materijali za analizu korišteni su uzorci tkiva uzeti iz dvije pacijentice s trostruko negativnim karcinomom dojke (uzorak 1 – serum 54-godišnje pacijentice; uzorak 2 – serum 74-godišnje pacijentice). Za istraživanje je korišten FT-IR spektrometar (Bruker Vertex 70v) uz analizu spektralnog raspona od 500 do 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Mjerenja su prikupljena s pet različitih mjesta u tkivu, a rezultati su prikazani na prosječnom spektru. [9]

### **3.1.2. Rezultati istraživanja**

Joanna Depciuch i sur. (2015.) u svojem su istraživanju karakterizirali vrpce apsorpcijskih spektara koje odgovaraju (a) tkivu karcinoma dojke prije kemoterapije, (b) normalnom tkivu dojke koje se nalazi oko kancerozne regije, (c) tkivu karcinoma dojke nakon kemoterapije te (d) nekanceroznom normalnom tkivu dojke. Svrha ove studije bila je prikazati razlike između ove četiri vrste tkiva, ali i ispitati utjecaj dobi pacijentica na razlike prisutne u tkivima.

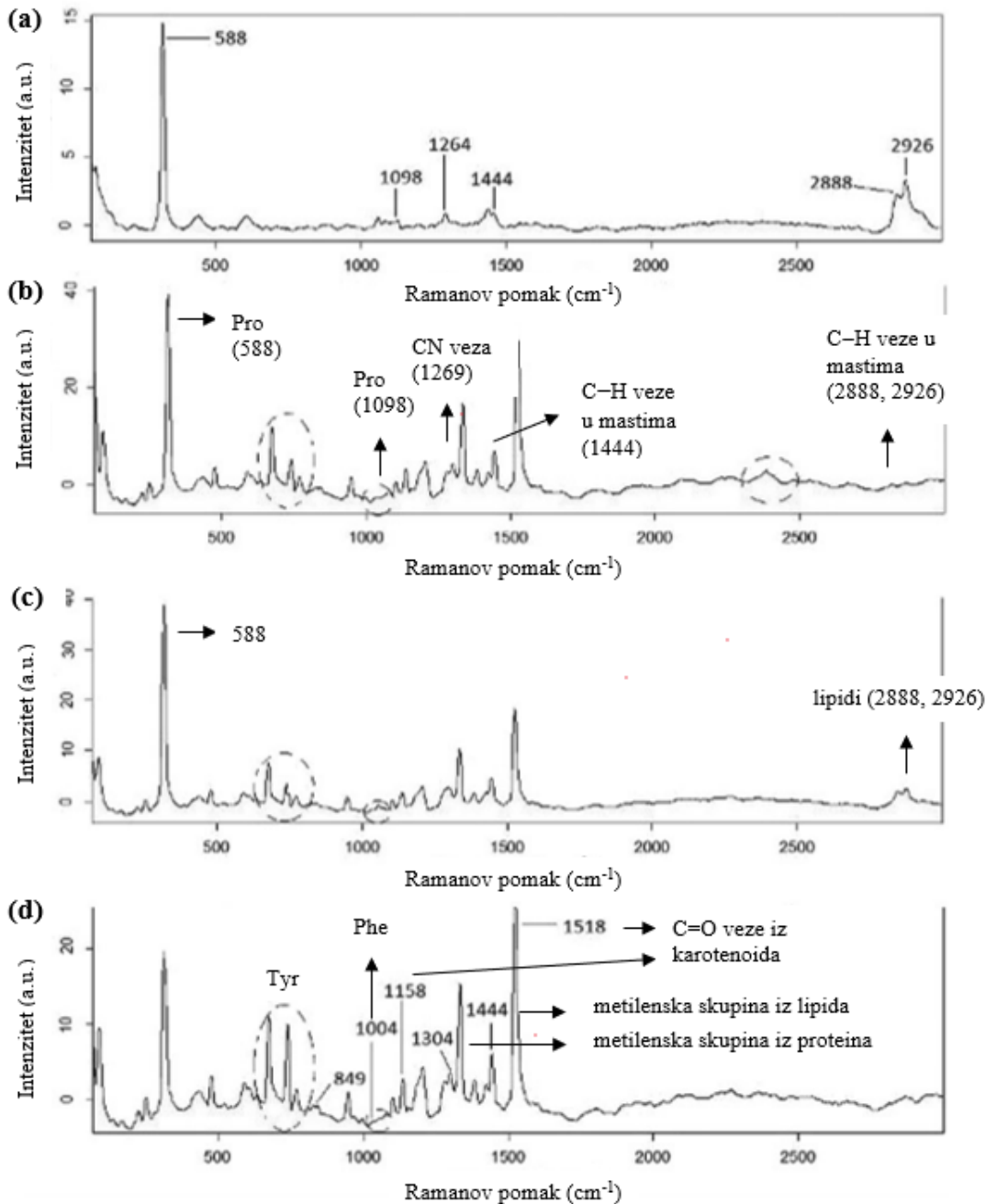
Na taj se način moglo otkriti jesu li određene vrpce u apsorpcijskim IR-spektrima korisne za dijagnosticiranje karcinoma dojke, kao i za praćenje učinkovitosti kemoterapije. [9]

Budući da molekule drugačije induciraju vibracije kod Ramanove i IR-spektroskopije u ovom su istraživanju primijenjene obje spektroskopske metode kako bi analiza uzoraka tkiva bila što točnija. [23]

Slika 1. prikazuje snimljene spektre Ramanovog pomaka za različite vrste tkiva prve pacijentice – uzorak 1: (a) tkivo karcinoma dojke prije kemoterapije, (b) normalno tkivo dojke koje se nalazi oko kancerozne regije, (c) tkivo karcinoma dojke nakon kemoterapije te (d) nekancerozno normalno tkivo dojke.

Slika 1d. prikazuje spektar normalnog nekanceroznog tkiva dojke. U normalnom tkivu

apsorpcijske vrpce jakog intenziteta prisutne su u području koje odgovara aminokiselinama Tyr (849  $\text{cm}^{-1}$ ) i Phe (1004  $\text{cm}^{-1}$ ). Apsorpcijske vrpce pri 1158  $\text{cm}^{-1}$  i 1518  $\text{cm}^{-1}$  odgovaraju C=O vezama koje potječu od karotenoida. Vrpca koja se javlja pri 1304  $\text{cm}^{-1}$  odgovorna je za metilensku skupinu iz proteina, dok vrpca pri 1444  $\text{cm}^{-1}$  odgovara metilenskoj skupini iz lipida. [24]



Slika 1. Spektri Ramanovog pomaka za uzorak 1: (a) tkivo karcinoma dojke prije kemoterapije, (b) normalno tkivo dojke koje se nalazi oko kancerozne regije, (c) tkivo karcinoma dojke nakon kemoterapije i (d) nekancerozno normalno tkivo dojke. [prema 9]

Slika 1b. prikazuje IR-spektar seruma iz kanceroznog tkiva dojke prije kemoterapije. Uspješno identificirane vrpce za ovu vrstu tkiva registrirane su pri  $588\text{ cm}^{-1}$  i  $1098\text{ cm}^{-1}$  (indiciraju prisutnost aminokiseline Pro) te pri  $1269\text{ cm}^{-1}$  što odgovara CN vezi iz tercijarnog amida. Apsorpcijske vrpce koje se javljaju pri  $1444\text{ cm}^{-1}$ ,  $2888\text{ cm}^{-1}$  i  $2926\text{ cm}^{-1}$  odgovaraju C–H vezama prisutnima u mastima. [25] Iz prikazanih spektara vidljivo je da se promijenjeno kancerozno tkivo, kojem odgovara spektar na slici 1a, znatno razlikuje od ostalih tkiva. Najintenzivniji signal koji se javlja pri  $588\text{ cm}^{-1}$  karakterističan je za kancerozno tkivo, a ista vrpca javlja se kao najintenzivnija u kanceroznom tkivu nakon kemoterapije (spektar na slici 1c) te u tkivu uzetom iz područja oko kancerozne regije (spektar na slici 1b). [9]

Iz dobivenih rezultata može se pretpostaviti da je primijenjena terapija imala pozitivne učinke te je pomogla pacijentici, s obzirom da su rezultati za kancerozno tkivo nakon kemoterapije vrlo slični rezultatima zdravog tkiva. Promjene u tkivu pacijentica uočene su nakon 4 ciklusa kemoterapije. Također je moguće zaključiti da se tkivo nakon provedene kemoterapije ne vraća u prvobitnu strukturu, već ostaje obilježeno tumorskim promjenama. Ovakve zaključke dodatno potvrđuje činjenica da se u tkivu nakon kemoterapije (spektar na slici 1c) ne javlja signal karakterističan za aminokiselinu Phe iz zdravog tkiva ( $1004\text{ cm}^{-1}$ ). U tkivu nakon provedene kemoterapije također je zabilježeno značajno povećanje količine lipida kojima se pripisuju vrpce pri  $2888\text{ cm}^{-1}$  i  $2926\text{ cm}^{-1}$ .

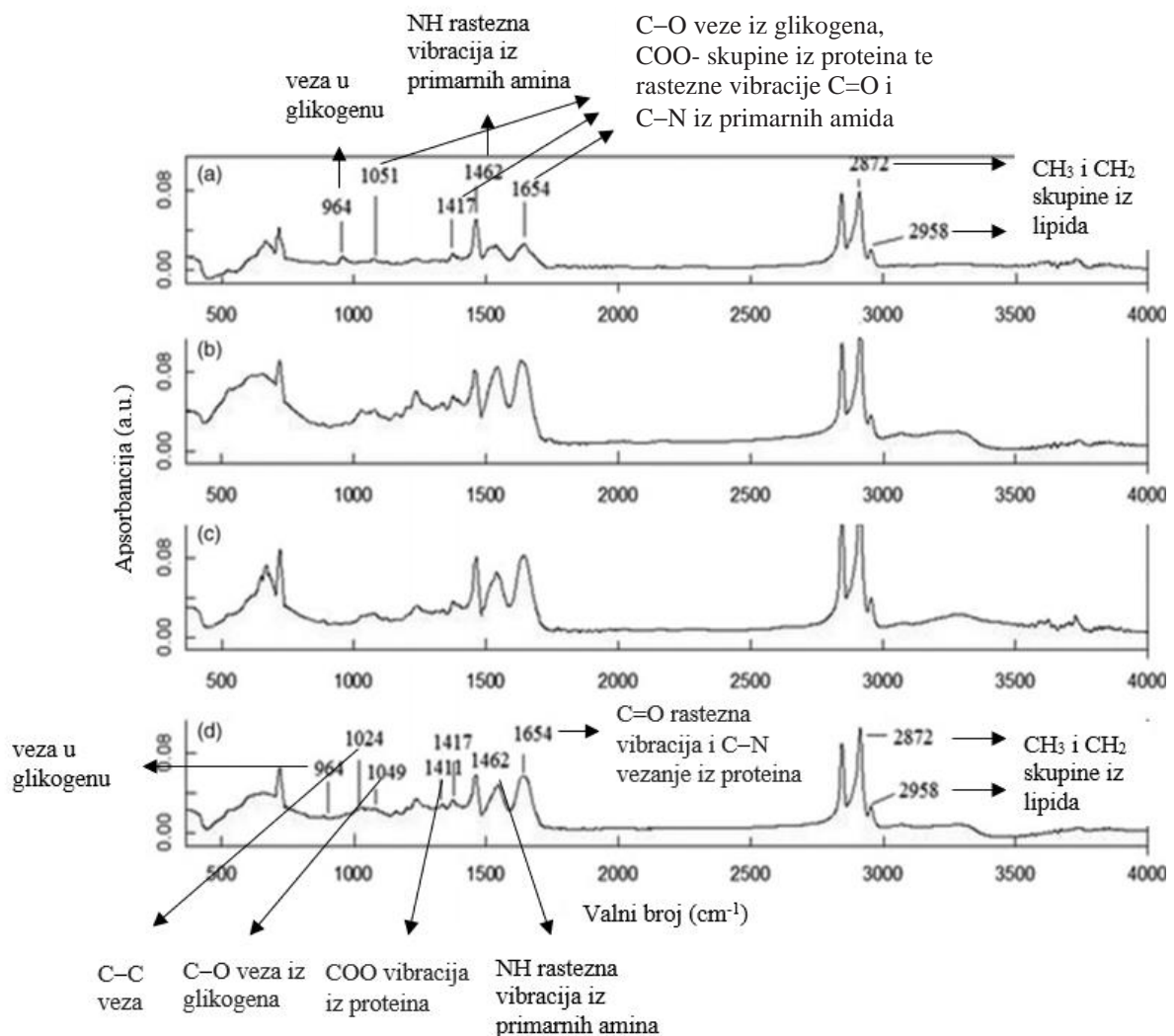
Na temelju rezultata provedene analize zaključeno je da se uporabom kemoterapije kancerozno tkivo znatno mijenja i postaje nalik zdravom tkivu, no neke genetičke promjene nastale kao rezultat tumorskog procesa i dalje ostaju prisutne u tkivu. Isto tako smatra se da se u tkivu u neposrednoj blizini tumora mogu pokazati određene promjene karakteristične za proces karcinogeneze. [9]

Nakon što je analiza uzoraka tkiva provedena pomoću Ramanove spektroskopije, primijenjena je i IR-spektroskopija.

Na slici 2. prikazani su IR-spektri apsorbancije i valnog broja za različite vrste tkiva prve pacijentice – uzorak 1: (a) tkivo karcinoma dojke prije kemoterapije, (b) normalno tkivo dojke iz područja oko kancerozne regije, (c) tkivo karcinoma dojke nakon kemoterapije te (d) normalno nekancerozno tkivo.

Na spektrima koji odgovaraju kanceroznom tkivu (slika 2a) i normalnom zdravom tkivu (slika 2d) uočeni su karakteristični signali pri  $964\text{ cm}^{-1}$  (veza u glikogenu) [26],  $1462\text{ cm}^{-1}$  (odgovara NH rasteznoj vibraciji iz primarnih amina) te pri  $2872\text{ cm}^{-1}$  i  $2958\text{ cm}^{-1}$  (odgovaraju  $\text{CH}_3$  i  $\text{CH}_2$  skupinama iz lipida) [27]. Uz uobičajene vrpce karakteristične za normalno nekancerozno tkivo

na spektru 2d dodatno su uočeni signali pri  $1049\text{ cm}^{-1}$  (C–O veza iz glikogena),  $1411\text{ cm}^{-1}$  (COO vibracija iz proteina) te  $1654\text{ cm}^{-1}$  (C=O rastezna vibracija i C–N vezanje iz proteina) [25, 27]. Usporedbom FT-IR spektra kanceroznog tkiva prije kemoterapije (slika 2a) i spektra karakterističnog za zdravo tkivo uočljive su neznatne razlike. Na spektru kanceroznog tkiva prisutne su tri vrpce s drugačijim vrijednostima apsorbancije u odnosu na zdravo tkivo i to pri  $1051\text{ cm}^{-1}$ ,  $1417\text{ cm}^{-1}$  i  $1654\text{ cm}^{-1}$ , a odgovaraju karakterističnim vibracijama C–O veze iz glikogena, COO- skupine iz proteina te rasteznim vibracijama C=O i C–N iz primarnih amida. U komparativnoj analizi zdravog i kanceroznog tkiva, jedina vidljiva promjena u kanceroznom tkivu je odsutnost vrpce pri  $1024\text{ cm}^{-1}$  koja se pripisuje istežanju i savijanju C–C veze.

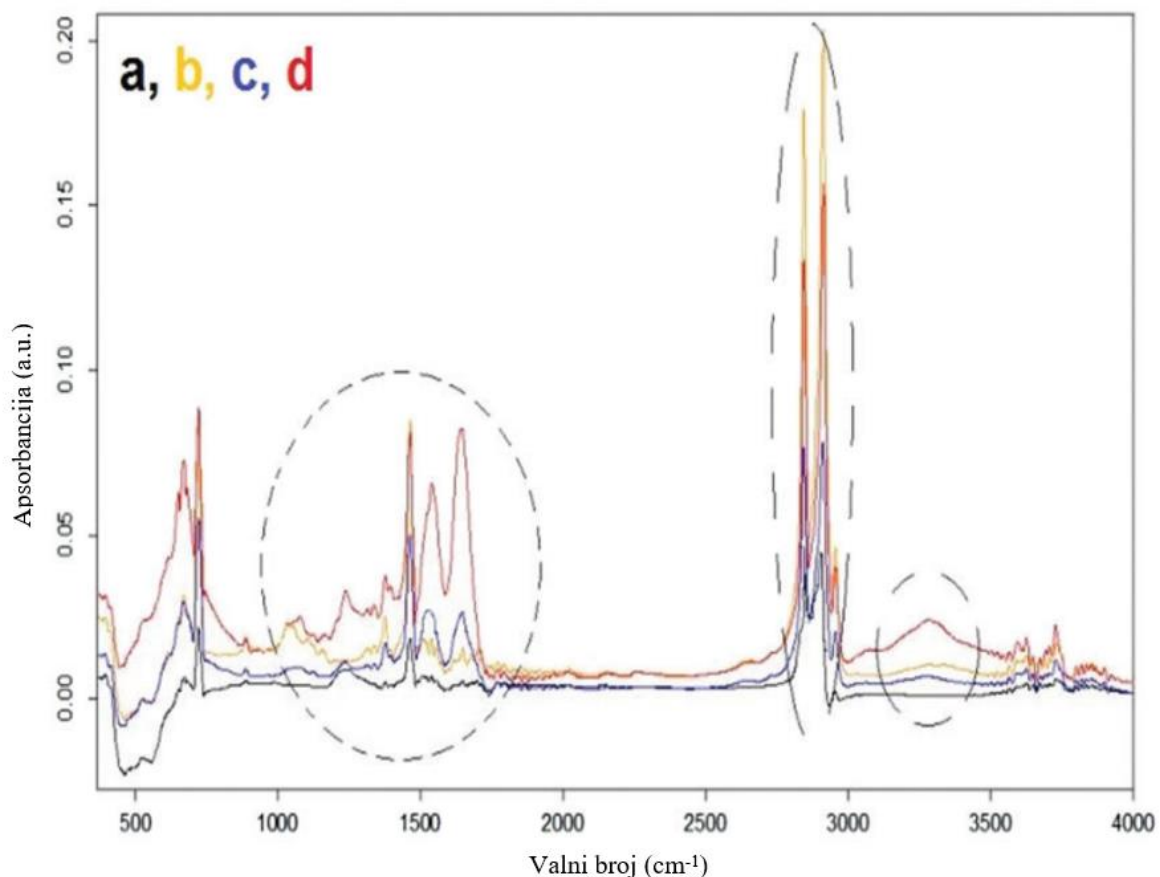


Slika 2. IR-spektri apsorbancije i valnog broja za uzorak 1: (a) tkivo karcinoma dojke prije kemoterapije, (b) normalno tkivo dojke iz područja oko kancerozne regije, (c) tkivo karcinoma dojke nakon kemoterapije i (d) normalno nekancerozno tkivo. [prema 9]

Slika 2b. prikazuje spektar normalnog tkiva dojke uzetog iz područja oko kancerozne regije. Usporedbom navedenog spektra sa spektrom zdravog tkiva (slika 2d) može se uočiti vrlo slična struktura navedenih vrsta tkiva. Značajnije razlike u ova dva spektra javljaju se u području koje odgovara proteinskim vibracijama ( $1250-1700\text{ cm}^{-1}$ ). Razlog tome može biti prisutnost kancerogenih stanica u tkivu koje je u izravnom kontaktu s tumorom.

Slika 2c. prikazuje FT-IR spektar tkiva dojke nakon kemoterapije. Usporedbom navedenog spektra i onoga koji odgovara zdravom tkivu vidljivo je da postoje sličnosti, ali i razlike između dvije navedene vrste tkiva. S obzirom na spektre prikazane na slikama 2a (tkivo karcinoma dojke prije kemoterapije), 2c (tkivo karcinoma dojke nakon kemoterapije) i 2d (zdravo tkivo) vidljivo je da tkivo nakon kemoterapije više nalikuje zdravom tkivu, nego kanceroznom. Rezultati provedene analize ukazuju na to da je kemoterapija uspješno provedena te da su njezini učinci jasno vidljivi. [9]

Spektri dobiveni za sve četiri vrste analiziranih tkiva prikazani su na slici 3.

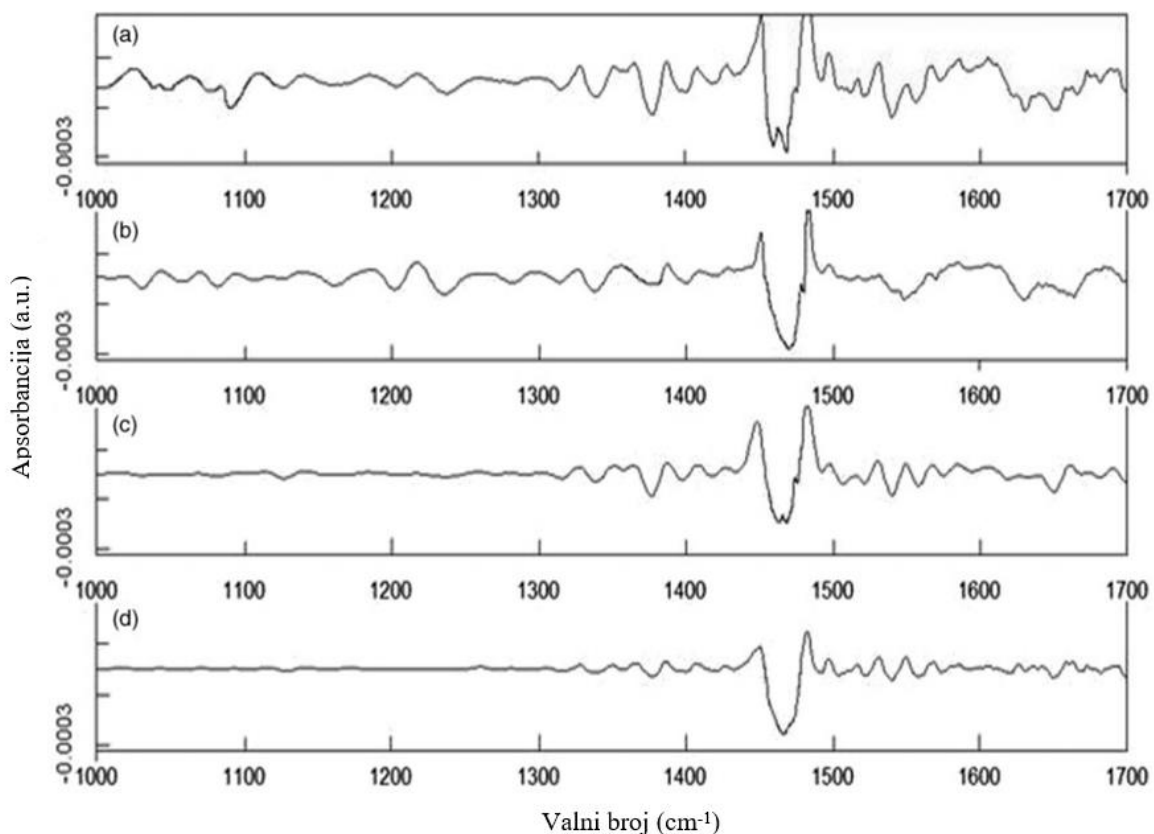


Slika 3. Spektar apsorbancije i valnog broja za uzorak 1: (a) tkivo karcinoma dojke prije kemoterapije, (b) normalno tkivo dojke iz područja oko kancerozne regije, (c) tkivo karcinoma dojke nakon kemoterapije i (d) normalno nekancerozno tkivo. [prema 9]



Iz spektara je vidljivo da obje vrste kanceroznog tkiva, tkivo uzeto izvan tumorske regije i ono nakon kemoterapije, imaju znatno veću količinu masti. Provedeno istraživanje također potvrđuje da se svako bolesno tkivo po svojoj strukturi razlikuje od zdravog tkiva, što je vidljivo na prethodno prikazanim i analiziranim spektrima (slike 1 i 2). Navedene promjene posebno su vidljive u području koje odgovara proteinima i šećerima. [9]

Kao i u slučaju mjerenja Ramanovom spektroskopijom, dokazano je da tkivo nakon provedenog tretmana ne poprima prvobitnu strukturu, već sadrži određene promjene karakteristične za proces karcinogeneze. Kako bi se potvrdilo postojanje pomaka valnih brojeva u kanceroznom tkivu određena je druga derivacija područja karakterističnog za šećere ( $1000-1250\text{ cm}^{-1}$ ) i proteine ( $1250-1700\text{ cm}^{-1}$ ) (slika 4). [9]



Slika 4. Druga derivacija spektara apsorbancije i valnog broja za uzorak 1: (a) tkivo karcinoma dojke prije kemoterapije, (b) normalno tkivo dojke iz područja oko kancerozne regije, (c) tkivo karcinoma dojke nakon kemoterapije i (d) normalno nekancerozno tkivo. [prema 9]

Karakterizacija uzoraka tkiva iz druge pacijentice bila je usmjerena na pronalaženje sličnosti i razlika između četiri analizirane vrste tkiva. Iz dobivenih spektara prikazanih na slikama 5-8 u Prilogu, vidljivo je da su sva analizirana tkiva druge pacijentice vrlo slična karakteriziranim tkivima prve pacijentice. [9]

Provedeno istraživanje, kao i brojne prethodno provedene studije karcinoma dojke [28,29], pokazuju korelaciju između procesa karcinogeneze i količine karotenoida, masti i proteina u tkivu dojke. U ovom istraživanju, između analiziranih vrsta tkiva uočene su značajne razlike u područjima koja odgovaraju vibracijama ribonukleinskih kiselina, karotenoida, lipida (Ramanova spektroskopija) i proteina (FT-IR spektroskopija). Ova studija stavila je poseban naglasak na analizu kanceroznog tkiva nakon kemoterapije i normalnog tkiva uzetog iz područja oko kancerozne regije. Ovakva istraživanja, koja dosad nisu provedena primjenom spektroskopskih metoda, donose nova saznanja o učincima kemoterapije, kao i o promjenama koje se zbivaju u stanicama dojke lociranih u blizini tumora. Budući da je ovo istraživanje pokazalo da primjenom kemoterapije bolesno tkivo postaje sve sličnije zdravom tkivu, no ne poprima u potpunosti prvobitnu strukturu, Ramanova i IR-spektroskopija mogu poslužiti kao izvrstan alat za praćenje učinkovitosti terapije. [9]

Uzimajući u obzir dobivene rezultate i sličnosti u spektrima pacijenata svih dobnih skupina, smatra se da Ramanova područja karakteristična za karotenoide i lipide te IR-područja specifična za šećere i proteine, mogu postati markeri u dijagnosticiranju karcinoma dojke te u praćenju učinkovitosti kemoterapije. S obzirom na važnost karotenoida, šećera, proteina i masnoća u karcinomu, primjena navedenih markera u dijagnosticiranju karcinoma sve je izglednija. Također je sve više dokaza o neizravnom učinku karotenoida na lučenje hormona, kao i na normalan rast stanica. [29] Veliki je broj studija koje proučavaju važnost masti u procesu karcinogeneze. Dobiveni rezultati pokazuju da jedan tip masnih kiselina potiče razvoj karcinoma, dok drugi tip zaustavlja njegov razvoj, što znači da su i masne kiseline potencijalni marker u dijagnosticiranju karcinoma dojke. [30]

### **3.1.3. Rasprava i zaključak istraživanja**

Provedena studija osmišljena je kako bi se provjerilo postoje li razlike između kanceroznog tkiva dojke, zdravog tkiva, tkiva nakon kemoterapije i tkiva koje se nalazi izvan tumora. Informacije prikupljene primjenom biokemijskih metoda za snimanje tkiva te Ramanovom spektroskopijom u IR-rasponu omogućuju uspješno praćenje promjena karcinoma dojke, kao i praćenje učinkovitosti kemoterapije. Dobiveni rezultati također mogu poslužiti za bolje razumijevanje mehanizama karcinoma dojke. Provedena analiza pokazuje da su Ramanov i IR-spektar osjetljivi pokazatelji glavnih biokemijskih komponenti tkiva dojke koji izgrađuju zdravo, ali i kancerozno tkivo. Iz analiziranih spektara vidljivo je da postoje sličnosti i razlike između normalnog zdravog tkiva i tkiva nakon kemoterapije, što omogućava praćenje

učinkovitosti terapije (što su apsorpcijski spektri zdravog tkiva i tkiva nakon tretmana sličniji, to je uspješnost liječenja veća). Druga derivacija apsorpcijskih IR-spektara ukazuje na strukturne promjene koje se javljaju u šećerima i proteinima u tkivu pacijenata, što upućuje na prisutnost metabolički poremećenih tumorskih stanica. Također je otkriveno da su proteini, šećeri, karotenoidi i lipidi najvarijabilnije komponente u tkivu dojke zbog čega se smatraju tumorskim markerima u dijagnosticanju karcinoma.

Daljnje studije fokusirat će se na pojedinačne frakcije kao potencijalne tumorske markere kako bi se istražilo koje od njih imaju najveći učinak na proces karcinogeneze te kako bi se postiglo bolje razumijevanje mehanizama nastajanja mutacija u tumorskim stanicama. Također se planira provođenje daljnjih istraživanja na većem broju ispitanika kako bi se dobiveni rezultati mogli primijeniti na široj populaciji. [9]

### **3.2. IR-spektroskopija i kemometrijski pristup u karakterizaciji karcinoma dojke**

Trostruko negativan karcinom dojke (TNBC) smatra se najagresivnijim epitelnim karcinomom dojke, a javlja se u približno 10-20 % oboljelih. [32] TNBC je imunohistokemijski negativan na ekspresiju receptora estrogena (ER) i progesterona (PR), a nema niti prekomjerne ekspresije gena humanog epidermalnog faktora rasta (HER2). [33] Zbog nedostatka ciljanih terapija za ovu vrstu karcinoma dojke, približno 70 % pacijentica neće postići potpuni patološki odgovor nakon kemoterapije. [34] Iz tog razloga znatno je gore ukupno preživljenje oboljelih, a u usporedbi s drugim vrstama karcinoma dojke rizik od smrti, recidiva ili metastaziranja je nekoliko puta veći. [35] Za istraživanje ove vrste karcinoma dojke upotrijebljeni su brojni dijagnostički pristupi, uključujući fizikalne i optičke tehnike. Kao učinkovita metoda pokazala se infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom koja za razliku od ostalih primijenjenih metoda, omogućuje karakterizaciju bioloških materijala bez primjene kompliciranih postupaka pripreme uzorka ili dodatnih reagensa. [36] U kombinaciji s kemometrijskim pristupom, koji uključuje matematičke i statističke metode, omogućuje identifikaciju karcinoma, kao i praćenje učinkovitosti kemoterapije. [31]

U istraživanju kojeg su proveli Magdalena Kołodziej i sur. (2022.), uspoređene su zdrave kontrole s TNBC tkivom prije i nakon kemoterapije istog pacijenta primjenom FT-IR spektroskopije uz kemometrijski pristup i ispitivanje omjera apsorbancije. Primarne spektralne razlike između zdravog i kanceroznog tkiva pronađene su u područjima koja odgovaraju proteinima, polisaharidima i nukleinskim kiselinama.

Svrha provedenog istraživanja bila je praćenje kemoterapije u četiri pacijentice te pronalaženje spektralnih markera za praćenje učinkovitosti liječenja primjenom dijagnostičkog pristupa razvijenog na temelju FT-IR mikrospektroskopije i kemometrijskih tehnika. [31]

### 3.2.1. Metode i materijali

Za analizu su primijenjeni uzorci tkiva dojke dobiveni biopsijom dvije zdrave pacijentice tijekom postupka smanjenja grudi (kontrolne skupine) te uzorci iz četiri TNBC pacijentice prije i nakon kemoterapije s različitim stadijima malignosti. Uzorci su fiksirani formalinom te ugrađeni parafinom (FFPE). Apsorpcijski IR-spektri snimljeni su u spektralnom rasponu od 4000-800  $\text{cm}^{-1}$ . Istraživanje je provedeno primjenom FT-IR mikroskopa (Bruker Hyperion 2000) uz FT-IR spektrometar (Vertex 70/70v). Tijekom analize dobivenih podataka, spektar druge derivacije poslužio je za odabir spektralnih vrpce koji će se analizirati.

Kako bi se isključio doprinos parafina koji je korišten u pripremi uzoraka tkiva, u konačnoj analizi korištene su samo regije 1700-1495  $\text{cm}^{-1}$  i 1350-950  $\text{cm}^{-1}$ . [31]

### 3.2.2. Rezultati istraživanja

U predmetnom istraživanju uspoređena su zdrava kontrolna tkiva i TNBC tkiva četiri pacijentice s različitim stupnjem malignosti. Tkivo iz svake pacijentice također je uspoređeno prije i nakon primijenjene kemoterapije.

Slike 9-12 predstavljaju prosječne spektre druge derivacije koji su ispravljeni EMSC metodom (eng. *Extended Multiplicative Signal Corrected*), a dobiveni su iz zdravog tkiva dojke (slika 9) te iz tkiva dojke prije (a) i nakon (b) kemoterapije (slike 10-12). U svim su spektrima dominantne apsorpcijske vrpce koje odgovaraju proteinima, lipidima i nukleinskim kiselinama. Minimumi vrpce uočeni u području amida I (1690-1630  $\text{cm}^{-1}$ ) pripisuju se strukturama  $\alpha$ -uzvojnice (1661  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\beta$ -ploče (1695, 1637  $\text{cm}^{-1}$ ) i  $\beta$ -okreta (1681  $\text{cm}^{-1}$ ), pri čemu većina proteina ima strukturu  $\alpha$ -uzvojnice. [37] Najizraženija razlika između zdravog kontrolnog tkiva i tkiva prije i nakon kemoterapije zabilježena je u tkivu dojke s 3. stupnjem malignosti (G3) (slika 12). U zdravom kontrolnom tkivu apsorpcijske vrpce u regiji amida I javljaju se pri 1681  $\text{cm}^{-1}$ , 1661  $\text{cm}^{-1}$  i 1637  $\text{cm}^{-1}$ , dok su u G3 stadiju karcinoma prije kemoterapije apsorpcijske vrpce pomaknute prema nižem valnom broju za 4  $\text{cm}^{-1}$ . Najizraženija promjena signal pripisuje se  $\beta$ -ploči pomaknutoj za 7  $\text{cm}^{-1}$  (slika 12a). U G3 stadiju karcinoma nakon kemoterapije, apsorpcijske vrpce se vraćaju u položaj sličan zdravom kontrolnom tkivu (slika 12 b). Zanimljiv je signal pri 1643  $\text{cm}^{-1}$  koji odgovara konformaciji  $\beta$ -ploče, a nije prisutan u spektru

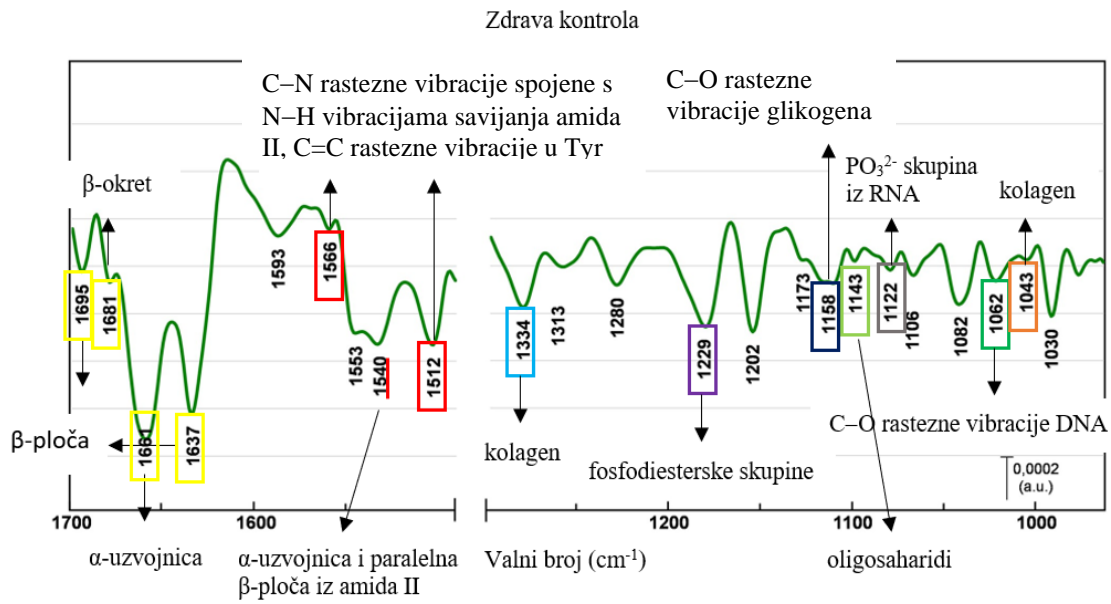
tkiva nakon kemoterapije, već se javlja samo u G3 stadiju karcinoma prije kemoterapije (slika 12a). U promatranom području amida I zabilježene su manje promjene u stadiju karcinoma G1 (slika 10) i G2 (slika 11). [31]

Nadalje, slične promjene u apsorpcijskim vrpčama uočene su i u području amida II (1590-1510  $\text{cm}^{-1}$ ). [38-40] U slučaju G3 stadija karcinoma prije kemoterapije, apsorpcijske vrpce pripisuju se C–N rasteznim vibracijama spojenima s N–H vibracijama savijanja amida II [38] te C=C rasteznim vibracijama u aminokiselini Tyr. [39] Navedene apsorpcijske vrpce u zdravom tkivu nalaze se pri 1566  $\text{cm}^{-1}$  i 1512  $\text{cm}^{-1}$ , dok su u spektru G3 stadija karcinoma (slika 12a) pomaknute prema višim valnim brojevima za 5  $\text{cm}^{-1}$  (1571  $\text{cm}^{-1}$ ) te za 4  $\text{cm}^{-1}$  (1516  $\text{cm}^{-1}$ ). Zanimljiv je signal pri 1540  $\text{cm}^{-1}$  [40] koji se nalazi u spektru zdravog tkiva, a pripisuje se  $\alpha$ -uzvojnica i paralelnoj  $\beta$ -ploči iz amida II. Navedena apsorpcijska vrpca pomaknuta je prema višem valnom broju za 6  $\text{cm}^{-1}$  za sve stadije karcinoma prije kemoterapije (pomak s 1540  $\text{cm}^{-1}$  na 1546  $\text{cm}^{-1}$ ) (slike 10-12a), dok su u stadijima karcinoma nakon kemoterapije uočeni pomaci manje izraženi (pomak s 1540  $\text{cm}^{-1}$  na 1545  $\text{cm}^{-1}$  za G1; pomak s 1540  $\text{cm}^{-1}$  na 1544  $\text{cm}^{-1}$  za G2; pomak s 1540  $\text{cm}^{-1}$  na 1545  $\text{cm}^{-1}$  za G3) (slike 10-12b). [31]

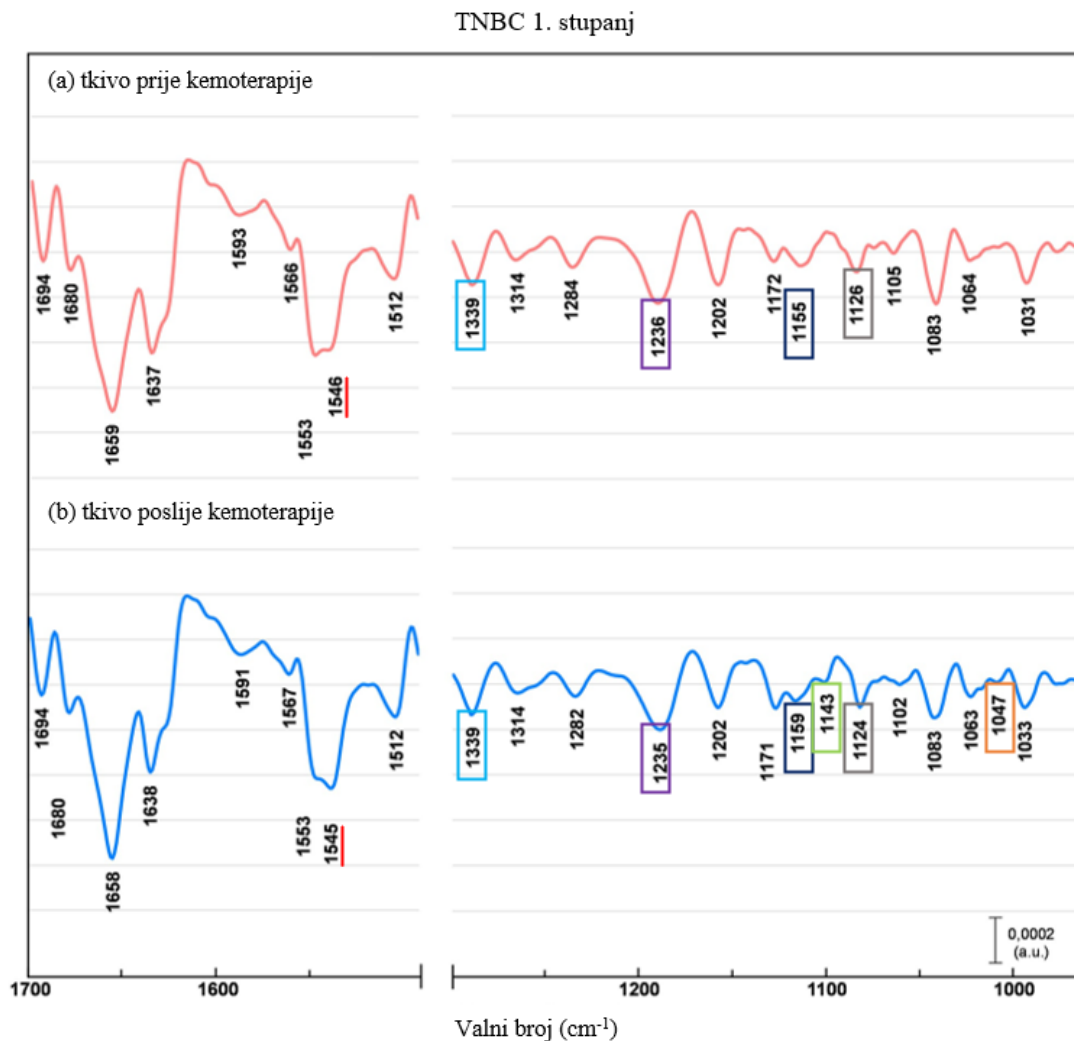
U području nižih valnih brojeva uočene su značajnije razlike za sva tri stadija karcinoma, pri čemu su najuočljivije promjene u apsorpcijskim vrpčama koje se pripisuju DNA, RNA i glikogenu. Važno je istaknuti signal pri 1334  $\text{cm}^{-1}$  koji se pripisuje vibracijama bočnog lanca kolagena. [41] Navedeni signal pomaknut je prema višem valnom broju za 5  $\text{cm}^{-1}$  za G1 stadij karcinoma prije i nakon kemoterapije (slika 10), za 7  $\text{cm}^{-1}$  prije i 6  $\text{cm}^{-1}$  nakon kemoterapije za G2 i G3 stadije karcinoma (slike 11 i 12). Najznačajnije promjene uočene su u apsorpcijskoj vrpci pri 1229  $\text{cm}^{-1}$  koja se pripisuje asimetričnom rastezanju fosfodieterskih skupina. [42] Apsorpcijska vrpca pomaknuta je prema višem valnom broju za 7  $\text{cm}^{-1}$  (1236  $\text{cm}^{-1}$ ) prije kemoterapije i 6  $\text{cm}^{-1}$  (1235  $\text{cm}^{-1}$ ) nakon kemoterapije za G1 i G2 stadije karcinoma (slike 10 i 11), a pomak signala još je izraženiji za G3 stadij karcinoma od 9  $\text{cm}^{-1}$  (1238  $\text{cm}^{-1}$ ) prije i 5  $\text{cm}^{-1}$  (1234  $\text{cm}^{-1}$ ) nakon liječenja (slika 12). Za apsorpcijsku vrpca koja se u zdravom tkivu javlja pri 1062  $\text{cm}^{-1}$ , a odgovara C–O rasteznim vibracijama DNA, [37] zabilježen je pomak od 5  $\text{cm}^{-1}$  prema nižem valnom broju samo u G3 stadiju karcinoma. Nadalje, analizirana je apsorpcijska vrpca koja odgovara asimetričnom istezanju  $\text{PO}_3^{2-}$  skupine iz RNA, [41] a u zdravom tkivu javlja se pri 1122  $\text{cm}^{-1}$ . Navedena vrpca pomaknuta je prema višem valnom broju za 4  $\text{cm}^{-1}$ , odnosno 3  $\text{cm}^{-1}$  i 2  $\text{cm}^{-1}$  za sva tri stadija karcinoma prije kemoterapije, dok u apsorpcijskim spektrima tkiva nakon kemoterapije nema značajnih promjena u odnosu na zdravo tkivo. Slične promjena uočene su i kod apsorpcijske vrpce pripisane C–O rasteznim

vibracijama glikogena pri  $1158\text{ cm}^{-1}$  u zdravom tkivu. [41] Navedeni signal pomaknut je prema nižem valnom broju za  $4\text{ cm}^{-1}$  u G3 stadiju te za  $3\text{ cm}^{-1}$  u G1 i G2 stadijima karcinoma prije kemoterapije, dok se nakon provedene kemoterapije u svim stadijima karcinoma vrijednosti valnog broja vraćaju na zdrave kontrolne vrijednosti. Važno je istaknuti i apsorpcijsku vrpcau pri  $1043\text{ cm}^{-1}$  koja je povezana s glikogenom, a prisutna je samo u zdravoj kontroli i tkivima nakon kemoterapije (slike 10-12b). Također se vrpca pri  $1143\text{ cm}^{-1}$ , povezana s oligosaharidima, javlja samo u apsorpcijskom spektru zdrave kontrole te tkivima nakon provedene kemoterapije za G1 i G3 stadije karcinoma. [31]

Na apsorpcijskim spektrima (slike 9-12) bojama su označene najznačajnije razlike između promatranih vrsta tkiva. Žutom bojom označene su apsorpcijske vrpce prisutne u području amida I. Žutim kvadratima obilježeni su signali s najvećom razlikom u odnosu na zdravu kontrolu, a prisutni su u G3 stadiju karcinoma, dok je plavom linijom obilježen signal koji se javlja samo u tkivu prije kemoterapije u G3 stadiju karcinoma. Crvenom bojom označeno je područje amida II. Crvenim kvadratima obilježene su najznačajnije promjene u odnosu na zdravu kontrolu, a prisutne su u G3 stadiju karcinoma prije kemoterapije, dok je crvenim linijama označena apsorpcijska vrpca kod koje je uočen pomak u sva tri stadija karcinoma. Pomak navedene apsorpcijske vrpce veći je za tkiva prije kemoterapije, dok je manje izražen za tkiva poslije kemoterapije. Apsorpcijske vrpce koje se nalaze u području nižih valnih brojeva označene su svijetlo i tamno plavom bojom, svijetlo i tamno zelenom bojom te ljubičastom, sivom i narančastom bojom. Svijetlo plavom bojom označena je apsorpcijska vrpca kod koje do pomaka dolazi u sva tri stupnja karcinoma, i u tkivu prije i poslije liječenja. Najznačajnije promjene uočene su u apsorpcijskoj vrpci označenoj ljubičastom bojom. Navedeni signal se u odnosu na zdravu kontrolu razlikuje u sva tri stadija karcinoma, a pomak je najizraženiji u G3 stadiju. Tamno zelenom bojom obilježena je apsorpcijska vrpca kod koje dolazi do značajnije promjene samo u G3 stadiju karcinoma prije kemoterapije. Apsorpcijska vrpca označena sivom bojom značajnije se razlikuje u tkivima prije kemoterapije, dok u spektrima tkiva nakon liječenja nema većih promjena u odnosu na zdravu kontrolu. Slične promjene uočene su i kod apsorpcijske vrpce označene tamno plavom bojom kod koje u sva tri stadija karcinoma prije kemoterapije dolazi do značajnijeg pomaka valnog broja. Signal označen narančastom bojom javlja se samo u zdravoj kontroli i tkivima nakon kemoterapije, a vrpca označena svijetlo zelenom bojom nalazi se samo u spektru zdrave kontrole i tkivima nakon provedene kemoterapije za G1 i G3 stadije karcinoma. [prema 31]

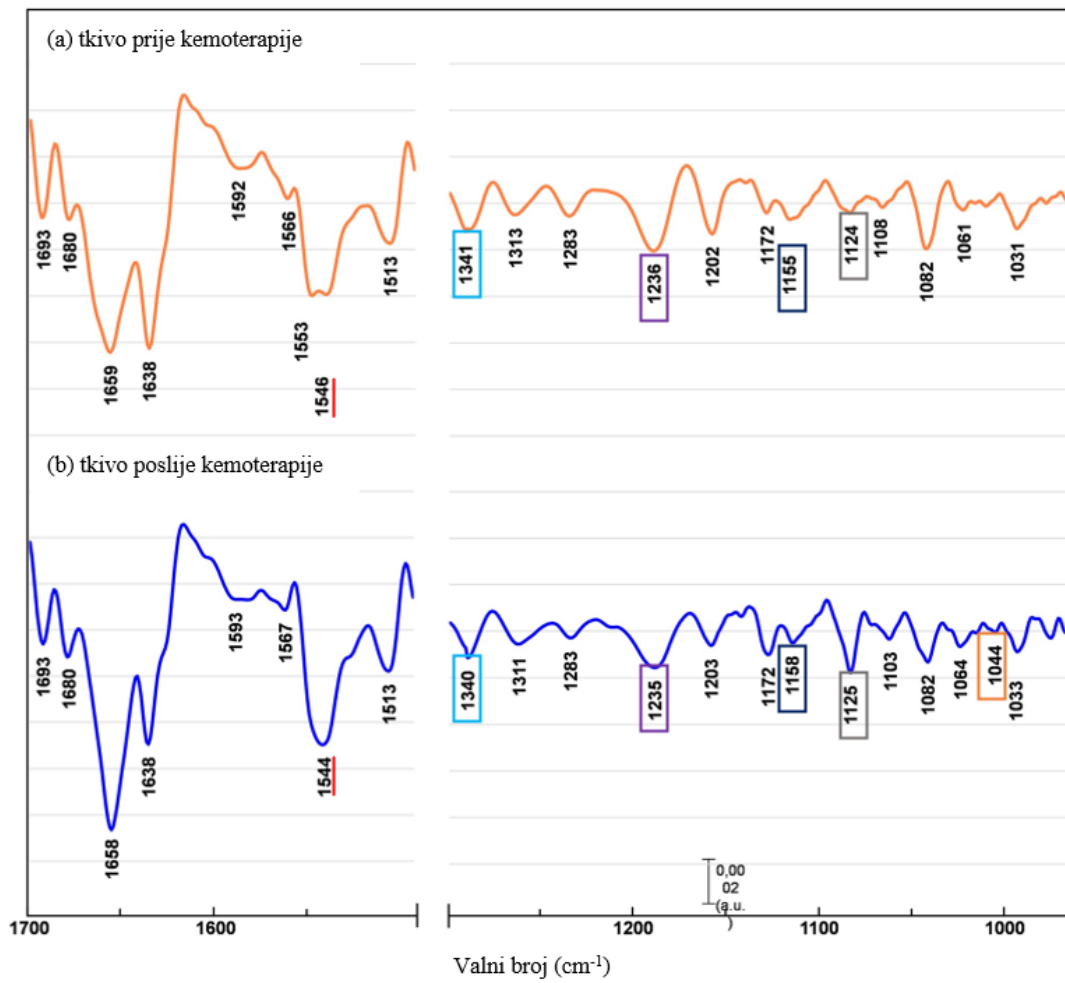


Slika 9. Prosječan apsorpcijski spektar zdravog kontrolnog tkiva dojke. [prema 31]



Slika 10. Prosječan apsorpcijski spektar TNBC tkiva 1. stupnja: (a) tkivo prije kemoterapije i (b) tkivo poslije kemoterapije. [prema 31]

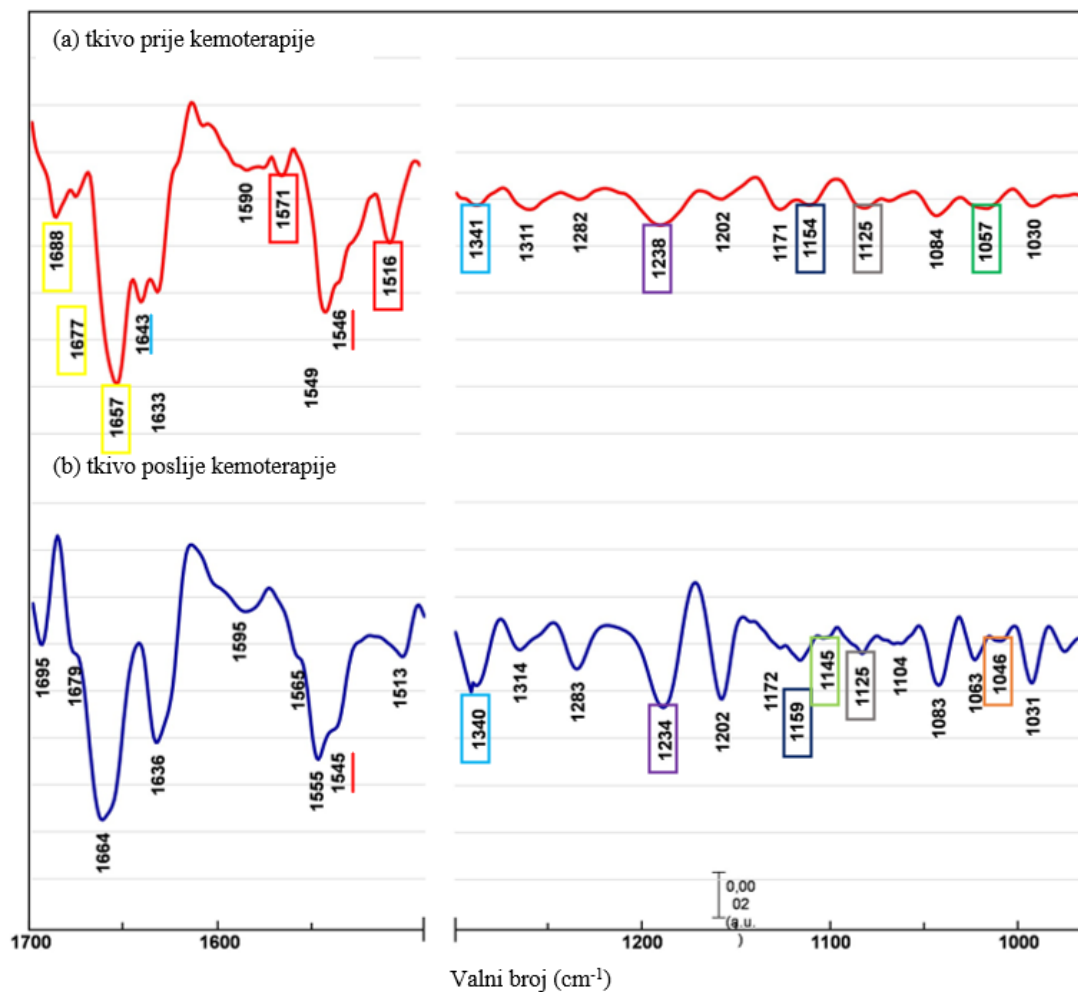
TNBC 2. stupanj



Slika 11. Prosječan apsorpcijski spektar TNBC tkiva 2. stupnja: (a) tkivo prije kemoterapije i (b) tkivo poslije kemoterapije. [prema 31]



TNBC 3. stupanj



Slika 12. Prosječan apsorpcijski spektar TNBC tkiva 3. stupnja: (a) tkivo prije kemoterapije i (b) tkivo poslije kemoterapije. [prema 31]

U tablici 2. prikazan je sažetak analiziranih apsorpcijskih vrpca, odgovarajućih valnih brojeva te njihovo biološko podrijetlo. [prema 31]

Tablica 2. Pregled analiziranih apsorpcijskih vrpca, odgovarajućih valnih brojeva i biološkog podrijetla. [prema 31]

Valni brojevi ( $\text{cm}^{-1}$ )	Pomaci						Apsorpcijske vrpce	Oznake	
	G1		G2		G3				
	PK	NK	PK	NK	PK	NK			
1695	1694	1694	1693	1693	1688	1995	Amid I: struktura agregirane $\beta$ -ploče	AI	
1681	1680	1680	1680	1680	1676	1679	Amid I: struktura $\beta$ -okreta		
1661	1659	1658	1659	1658	1657	1664	Amid I: struktura $\alpha$ -uzvojnice		
1637	1637	1637	1638	1638	1641	1636	Amid I: struktura $\beta$ -ploče		
1593	1593	1591	1592	1593	1590	1595	C=N, N-H vibracije Ade		
1566	1566	1567	1566	1567	1571	1565	$\delta_{\text{as}}(\text{N-H})$ i $\nu(\text{C-N})$ vibracije amida II	AII	
1553	1553	1553	1553	-	1549	1555	$\nu(\text{C-O})$ i $\delta(\text{N-H})$ vibracije amida II		
1540	1546	1545	1546	1544	1546	1545	Amid II: $\delta(\text{N-H})$ i $\nu(\text{C-N})$ vibracija		
							Amid II: $\alpha$ -uzvojnica i $\beta$ -ploča		
1512	1512	1512	1513	1513	1516	1513	C=C rastezna vibracija iz Tyr		
1334	1339	1339	1341	1340	1341	1340	$\omega(\text{CH}_2)$ vibracija bočnog lanca kolagena	$\frac{L}{W}$ $\frac{N}{N}$	
1313	1314	1314	1313	1311	1311	1314	$\omega(\text{CH}_2)$ vibracija Gly		
1280	1284	1282	1283	1283	1282	1283	Amid III: vrpce iz proteina		
1229	1236	1235	1236	1235	1238	1234	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ iz DNA		Ph1
1202	1202	1202	1202	1203	1202	1202	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ iz DNA		

1173	1172	1171	1172	1172	1171	1172	v(C–O) i $\delta$ (C–O) iz C–OH skupine (glikogen)		GLYCO
1158	1155	1159	1155	1158	1154	1159	v(C–O) iz polisaharida		
1143	-	1143	-	-	-	1145	Fosfat i oligosaharidi		
1122	1126	1124	1124	1125	1125	1125	vas(PO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ) iz RNA		RNA
1106	1105	1102	1108	1103	-	1108	v(CO), v(CC), prsten polisaharida		
1082	1083	1083	1082	1082	1084	1083	vs(PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) iz DNA		Ph2
1062	1064	1063	1061	1064	1067	1061	vs(C–O) iz DNA (zajedno s 1031 i 1081 cm <sup>-1</sup> )		DNA
1043	-	1047	-	1044	-	1046	vs(CO–O–C) iz polisaharida		GLYCO
1030	1031	1033	1031	1033	1030	1031	C–O deformacija u nukleinskim kiselinama (zajedno s 1060 i 1081 cm <sup>-1</sup> )		DNA

Kratice: G1-G3 = stadiji karcinoma od 1-3; PK = prije kemoterapije; NK = nakon kemoterapije; v<sub>s</sub> = simetrično istežanje; v<sub>as</sub> = asimetrično istežanje;  $\delta$  = ravninska deformacija;  $\omega$  = izvanravninska njišuća vibracija

Nadalje, izračunati su omjeri apsorbancije za zdravo kontrolno tkivo te za tkiva prije i nakon kemoterapije u G1-G3 stadijima karcinoma. Zatim je provedena statistička analiza određenih omjera apsorbancije.

**Amid I/ Amid II omjer (1700-1500  $\text{cm}^{-1}$ ):** Pomoću amid I/ amid II omjera moguće je procijeniti sekundarnu strukturu proteina. [43] Za pacijentice s G1 i G2 stadijima karcinoma navedeni omjer se prije i nakon kemoterapije značajno smanjuje, ali je u oba slučaja razlika između omjera zdrave kontrole i tkiva nakon kemoterapije manje izražena. Za G3 stadij karcinoma, omjer se povećava prije i smanjuje nakon kemoterapije. S dobivenim rezultatima povezan je i dodatni signal pri  $1643 \text{ cm}^{-1}$  koji se pripisuje konformaciji  $\beta$ -ploče, a javlja se samo u G3 stadiju karcinoma prije kemoterapije. [31]

**Amid III i nukleinske kiseline (1350-950  $\text{cm}^{-1}$ ):** Sljedeći omjeri omogućuju procjenu konformacije amida III i nukleinskih kiselina u odnosu na zdravo tkivo: Ph1/LWN omjer (količina fosfatnih skupina u proteinima) značajno se povećava; Ph2/LWN omjer (količina fosfatnih skupina u nukleinskim kiselinama) značajno se povećava; RNA/LWN omjer (količina RNA) značajno se povećava; DNA/LWN omjer (količina DNA) značajno se povećava. Svi navedeni omjeri pokazuju sličan obrazac za sva tri stupnja malignosti TNBC tkiva: vrijednosti prije i nakon kemoterapije značajno se povećavaju, no vrijednosti koje odgovaraju tkivu nakon kemoterapije bliže su vrijednostima zdravog tkiva. Štoviše, razlike između zdravog kontrolnog tkiva i TNBC tkiva postaju sve veće sa svakim idućim stadijem karcinoma. Također je važno spomenuti da se vrijednost omjera GLYCO/LWN, koji ukazuje na udio ugljikohidrata, značajno smanjuje u tkivu prije kemoterapije te značajno povećava u tkivu nakon provedenog liječenja. Takva značajna razlika povezana je s apsorpcijskom vrpcom pri  $1043 \text{ cm}^{-1}$  koja se pripisuje glikogenu, a ne javlja se u apsorpcijskim spektrima tkiva prije kemoterapije za sve stadije karcinoma. [31]

Nakon provedene analize omjera apsorbancije primijenjena je jedna od kemometrijskih tehnika, analiza glavnih komponenata (eng. *Principal component analysis*, PCA). Navedena tehnika je zajedno s FT-IR spektroskopijom korištena u velikom broju studija za identifikaciju karcinoma, kao i za praćenje učinkovitosti terapije. [4, 44] U ovom istraživanju PCA analiza provedena je na dva spektralna područja karakteristična za proteine, lipide, ugljikohidrate i nukleinske kiseline,  $1700-1495 \text{ cm}^{-1}$  i  $1350-950 \text{ cm}^{-1}$ . Rezultati provedene analize u skladu su s prethodno analiziranim apsorpcijskim spektrima (slike 9-12) te omjerima apsorbancije, pokazujući da nukleinske kiseline [45] imaju važnu ulogu u nastajanju tumora, dok su proteini [39] najosjetljiviji na mutacije koji se zbivaju tijekom procesa karcinogeneze. [31]

### 3.2.3. Rasprava i zaljučak istraživanja

Provedeno istraživanje ukazuje na mogućnost primjene FT-IR spektroskopske analize za praćenje razvoja karcinoma, ali i učinkovitosti terapije. [41] Dokazano je da FT-IR spektroskopija uz tehnike analize podataka omogućuje otkrivanje promjena u biokemijskom sastavu tkiva ključnom za uspješno liječenje. Također je dokazano da FT-IR spektroskopija zajedno s PCA analizom može doprinijeti u procjeni učinkovitosti kemoterapije. [44]

U provedenom istraživanju omjer amid I/ amid II u G1 i G2 stadijima karcinoma pokazuje slično smanjenje prije i povećanje nakon kemoterapije. Najviše su pogođeni pacijenti s G3 stadijem karcinoma kod kojih je vidljivo povećanje udjela sekundarne strukture proteina prije kemoterapije te smanjenje nakon kemoterapije. Analiza apsorpcijskih spektara također je pokazala da je u tkivu prije kemoterapije posebno naglašeno područje amida II u proteinima. Dobiveni rezultati potvrđeni su i PCA analizom koja pokazuje povećanu prisutnost konformacije  $\beta$ -ploče amida I u spektrima tkiva prije kemoterapije, dok do stabilizacije dolazi nakon provedenog liječenja u sva tri stadija karcinoma. [31] Povezanost između količine proteina u tkivu i procesa karcinogeneze dokazana je u brojnim prethodno provedenim istraživanjima. [46] U kanceroznim stanicama funkcije proteina su poremećene, a metabolički putevi onemogućavaju pravilan rast stanica. [47, 48] Analiza područja nižih valnih brojeva također upućuje na prisutnost mutagenih aberacija u tkivu. [46] Utvrđeno je da razlike u frekvenciji osciliranja DNA i RNA imaju važnu ulogu u razlikovanju apsorpcijskih spektara zdravih i oboljelih pacijenata, [49] što se može objasniti brojnim faktorima poput povećanog sadržaja DNA, prisutnosti rastezних vibracija  $PO_2^-$  skupine koje se pripisuju ostećenjima DNA, ubrzanom metabolizmu DNA/RNA u kanceroznim stanicama te prisutnosti cirkulirajuće DNA dobivene iz karcinoma. [31]

U provedenom istraživanju omjeri Ph2, RNA, GLYCO i DNA povećavaju se prije i smanjuju poslije liječenja, približavajući se vrijednostima zdrave kontrole. Najzanimljiviji je omjer GLYCO/LWN (udio ugljikohidrata) koji se značajno smanjuje prije kemoterapije i zatim povećava nakon liječenja, a povezan je s izostankom jednog od pikova ugljikohidrata ( $1043\text{ cm}^{-1}$ ) u spektrima svih tkiva prije kemoterapije. Dobiveni rezultati odgovaraju i dostupnim saznanjima o tzv. "Warburgovom efektu", [50] koji objašnjava pojačani metabolizam glukoze u stanicama karcinoma tijekom neoplastičnog procesa. [31]

Nakon provedene analize područja nižih valnih brojeva, zaključeno je da su potrebna daljnja istraživanja za uspješno liječenje pacijenata s G2 stadijem karcinoma, budući da dobiveni rezultati za ovaj stadij karcinoma ukazuju da tkivo i dalje posjeduje najviše biokemijskih

značajki malignog tkiva u odnosu na tkiva s G1 i G3 stadijem tumora.

Bez obzira na uspješno provedeno predmetno istraživanje, postoje i određena ograničenja. Prvo, dugoročne informacije o svakom pacijentu bile bi od neprocjenjive važnosti kao dokaz dobivenih rezultata istraživanja. U ovom istraživanju svi su pacijenti uspješno izliječeni, stoga ne postoje rezultati o neuspješno provedenoj kemoterapiji što bi također bilo od neprocjenjive važnosti za bolje razumijevanje primijenjenog pristupa. S obzirom na navedeno, nije moguće definirati osjetljivost i specifičnost primijenjene metode za postavljanje moguće prognoze bolesti. Drugo, fiksacija parafinom tijekom pripreme uzoraka može utjecati na rezultate analize pa kako bi se izbjegao njezin utjecaj na spektralnu analizu i rezultate kemometrije, iz analize su isključene parafinske vrpce.

S obzirom da su u provedenom istraživanju praćeni rezultati prije i poslije kemoterapije malog broja pacijenata, dobiveni rezultati i zaključci ne mogu se primijeniti na cijelokupnoj populaciji. Dostupnost uzoraka također je vrlo ograničena zbog potrebe da se tkivo uzme dva puta iz istog pacijenta, prije i poslije punog ciklusa kemoterapije. Izrazito je važno provesti daljnja istraživanja s više uzoraka kako bi se dobiveni rezultati mogli primijeniti i u kliničke svrhe. Unatoč spomenutim ograničenjima provedenog istraživanja, pokazalo se da je analizom apsorpcijskih spektara te primjenom različitih kemometrijskih pristupa moguća procjena učinkovitosti liječenja karcinoma. [31]

## 4. Zaključak

1. Karcinom dojke najučestalija je vrsta karcinoma među ženama diljem svijeta. Stoga je od iznimne važnosti brza i rana dijagnoza kako bi se primjenom odgovarajućih terapija spriječilo daljnje napredovanje bolesti, a stopa preživljenja pacijenata uvelike povećala.
2. IR-spektroskopija jedna je od najčešće korištenih instrumentalnih metoda te pronalazi široku primjenu u biotehnologiji, medicine, biologiji, prehrambenoj industriji te u mnogim drugim područjima. Posljednjih godina IR-spektroskopija doživjela je veliki napredak te se počela primijenjivati u dijagnosticiranju različitih bolesti uključujući i karcinom dojke. Zbog svoje jednostavnosti, brzine, točnosti, niske cijene i mogućnosti automatizacije smatra se obećavajućom metodom za dijagnosticiranje i praćenje razvoja karcinoma dojke.
3. Prednosti Ramanove spektroskopije u usporedbi s drugim spektroskopskim tehnikama su mogućnost provođenja analize u uvjetima koji ne zahtijevaju vakuum, prisutnost inertnog plina niti specifičnu pripremu uzoraka. Ramanova i IR-spektroskopija međusobno su komplementarne te je njihovim kombiniranjem i analizom dobivenih vibracijskih spektara moguće dobiti informacije o kemijskom sastavu ispitivanog tkiva.
4. Posljednjih desetljeća prepoznat je potencijal FT-IR spektroskopije za analizu bioloških uzoraka karcinoma. Značajne prednosti ove metode su njezina jednostavnost, nedestruktivnost prema uzorcima, visoka rezolucija, ne zahtijeva primjenu reagensa te je potrebna mala količina uzorka uz minimalnu pripremu. FT-IR spektroskopija ima veliki potencijal za kliničke primjene koje uključuju probir, dijagnozu i prognozu karcinoma, kao i kontinuirano praćenje liječenja, progresije ili regresije bolesti. Ova metoda pokazala se kao potencijalno nova dijagnostička metoda za razlikovanje kancerogenih uzoraka od zdravih, kao i različitih vrsta karcinoma, uz visoku točnost, specifičnost i osjetljivost.
5. Budući da svaka molekula ima jedinstveni IR-spektar ovisno o valnoj duljini i količini apsorbiranog infracrvenog zračenja, primjenom IR-spektroskopije nastaju apsorpcijski IR-spektri s apsorpcijskim vrpčama karakterističnima za ispitani uzorak. Promjene koje se događaju u apsorpcijskim IR-spektrima karakteristične su za molekulske promjene kod specifičnih bolesti.
6. Ramanova i IR-spektroskopija omogućuju provedbu usporedne spektroskopske analize između zdravog i kanceroznog tkiva te tkiva koje se nalazi u blizini kancerozne regije. Između analiziranih vrsta tkiva uočene su značajne razlike u područjima koja

odgovaraju vibracijama ribonukleinskih kiselina, karotenoida, lipida i proteina. Provedeno istraživanje također pokazuje korelaciju između procesa karcinogeneze i količine karotenoida, masti i proteina u tkivu dojke. Strukturne promjene koje se javljaju u šećerima i proteinima u tkivu pacijenata upućuju na prisutnost metabolički poremećenih tumorskih stanica. Također je otkriveno da su proteini, šećeri, karotenoidi i lipidi najvarijabilnije komponente u tkivu dojke zbog čega se smatraju tumorskim markerima u dijagnosticiranju karcinoma.

7. Na temelju rezultata provedene analize zaključeno je da postoje uočljive razlike između zdravog i kanceroznog tkiva dojke, kao i da se uporabom kemoterapije kancerozno tkivo znatno mijenja i postaje nalik zdravom tkivu, no neke genetičke promjene nastale kao rezultat tumorskog procesa i dalje ostaju prisutne u tkivu. Stoga, Ramanova i IR-spektroskopija mogu poslužiti kao izvrstan alat za uspješno praćenje promjena karcinoma dojke, kao i praćenje učinkovitosti kemoterapije.
8. FT-IR spektroskopija u kombinaciji s kemometrijskim pristupom omogućuje usporedbu zdravog kontrolnog tkiva s TNBC tkivom prije i nakon kemoterapije s različitim stadijima malignosti. Primarne spektralne razlike između zdravog i kanceroznog tkiva pronađene su u područjima koja odgovaraju proteinima, polisaharidima i nukleinskim kiselinama. Primjenom statističke analize omjera apsorbancije i jedne od kemometrijskih tehnika, dokazano je da nukleinske kiseline imaju važnu ulogu u nastajanju tumora, dok su proteini najosjetljiviji na mutacije koje se zbivaju tijekom procesa karcinogeneze.
9. Dokazano je da FT-IR spektroskopija uz tehnike analize podataka omogućuje otkrivanje promjena u biokemijskom sastavu tkiva ključnom za uspješno liječenje. Također je dokazano da FT-IR spektroskopija zajedno s PCA analizom može doprinijeti u procjeni učinkovitosti kemoterapije.
10. Unatoč uspješno provedenim istraživanjima, postoje određena ograničenja primijenjenih metoda. Iz tog razloga potrebno je provesti daljnja istraživanja kako bi se sama metoda dodatno razvila i unaprijedila. Također je daljnja istraživanja potrebno provesti na većem broju ispitanika kako bi se dobiveni rezultati mogli primijeniti na široj populaciji. S obzirom na brojne navedene prednosti, sve je izglednije da će primjena IR-spektroskopije kao dijagnostičke metode imati svijetlu budućnost.



## 5. Popis literature

1. Roche Hrvatska (2022) <https://www.roche.hr/hr/terapijska-podrucja/onkologija/rak-dojke.html>. Pristupljeno 13. kolovoza 2022.
2. Backhaus J, Mueller R, Formanski N, Szlama N, Meerpohl HG, Eidt M i sur. (2010) Diagnosis of breast cancer with infrared spectroscopy from serum samples. *Vib Spectrosc* **52**, 173-177
3. Kovač V (2021) IR-spektroskopija. Nastavni materijal preuzet s Merlina, 3-45
4. Kar-Yan S, Wai-Leng L (2020) Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Cancer Screening and Diagnostic Tool: A Review and Prospects. *Cancers* **12**, 115
5. Epstein JB, Zhang L, Rosin M (2002) Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J Can Dent Assoc* **68**, 617–621
6. Seregni E, Coli A, Mazzucca N (2004) Circulating tumour markers in breast cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **31**, S15–S22
7. Soletormos G, Nielsen D, Schioler V, Mouridsen H, Dombernowsky P (2004) Monitoring different stages of breast cancer using tumour markers CA 15-3, CEA and TPA. *Eur J Cancer* **40**, 481–486
8. Denk W, Strickler JH (1990) Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Science* **248** (4951), 73-76
9. Depciuch J, Kaznowska E, Zawlik I, Wojnarowska R, Cholewa M, Heraud P i sur. (2016) Application of Raman Spectroscopy and Infrared Spectroscopy in the Identification of Breast Cancer. *Applied Spectroscopy* **70** (2), 251-263
10. Kečki Z (1992) Podstawy spektroskopii molekularnej. *PWN*
11. Institut Ruđer Bošković (2019) <https://www.irb.hr/Istrazivanje/Kapitalna-oprema/Ramanov-spektrometar>. Pristupljeno 25. kolovoza 2022.
12. Naumann D (2001) FT-Infrared and FT-Raman Spectroscopy in Biomedical Research: Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials. *Marcel Dekker*
13. Duncan WD, Williams GP (1983) Infrared Synchrotron Radiation from Electron Storage Rings. *Appl Opt* **22** (18), 2914-2923
14. Miller LM, Dumas P (2006) Chemical Imaging of Biological Tissue with Synchrotron Infrared Light. *Biochim Biophys Acta* **1758** (7), 846-857
15. Lyng FM, Faoláin EO, Conroy J, Meade AD, Knief P, Duffy B i sur. (2007) Vibrational Spectroscopy for Cervical Cancer Pathology, from Biochemical Analysis to Diagnostic Tool. *Exp Mol Pathol* **82** (2), 121–129
16. Walsh MJ, Singh MN, Stringfellow HF, Pollock HM, Hammiche A, Grude O i sur. (2008)

FTIR microspectroscopy coupled with two-class discrimination segregates markers responsible for inter- and intra-category variance in exfoliative cervical cytology. *Biomark Insights* **3**, 179–189

17. Balan V, Mihai CT, Cojocaru FD, Uritu CM, Dodi G, Botezat D i sur. (2019) Vibrational spectroscopy fingerprinting in medicine: From molecular to clinical practice. *Materials* **12**, 2884

18. Caine S, Heraud P, Tobin MJ, McNaughton D, Bernard CC (2012) The application of Fourier transform infrared microspectroscopy for the study of diseased central nervous system tissue. *Neuroimage* **59**, 3624–3640

19. Kumar S, Srinivasan A, Nikolajeff F (2018) Role of infrared spectroscopy and imaging in cancer diagnosis. *Curr Med Chem* **25**, 1055–1072

20. Backhaus J, Mueller R, Formanski N, Szlama N, Meerpohl HG, Eidt M i sur. (2010) Diagnosis of breast cancer with infrared spectroscopy from serum samples. *Vib Spectrosc* **52**, 173–177

21. WHO (2021) Breast cancer. WHO-World Health Organization, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>. Pristupljeno 13. kolovoza 2022.

22. Belac-Lovasić I (2022) Karcinom dojke – Pliva zdravlje. <https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/36080/Rak-dojke.html>. Pristupljeno 13. kolovoza 2022.

23. Meyers RA (2000) Encyclopedia of Analytical Chemistry. *John Wiley & Sons Ltd.*, Pp. 10815– 10837

24. Abramczyk H, Brozek-Pluska B, Surmacki J, Jablonska-Gajewicz J, Kordek R (2012) Raman ‘Optical Biopsy’ of Human Breast Cancer. *Prog Biophys Mol Biol* **108** (1–2), 74–81

25. Calder PC (2006) N-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Inflammation, and Inflammatory Diseases. *Am J Clin Nutr* **83** (6 Suppl), 1505S–1519S

26. Barth A (2000) The Infrared Absorption of Amino Acid Side Chains. *Prog Biophys Mol Biol* **74** (3–5), 141–173

27. Goralski P (1996) Interactions Between Cholesterol and Triacylglycerols in Carbon Tetrachloride: Calorimetric and Spectroscopic Studies. *Thermochim Acta* **274** (1), 45–52

28. Bhushan B, Pradhan A (2013) Detection of Breast & Cervical Cancer Using Raman Spectroscopy. *Int J Innov Res Sci Eng Technol* **2** (8), 3420–3425

29. Miller SO, Ewing GP, Howard C, Tachikawa H, Bigler SA, Barber WH i sur. (2003) Incorporating Cytochrome P450 3A4 Genotype Expression and FT-IR/Raman Spectroscopy Data as Means of Identification of Breast Tumors. *Biomed Sci Instrum* **39**, 24–29

30. Sommer E, Sommer S, Skopinska-Rozanska E (2022) Nienasycone kwasy tluszczowe a

nowotworzeni. *Współczesna onkologia* **2** (6), 60–63

31. Kołodzie M, Kaznowska E, Paszek S, Cebulski J, Barnaś E, Cholewa M i sur. (2022) Characterisation of breast cancer molecular signature and treatment assessment with vibrational spectroscopy and chemometric approach. *Plos One* **17** (3), 1-16
32. Morris G, Naidu S, Topham A, Guiles F, Xu Y, McCue P i sur. (2007) Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients—A single-institution compilation compared with the National Cancer Institute’s Surveillance, Epidemiology, and End Results Database. *Cancer* **110** (4), 876–84
33. Schneider B, Winer E, Foulkes W, Garber J, Perou C, Richardson A i sur. (2008) Triple-Negative Breast Cancer: Risk Factors to Potential Targets. *Clinical Cancer Research* **14** (24), 8010-8
34. Carey L, Dees E, Sawyer L, Gatti L, Moore D, Collichio F i sur. (2007) The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clinical Cancer Research* **13** (8), 2329-34
35. Wu X, Baig A, Kasymjanova G, Kafi K, Holcroft C, Mekouar H i sur. (2016) Pattern of Local Recurrence and Distant Metastasis in Breast Cancer By Molecular Subtype. *Cureus* **8** (12), e924
36. Wetzel D, LeVine S (1999) Microspectroscopy – Imaging molecular chemistry with infrared microscopy. *Science* **285** (5431), 1224-5
37. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman I (2008) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews* **43** (2), 134–79
38. Grzelak M, Wrobel P, Lankosz M, Stegowski Z, Chmura L, Adamek D i sur. (2018) Diagnosis of ovarian tumour tissues by SR-FTIR spectroscopy: A pilot study. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **203**, 48–55
39. Wongwattanakul M, Hahnvajjanawong C, Tippayawat P, Chio-Srichan S, Leelayuwat C, Limpaiboon T i sur. (2017) Classification of Gemcitabine resistant Cholangiocarcinoma cell lines using synchrotron FTIR microspectroscopy. *Journal of Biophotonics* **10** (3), 367–76
40. Timilsena Y, Vongsvivut J, Tobin M, Adhikari R, Barrow C, Adhikari B (2019) Investigation of oil distribution in spray-dried chia seed oil microcapsules using synchrotron-FTIR microspectroscopy. *Food Chemistry* **275**, 457–66
41. Kaznowska E, Depciuch J, Lach K, Kolodziej M, Kozirowska A, Vongsvivut J i sur. (2018) The classification of lung cancers and their degree of malignancy by FTIR, PCA-LDA analysis, and a physics-based computational model. *Talanta* **186**, 337–45
42. Gazi E, Dwyer J, Lockyer NP, Miyan J, Gardner P, Hart CA i sur. (2005) A study of cytokinetic and motile prostate cancer cells using synchrotron-based FTIR microspectroscopic imaging. *Vibrational Spectroscopy* **38** (1–2), 193–201
43. Liu H, Su Q, Sheng D, Zheng W, Wang X (2017) Comparison of red blood cells from

gastric cancer patients and healthy persons using FTIR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* **1130**, 33–7

44. Zawlik I, Kaznowska E, Cebulski J, Kolodziej M, Depciuch J, Vongsvivut J i sur. (2016). FPA-FTIR microspectroscopy for monitoring chemotherapy efficacy in triple-negative breast cancer. *Sci Rep* **6**, 37333

45. Pfirschke C, Garris C, Pittet M (2015) Common TLR5 Mutations Control Cancer Progression. *Cancer Cell* **27** (1), 1–3

46. Chang C, Tu H, Chen Y, Lin C, Hou M (2014) Tumour and lymph node uptakes on dual-phased 2-deoxy-2 [18F] fluoro-D-glucose positron emission tomography/computed tomography correlate with prognostic parameters in breast cancer. *Journal of International Medical Research* **42** (6), 1209–21

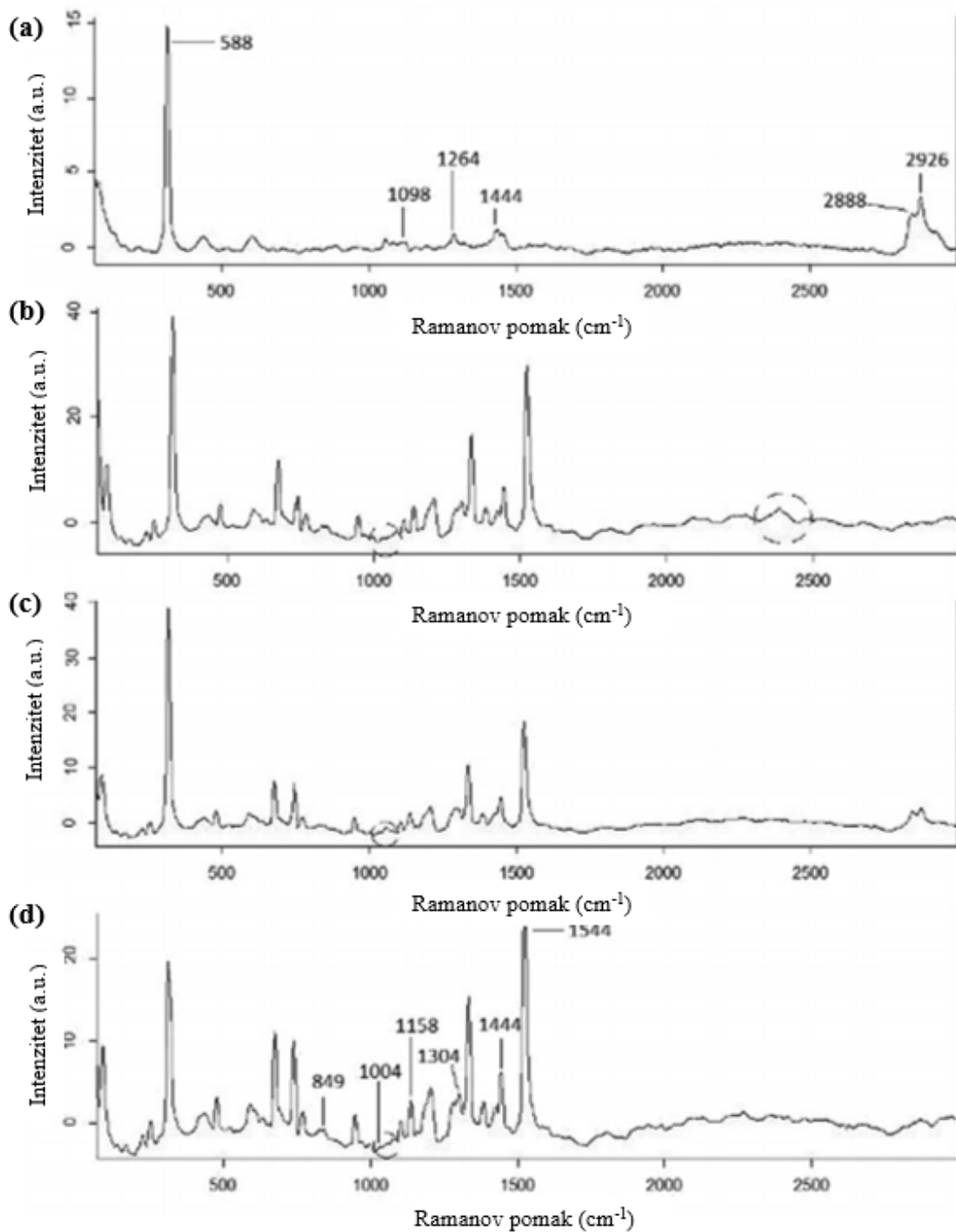
47. Behbod F, Rosen J (2005) Will cancer stem cells provide new therapeutic targets? *Carcinogenesis* **26** (4), 703–11

48. Kumar N, Gilula N (1996) The gap junction communication channel. *Cell* **84** (3), 381–8

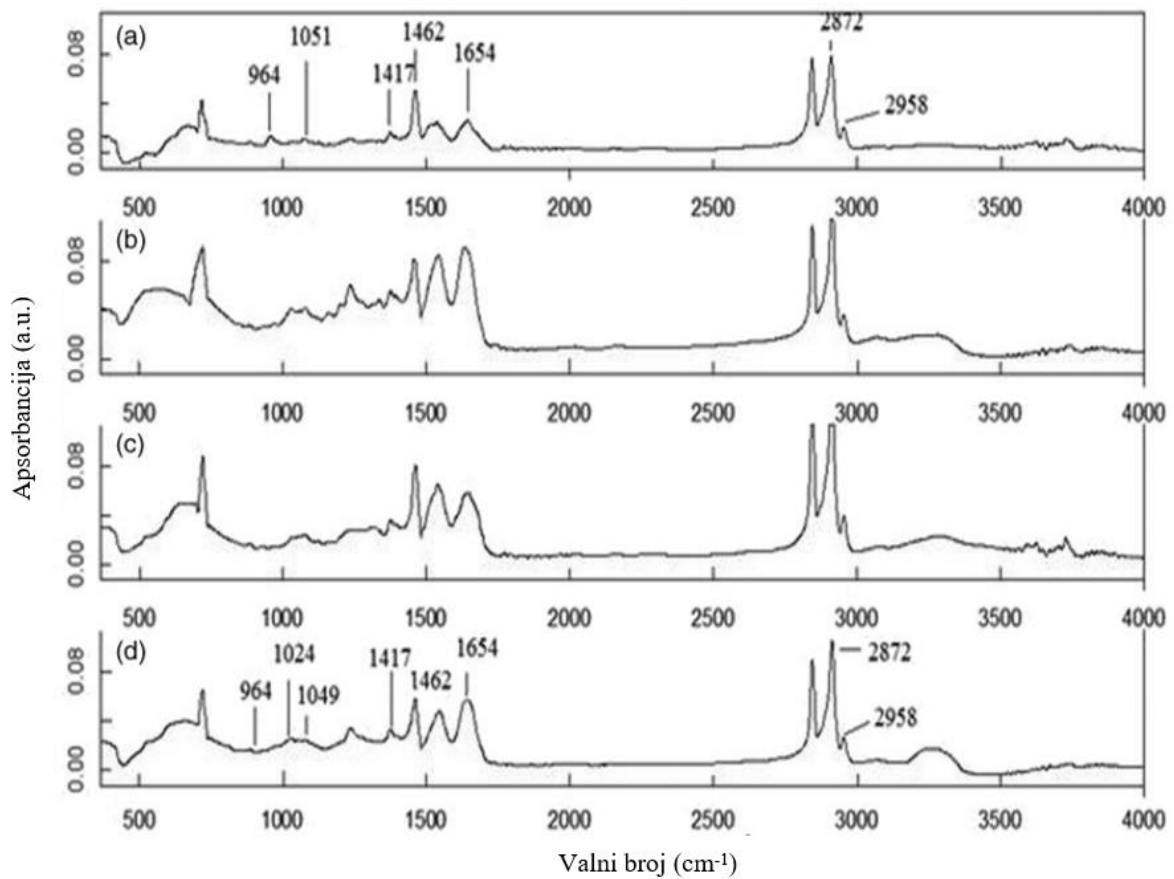
49. Sitnikova V, Kotkova M, Nosenko T, Kotkova T, Martynova D, Uspenskaya M (2020) Breast cancer detection by ATR-FTIR spectroscopy of blood serum and multivariate data-analysis. *Talanta* **214**

50. Warburg O, Wind F, Negelein E (1927) The metabolism of tumors in the body. *Journal of General Physiology* **8** (6), 519–30

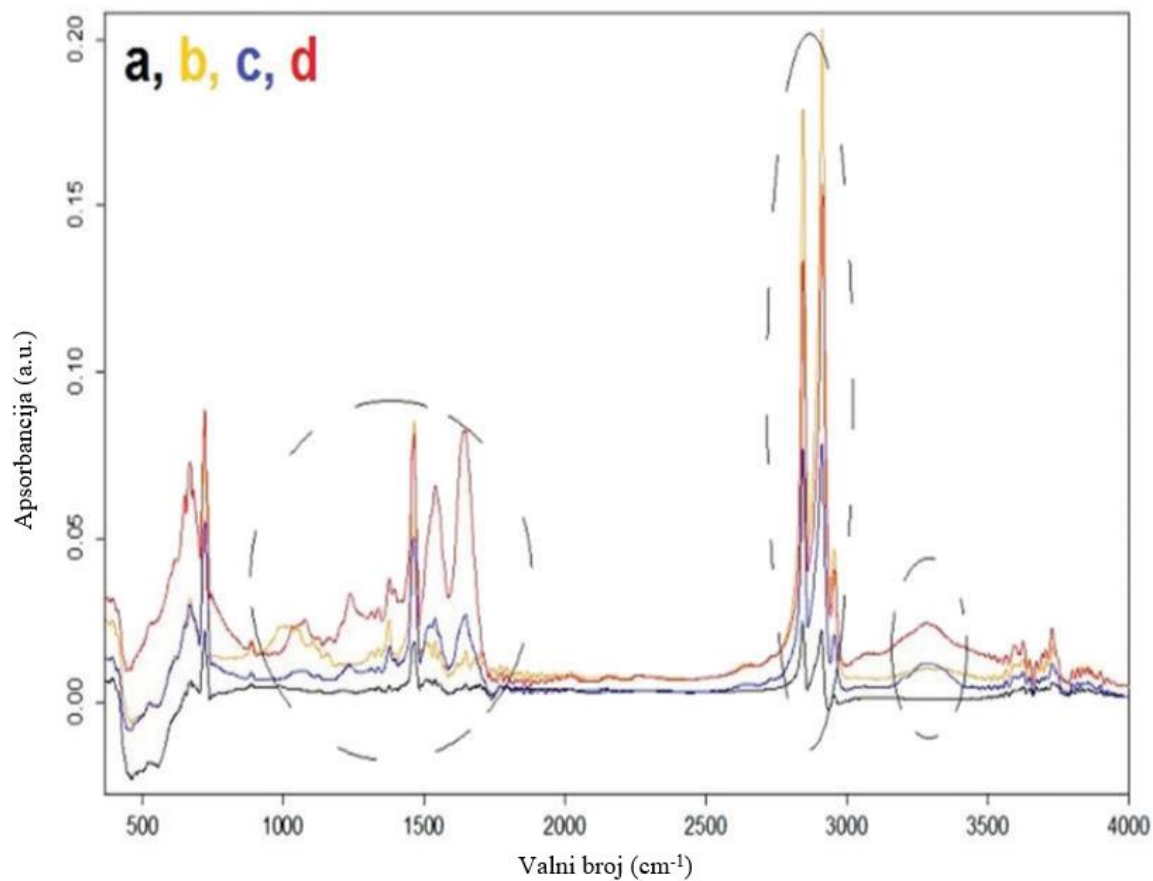
## 6. Prilog



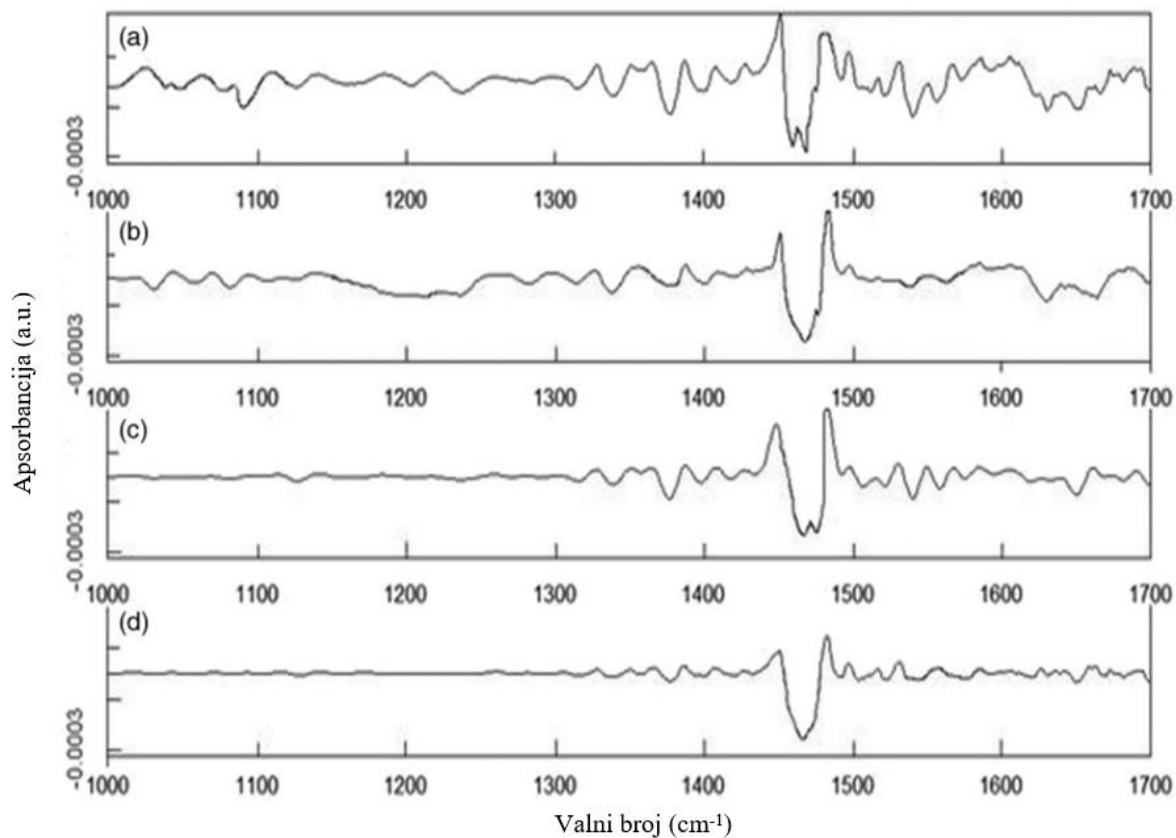
Slika 5. Spektri Ramanovog pomaka za uzorak 2: (a) tkivo karcinoma dojke prije kemoterapije, (b) normalno tkivo dojke koje se nalazi oko kancerozne regije, (c) tkivo karcinoma dojke nakon kemoterapije i (d) nekancerozno normalno tkivo dojke. [prema 9]



Slika 6. IR-spektri apsorbancije i valnog broja za uzorak 2: (a) tkivo karcinoma dojke prije kemoterapije, (b) normalno tkivo dojke iz područja oko kancerozne regije, (c) tkivo karcinoma dojke nakon kemoterapije i (d) normalno nekancerozno tkivo. [prema 9]



Slika 7. Spektar apsorbancije i valnog broja za uzorak 2: (a) tkivo karcinoma dojke prije kemoterapije, (b) normalno tkivo dojke iz područja oko kancerozne regije, (c) tkivo karcinoma dojke nakon kemoterapije i (d) normalno nekancerozno tkivo. [prema 9]



Slika 8. Druga derivacija spektara apsorbancije i valnog broja za uzorak 2: (a) tkivo karcinoma dojke prije kemoterapije, (b) normalno tkivo dojke iz područja oko kancerozne regije, (c) tkivo karcinoma dojke nakon kemoterapije i (d) normalno nekancerozno tkivo. [prema 9]



## **Izjava o izvornosti**

Ja Vita Vučićević izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis