

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.638>

<https://orcid.org/0009-0000-3794-5073>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gediminas Platkevičius

Šlapimo pūslės vėžio diagnostikos
rezultatų palyginimas audinių
virpesinės spektroskopijos, citologijos ir
histologijos metodais

DAKTARO DISERTACIJA

Medicinos ir sveikatos mokslai,

Medicina (M 001)

VILNIUS 2024

Disertacija rengta 2019–2023 metais Vilniaus universitete, medicinos fakultete.

Mokslinis vadovas – prof. dr. Arūnas Želvys (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – prof. dr. Tomas Poškus (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Nariai:

prof. dr. Vilnis Lietuvietis (Riga Stradinš University, medicinos ir sveikatos mokslai),

doc. dr. Aušvydas Patašius (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, visuomenės sveikata – M 004),

doc. dr. Laurynas Rimševičius (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

prof. dr. Gilvydas Verkauskas (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2024 m. rugsėjo mėn. 18 d. 10 val. Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Raudonojoje auditorijoje. Adresas: Santariškių g. 2, LT-08661, Vilnius, Lietuva.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.638>

<https://orcid.org/0009-0000-3794-5073>

VILNIUS UNIVERSITY

Gediminas Platkevičius

Comparison of Bladder Cancer Diagnostic Results by Tissue Vibrational Spectroscopy, Cytology, and Histology Methods

DOCTORAL DISSERTATION

Medicine and Health Sciences,
Medicine (M 001)

VILNIUS 2024

The dissertation was prepared between 2019 and 2023 at Vilnius University.

Academic supervisor – Prof. Dr. Arūnas Želvys (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

This doctoral dissertation will be defended in a public/closed meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Tomas Poškus (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

Members:

Prof. Dr. Vilnis Lietuvielis (Riga Stradiņš University, Medicine and Health Sciences),

Assoc. Prof. Dr. Aušvydas Patašius (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Public Health – M 001),

Assoc. Prof. Dr. Laurynas Rimševičius (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Prof. Dr. Gilvydas Verkauskas (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 10:00 on the 18th of September, 2024 in the Red Hall of Vilnius University Hospital Santaros Klinikos.

Address: Santariškių Str. 2, LT-08661, Vilnius, Lithuania

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

SANTRUMPOS

ŠPV – šlapimo pūslės vėžys

UK – urotelio karcinoma

RNN – raumeninio sluoksnio neinfiltruojantis navikas

RIN – raumeninį sluoksnį infiltruojantys navikai

ŠPTUR – šlapimo pūslės transuretrinė rezekcija

IR – infraraudonieji spinduliai

CIS – karcinoma in situ

PSO – Pasaulio Sveikatos Organizacija

BŠC – baltos šviesos cistoskopija

PDD - fotodinaminė diagnostika (PDD, angl. - photodynamic diagnosis)

NBI - siauros juostos vaizdavimas (NBI, angl. – narrow band imaging)

NPV – neigiama prognostinė vertė

TPV – teigiama prognostinė vertė

RC – radikali cistektomija

TNM – vėžio išplitimo klasifikavimo sistema (angl. Tumor Node Metastasis)

SERS - paviršiaus sustiprinta Ramano sklaidos spektroskopija (SERS, angl. surface-enhanced Raman scattering spectroscopy)

GLOBOCAN - Pasaulinė Vėžio Stebėjimo organizacija (GLOBOCAN; angl. Global Cancer Observatory)

RS – rizikos santykis

PI – pasikliautinis intervalas

BCG - Bacillus Calmette–Guérin

HCA - hierarchinė klasterių analizė (angl. hierarchical cluster analysis)

PCA - pagrindinių komponentų analizė (angl. principal component analysis)

APUK – aukšto piktybiškumo urotelio karcinoma

ŽPUK – žemo piktybiškumo urotelio karcinoma

AUC – plotas po kreive (angl. area under curve). Binarinio klasifikatoriaus gebėjimo atskirti klases matas.

TURINYS

1. ĮVADAS.....	9
1.1. Darbo aktualumas.....	9
1.2. Darbo tikslas.....	10
1.3. Darbo uždaviniai	10
1.4. Darbo naujumas ir reikšmė	11
1.5. Disertacijos ginamieji teiginiai.....	12
2. LITERATŪROS APŽVALGA	13
2.1. Šlapimo pūslės vėžys	13
2.1.1. Šlapimo pūslės vėžio epidemiologija.....	13
2.1.2. Šlapimo pūslės vėžio etiopatogenezė.....	15
2.1.3. Šlapimo pūslės vėžio piktybiškumo vertinimas	16
2.1.4. Šlapimo pūslės vėžio išplitimo vertinimas.....	17
2.1.5. Endoskopiniai šlapimo pūslės vėžio diagnostikos metodai	18
2.1.6. Šlapimo pūslės vėžio šlapimo ir nuoplovų žymenys	19
2.2. Virpesinės spektroskopijos pritaikymas šlapimo pūslės vėžio diagnostikai	20
2.2.1. Ramano spektroskopija.....	24
2.2.2. Paviršiaus sustiprinta Ramano sklaida.....	25
2.2.2. Infraraudonoji (IR) spektroskopija.....	27
2.2.1. Šviesolaidiniai zondai pritaikant spektroskopinius metodus klinikinėje praktikoje	30
3. DARBO METODOLOGIJA	32
3.1. Įtraukimo kriterijai	33
3.2. Neįtraukimo kriterijai.....	33
3.3. Klinikiniai ir pataloginiai duomenys.....	34
3.3.1. Klinikinių ir pataloginių duomenų rinkimas.....	34
3.4. Biologiniai mėginiai ir jų molekulinė analizė	34
3.4.1. Biologinių mėginių rinkimas.....	34

3.4.2. Biologinių mėginių spektroskopinė analizė	35
3.4.2.1. SERS viso audinio ir audinių tarpląstelinio skysčio mėginių analizė	36
3.4.2.2. IR viso audinio spektroskopinė analizė	38
3.4.2.3. Šlapimo pūslės nuoplovų tyrimas SERS metodu.....	38
3.5. Rezultatų vertinimas matematinės statistikos metodais	39
3.6. Doktoranto ir kitų tyrėjų indėlis	43
4. REZULTATAI	45
4.1. Tiriamųjų bendrosios charakteristikos	45
4.2. Šlapimo pūslės audinio tyrimai SERS metodu.....	45
4.3. Šlapimo pūslės tarpląstelinio skysčio tyrimai SERS metodu.....	48
4.4. Šlapimo pūslės audinio tyrimai IR metodu	52
4.5. Šlapimo pūslės nuoplovų tyrimas SERS metodu.....	56
4.6. Šlapimo pūslės vėžio piktybiškumo vertinimas spektroskopiniais metodais	60
5. REZULTATŲ APTARIMAS	63
5.1. Spektroskopinių tyrimų nustatytų žymenų juostų analizė.....	63
5.2. Spektroskopinių metodų rezultatų palyginimas	68
5.3. Veiksniai, galėję įtakoti tyrimo rezultatus.....	69
IŠVADOS.....	72
PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS.....	73
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	74
CURRICULUM VITAE	89
PRIEDAI	92
SUMMARY	93
PADĖKA.....	131
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	132

1. ĮVADAS

1.1. Darbo aktualumas

Šlapimo pūslės vėžys (ŠPV) – septintas pagal dažnumą vyrų onkologinis susirgimas pasaulyje, dešimtas – jei skaičiuojamos abi lytys.¹ Sergamumas šlapimo pūslės vėžiu yra nevienodas skirtinguose geografiniuose regionuose, tačiau prognozuojama, kad bendrai pasaulyje per ateinantį dešimtmetį jis ir toliau didės.² Tai yra heterogeniška liga, kuri apima ir mažai agresyvius šlapimo pūslės navikus, kurie retai progresuoja, tačiau dažnai recidyvuoja ir lemia ilgalaikį pacientų sekimą, ir agresyvius navikus, kurie dažnai plinta į gilesnius šlapimo pūslės sluoksnius ir kitus organus.³ Didžioji dalis (apie 75 %) naujai nustatomų ŠPV atvejų yra raumenis neinfiltruojantys navikai (RNN, ≤T1 stadija), apriboti šlapimo pūslės gleivinės ir pogleivio ribose.⁴ Likusiems 25-30 % ŠPV atvejų nustatoma naviko invazija į gilesnius šlapimo pūslės sluoksnius (RIN – raumeninį sluoksnį infiltruojantis navikas, ≥T2 stadija), arba nustatoma liga, kai jau susiformavo atokiosios metastazės.⁴ RNN gydomas atliekant šlapimo pūslės transuretrines rezekcijas su ar be po to sekančia intravezikine terapija⁵, kai tuo tarpu RIN gydomas radikaliomis cistektomijos, radioterapijos, chemoterapijos gydymo metodais ar jų kombinacijomis.⁶ Nepaisant to, kad didžioji dalis ŠPV atvejų nustatoma ankstyvose stadijose, kai pacientui dar galima taikyti šlapimo pūslę tausojančius gydymo metodus, ligai būdingas aukštas recidyvavimo (78 %) ir progresavimo (45 %) dažnis.⁷ Ligos nustatymas pradinėse ligos stadijose – vienas svarbiausių klinicisto uždavinių. Anksti nustatyta liga gali pagerinti pacientų išgyvenamumą, išsaugoti pacientų gyvenimo kokybę ir sumažinti ekonominę naštą visuomenei.

Šiuo metu taikomos standartinės šlapimo pūslės vėžio diagnostinės priemonės yra baltos šviesos cistoskopija kartu su šlapimo pūslės transuretrine rezekcija (ŠPTUR) ir po to sekančiu patologiiniu šlapimo pūslės rezektatų ištyrimu. Ši diagnostinė taktika leidžia nustatyti, ar tiriamajame audinyje yra ŠPV požymių, kokius šlapimo pūslės sluoksnius pažeidžia ŠPV, koks yra ŠPV piktybiškumo laipsnis. Vis dėlto, baltos šviesos cistoskopija pasižymi nedideliu neigiamos prognostinės vertės (NPV) rodikliu – 56 %.⁸ Šis rodiklis yra kiek aukštesnis – 86 %, jei kartu yra taikomas šlapimo pūslės nuoplovų citologinis tyrimas.⁹ Taip pat ši diagnostinė taktika yra invazinė, jai būtina atlikti šlapimo pūslės sienelės rezekciją, kad po to būtų galima ją iširti pataloginiais metodais. ŠPTUR komplikacijų dažnis siekia 4-6 %, dažniausios iš jų – šlapimo takų infekcijos ir kraujavimas iš šlapimo takų.¹⁰ Literatūros duomenimis baltos šviesos cistoskopijos teigiama prognostinė vertė (PPV) yra

64 %, o tai reiškia, kad 36 % ŠPTUR procedūrų yra perteklinės.⁸ Tai rodo, kad ŠPV standartinė diagnostikos taktika nėra optimali ir reikalingos naujos technologijos navikiniams procesams šlapimo pūslėje nustatyti, kurios būtų tikslesnės, patogios specialistui, sumažintų su liga susijusių komplikacijų dažnį ir ekonominę naštą visuomenei.

Biologinių audinių tyrimams chirurginės onkologijos srityje vis plačiau taikomi įvairūs optinės spektroskopijos metodai, įskaitant fluorescencinę, Ramano sklaidos ir infraraudonosios (IR) sugerties spektroskopiją. Chirurginėms procedūroms jau taikomi fluorescencijos metodai. Fluorescencinė chirurgija jau taikoma kelių tipų onkologinėms operacijoms.¹¹ Operacijos metu šis metodas leidžia vizualizuoti įvairius audinių tipus, tokius kaip normalus audinys ir piktybiniai pažeidimai, kurie nebūtų matomi apžiūrint plika akimi. Tačiau yra tam tikrų apribojimų. Norint vizualizuoti skirtingus audinių tipus, prieš tyrimą į organizmą reikia įterpti fluorescencinės kontrastinės medžiagos, kad ji kauptųsi tikslinėje navikinio audinio srityje. Šiuo atžvilgiu virpesinės spektroskopijos (Ramano sklaida ir IR sugertis) metodai turi tam tikrų pranašumų, nes juos galima laikyti metodais be papildomos kontrastinės medžiagos, nereikalaujant audinių dažymo ar cheminio apdorojimo prieš tyrimą.

Ramano sklaidos spektroskopijos metodai buvo pritaikyti navikinių audinių identifikavimui žmonių ir gyvūnų modeliuose ir davė daug žadančių rezultatų.¹² Pavyzdžiui, pritaikius šviesolaidinę technologiją smegenų audinio tyrimui parodė galimybę atlikti tyrimą *in vivo* sąlygomis ir parodė gerus intraoperacinio naviko nustatymo rezultatus.¹³ Taip pat buvo atlikta nemažai virpesinės spektroskopijos tyrimų su šlapimo pūslės vėžiu.¹⁴⁻²¹ Įrodyta, kad IR spektroskopija gali būti naudojama ne tik vėžiniams ir nevėžiniams šlapimo pūslės audiniams atskirti^{14,15}, bet ir šlapimo pūslės vėžiui aptikti iš šlapimo pūslės nuoplovų.¹⁶

1.2. Darbo tikslas

Pacientų sergančių šlapimo pūslės vėžiu diagnostikos optimizavimas, remiantis audinių virpesinės spektroskopijos, citologijos ir histologijos metodais.

1.3. Darbo uždaviniai

1. Įvertinti virpesinės spektroskopijos metodų galimybę diagnozuoti šlapimo pūslės vėžį, analizuojant šlapimo pūslės audinius.

2. Įvertinti virpesinės spektroskopijos metodo galimybes diagnozuoti šlapimo pūslės vėžį, analizuojant šlapimo pūslės nuoplovų nuosėdas.
3. Nustatyti virpesinės spektroskopijos metodo tikslumą diagnozuojant šlapimo pūslės vėžį.
4. Įvertinti virpesinės spektroskopijos metodo galimybę diferencijuoti šlapimo pūslės vėžį pagal histologinį (diferenciacijos) laipsnį.

1.4. Darbo naujumas ir reikšmė

Šių dienų literatūroje daug dėmesio skiriama onkologinių ligų netiesioginiam nustatymui, geriau žinomam „skystųjų biopsijų“ (angl. Liquid biopsies) pavadinimu. Jų principas yra neinvaziniu būdu nustatyti ar tiksliniame organe yra vėžinių pakitimų. Virpesinės spektroskopijos metodai pasižymi galimybe atskirti medžiagas pagal jų molekulinis skirtumus, šių medžiagų (ar audinių) nepažeidžiant. Šiame tyrime buvo naudoti du virpesinės spektroskopijos metodai – paviršiaus sustiprinta Ramano sklaidos spektroskopija (SERS, angl. surface-enhanced Raman scattering spectroscopy) ir šviesolaidinė pažeistojo visiškojo vidaus atspindžio Infraraudonoji spektroskopija (angl. fiber-based attenuated total reflection infrared spectroscopy).

Pirmuoju metodu (SERS) buvo tiriami šlapimo pūslės vėžinio ir nevėžinio audinio preparatai, jų tarpląstelinio skysčio preparatai, taip pat šlapimo pūslės nuoplovos pacientų, sergančių ir nesergančių šlapimo pūslės vėžiu.

Nustatyti pagrindiniai spektriniai skirtumai *ex vivo* sąlygomis, leidžiantys atskirti nevėžinius ir vėžinius audinius, tarpląstelinio skysčio SERS spektruose. Šios spektrinės juostos yra ties 1052 cm^{-1} , 1414 cm^{-1} ir 660 cm^{-1} . Spektrinė juosta ties 1052 cm^{-1} priskirta pieno rūgšties ir cisteino molekulėms, spektrinė juosta ties 1414 cm^{-1} – lipidų, nukleorūgščių ir baltymų molekulėms, spektrinė juosta ties 660 cm^{-1} – cisteino molekulėms.

Nustatyta spektrinė sritis ties $1020\text{--}1080\text{ cm}^{-1}$, kurią analizuojant pagrindinių komponentų analizės metodu, aiškiai išskiriama taškų grupė, kuri leidžia diferencijuoti nevėžinį šlapimo pūslės audinį nuo vėžinio.

Nustatyti spektrinių juostų skirtumai ties 852 cm^{-1} , 919 cm^{-1} , 1200 cm^{-1} ir 1030 cm^{-1} tiriant sveikų ir sergančių šlapimo pūslės vėžiu pacientų šlapimo pūslės nuoplovas. Nustatytas spektrinių juostų intervalas ties $900\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$, kuriame atlikus K-vidurkių analizę gauti geriausi šlapimo pūslės nuoplovų tyrimo jautrumo ir specifiškumo rezultatai.

Antruoju metodu (IR spektroskopija) buvo tiriami vėžinio ir nevėžinio audinio preparatai.

Nustatyti pagrindiniai spektriniai skirtumai, leidžiantys atskirti nevėžinius ir vėžinius audinius šlapimo pūslės audinio IR spektruose. Šios spektrinės juostos yra ties 972 cm^{-1} , 1028 cm^{-1} , 1033 cm^{-1} , 1082 cm^{-1} , 1154 cm^{-1} , 1206 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} , 1282 cm^{-1} , 1317 cm^{-1} ir 1339 cm^{-1} .

Literatūroje yra tik pavieniai virpesinės spektroskopijos tyrimai su šlapimo pūslės vėžio preparatais. Doktoranto žiniomis, šioje disertacijoje aprašomas šviesolaidinės spektroskopijos tyrimas su šviežiai rezekuotais šlapimo pūslės audiniais buvo pirmasis literatūroje. Virpesinės spektroskopijos tyrimas su šlapimo pūslės nuoplovomis buvo tik viena kartą aprašytas literatūroje.¹⁶ Tuo tarpu, SERS metodu šlapimo pūslės nuoplovų tyrimų literatūroje nebuvo rasta.

Šioje disertacijoje aprašomo darbo tikslas - supaprastinti šlapimo pūslės vėžio diagnostiką, sumažinti intervencijų ir su jomis susijusių komplikacijų dažnį. Teorinė darbo reikšmė: automatizuotais diagnostiniais metodais nustatyti ar audinyje yra objektyvių ŠPV požymių iki planuojant chirurginę intervenciją ir šlapimo pūslės audinio vientisumo suardymą.

1.5. Disertacijos ginamieji teiginiai

1. Paviršiaus sustiprinta Ramano sklaidos spektroskopija (SERS) ir Infraraudonoji (IR) spektroskopija gali diferencijuoti šlapimo pūslės vėžio ir nevėžinius šlapimo pūslės audinius *ex vivo* sąlygomis.
2. SERS gali diferencijuoti šlapimo pūslės vėžiu sergančiųjų ir sveikų pacientų nuoplovas.
3. SERS ir IR spektroskopijos metodai pasižymi aukštais jautrumo ir specifiškumo rodikliais diferencijuojant šlapimo pūslės vėžio ir nevėžinius šlapimo pūslės audinius *ex vivo* sąlygomis.
4. IR spektroskopijos metodas gali diferencijuoti šlapimo pūslės vėžio audinius pagal piktybiškumo laipsnį *ex vivo* sąlygomis.

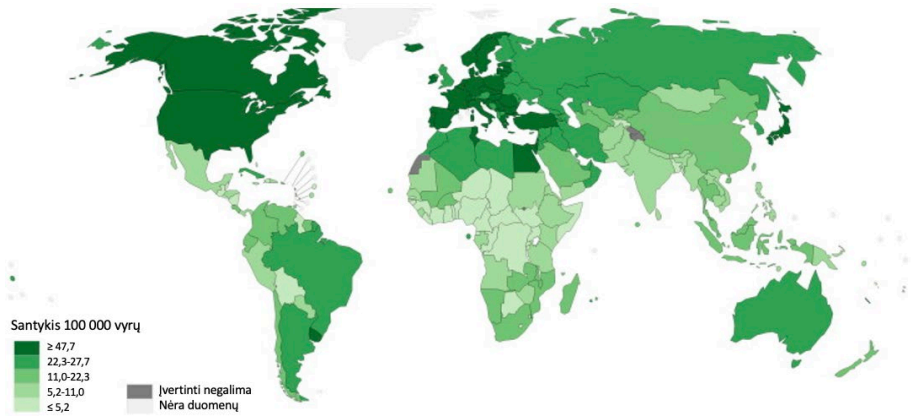
2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Šlapimo pūslės vėžys

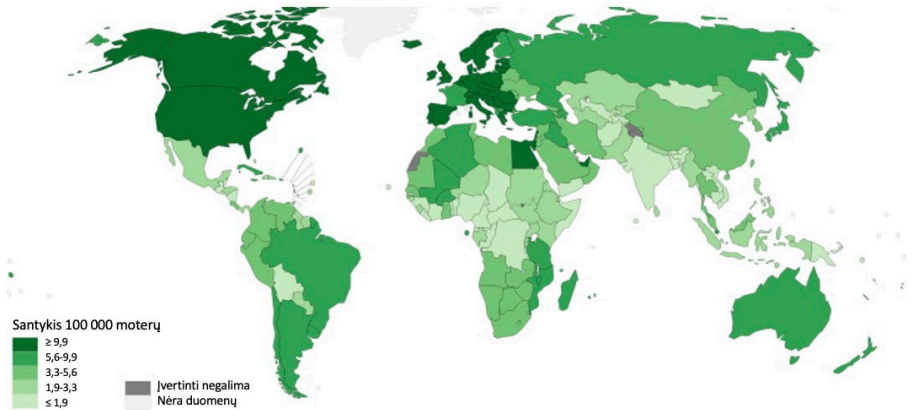
Šlapimo pūslės vėžys (ŠPV) – tai paviršinių, išklojančių šlapimo pūslės spindį ląstelių – urotelio (arba pereinamųjų ląstelių), piktybinis susirgimas (karcinoma). Urotelio karcinomos (UK) terminas apima ir kitų šlapimo takų dalių onkologinius susirgimus (inksto geldelės, šlapimtakių, šlaplės), tačiau 90-95% urotelio karcinomos atvejų yra ŠPV, todėl šios disertacijos dėmesys bus skirtas šlapimo pūslės vėžiui.¹⁷

2.1.1. Šlapimo pūslės vėžio epidemiologija

Pasaulinės Vėžio Stebėjimo organizacijos (GLOBOCAN; angl. Global Cancer Observatory) duomenimis 2020 metais pasaulyje buvo 573 000 nauji ŠPV atvejai ir 213 000 mirtys.^{18,19} Trys ketvirtadaliai naujų ŠPV atvejų buvo nustatyti vyrams. Pagal amžių standartizuoti sergamumo rodikliai (100 000 gyventojų per metus) abiem lytims buvo aukščiausi Europoje (11), Šiaurės Amerikoje (11), Šiaurės Afrikoje (8,9) ir Vakarų Azijoje (8,6). Tuo tarpu žemiausi – Vakarų Afrikoje (2,0), Vidurio Afrikoje (2,0), Centrinėje Amerikoje (2,2) ir Pietų Vidurio Azijoje (1,9). Vyrų ir moterų santykis Pasaulyje skirtinguose regionuose varijuoja nuo 6:1 iki 2:1 (100 000 gyventojų per metus). 2020 metais nustatytas 5-erių metų ŠPV paplitimas pasaulyje buvo 1 721 000 atvejai. Pagal amžių standartizuoti mirtingumo rodikliai (100 000 gyventojų per metus) abiem lytims buvo aukščiausi Šiaurės Afrikoje (5,2), Pietų Europoje (3,3) ir Vakarų Afrikoje (3,2).²⁰ Vyrams ŠPV yra 6-ta dažniausia onkologinė liga pasaulyje (~ 5 % visų onkologinių ligų), tuo tarpu moterims – 17-ta (~ 1,5 % visų onkologinių ligų). ŠPV yra 9-ta labiausiai paplitusi onkologinė liga abiem lytims (5-erių metų paplitimo rodiklis, 22 atv. per 100 000 gyv.).²⁰ GLOBACON sudaryti ŠPV paplitimo per penkerius metus rodikliai vyrams ir moterims pateikti paveikslėliuose nr. 1 ir 2.



1 pav. Šlapimo pūslės vėžio paplitimo per penkerius metus rodiklis pasaulyje vyrams. (2020 m., visos amžiaus grupės. GLOBACON 2020, pritaikyta pagal prieigą internete: <http://gco.iarc.fr/today>)



2 pav. Šlapimo pūslės vėžio paplitimo per penkerius metus rodiklis pasaulyje moterims. (2020 m., visos amžiaus grupės. GLOBACON 2020, pritaikyta pagal prieigą internete: <http://gco.iarc.fr/today>)

Lietuvos vėžio registre 2017 metų duomenimis ŠPV pagal amžių standartizuotas sergamumo rodiklis (100 000 gyv. per metus) abiem lytims buvo 5,5 (viso 405 atvejai). Tuo tarpu vyrams – 11,9 (viso 321 atvejai), o moterims – 1,6 (viso 84 atvejai). Pagal amžių standartizuotas mirtingumo rodiklis (100 000 gyv. per metus) abiem lytims buvo 3,1 (viso 263 atvejai). Tuo tarpu vyrams – 6,7 (viso 195 atvejai), o moterims – 1,1 (viso 68 atvejai).

2.1.2. Šlapimo pūslės vėžio etiopatogeneze

ŠPV – daugiafaktorinė liga, kurios etiologija nėra aiškiai žinoma. Tyrimų duomenimis tik 4,3 % pacientų sergančių ŠPV turi pirmos eilės giminaitį sirgusį ŠPV²¹, o 50 % pacientų sergančių UK šeimoje buvo asmenų sirgusių betkokia onkologine liga.²² Manoma, kad daugelį ŠPV sukelia išoriniai veiksniai. Tarptautinė vėžio tyrimų agentūra (IARC - International Agency for Research on Cancer) surinko pakankamai įrodymų dėl šių ŠPV išorės rizikos veiksnių: tabako rūkymas, įvairūs profesiniai poveikiai (aliuminio gamyba, gumos gamyba, dažymas, gaisrų gesinimas, įvairių dažų (pvz.: auraminas) arba tarpinių dažų produktų (pvz., 4-aminobifenilas)), aplinkos poveikis (jonizuojančioji spinduliuotė ir arsenas), vaistai (ciklofosfamidai ir chlornafazinas), opijaus vartojimas ir šistosomų sukelta infekcija.²⁰ Apie 50 % visų ŠPV atvejų yra sukelti tabako gaminių rūkymo.²³ Kohortinis tyrimas, kuriame dalyvavo 422 010 tiriamųjų, kurie buvo stebimi 30 metų, parodė 2–3 kartus padidėjusią ŠPV riziką rūkant (rizikos santykis [RS]: 2,32, 95 % pasikliautinis intervalas [PI]).²⁴

UK vystosi dviem skirtingais būdais: pirmasis lemia papiliarinio tipo karcinomos vystymąsi, o antrasis – plokščios morfologijos tipo karcinomos vystymąsi. Kopijų skaičiaus pokyčiai (somatiniai pokyčiai chromosomų struktūroje) ir genetinis nestabilumas koreliuoja su naviko progresavimu ir prastesne ligos prognoze. Žemo laipsnio papiliariniai navikai dažniausiai atsiranda dėl paprastos hiperplazijos ir (arba) minimalios displazijos. Jiems būdingas 9 chromosomos heterozigotiškumo (angl. LOH – loss of heterozygosity) praradimas ir fibroblastų augimo faktoriaus receptoriaus 3 (FGFR3), telomerazės atvirkštinės transkriptazės (TERT), fosfatidilinozitolio 4 aktyvinimo mutacijos, 5-bisfosfato 3-kinazės katalizinio subvieneto alfa izoforma (PIK3CA) ir inaktyvuojančios STAG2 mutacijos. Žemo laipsnio papiliarinis neinvazinis ŠPV dėl CDKN2A geno praradimo gali progresuoti į raumenis infiltruojantį ŠPV. Raumenis infiltruojantis ŠPV atsiranda dėl plokščios displazijos arba karcinomos *in situ* (CIS); pažeidimai rodo TP53 geno mutacijas ir 9 chromosomos LOH. Tada invazinė karcinoma gali papildomai prarasti genus RB1 ir PTEN. Tai lemia, kartu su kitais pakitimais, metastazavimo potencialo įgyjimą. Apskritai, neinvazinis ŠPV paprastai rodo diploidinius arba beveik diploidinius kariotipus ir mažiau kopijų skaičiaus pokyčių, palyginti su raumenis infiltruojančiu ŠPV. Raumenis infiltruojantis ŠPV paprastai yra aneuploidinis, turintis daug chromosomų pakitimų.^{25,26}

ŠPV pagal naviko morfologiją ir patogenezę kelių skirstomas į papiliarinę (papiloma, papilinis urotelio navikas su mažu piktybiškumo potencialu ir papiliarinė karcinoma) ir plokščiąją (urotelio karcinoma *in situ* ir invazinė

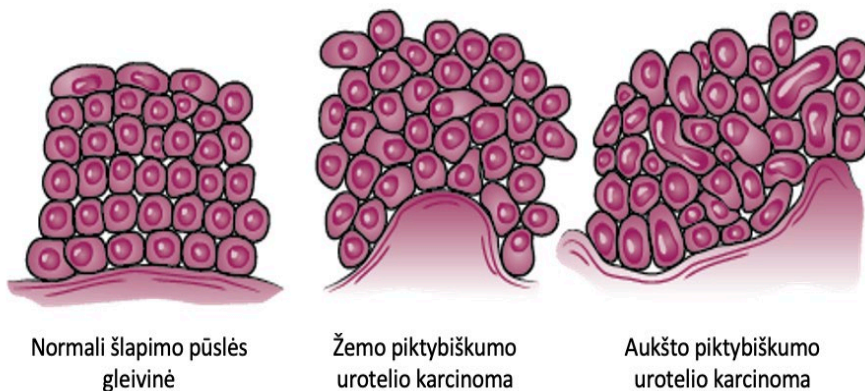
UK) kategorijas. Pasaulio sveikatos organizacija (PSO) klasifikuoja UK pagal histopatologiją į žemo laipsnio arba aukšto laipsnio, atsižvelgiant į branduolių anaplazijos laipsnį ir ląstelių architektūros anomalijas. Šlapimo pūslės raumenis infiltruojančios UK histologija gali būti įvairi. Dauguma paviršinius šlapimo pūslės audinius pažeidžiančio (gleivinė, pogleivis) UK atvejų yra papiliarinio, žemo ar aukšto laipsnio, tuo tarpu dauguma šlapimo pūslės raumenis ir gilesnius organo sluoksnius infiltruojančių karcinomų yra nepapiliarinės ir aukšto laipsnio. Kai UK vystosi kartu su kitomis histologinėmis formomis, šis navikinio audinio tipas vadinamas netipinės histologijos ŠPV. ²⁷ Netipinės histologijos ŠPV sudaro mažiau nei 5 % visų šlapimo takuose nustatomų navikų.²⁸ Dauguma netipinės histologijos piktybinių navikų, atsirandančių šlapimo pūslėje, yra epitelio kilmės²⁹ ir apima šias histologines formas: plokščialąstelinę karcinomą, adenokarcinomą, smulkialąstelinę karcinomą ir nediferencijuotinas karcinomas, kurių dažnis yra maždaug <5 %. Šio tipo ŠPV sergančių pacientų išgyvenamumas bendrai yra blogesnis nei tipinės UK atvejų.³⁰

Realii ŠPV patogenezinė stadija nustatoma patologinio ištyrimo metu. Svarbiausias veiksnys atliekant UK vertinimą yra ŠPV invazijos masto nustatymas šlapimo pūslės audinyje, siekiant nustatyti ŠPV stadiją ir prognozę. ŠPV gali būti vienžidiniai arba daugiažidiniai. Dauguma atvejų yra daugiažidiniai. Daugiažidiniai gali vystytis nepriklausomai nuo kitų ŠPV židinių arba būti vienos kilmės. Patologijos ataskaitoje turėtų būti nurodyta: tirta naviko vieta, naviko piktybiškumo laipsnis, naviko invazijos stadija pagal TNM klasifikaciją, CIS buvimas / nebuvimas ir tai, ar tiriamame mėginyje yra šlapimo pūslės raumeninio sluoksnio. Patologijos ataskaitoje taip pat turėtų būti nurodyta limfavaskulinės invazijos ir netipinės histologijos požymiai.²⁷

2.1.3. Šlapimo pūslės vėžio piktybiškumo vertinimas

ŠPV gali būti skirstomas į žemo ir aukšto piktybiškumo laipsnio UK pagal standartizuotus histologinius požymius. Žemo piktybiškumo laipsnio UK dažniausiai būna papilinės struktūros su fibrovaskuliniu stromos stiebeliu ir daugybiniu papiliniu išsišakojimu, kurias iškloja urotelis, suformuotas atipinių ląstelių su sutrikusia branduolių poliarizacija, nežymiu, fokaliai kiek ryškesniu branduolių polimorfizmu bei hiperchromija. Šiems navikams būdingos genų alteracijos 9-oje chromosomoje ir dažnos mutacijos FGFR3, PI3K genuose, arba Ras genuose.³¹⁻³³ Žemo piktybiškumo laipsnio UK recidyvavimo dažnis siekia 48-71 %, progresavimo dažnis į raumenis infiltruojantį ŠPV – 2-12 %.³⁴ Aukšto piktybiškumo laipsnio urotelio

karcinomos atveju stebima netvarkinga ląstelių išsidėstymo sistema, lizdinės, trabekulinės ar solidinės naviko struktūros. Ląstelės su polimorfiškais vidutinio ar stambaus kalibro apvaliais/ovaliais, hiperchromiškais branduoliais, kuriems būdingos nukleolės. Šiam piktybiškumo laipsniui būdingas didesnis recidyvavimo ir, svarbiausia, progresavimo į raumenis infiltruojantį ŠPV tipą dažnis.³⁵



3 pav. Sveikos šlapimo pūslės gleivinės urotelio, žemo ir aukšto piktybiškumo urotelio karcinomos schematinis ląstelių architektūros ir branduolių morfologijos atvaizdavimas. (Bladder Cancer Advocacy Network paveikslas, pritaikyta pagal prieigą internete <https://bcacn.org/>)

2.1.4. Šlapimo pūslės vėžio išplitimo vertinimas

ŠPV išplitimo vertinimui naudojama 2017 m. publikuota TNM (Tumor, Node, Metastasis. Liet. – pirminis navikas, limfmazgiai, metastazės) klasifikacija. Naujausias TNM klasifikacijos leidimas, kuris buvo patvirtintas Union International Contre le Cancer (UICC) (8 leidimas), pateiktas 1-oje lentelėje.

1 lentelė. Šlapimo pūslės vėžio 2017 m. TNM klasifikacija.

Pirminis navikas (T)	
Tx	Pirminis navikas neįvertintas
T0	Pirminio naviko nėra
Ta	Neinvazinė papilinė karcinoma
Tis	Karcinoma <i>in situ</i> : “plokščias navikas”
T1	Naviko invazija į pogleivio jungiamąjį audinį
T2	Naviko invazija į raumeninį sluoksnį
T2a	Naviko invazija į paviršinį raumeninį sluoksnį (vidinė pusė)

Pirminis navikas (T)	
T2b	Naviko invazija į gilųjį raumeninį sluoksnį (išorinė pusė)
T3	Naviko invazija į perivezikinius audinius
T3a	Mikroskopiniai požymiai
T3b	Makroskopiniai požymiai (ekstravezikinės masės)
T4	Naviko invazija į bet kurį iš šių organų: prostatos stroma, sėklinės pūslelės, gimda, makštis, dubens siena, pilvo siena
T4a	Naviko invazija į prostatos stromą, sėklines pūsleles, gimdą ar makštį
T4b	Naviko invazija į dubens ar pilvo sieną
Sritiniai limfmazgiai (N)	
Nx	Sritiniai limfmazgiai neįvertinti
N0	Sritiniuose limfmazgiuose metastazių nėra
N1	Viena metastazė vienoje iš šių limfmazgių grupių: hipogastriniai, obturatoriniai, išoriniai dubeniniai, presakraliniai
N2	Daugybinės metastazės šiose limfmazgių grupėse: hipogastriniai, obturatoriniai, išoriniai dubeniniai, presakraliniai
N3	Metastazės bendruosiuose dubeniniuose limfmazgiuose
Tolimosios metastazės (M)	
M0	Tolimųjų metastazių nėra
M1a	Metastazės nesritiniuose limfmazgiuose
M1b	Kitos tolimosios metastazės

2.1.5. Endoskopiniai šlapimo pūslės vėžio diagnostikos metodai

ŠPV pradeda vystytis šlapimo pūslės spindį išklojančioje gleivinėje, todėl pirminiais jo vystymosi etapais galima jį aptikti optiniais prietaisais, kurie sukurti apžiūrėti šlapimo pūslę iš vidaus. Jie vadinami endoskopiniais prietaisais. Šlapimo pūslės diagnostikai naudojamas optinis endoskopas vadinamas cistoskopu.

Baltos šviesos cistoskopija (BŠC) yra vyraujantis šlapimo pūslės navikų nustatymo metodas.²⁷ Dėl ribotos šlapimo pūslės pažeidimų vizualizacijos BŠC klaidingai teigiamų rezultatų rodiklis yra 10–20 %.³⁶ Todėl kuriamos naujos technologijos, skirtos pagerinti pažeidimų aptikimą, diagnostikos tikslumą ir prognozę.

Vadinamoji „mėlynosios šviesos cistoskopija“, dar žinoma kaip fotodinaminės diagnostikos (PDD, angl. - photodynamic diagnosis) fluorescencinė cistoskopija, pirmą kartą buvo aprašyta 1964 m.³⁷ Pacientui 30-60 min. prieš atliekant PDD cistoskopiją į šlapimo pūslę instiliuojama 5-aminolevulino rūgšties (5-ALA) arba heksaaminolevulinato (HAL), fotosensibilizuojančių preparatų, kurie pirmiausia skatina porfirinų, ypač

protoporfirino IX, kaupimasi greitai proliferuojančiose urotelio ląstelėse. Šlapimo pūslės sienelės apšvietimas mėlyna šviesa (380–450 nm) sukelia ląstelės su sukauptu protoporfirinu fluorescenciją raudona spalva, o tai padeda identifikuoti navikines ląsteles, kurioms būdinga greita proliferacija.

Kitas cistoskopijos papildymas, žinomas kaip siauros juostos vaizdavimas (NBI, angl. – narrow band imaging), apima šlapimo pūslės sienelės apšvietimą filtruota balta šviesa. Specifinio bangos ilgio filtruota šviesa sugerama hemoglobino ir taip prasiskverbia pro urotelio paviršių ir pagerina gleivinės kraujagyslių vizualizaciją, tuo pačiu ir struktūrą, kurioms būdinga neoangiogeneze ir hipervaskulizacija, kaip kad šlapimo pūslės navikai.²⁷

Vienoje naujausių metaanalizių, į kurią buvo įtrauktos 17 prospektyvinės nerandomizuotos ir randomizuotos kontroliuojamos studijos, buvo palygintas šių trijų endoskopinių šlapimo pūslės diagnostikos metodų tikslumas. Šios metaanalizės duomenimis, nustatyta, kad BŠC pasižymėjo prastesniais jautrumo ir diagnostinio šansų santykio rodikliais. Vidutinis NBI jautrumas buvo 96 % (95 % PI = 93-98 %), PDD – 92 % (95 % PI, 80-100 %), tuo tarpu BŠC – 71 % (95 % PI, 49-93 %). Vidutinis NBI specifiškumas buvo 65 % (95 % PI = 54-75 %), PDD – 57 % (95 % PI, 36-79 %), kai BŠC – 72 % (95 % PI, 47-96 %). Tyrimo išvada, kad naujos kartos cistoskopiniai metodai (NBI ir PDD) pasižymi reikšmingai didesniu jautrumu, lyginant su tradicine baltos šviesos cistoskopija.³⁸

2.1.6. Šlapimo pūslės vėžio šlapimo ir nuoplovų žymenys

ŠPV diagnostikai be endoskopinių ir radiologinių tyrimo metodų, dar naudojami neinvaziniai šlapimo ir šlapimo pūslės nuoplovų žymenys. Tai metodai, kai iš šlapimo ar šlapimo pūslės nuoplovų patologiniais ar genetiniais metodais nustatomi ŠPV požymiai. Plačiausiai klinikinėje praktikoje naudojamas šlapimo pūslės nuoplovų citologinis tyrimas atipinėms ląstelėms nustatyti. Tai yra didelio jautrumo (84 %) tyrimas aukšto piktybiškumo ŠPV nustatyti, tačiau žemo piktybiškumo ligai, tyrimo jautrumas siekia tik 16 %³⁹, taip pat yra priklausomas nuo patologų analizės tikslumo.⁴⁰ Tyrimo specifiškumas aukšto piktybiškumo ŠPV siekia 95-100 %. Vis dėlto, tyrimo rezultatai prastėja esant šioms būklėms: šlapimo takų infekcija, inkstų akmenligė, taikoma intravezikinė terapija.⁴¹ Todėl Europos Urologų Asociacijos (EAU) gairėse teigiama, kad citologinis tyrimas negali būti naudojamas „cistoskopijų skaičiui sumažinti“.²⁷ Abi procedūros turi didelių trūkumų ir yra gana brangios,⁴² o tai rodo, kad reikia ieškoti naujų diagnostinių metodų, kurie supaprastintų ŠPV diagnostiką.

Paskutiniais metais atsirado naujų molekulinį šlapimo žymenų, pagrįstų genetinėmis anomalijomis arba epigenetiniais pokyčiais, kurie dažniausiai randami ŠPV (pvz.: nenormalus DNR metilinimas, egzozomos, metabolitai, mRNR arba DNR be ląstelių). Kai kurie iš šių testų buvo išbandyti stebint pacientus dėl RNN ŠPV recidyvo ir parodė labai aukštą NPV.⁴³ Vis dėlto, kol kas nei vienas iš šių žymenų nebuvo patvirtintas oficialių tarptautinių gairių kaip rutininis tyrimo metodas dėl šių priežasčių:

- Molekuliniai žymenys pasižymi didesniu jautrumu, tačiau mažesniu specifiškumu, lyginant su citologiniu tyrimu^{41,44-48}
- Gretutinė šlapimo takų patologija ir ankstesnės BCG instiliacijos reikšmingai įtakoja molekulinį šlapimo žymenų rezultatus^{41,44,45}
- To paties molekulinio žymens didelio diapazono tikslumo rezultatų skirtumai tyrimuose gali būti paaiškinti pacientų atrankos selektyvumu ir sudėtingų laboratorijos metodų poreikiu^{45,46,49-56}

Šiuo metu esantys tyrimai ir jų apžvalgos literatūroje rodo molekulinį šlapimo žymenų perspektyvą ateityje pirminei diagnostikai ir pacientų sekimui dėl recidyvo. Naudojant šiuos žymenis potencialiai galima sumažinti nereikalingų cistoskopijų skaičių. Vis dėlto, kol kas trūksta įrodymų, kad molekuliniai žymenys gali būti naudojami kasdieninėje praktikoje.

2.2. Virpesinės spektroskopijos pritaikymas šlapimo pūslės vėžio diagnostikai

Siekiant patobulinti šiuo metu naudojamus diagnostikos metodus įvairių lokalizacijų vėžiui nustatyti, mokslininkų bendruomenė ieško itin jautrių technologijų, kurios gali greitai ir neinvaziniu būdu diagnozuoti onkologinius susirgimus ankstyvose stadijose, suteikti platesnę ir tikslesnę informaciją.

Paviršiaus sustiprinta Ramano spektroskopija ir infraraudonoji (IR) spektroskopija yra optinės virpesinės spektroskopijos metodai, kuriuos taikant galima gauti informaciją apie tiriamosios medžiagos cheminę sudėtį. Šie metodai pasižymi dideliu jautrumu, neinvaziškumu, galimybe realiu laiku gauti informaciją apie molekulinę audinio sudėtį ir nereikalauja papildomo kontrastavimo. Molekulėje ją sudarantys branduoliai virpa tam tikrais dažniais, kiekviena funkcinė grupė turi savitą virpesių dažnį, o tai reiškia, kad naudojant virpesinę spektroskopiją galima identifikuoti mišinio komponentus. Taip pat nedidelius skirtumus tarp mėginių, net ir nehomogeniškiems biologiniams preparatams tiek *in situ*, tiek ir *in vivo* sąlygomis.⁵⁷

Siekiant suprasti, kokie vėžinio audinio skirtumai nuo nevėžinio audinio lemia virpesinės spektroskopijos metodų gebėjimą diferencijuoti juos, reikia paminėti vėžio biologijos principus. Organizme vėžys atsiranda dėl

nekontroliuojamo ląstelių dauginimosi. Vėžys pradeda augti dėl genetinių mutacijų normaliose ląstelėse, kurios lemia padidėjusį ląstelių dauginimosi greitį, mažesnę ląstelių diferenciaciją, invazinę elgesį ir naujų kraujagyslių formavimosi procesą (neoangiogenezė).⁵⁸ Nepaisant to, patį naviką sudaro ne tik navikinės ląstelės, bet ir šeimininko ląstelės, imuninės ląstelės, kraujagyslės ir tarpląstelinis užpildas. Dėl neoangiogenezės kraujagyslių endotelio augimo faktoriai ir citokinai, skatinantys naviko kraujagyslių tinklo augimą, atsiranda tarpląsteliniam skystyje. Šio proceso metu formuojasi nauji kapiliarai, o jau esančios kraujagyslės pertvarkomos. Augant piktybiniam navikui, vykstant neoangiogenezei ir susidarius uždegiminių procesui, navikinės ląstelės migruoja į kitus to paties audinio sluoksnius ar šalia esančių organų audinius.⁵⁹ Kai kuriems navikų tipams, dėl padidėjusio energijos poreikio, būdingas didesnis glikogeno kaupimas ląstelėse. Tokie požymiai nustatyti krūties, inkstų, gimdos, šlapimo pūslės, kiaušidžių, odos ir smegenų vėžio atvejais.⁶⁰

Kitas svarbus veiksnys yra su vėžiu susiję fibroblastai, kurie yra pagrindinė stromos sudedamoji dalis ir išskiria augimo veiksnius, uždegiminius ligandus ir tarpląstelinio užpildo baltymus, kurie skatina naviko proliferaciją, atsparumą gydymui ir atsparumą imuniniam atsakui.⁶¹ Pagrindiniai šių baltymų yra kolagenas, fibronektinas, elastinas ir lamininas, kurie sudaro fizinį karkasą vėžinėms ląstelėms.

Navikinėms ląstelėms būdingas invaziškumas, kai proliferuodamos greita šeimininko audinių išskiria fermentus ir ardo aplinkines struktūras. Pavyzdžiui, sergant urotelio karcinoma, navikinių ląstelių išskiriamos kolagenazės sekrecija gali sumažinti normalaus šlapimo pūslės audinio kolageno kiekį.⁶²

Apibendrinant, vėžio formavimosi metu vyksta įvairūs ląstelių mikroaplinkos ir medžiagų apykaitos pokyčiai. Yra įvairių vėžinių susirgimų, kurie gali atsirasti skirtinguose organuose, ir kiekvienas naviko tipas turi savo specifinių bruožų: genetinių pakitimų, metabolinių ir signalinių kelių, specifinės mikroaplinkos. Dėl šių veiksnių audiniuose vyksta įvairūs biocheminiai pokyčiai. Šių pokyčių biocheminę sudėtį galima pastebėti virpesinės spektroskopijos spektruose, todėl vėžinius audinius galima identifikuoti pagal spektrinius skirtumus.

Literatūroje aprašomi Ramano ir IR spektroskopijos biologinių mėginių tyrimai, kuriose nustatyti žmogaus genų, metabolitų ir baltymų biocheminiai ryšiai ypatingu tikslumu, dar vadinami molekulių „pirštų antspaudais“. Virpesinės spektroskopijos metodai atvaizduoja biocheminius ryšius ir leidžia tyrėjams itin tiksliai nustatyti molekulių patologinius pokyčius. Šie metodai buvo sėkmingai panaudoti diagnozuojant Alzheimerio ligą, demenciją^{63,64},

cukrinį diabetą^{65,66}, virusines infekcijas⁶⁷⁻⁷⁰, bakterines ir grybelines infekcijas⁷¹⁻⁷⁴. Taip pat ir įvairių lokalizacijų onkologinėms ligoms diagnozuoti: plaučių⁷⁵, krūties⁷⁶, odos⁷⁷, skrandžio⁷⁸, stemplės⁷⁹, burnos⁸⁰, smegenų⁸¹, kolorektalinio⁸², gimdos kaklelio⁸³, vulvos⁷² ir prostatos⁸⁴.

Šiuo metu yra atliktų virpesinės spektroskopijos tyrimų ir su ŠPV audiniais, kurių rezultatai pavaizduoti 2 lentelėje. Pateikti tyrimai, kuriuose buvo bandoma SERS ar IR spektroskopijos metodu diferencijuoti ŠPV nuo nevėžinio audinio. Tyrimai yra nehomogeniški, reikšmingai skiriasi jų imties dydis, tirta biologinė medžiaga, atlikti statistiniai metodai ir rezultatų pateikimo forma. Ne visuose tyrimuose identifikuotos ir pateiktos spektrinės juostos pokyčiai, ar nebuvo paskaičiuoti diagnostinio tikslumo rodikliai. Literatūros duomenų bazėse SERS tyrimų su šlapimo pūslės audiniu, kuriuose būtų lygintas nevėžinis šlapimo pūslės audinys ir šlapimo pūslės urotelio karcinomos buvo aptiktas tik vienas.⁸⁵ Tuo tarpu, IR spektroskopijos tyrimų, kuriuose būtų bandoma diferencijuoti nevėžinį ir vėžinį audinį buvo rasta tik trys.^{14,15,86} SERS spektroskopijos tyrimų, kuriuose bandyta analizuoti sveikų ir ŠPV sergančių pacientų šlapimo pūslės nuoplovas nebuvo aptikta. Vienintelis tyrimas, kuriame buvo tirtos šlapimo pūslės nuoplovas atliktas IR spektroskopijos metodu.¹⁶

2 lentelė. Publikuoti tyrimai, kai vibracinės spektroskopijos metodai buvo pritaikyti šlapimo pūslės vėžio diagnostikai.

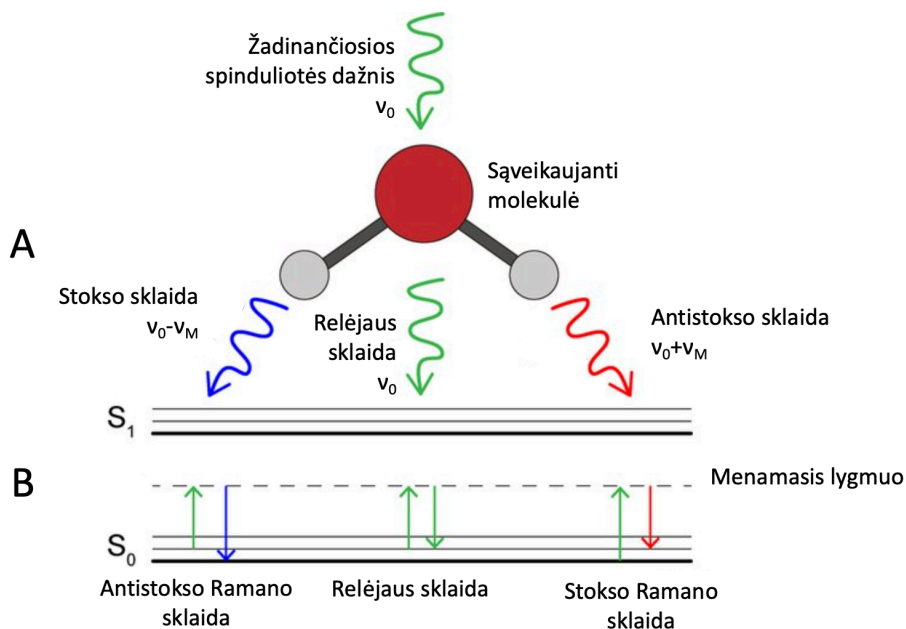
Autorius, metai	Virpesinės spektroskopijos metodas	Tirta medžiaga	Tiriamųjų skaičius	Nustatyti spektrinės juostos pokyčiai (cm ⁻¹)	Jautrumas (%)	Specifiškumas (%)	AUC	Bendras diagnostinis tikslumas (%)
Al-Muslet et al. 2012 ¹⁴	IR	ŠP vėžinis ir nevēžinis audinys	11	Baltymai (1650, 1550) Lipidai (2925,2850) Nukleorūgštys (1080, 1236)	-	-	-	-
Pezzei et al. ⁸⁶	IR	ŠP vėžinis ir nevēžinis audinys	214	1100-1300, 1235, 1350-1450, 1550, 1655, 2800-3000, 3300	-	-	-	-
Shaoin Li et al. 2015 ⁸⁷	SERS	Kraujo serumas	91	481-486, 682-687, 1018-1034, 1313-1323, 1450-1459, 1582-1587	90,9	100	-	-
Gok et al. 2016 ¹⁶	IR	ŠP nuoplovos	136	1500-1340 1100-900 900-800	83,8 89,2 89,2	73,5 55,9 52,9	-	-
Davis et al. 2018 ⁸⁵	SERS	ŠP vėžinis ir nevēžinis audinys	15	-	-	-	0,93 (0,75-1,00)	-
Chen et al. 2019 ⁸⁸	SERS	Kraujo serumas	90	-	98,3	96,7	0,987	97,8
Witzke et al. 2019 ¹⁵	IR (proteominė analizė)	ŠP vėžinis ir uždegimiškai pakitęs audinys	387	-	95	95	-	95
Dayu Hu et al. 2021 ⁸⁹	SERS	Šlapimas	241	527, 668, 717, 798, 890, 1000, 1049, 1140, 1241, 1294, 1356, 1483, 1598 cm ⁻¹	100	98,85	-	-
Liang et al. 2022 ⁹⁰	SERS	Šlapimas	-	-	80	100	-	-
El-Faloujit al. 2022 ⁹¹	IR	Šlapimas	62	-	86	77	0,92	-

2.2.1. Ramano spektroskopija

Ramano spektroskopija yra analitinės chemijos technika, naudojama molekulių struktūros, cheminės sudėties ir medžiagų savybių tyrimui. Ji remiasi Ramano efektu, kuris atsiranda, kai šviesa išsklaidoma nuo molekulės, ir dalis šios šviesos energijos pasikeičia dėl sąveikos su molekulės virpesine energija. Ramano sklaidos metu tik nedidelė fotonų dalis dalyvauja energijos mainuose su molekulėmis įgaudami arba netekdami energijos.

Molekulės energijos lygmenys yra kvantuoti, todėl energijos mainai tarp molekulės ir šviesos kvanto (ν_0) vyksta tam tikrais nustatytais dydžiais, atitinkančiais molekulės virpesinio sužadavimo energiją.⁹²

Kai monochromatinė (dažniausiai lazerio) šviesa sąveikauja su medžiaga, didžioji dalis šviesos išsklaidoma be energijos pokyčio (Relėjaus sklaida). Tačiau nedidelė dalis šviesos sąveikauja su molekulių virpesiais ir išsklaidoma su pasikeitusia energija. Išsklaidyta šviesa gali būti mažesnės ($\nu_0 - \nu_M$) arba didesnės ($\nu_0 + \nu_M$) energijos lygmenyje. Šis energijos pokytis yra vadinamas atitinkamai Stokso Ramano sklaida ir antistokso Ramano sklaida (4 pav.).⁹²



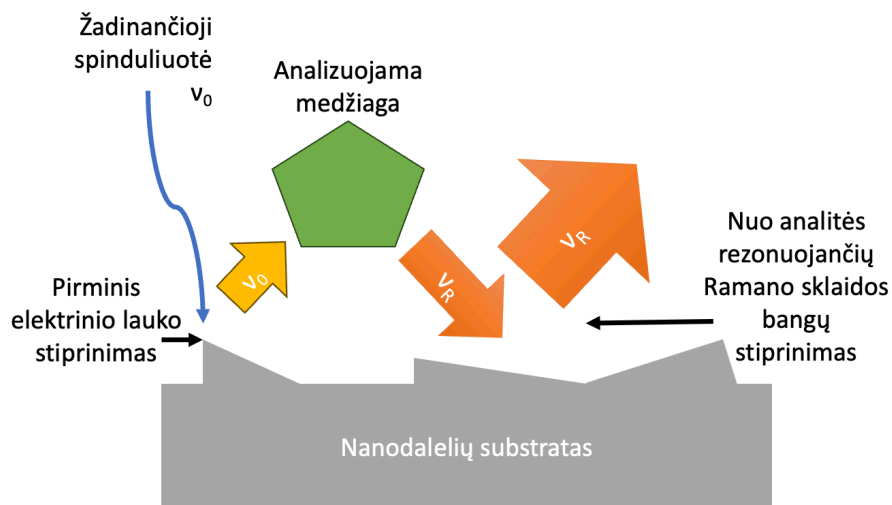
4 pav. (A) Ramano sklaidos proceso schema ir (B) Ramano (Stokso ir antistokso) ir Relėjaus sklaidos energijų sugerties diagrama. S_0 ir S_1 – pagrindinis ir sužadintas elektroniniai lygmenys. Adaptuota pagal ⁹².

Ramano spektroskopijos privalumai yra tai, kad tyrimo metu mėginys nėra pažeidžiamas, nereikalingas sudėtingas mėginio paruošimas, greitas tyrimo atlikimas. Vis dėlto, mažas sklaidos efektyvumas neleido šiai technologijai greitai vystytis. Reikšminga technologinė pažanga įvyko atradus paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos (SERS) reiškinį.

2.2.2. Paviršiaus sustiprinta Ramano sklaida

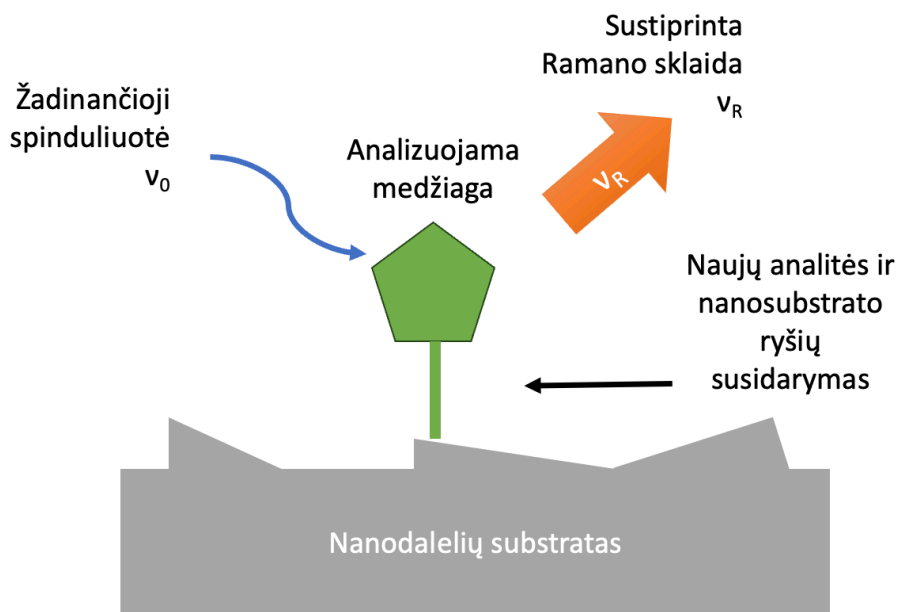
Paviršiaus sustiprinta Ramano sklaidos spektroskopija arba paviršiaus sustiprinta Ramano sklaida (angl. surface-enhanced Raman scattering, SERS) - tai paviršiui jautrus metodas, kuris sustiprina Ramano sklaidą molekulių, adsorbuotų ant šiurkščių metalo paviršių arba nanostruktūrų.⁹³ Stiprinimo faktorius gali siekti nuo 10^4 iki 10^{11} ,⁹⁴ o tai reiškia, kad šiuo metodu galima aptikti pavienes molekules.⁹⁴ SERS mechanizmas apima ir elektromagnetinį, ir cheminį (krūvio pernašos) stiprinimą^{95,96}:

Elektromagnetinis modelis, kuris nagrinėja šviesos bangų elektrinio lauko įtaką metalo paviršiui, paaiškina pagrindinę Ramano sklaidos stiprinimo priežastį (5 pav). Šis modelis pateikia aiškinimą spektrinių signalų sustiprinimui, net jei tarp tiriamos molekulės ir metalo paviršiaus nėra cheminio ryšio. Šviesos bangų sukeltas elektrinio lauko stiprinimas šalia metalo susidaro dėl lokalizuotų paviršiaus plazmonų rezonanso (LSRP, angl. - localized surface plasmon resonance).⁹⁷ Kadangi elektromagnetinė spinduliuotė sąveikauja su metalo paviršiumi, vietinio elektrinio lauko stiprinimo faktoriaus vertė gali išaugti nuo 10^4 iki 10^{11} kartų.



5 pav. SERS spektroskopijos elektromagnetinio stiprinimo modelis. ν_0 – žadinančiosios spinduliuotės dažnis, ν_R – Ramano sklaidos dažnis.

Paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos reiškinį galima paaiškinti krūvio pernašos komplekso susidarymu tarp metalo paviršiaus ir tiriamos molekulės.⁹⁸ Kadangi reikalinga didelė tiriamos molekulės chemisorbcija ant metalo paviršiaus, šis kompleksas formuojamas retai. Krūvio pernašos komplekso svarba Ramano sklaidos signalo sustiprinimui dažnai yra ribota, nes ne visos molekulės gali sukurti cheminius ryšius su metalo paviršiumi. Taigi, šis modelis paaiškina tik mažąją Ramano sklaidos signalo sustiprinimo dalį (6 pav.).



6 pav. SERS spektroskopijos cheminio stiprinimo modelis. v_0 – žadinančiosios spinduliuotės dažnis, v_R – Ramano sklaidos dažnis.

Bendras elektromagnetinio ir cheminio stiprinimo poveikis SERS lemia, kad šis metodas yra labai jautrus ir juo galima aptikti nedideles molekulių koncentracijas. Konkretūs mechanizmai gali skirtis priklausomai nuo metalo nanodalelių savybių, sužadimo bangos ilgio ir adsorbuotų molekulių pobūdžio.

Tyrimams naudojamos įvairios metodikos, kurios yra pritaikytos atlikti specialius eksperimentus ir tirti specifines molekules. Yra trys pagrindinės paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos metodikos, kurios skiriasi pagal substratus, naudojamus kiekvienai iš jų: šiurkštinto elektrodo paviršius, nanostruktūrizuoti metaliniai paviršiai, koloidiniai nanodalelių tirpalai.⁹⁹ Plačiausiai naudojama metodika yra naudojant substratus iš koloidinių nanodalelių tirpalų. Dažniausiai pasitelkiami mišiniai, sudaryti iš bandinio ir

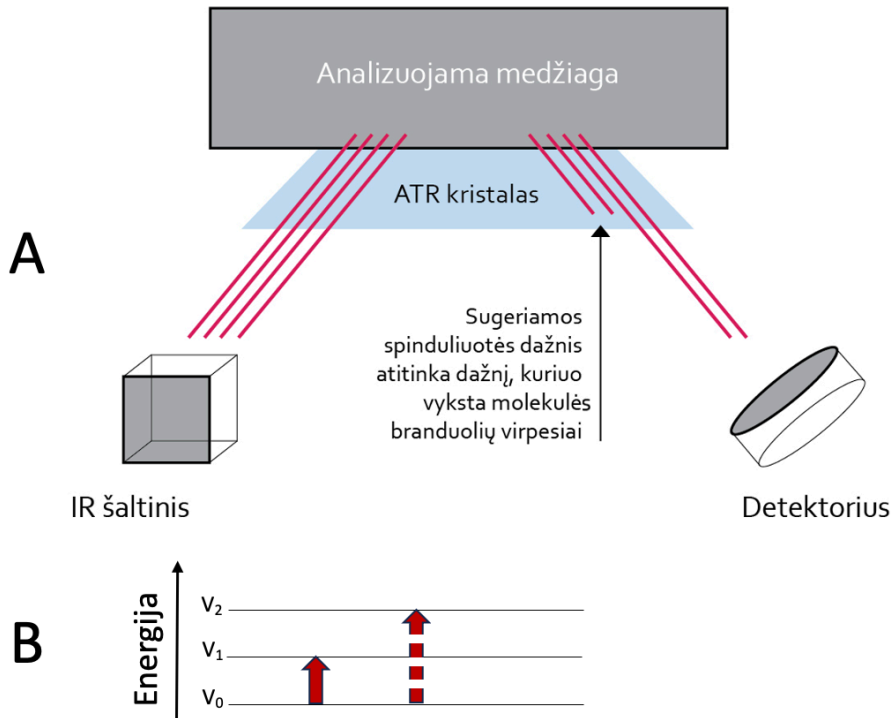
koloidinio tirpalo, todėl šių substratų gamyba yra greita ir nesudėtinga. Procedūra, kurią reikia atlikti norint paruošti šiuos substratus, yra daug paprastesnė ir pigesnė nei ruošiant nanostruktūrizuotus metalinius paviršius ir ji trunka mažiau laiko nei elektrodo paviršiaus paruošimas. Be to, naudojant šiuos substratus galima pasiekti ar net viršyti stiprinimo faktorius, kurie būna naudojant nanostruktūrizuotus metalinius paviršius. Be to, yra galimybė paruošti nanodaleles įvairios sudėties, formų ir dydžių, todėl šie substratai gali būti tinkami naudoti įvairioms spektrų registravimo sistemoms, atsizvelgiant į jų specifinius reikalavimus.⁹⁹ Nanodalelės gali būti sukuriamos naudojant metalus, tokius kaip Ag, Au, Cu, Li ir Al. Šio tyrimo metu buvo naudojamas sidabro nanodalelių koloidinis tirpalas. Sidabro nanodalelės, turinčios LSPR, gali būti aptinkamos spektro dalyje nuo 300 iki 1200 nm.¹⁰⁰

2.2.2. Infraraudonoji (IR) spektroskopija

Infraraudonoji spinduliuotė (IR) yra elektromagnetinės bangos, kurių bangos ilgis yra ilgesnis nei matomos šviesos, tačiau trumpesnis nei radijo bangų. Pavadinimas "infraraudonieji" reiškia "žemiau raudono" (lot. *infra* - žemiau). Raudona spalva atitinka matomos šviesos ilgiausią bangos ilgį. Infraraudonųjų spindulių diapazonas yra 12800 - 10 cm⁻¹ ir gali būti skirstomas į artimųjų infraraudonųjų spindulių sritį (12800 - 4000 cm⁻¹), vidutiniųjų infraraudonųjų spindulių sritį (4000 - 200 cm⁻¹) ir tolimųjų infraraudonųjų spindulių sritį (50 - 1000 cm⁻¹). Infraraudonoji šviesa buvo atrasta XIX amžiuje. Nuo to laiko mokslininkai nustatė įvairius infraraudonųjų spindulių panaudojimo būdus.¹⁰¹

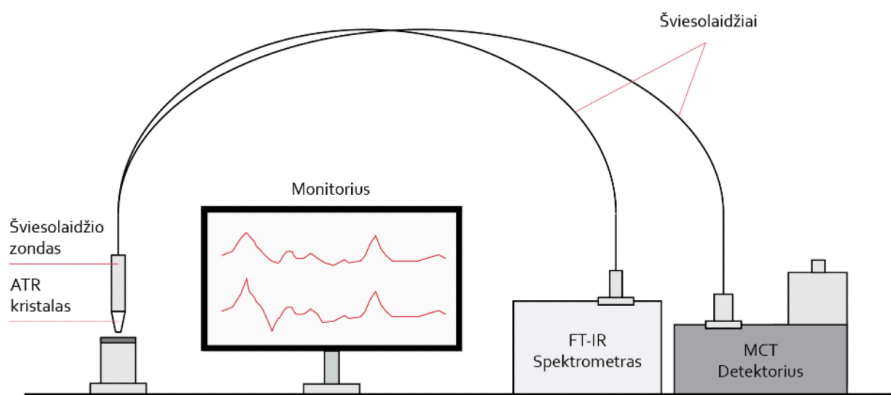
Infraraudonųjų spindulių spektroskopija - tai infraraudonųjų spindulių sąveikos su tiriamąja medžiaga tyrimas. Tiriamosios medžiagos molekulėse vyksta branduolių virpesiai. Molekulėms patekus į aktyvios IR spinduliuotės spektrą, šios selektyviai sugeria tam tikro dažnio IR spinduliuotę. Sugeriamos spinduliuotės dažnis atitinka dažnį, kuriuo vyksta branduolių virpesiai. Vykstant IR spinduliuotės sugerčiai, molekulės pereina iš žemesnio virpesinio energetinio lygmens į aukštesnį. Sugertos spinduliuotės energija lygi energetinių lygmenų energijų skirtumui. Molekulė bus aktyvi IR spektre, jei kinta jos dipolinis momentas. Kiekviena IR aktyvi molekulė turės jai būdingą IR spektrą, o pagal spektrinių juostų padėtis galima nustatyti molekulių chemines grupes. Todėl analizuojant infraraudonąjį spektrą galima gauti daug informacijos apie molekulės struktūrą. Dauguma molekulių yra aktyvios IR spinduliuose, išskyrus kelias homonuklearines dviatomes molekules, pavyzdžiui, O₂, N₂ ir Cl₂, dėl nulinio dipolio pokyčio šių molekulių virpesių

ir sukimosi.¹⁰² IR spektroskopijos principas ir energijos sugerties diagrama pateikta 7 paveiksle.



7 pav. (A) ATR-FTIR spektroskopijos proceso schema ir (B) IR energijos sugerties diagrama. V_0 , V_1 , V_2 – pagrindinis, pirmasis ir antrasis virpesinis lygmuo. Adaptuota pagal ¹⁰³.

Tai yra jautrus ir selektyvus medžiagų analizės metodas, kai kiekviena molekulė pasižymi savitu virpesių dažnių rinkiniu, išreikštu būdingomis spektrinėmis juostomis. Šios juostos leidžia identifikuoti mėginio komponentus. Todėl IR spektroskopija leidžia atpažinti įvairias molekules ir molekulių grupes. Be to, naudojant tinkamas matavimo konfigūracijas, galima nuodugniai ištirti beveik bet kokią mėginį, neatsižvelgiant į jo būseną (kietą, skystą ar dujinį). Dažniausiai naudojamas laboratorinis prietaisas, kuriame naudojamas šis metodas, yra Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių (FTIR) spektrometras. (8 paveikslas)



8 pav. Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių (FT-IR) spektrometro schema. Prietaisą sudaro FT-IR spektrometras, išorinis skystu azotu aušinamas MCT detektorius, šviesolaidžiai, šviesolaidžio zondas ir visiškojo vidaus atsindžio (ATR) kristalas.

Istoriškai IR spektroskopija daugiausia buvo naudojama chemijoje molekulinėms struktūroms apibūdinti. Tačiau jos potencialas analizuojant biologinius mėginius, žinomas jau dešimtmečius.¹⁰⁴ Šis metodas, garsėjantis savo paprastumu ir tikslumu, nereikalauja reagentų, nepažeidžia mėginių ir reikalauja tik nedidelio mėginio kiekio ir minimalaus mėginio paruošimo. IR spektroskopijos jautrumas cheminiams pokyčiams tarp sveiko ir patologiškai pakitusio audinio leidžia nustatyti naujus biomarkerius ligoms.¹⁰⁵ Todėl IR spektroskopija tampa patikima diagnostikos priemone, turinčia didelį klinikinio pritaikymo potencialą, apimančią ne tik vėžio atrankinę patikrą, diagnozavimą, bet ir atsako į gydymą vertinimą.¹⁰⁶

Siekiant sukurti geresnes vėžio diagnostikos alternatyvas, IR spektroskopijos metodu buvo tiriamos įvairių tipų biologinės medžiagos, įskaitant kraują¹⁰⁷, audinius¹⁰⁸, šlapimą¹⁰⁹, šlapimo pūslės nuoplovas¹⁶, tulžį¹¹⁰ ir skreplius¹¹¹. Šiuo metu klinikinėje praktikoje ligų diagnostikai naudojami kraujo ir įvairių audinių mėginiai, tačiau IR spektroskopijos panaudojamumas didėja atliekant daugiau tyrimų ir su kitomis biologinėmis medžiagomis.

IR spektroskopijos tyrimo metu biologiniuose mėginiuose nustatoma biocheminė sudėtis: nukleino rūgštys, baltymai, lipidai ir angliavandeniai, tiksliai nustatant molekulinę konformaciją, jungčių tipus, funkcines grupes ir tarpmolekulines sąveikas, iš kurių sudarytas mėginys. Kadangi kiekviena molekulė turi unikalų spektrą, priklausantį nuo sugertos infraraudonosios spinduliuotės bangos ilgio ir kiekio, infraraudonosios spinduliuotės spektroskopija sukuria spektrinį pirštų atspaudą su optinio tankio juostomis, kuris leidžia nustatyti daugybinius tiriamo mėginio sudėties parametrus. Iš

esmės biocheminiai pirštų atspaudų pokyčiai yra unikalūs konkrečių ligų molekuliniais pakitimams ir suteikia vertingos diagnostinės informacijos apie kiekvieno paciento sveikatos būklę.¹¹²

2.2.1. Šviesolaidiniai zondai pritaikant spektroskopinius metodus klinikinėje praktikoje

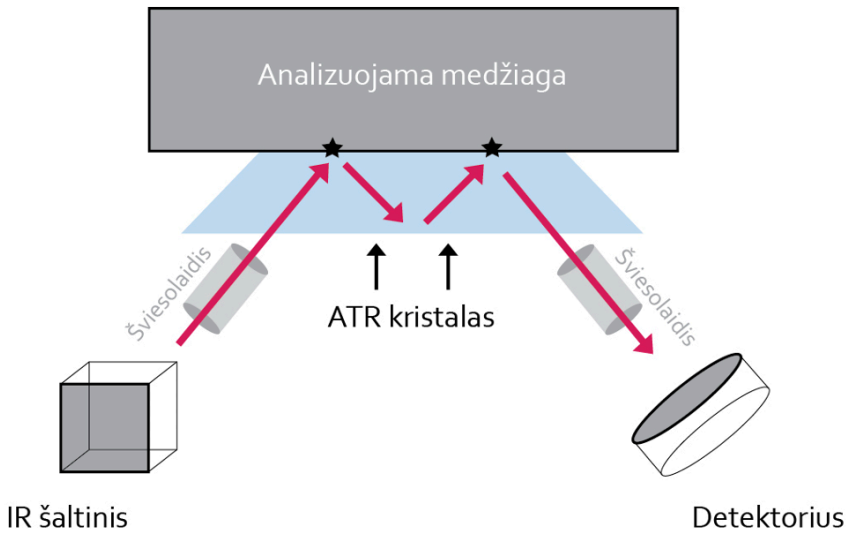
Šlapimo pūslės vėžio diagnostika šiuo metu remiasi endoskopiniais minimaliai invazyviais tyrimo metodais, kai instrumentai optinių prietaisų pagalba pravedami per šlaplę į šlapimo pūslę. Tai sukelia nedidelį diskomfortą pacientui, nereikalauja bendrinės nejautos ir gali būti atlikta ambulatoriškai. Virpesinės spektroskopijos metodai istoriškai buvo naudojami įvairias medžiagas tirti jas perkeltiant į laboratoriją, tačiau siekiant integruoti šiuos prietaisus į klinikinę praktiką, jie turės atitikti šių dienų reikalavimus – nesukelti pacientui papildomo diskomforto, būti neinvaziniais ar minimaliai invaziniais ir matavimus atlikti *in vivo* sąlygomis.

Šviesolaidiniai zondai suteikė galimybę virpesinės spektroskopijos metodus naudoti *in vivo* klinikiniais tikslais – diferencijuoti navikinį audinį prieš atliekant biopsiją ir taip prisidėti prie ankstyvos vėžio diagnostikos. Šviesolaidiniai zondai, kuriuos galima prvesti pro endoskopinius kanalus, leido atlikti spektrinius matavimus *in vivo* šiose lokalizacijose: burnos ertmės,¹¹³ plaučių,¹¹⁴ viršutinės virškinamojo trakto dalies,⁷⁸ storosios žarnos,¹¹⁵ gimdos kaklelio,⁸³ ir šlapimo pūslės.¹¹⁶

Pastaraisiais metais sukurta, optimizuota ir išbandyta daugybė Ramano zondu konstrukcijų, skirtų klinikiniais tikslams. Vis dažniau stengiamasi pritaikyti spektroskopinius zondus klinikiniais poreikiams ir apribojimams, kuriuos lemia specifinė ligų patofiziologija ir specifinė dominančios srities anatomija (pvz.: skaidulos pravedimas natūraliais takais iki tiriamojo organo, endoskopinio instrumento kanalo skersmuo, mėginio paėmimo gylis).¹¹⁷

Šviesolaidinius zondus paprastai sudaro atskiri apšvietimo ir surinkimo šviesolaidžiai, prijungti atitinkamai prie šviesos šaltinio ir detektoriaus. Jie susijungia su zondo galu, kad būtų galima vienu metu apšviesti mėginį ir surinkti šviesą. Zondo antgalio geometrija kinta siekiant užtikrinti optimalų sąlytį su mėginiu arba nuo zonu sklindančios spinduliuotės pluošto sklidimo geometrijos.¹¹⁷ Taikant šviesolaidinius zondus IR spektroskopijoje, dažniausiai integruojamas į zondo antgalį pažeistojo visiškojo vidaus atspindžio (ATR, angl. - Attenuated total reflection) kristalas. (9 paveikslas) Tinkamas medžiagos, iš kurios pagamintas ATR kristalas, parinkimas ir optimali kristalo geometrija lemia zondo tinkamumą bandiniui tirti. Naudojant šviesolaidinį zondą biologiniams audiniams tirti, ATR kristalo medžiaga turi

būti netoksiška biologiniams audiniams, nes ji liečiasi su tiriamu audiniu.¹¹⁸ Mūsų tyrime IR spektroskopijos dalyje buvo naudotas ATR sidabro halogenidų šviesolaidinis zondas *ex vivo* sąlygomis.



9 pav. Pažeistojo visiškojo vidaus atspindžio (ATR) kristals. * simboliu pažymėtos gėstančio lauko vietos, kur įvyksta tam tikrų IR spinduliuotės dažnių absorbcija, sąveikaujant su analizuojama medžiaga.

3. DARBO METODOLOGIJA

Tyrimui atlikti išduotas Vilniaus Regioninio Biomedicininų Tyrimų Etikos komiteto (M. K. Čiurlionio g. 21, 03101 Vilnius, Lietuva) leidimas (2019-12-03 Nr. 2019/12-1178-665; žr. 1 priedą).

Dalyvauti tyrime buvo kviečiami visi ligoniai, gydyti Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų (VUL SK) Urologijos centre (Santariškių g. 2, 08661 Vilnius, Lietuva), kurie atitiko įtraukimo į tyrimą kriterijus ir kuriems nenustatyta atmetimo kriterijų.

Spektroskopijos tyrimai atlikti Vilniaus universiteto Fizikos fakulteto Cheminės Fizikos institute (Saulėtekio al. 3, 10257 Vilnius, Lietuva).

Tyrimo imties dydžio skaičiavimas buvo atliktas atsižvelgus į mūsų tyrimo tikslą - įvertinti diagnostinio metodo galimybę diferencijuoti šlapimo pūslės vėžio audinius nuo nevėžinių. Tyrime numatomas statistinis metodas – jautrumo ir specifiškumo apskaičiavimas.

Numatytas reikšmingumo lygis – Alfa (α): 0,05, galia – $(1-\beta)$: 0,80.

Imties dydis apskaičiuotas, reikalingas jautrumui ir specifiškumui įvertinti su norimu tikslumu. Šiam tikslui naudosime diagnostinių tyrimų imties dydžio apskaičiavimo formulę:

$$n = \left(\frac{Z^2 \cdot \hat{P} \cdot (1 - \hat{P})}{d^2} \right)$$

- Z yra Z-skaičius, atitinkantis norimą pasitikėjimo lygį (95% pasitikėjimui $Z \approx 1,96$).
- P yra tikėtinas santykis (jautrumas arba specifiškumas).
- d yra norima paklaida.

Tarkime, norime įvertinti jautrumą ir specifiškumą su 5% paklaida ($d = 0,05$) ir tikimės, kad jautrumas P bus 90% (0,90):

$$n = \left(\frac{(1,96)^2 \cdot 0,90 \cdot (1 - 0,90)}{(0,05)^2} \right)$$

$$n = \left(\frac{3.8416 \cdot 0.90 \cdot 0.10}{0.0025} \right)$$

$$n = \left(\frac{3.45744}{0.0025} \right)$$

$$n = 138.3$$

Taigi, tyrimui reikės maždaug 139 mėginių, kad įvertintumėte jautrumą su 5% paklaida. Planuojant iš vieno paciento paimti du mėginius – nevėžinio ir vėžinio audinio, tikslinis tyrimo pacientų kiekis – 70.

Papildomai galime prognozuoti reikšmingų rezultatų tikimybę, remiantis atliktu intraoperacinės inksto vėžio diagnostikos infraraudonosios spektroskopijos metodu tyrimu ¹¹⁹, kur buvo naudotas identiškas tyrimo metodas ir gauti aukšti tyrimo patikimumo rezultatai trijose spektrogramos pozicijose ($p < 0.001$ (1034 cm^{-1}), $p < 0.001$ (1358 cm^{-1}) and $p < 0.5$ (1393 cm^{-1})), naudojant klasterinę užregistruotų spektrų analizę. Minėto tyrimo imties dydis buvo 105 pacientai.

3.1. Įtraukimo kriterijai

- Pacientai, kuriems bendraklinikiniais ir radiologiniais tyrimo metodais įtariamas šlapimo pūslės vėžys;
- pacientai, kuriems jau nustatytas ir patvirtintas šlapimo pūslės vėžys ir pagal naujausias Europos Urologų Asociacijos pateiktas gaires yra indikuotina atlikti diagnostinę cistoskopiją, transuretrinę šlapimo pūslės rezekciją ar radikaliąją cistektomiją;
- pacientų amžius virš 18m.

3.2. Neįtraukimo kriterijai

- Aktyvi šlapimo takų infekcija, kuri diagnozuojama BŠT, šlapimo pasėliu;
- nekoreguota koaguliopatija (dalinis aktyvuoto tromboplastino laikas - ADTL daugiau 40 sekundžių; plazmos krešėjimo laiko ir vidutinio normalaus krešėjimo laiko santykis - INR daugiau 1,5);
- sunki bendra būklė. (pagal ECOG skalę 4 ir daugiau balų);
- atsisakymas dalyvauti tyrime;

- galutinėje tiriamųjų šlapimo pūslės vėžio histologinio tyrimo išvadoje nustatytas atipinis šlapimo pūslės vėžio variantas (ne urotelio karcinoma).

3.3. Klinikiniai ir patologiniai duomenys

3.3.1. Klinikinių ir patologinių duomenų rinkimas

Iš pacientų atliktų procedūrų dokumentacijos ir po procedūrų gautų patologinių tyrimų išvadų surinkti visų tiriamųjų, sutikusių dalyvauti biomediciniame tyrime, klinikiniai ir patologiniai duomenys: tiriamojo amžius procedūros metu, lytis, procedūros data, cTNM, pTNM, ŠPV piktybiškumo laipsnis, rezekuoto audinio histologinis tipas, šlapimo pūslės nuoplovų citologinio tyrimo atsakymas.

Visi tiriamieji, įtraukti į biomedicininį tyrimą, gavo savalaikį ir visavertį ŠPV gydymą. Jų dalyvavimas tyrime neturėjo jokios įtakos ŠPV gydymo pasirinkimui, pradžiai, eigai ar baigčiai.

3.4. Biologiniai mėginiai ir jų molekulinė analizė

3.4.1. Biologinių mėginių rinkimas

Iš tiriamųjų, sutikusių dalyvauti biomediciniame tyrime, spektroskopiniams tyrimams buvo renkami šlapimo pūslės vėžio audinių ir šlapimo pūslės nuoplovų mėginiai.

Šlapimo pūslės audinių mėginiai SERS ir IR spektroskopiniams tyrimams buvo gauti nuo 2019 m. gruodžio iki 2021 m. rugsėjo mėnesio Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Urologijos centre atliekant transuretrinę šlapimo pūslės rezekciją (ŠPTUR) arba radikalią cistektomiją (RC).

ŠPTUR procedūros pradžioje, prieš pjaunant naviką, spektriniais tyrimams endoskopiniu rezektoskopu, elektrine kilpele paimtas vienas onkologinių makroskopinių pakitimų neturintis (nevėžinis) šlapimo pūslės audinio mėginys, kurio skersmuo 2-5 mm. Po ŠPTUR procedūros spektriniais tyrimams buvo paimtas vienas navikiškai pakitęs audinio mėginys, kurio dydis galėjo siekti iki 5 mm. Piktybiškumas buvo patvirtintas patologiškai ištyrus likusį išpjautą audinį. Nevėžinio audinio grupę sudarė audiniai, kuriuose nebuvo šlapimo pūslės vėžio komponento. Atvejais, kai buvo atliekama RC, po procedūros buvo paimami nevėžinio ir piktybinio audinio mėginiai iš pašalintos šlapimo pūslės. Iškart po operacijos šlapimo

pūslės audinio mėginiai buvo pateikti histologinei ir spektroskopinei analizei. Histologinė analizė buvo atliekama pagal įprastinį protokolą taikomą gydymo įstaigoje, audiniai fiksuoti 10 % buferinio formalino tirpale. Spektroskopinė analizė buvo atliekama tą pačią dieną kaip ir operacija, transportuojant tiriamoji medžiaga talpinta 0,9 % natrio chlorido tirpale. Taigi, kiekviename spektroskopinei analizei surinktų mėginių rinkinyje buvo navikinis audinys ir nevėžinis audinys, paimtas iš to paties paciento šlapimo pūslės.

Šlapimo pūslės nuoplovos SERS spektriniais tyrimams surinktos nuo 2022 m. sausio mėnesio iki 2023 m. kovo mėnesio plaunant šlapimo takus fiziologiniu tirpalu (prieš betkokią manipuliaciją šlapimo takuose), kurios buvo perduotos spektrinei analizei iš karto jas gavus. Tiriamųjų, kuriems vėliau iš rezekuotos medžiagos histologiškai buvo patvirtinta šlapimo pūslės vėžio diagnozė, šlapimo pūslės nuoplovų mėginiai buvo laikyti navikinės grupės. Atskira grupė buvo renkama sveikų pacientų, kuriems nebuvo įtariamas šlapimo pūslės vėžys ir anamnezėje niekada nebuvo nustatyti šlapimo takų onkologiniai susirgimai. Tokių pacientų šlapimo pūslės nuoplovos buvo paimtos cistoskopijų metu, kai tyrimas buvo atliekamas dėl kitų neonkologinių ligų indikacijų. Pacientams, kurie buvo įtraukti į sveikų šlapimo pūslės nuoplovų grupę, nustatytos klinikinės diagnozės po urologo ištyrimo: lėtinis cistitas – 20 pacientų, idiopatinė mikrohematurija – 17 pacientų, šlapimo nelaikymas – 8 pacientai, nefrogeninės kilmės mikrohematurija – 4 pacientai, gerybinė prostatos hiperplazija – 4 pacientai, inkstų akmenligė – 1 pacientas. 33 pacientams iš visų 54 buvo atlikta pilvo ir dubens kompiuterinė tomografija viršutinių šlapimo takų urotelio karcinomai ekskliuduoti, tame tarpe visiems pacientams, kuriems nustatyta idiopatinė mikrohematurija. Kompiuterinės tomografijos tyrimas buvo atliktas pagal klinikinės indikacijas, tyrėjams neįtakojant sveikų pacientų ištyrimo taktikos. Visiems sveikų šlapimo pūslės nuoplovų grupės pacientams taip pat buvo atliktas citologinis tyrimas, kuris buvo neigiamas.

3.4.2. Biologinių mėginių spektroskopinė analizė

Šio tyrimo tikslas yra nustatyti spektroskopinių metodų galimybę diferencijuoti šlapimo pūslės vėžio ir nevėžinius šlapimo pūslės audinius, taip pat sveikų ir sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu pacientų nuoplovas. Remiantis jau atliktais spektroskopiniais tyrimais su biologiniais audiniais, kartu su šlapimo pūslės audinio analize, numatytas šlapimo pūslės audinio tarpląstelinio skysčio tyrimas.^{119,120} Tarpląstelinio skysčio Ramano sklaidos spektrai gali suteikti svarbios informacijos apie ląstelių tipą tose audinio srityse, iš kurių buvo paimtas skystis. Spektriniais tyrimams tarpląstelinio

skysčio mėginiai ruošiami šlampavimo būdu, prispaudžiant biopsinį audinį prie mėginio laikiklio. Atitraukus audinį, ant laikiklio lieka 0,1 μm - 1 μm storio tarpląstelinio skysčio plėvelė, kurios virpesinį spektrą reikia užfiksuoti. Dėl nedidelio tarpląstelinio skysčio sluoksnio storio Ramano sklaidos spektrai yra labai silpni ir netinka audinio diagnostikai. Tokios plonos plėvelės Ramano sklaidos spektrą galima užfiksuoti tik naudojant paviršiaus sustiprintą Ramano sklaidą (angl. SERS). Dėl tos pačios priežasties šlapimo pūslės nuoplovų tyrimai taip atlikti naudojant SERS spektroskopiją. Taip pat, tikintis priartinti laboratorijoje atliekamus tyrimus prie klinikinės praktikos, nuspręsta kartu atlikti tyrimus su IR spektroskopija dėl šių šio metodo privalumų: tai yra audinius nepažeidžiantis metodas, greitas spektrų užregistravimas, nereikalingas sudėtingas audinių paruošimas, galimybė naudoti šviesolaidinę techniką ir taip leisti naudoti metodą *in situ* sąlygomis, spektrometrai yra nedideli ir transportabilūs.

Projektuojant šviesolaidinės IR spektroskopijos panaudojimą *in vivo* sąlygomis endoskopiškai, buvo nuspręsta tirti IR galimybę diferencijuoti nevėžinį šlapimo pūslės audinį nuo vėžinio. Todėl nuspręsta IR spektroskopijos tyrimuose apsiriboti šlapimo pūslės audinio preparatais.

3.4.2.1. SERS viso audinio ir audinių tarpląstelinio skysčio mėginių analizė

3.4.2.1.1. Mėginių paruošimas

Mėginiai viso audinio SERS analizei buvo paruošti tokia eiga:

- švariui skalpelio ašmeniu buvo nupjauta nedidelė audinio dalis. Išpjauti šlapimo pūslės vėžio audiniai buvo gana maži dėl operacijos (rezekcijos procedūros) apribojimų. Todėl vidutiniškai analizuojamų audinių mėginiai buvo maždaug 1,5-2 mm skersmens;
- audinių pjūvis buvo padėtas pjautine puse į viršų, o ant viršaus užlašinta ir išdžiovinta nedidelė dalis koncentruoto koloidinio nanodalelių tirpalo;
- SERS spektrai buvo registruojami tiesiai nuo audinio paviršiaus.

Šiame darbe analizuojami nevėžinių ir vėžinių šlapimo pūslės audinių tarpląstelinio skysčio mėginiai buvo paruošti tokia eiga:

- nedidelė šlapimo pūslės audinio dalis buvo nupjauta nuo pagrindinio audinio ir prispausta ant aliumininio pagrindo, kuris buvo iš anksto nuvalytas metanoliu (aliuminis gerai atspindi

infraraudonąją spinduliuotę, krintančią į ją. Taip pat, aliuminio paviršius yra hidrofobinis, dėl to koloidinio nanodalelių tirpalo lašelis neišsiplėčia.);

- susidaręs tarpląstelinio skysčio sluoksnis buvo džiovinamas atviroje aplinkoje kambario temperatūroje ir naudojamas tolesniems tyrimams.

Atlikus tokią mėginio paruošimo procedūrą, susidaro plona tarpląstelinio skysčio plėvelė, į kurią patenka ir pavienės audinio ląstelės. Kadangi tarpląstelinio skysčio mėginiai buvo paimti antspauduojant tiriamąjį audinį ant stiklinio pagrindo, antspaudas išsaugo informaciją apie audinio morfologiją. Vėžinės audinio sritys yra tose pačiose antspaudavimo vietose, tik su daug mažesne ląstelių koncentracija. Prieš registruojant SERS spektrus, ant išdžiovinotos tarpląstelinio skysčio plėvelės viršaus buvo užlašintas lašas koloidinio nanodalelių tirpalo. Siekiant išvengti nuo laiko priklausančių biologinio mėginio pokyčių ir padidinti matavimų pakartojamumą, mėginio su koloidiniu nanodalelių tirpalu paruošimo ir SERS spektro gavimo laikas buvo pakankamai trumpas, ne ilgesnis kaip 5 min.

Taip buvo paruoštos sidabro nanodalelės:

- 18 mg sidabro nitrato (AgNO_3 , 99 %, Merck, Vokietija) ištirpinta 100 ml distiliuoto vandens.
- AgNO_3 vandeninis tirpalas nuolat maišant buvo kaitinamas iki virimo temperatūros.
- pasiekus virimo temperatūrą, įpilta 2 ml 1 % trinatrio citrato ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 99 %, Merck, Vokietija) tirpalo ir visas mišinys paliktas kaitinti dar valandą maišant.
- po 1 val. tirpalas buvo atšaldytas iki kambario temperatūros ledo vonioje. Gautas pilkšvai žalias sidabro nanodalelių tirpalas.
- siekiant padidinti nanodalelių koncentraciją, koloidinis tirpalas buvo centrifuguojamas 10 min. 6500 aps./min greičiu.
- 15 ml iš pradinio 30 ml tirpalo buvo pašalinta kaip supernatantas. Likęs koncentruotas tirpalas buvo naudojamas Ramano sklaidos matavimams.

Remiantis transmisinės elektroninės mikroskopijos vaizdo analize, nustatyta, kad vidutinis sferinių nanodalelių skersmuo yra apie 80 nm. Ag nanodalelių tinkamumas SERS tyrimams buvo patikrintas naudojant šlapimo rūgštį kaip adsorbantą. Nustatyta, kad apskaičiuotas analitinis sustiprinimo koeficientas nanodalelėms yra 8×10^4 .

3.4.2.1.2. Analizavimo įranga

SERS spektrai buvo registruojami naudojant Furjė transformacijos (FT-Raman) MultiRAM spektrometrą (Bruker GmbH, Vokietija). Mėginiai buvo apšvitinti 1064 nm bangos ilgio Nd:YAG lazeriu. Buvo naudojamas paausutas hiperbolinis 90 laipsnių kampo veidrodinis objektyvas, sujungtas su CCD kamera. Objektyvo židinio nuotolis buvo 33 mm, o sufokusuoto lazerio spindulio skersmuo - 100 μm (vidutinis teorinis intensyvumas bandinyje 1270 W/cm², kai lazerio galia 100 mW, tačiau reali tikėtina lazerio galia dėl nuostolių lazerio spindulio kelyje – 955 W/cm²). Išsklaidytai šviesai surinkti naudotas skystu azotu aušinamas Ge detektorius. Visi spektrai buvo registruojami 100-3600 cm⁻¹ bangos skaičių diapazone, skyra - 4 cm⁻¹.

3.4.2.2. IR viso audinio spektroskopinė analizė

Šviežiai išpjautų audinių mėginių IR spektrai buvo registruojami naudojant ATR IR šviesolaidinį zondą. Sistemą sudaro ATR sidabro halogenidų šviesolaidinis zondas (Art Photonics GmbH, Berlynas, Vokietija), prijungtas prie standartinio FT-IR (Furjė transformacijos infraraudonojo) spektrometro Alpha (Bruker Optik GmbH, Ettlingenas, Vokietija), sujungto su išoriniu skystu azotu aušinamu MCT (gyvsidabrio-kadmio-telurido) detektoriumi (Infrared Associates, Inc., modelis IRA-20-00131).

Buvo padaryti nedideli normalaus ir vėžinio šlapimo pūslės audinio pjūviai. Spektrai surinkti prispaudus ATR pluošto zondą prie šviežiai supjaustyto audinio paviršiaus. Kiekvienam mėginiui buvo užregistruoti keli spektrai, kurių analizei buvo išvestas vidurkis. Spektrai užregistruoti spektrinėje srityje nuo 400 iki 4000 cm⁻¹, skyra - 4 cm⁻¹. Kiekvieno matavimo metu registruojamos 64 interferogramos, kurių vidurkiui atlikus Furjė transformaciją gaunamas ATR IR spektras. Furjė transformacijos metu naudota Blackmanno-Harriso 3 narių apodizacijos funkcija ir užpildymo nuliais koeficientą 2. Prieš kiekvieną matavimą ATR kristalas buvo valomas distiliuotu vandeniu ir etanoliu ir matuojamas aplinkos oro foninis spektras.

3.4.2.3. Šlapimo pūslės nuoplovų tyrimas SERS metodu

Bandinio paruošimo procedūra tokia: pipetės pagalba ant aliuminio folija dengtos stiklinės plokštelės užlašinamas mažas šlapimo pūslės nuoplovų lašas. Prieš paruošiant nanodalelių sluoksnius ant aliuminiu padengto stiklo, pagrindas buvo nuvalomas metanoliu, kad būtų pašalintos nusėdusios dulkės, pirštų antspaudai ar kiti nešvarumai, nugulę ant aliuminio folijos paviršiaus.

Tuomet bandinys paliekamas išdžiūti kambario temperatūroje, užlašinamas koloidinio nanodalelių tirpalo lašas ir taip pat išdžiovinamas. Taip substrato paviršiuje susidaro ovalo formos bandinys, kurio kraštuose registruojamas sustiprintos Ramano sklaidos spektras.

SERS spektrai registruojami naudojant Furjė transformacijos (FT-Raman) MultiRAM spektrometrą (Bruker GmbH, Vokietija), kurio parametrai aprašyti aukščiau (žr. 3.4.2.1.2 skyrių). Norint padidinti signalo ir triukšmo santykį visi spektrai buvo vidurkinami. Kiekvienas iš spektrų buvo registruojamas 200 kartų (angl. 200 scans), o gautieji rezultatai vidurkinami.

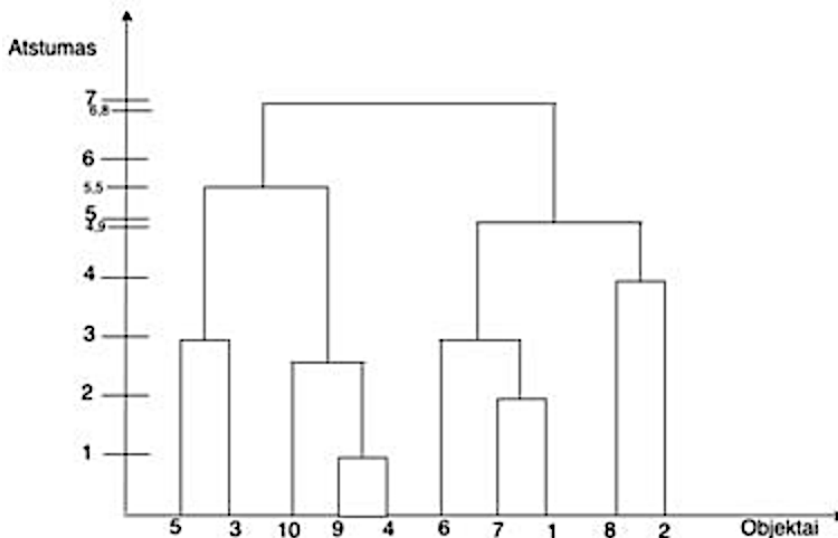
3.5. Rezultatų vertinimas matematinės statistikos metodais

SERS ir IR spektroskopija yra galingi ir tikslūs cheminių junginių identifikavimo metodai, tačiau biologinių audinių biocheminės sudėties nustatymas naudojant šią metodiką nėra paprastas arba aiškus. Biologiniai mėginiai yra sudėtingos medžiagos, kurią sudaro įvairūs cheminiai komponentai. Daugumoje biologinių mėginių yra gausu įvairių junginių grupių, tokių kaip baltymai, lipidai, angliavandeniai ir nukleino rūgštys, tačiau šių komponentų proporcijos gali skirtis net tarp tos pačios kilmės mėginių. Be to, spektrinės juostos yra gana plačios ir gali persidengti tarpusavyje. Dėl šios priežasties skiriasi IR spektrai, netgi to paties organo audiniuose skirtinguose individuose. Ši vidinė ir tarpklasė kintamumo savybė sukelia sunkumų aiškinant biologinių audinių biocheminių sudėčių pokyčius dėl patologijos. Kai kuriais atvejais patologiniai procesai gali sukelti nedidelius cheminio pobūdžio pokyčius audiniuose, todėl reikalingi statistiniai metodai, kurie atsižvelgtų į skirtumus tarp tos pačios kilmės audinių skirtinguose individuose ir leistų tuo pačiu metu nustatyti patologinių procesų sukeltus pokyčius.

3.5.1. Naudoti statistiniai tyrimo metodai

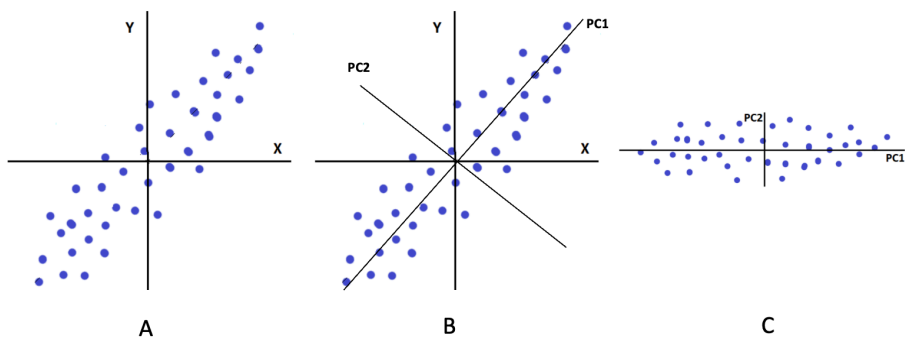
- Hierarchinė klasterių analizė (HCA) – tai klasterių grupavimo metodas, kuris leidžia suprasti, kaip klasteriai tarpusavyje susiję. Tai dažnai vaizduojama dendrograma, kuri parodo klasterių sąryšius ir jų sujungimo būdą. Pagrindiniai etapai yra objektų atranka klasterizavimui, savybių apibrėžimas, panašumo matavimas, objektų priskyrimas klasteriams ir gautų rezultatų analizė. Pirmiausia atskiri objektai (pvz., spektrai) laikomi atskirais klasteriais. Vėliau randamas panašiausias klasteris (spektras) ir šie du klasteriai sujungiami. Toliau operacija

kartojama sujungiant dar du klasterius, o visi klasteriai sujungiami į vieną struktūrą, pavadintą dendrograma. Panašumas tarp klasterių apibūdinamas atstumu (pvz., Euklido atstumu) - kuo mažesnis atstumas tarp dviejų klasterių, tuo panašesni duomenys. Pavyzdinė schema 10 paveiksle.



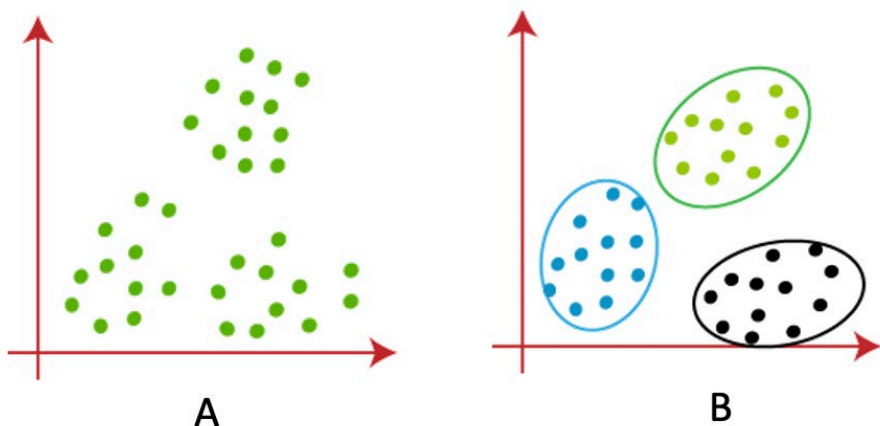
10 pav. Hierarchinės klasterinės analizės dendrogramos pavyzdys. Y ašyje – Euklido atstumas. X ašyje – objektai, kurie grupavimo pradžioje sudaro atskirą klasterį. Pirmiausia nustatomi du klasteriai (9 ir 4), kurie panašiausi ir sugrupuojami. Vėliau šis sugrupuotas klasteris (9, 4) dalyvauja analizėje kaip atskiras klasteris, o jų požymiai suvidurkinami. Analizė tęsiama, kol sujungiami visi klasteriai.

- Pagrindinių komponentių analizė (PCA) naudojama duomenų dimensijų sumažinimui ir didesnei dispersijai, tiesiškai transformuojant duomenis (pvz., spektrų bangų dažnius ir spektrų skaičių) ir atmetant komponentes su maža dispersija. Įvertinant duomenų skirstymą, ši analizė identifikuoja pagrindines komponentes, kurios paaiškina duomenų variaciją. Pagrindinės komponentės yra nepriklausomos viena nuo kitos. Pagrindinių komponentių skaičius yra mažesnis, palyginti su kintamųjų skaičiumi. Pirmoji pagrindinė komponentė rodo didžiausią variacijų dalį, antroji - antrąją pagal dydį variacijų dalį, trečioji - trečiąją pagal dydį variacijų dalį ir t. t. PCA grafiką sudaro dvi pagrindinių komponentių plokštumos, kurios paprastai yra didžiausios. Pavyzdinė schema 11 paveiksle.



11 pav. Pagrindinių komponenčių analizės sudarymo schema. Pavyzdyje naudojami objektai turintys du kintamuosius išdėstyti X ir Y ašyse (A). PCA naudoja koreliaciją tarp kintamųjų, kad surastų vektorius PC1 ir PC2, kurie paaiškina didžiausią dispersiją (B). Duomenų taškuose vaizduojami tie patys stebėjimai kaip ir anksčiau, tačiau dabar naudojamos naujos koordinatės, pagrįstos ortogonaliumi vektoriumi (Pagrindinėmis komponenčiomis PC1 ir PC2) duomenimis (C).

- K-vidurkių analizė yra duomenų grupavimo metodas, kuris naudojamas duomenų rinkiniuose rasti natūraliai susidarantias grupes (klasterius). Šiame metode kiekvienas klasteris yra apibrėžiamas pagal jo vidurkį, kuris yra klasteryje esančių taškų vidutinė pozicija. Pavyzdinė schema pateikta 12 paveiksle.



12 pav. K vidurkių analizės sudarymo schema. A schemoje pavaizduoti duomenys iki analizės. B schemoje pavaizduoti sugrupuoti duomenys. Visų pirma yra nustatomi 2 ar daugiau duomenų centroidai iš išdėstytų duomenų taškų. Kiekvienas duomenų taškas priskiriamas artimiausiam centroidui. B schemoje pavaizduoti duomenys po grupavimo.

- Diagnostinio tyrimo patikimumui įvertinti apskaičiuojamos jautrumo, specifiškumo, teigiamos (PPV) ir neigiamos prognostinės (NPV) vertės. Šiems parametrams nustatyti naudojama rezultatų suskirstymo lentelė:¹²¹

		Liga	
		Yra	Nėra
Diagnostinio testo rezultatas	Teigiamas	Teisingai teigiamas	Klaidingai teigiamas
	Neigiamas	Klaidingai neigiamas	Teisingai neigiamas

Jautrumas - tai gebėjimas nustatyti, kad testo rezultatai yra teigiami. Didelio jautrumo testas reiškia, kad yra nedaug klaidingai neigiamų rezultatų, todėl praleidžiama mažiau ligos atvejų.¹²¹ Tai galima apibūdinti šia formule:

$$Jautrumas = \frac{Teisingai\ teigiami}{Teisingai\ teigiami + Klaidingai\ neigiami}$$

Tyrimo specifiškumas - tai gebėjimas neigiamai įvertinti asmenį, kuris neserga tam tikra liga. Labai specifinis testas reiškia, kad klaidingai teigiamų rezultatų būna nedaug.¹²¹ Tai galima apibūdinti šia formule:

$$Specifiškumas = \frac{Teisingai\ neigiami}{Teisingai\ neigiami + Klaidingai\ teigiami}$$

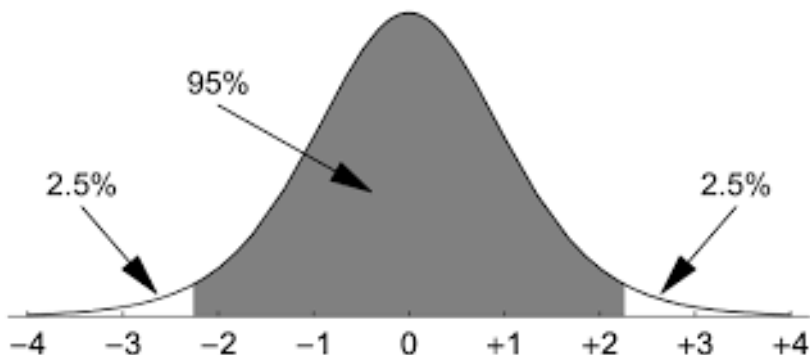
Teigiama prognostinė vertė (TPV) - tai tikimybė, kad pacientas, kurio tyrimo rezultatas yra teigiamas, iš tikrųjų serga liga.¹²¹ Ši vertė apibūdinama šia formule:

$$TPV = \frac{Teisingai\ teigiami}{Teisingai\ teigiami + Klaidingai\ teigiami}$$

Neigiama prognostinė vertė (NPV) - tai tikimybė, kad neigiamą testo rezultatą gavęs asmuo tikrai neserga.¹²¹

$$NPV = \frac{Teisingai\ neigiami}{Teisingai\ neigiami + Klaidingai\ neigiami}$$

- Pasikliautinis intervalas (PI, angl. confidence interval) rodo ribas, kuriose su tam tikra tikimybe yra tikrasis rodiklis. Tikimybė, kad tikrasis rodiklis yra šiame intervale, vadinama reikšmingumo lygmeniu. Moksle paprastai pateikiamas 95 % reikšmingumo lygmuo. PI rezultatai pateikiami intervalu, nurodant reikšmingumo lygmenį. Pasikliautinio intervalo schema pateikta 13 paveiksle.



13 pav. Pasikliautinio intervalo schema. Pagal nurodytą grafiką galime teigti, kad 95 % atvejų populiaciją atspindintis rezultatas bus nurodytame pasikliautiniame intervale.

3.6. Doktoranto ir kitų tyrėjų indėlis

Doktorantas Gediminas Platkevičius įtraukė visus tiramuosius į biomedicininį tyrimą, surinko visus klinikinius ir patologinius duomenis. Rinko biologinę medžiagą operacinėje ir atliko pooperacinę tiramųjų stebėseną. Gediminas Platkevičius analizavo spektroskopinių tyrimų rezultatus ir siejo juos su klinikiniais ir patologiniais duomenimis. Doktorantas buvo vienas pagrindinių autorių, rengiant tyrimo duomenimis paremtus mokslinius straipsnius. Pristatė biomedicininio tyrimo duomenis mokslinėse konferencijose.

Spektroskopinių tyrimų dalį atliko prof. dr. Valdo Šablinsko vadovaujama fizikos fakulteto cheminės fizikos instituto komanda: dr. Rimantė Bandzevičiūtė, prof. dr. Justinas Čėponkus, Edvinas Zacharovas, dr. Martynas Velička. Edvinas Zacharovas ir dr. Martynas Velička buvo pagrindiniai bendraautoriai ruošiant pirmąją mokslinę publikaciją. Dr. Rimantė Bandzevičiūtė ir prof. dr. Justinas Čėponkus buvo antrosios publikacijos pagrindiniai bendraautoriai.

Dr. Rimantė Bandzevičiūtė supažindino doktorantą su spektroskopijos prietaisais ir parodė, kaip yra atliekami spektroskopiniai tyrimai su gyvais

audiniai. Dr. R. Bandzevičiūtė, prof. dr. Justinas Čeponkus, dr. Martynas Velička konsultavo doktorantą ruošiant disertaciją fizikiniais klausimais.

Prof. dr. Valdas Šablinskas buvo pagrindinis konsultantas, atsakingas už biomedicininio tyrimo fizikinę dalį. Profesorius kritiškai vertino parengtas mokslines publikacijas, pateikė vertingų pastabų dėl jų turinio ir pateikimo spaudai.

Prof. dr. A. Želvys buvo darbo vadovas, atsakingas už biomedicininio tyrimo dizainą, ir pagrindinis konsultantas, sprendžiant klinikinius klausimus. Profesorius taip pat kritiškai vertino parengtas mokslines publikacijas, pateikė vertingų pastabų dėl jų turinio ir pateikimo spaudai.

4. REZULTATAI

4.1. Tiriamųjų bendrosios charakteristikos

Iš viso į tyrimą buvo įtraukti 157 tiriamieji, kurie buvo gydyti VULSK dėl šlapimo pūslės vėžio. Iš jų, 76 – buvo įtraukti į šlapimo pūslės vėžio audinių tyrimus. Šiems pacientams buvo atliekama ŠPTUR ar RC procedūros, ir esant galimybei paimta šlapimo pūslės nevėžinio ir navikiškai pakitusio audinio mėginiai. Atvejais, kai procedūros metu nebuvo galima vizualizuoti sveikos šlapimo pūslės gleivinės, nevėžinio audinio mėginiai nebuvo imti, todėl audinių tyrimuose nevėžinio ir vėžinio audinio kiekis nėra lygus.

Audinių tyrimai buvo atlikti etapais. Pirmieji 30 pacientų buvo tirti abiem spektroskopijos metodais – SERS ir IR. Vėlesni pacientai, buvo tirti tik IR metodu. Šios tyrimų imtys pateiktos atskirai, aprašant kiekvieno metodo rezultatus. Pirmojo tyrimo etapo metu dalis makroskopiškai vertinto audinio kaip navikinis, histologiniame tyrime buvo vertintas kaip pakitęs uždegimiškai (cistito), todėl ši grupė spektroskopiniuose tyrimuose buvo išskirta atskirai. Vertinant IR metodu visi tiriamieji, kai histologinio tyrimo galutiniame atsakyme buvo nustatyta ne urotelio karcinoma (pavyzdžiui nespecifinis cistitas, neuroendokrininė karcinoma, adenokarcinoma), buvo eksliuduoti. Tuomet, tyrime liko 54 tiriamieji.

Šlapimo pūslės nuoplovų tyrime įtrauktas 81 tiriamasis, iš kurių 27 tiriamųjų – ŠPV grupėje ir 54 tiriamieji sveikoje grupėje, kuriems niekada nebuvo nustatytas ŠPV.

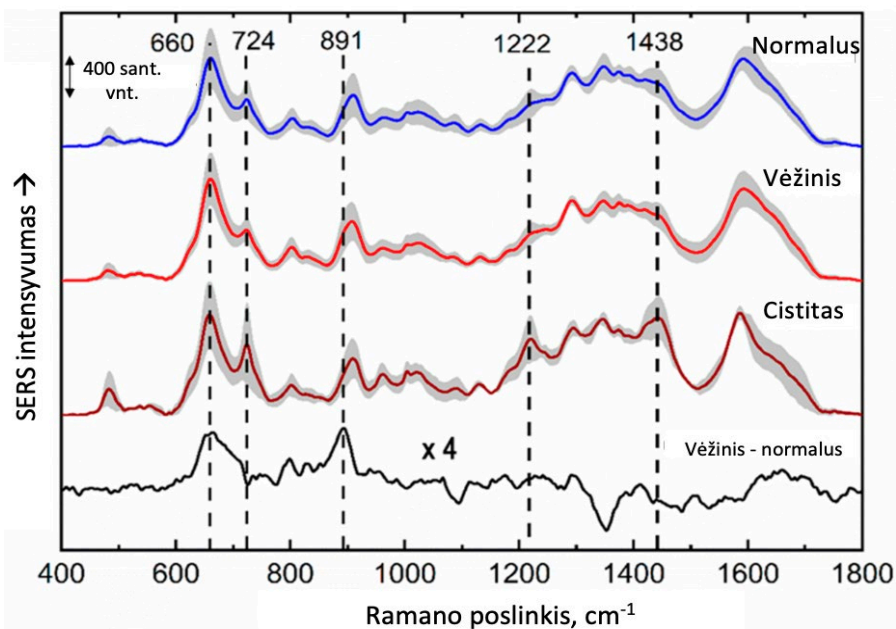
4.2. Šlapimo pūslės audinio tyrimai SERS metodu

Šiame darbe buvo surinkti ir ištirti 58 šlapimo pūslės audinio mėginiai iš 30 skirtingų pacientų (28 sveikų, 25 vėžiu sergančių pacientų ir 5 cistitu sergančių pacientų). Dviems pacientams sveiko audinio mėginio nebuvo įmanoma paimti. Šiame tyrime naudotų šlapimo pūslės audinių histologinės analizės rezultatai pateikti 3 lentelėje. Vėžiniai susirgimai buvo klasifikuojami pagal TNM klasifikavimo sistemą.

3 lentelė. Tyrimo metu surinkti audinių tipai ir pacientų charakteristikos. Informacija, pagrįsta operacijos metu gauta informacija ir galutinių patologinio ištyrimo duomenimis.

Audinio tipas	Mėginių skaičius
Normalus ŠP audinys	28
Pažeistas audinys	
Cistitas	5
Aukšto laipsnio UK	16
Žemo laipsnio UK	9
Tiriamųjų charakteristika	Tiriamųjų skaičius
Tumoro dydis ŠPTUR metu	
<10 mm	8
10–30 mm	10
>30 mm	7
Tumorių skaičius ŠPTUR metu	
Vienas	10
Du - trys	9
Daugiau nei trys	6
Papildoma informacija	
Viso dalyvavo tiriamųjų	30
Vidutinis tiriamųjų amžius (metais)	71,3

Norint nustatyti spektrinius skirtumus tarp nevėžinių, vėžinių ir cistitu paveiktų šlapimo pūslės audinių, buvo užregistruoti SERS spektrai. Spektrai buvo registruojami penkiose skirtingose bandinio vietose kiekvienam šlapimo pūslės audinio mėginiui, siekiant atsižvelgti į galimus skirtumus spektruose skirtingose to paties audinio vietose. Šlapimo pūslės audinių vidutiniai SERS spektrai pateikiami 14 paveiksle.



14 pav. Vidutiniai visų tiriamųjų SERS spektrai cistitu paveiktų, vėžinių ir sveikų šlapimo pūslės audinių mėginių, ir skirtuminis spektras, kuris yra apskaičiuotas iš vėžinio audinio spektro atėmus normalaus audinio spektrą ir pateiktas padidintu intensyvumu (4x). Spektuose pilki plotai atitinka intensyvumo standartinę nuokrypį. Žadinančios spinduliuotės bangos ilgis yra 1064 nm.

Pilkos spalvos plotai rodo SERS spektro juostų intensyvumo standartinę nuokrypį. Šiuos pokyčius galima paaiškinti koncentracijos svyravimais dėl nevienodo struktūrinių molekulių pasiskirstymo. Vėžiui svarbių molekulių pasiskirstymas žmogaus organizme priklauso nuo fiziologijos, gyvenimo būdo, fizinio aktyvumo, vartojamo maisto, vaistų, ligų ir kitų veiksnių. Be to, vėžio atveju tokių molekulių koncentracija audiniuose gali kisti priklausomai nuo skirtingo naviko tipo, jo stadijos ir vėžinių ląstelių morfologinių pokyčių. Taip pat svarbu pažymėti, kad operacijos metu tiksli riba tarp normalių ir vėžinių audinių yra nematoma. Todėl vėžines ląsteles galima aptikti sveiko audinio mėginyje ir atvirkščiai.

Analizuojant sveiko ir vėžinio šlapimo pūslės audinio SERS spektrų vidurkius, reikšmingų spektrinių skirtumų tarp jų nebuvo nustatyta. Siekdami išryškinti nedidelius spektrinius nuokrypius tarp tirtų mėginių, sudarytas skirtuminis spektras, kuris yra apskaičiuotas iš vėžinio audinio spektro atėmus normalaus audinio spektrą (toks metodas anksčiau buvo taikytas išsamiai Raman/SERS šlapimo pūslės vėžio analizei^{88,89,122}). Skirtuminis spektras parodė dvi dominančias spektrines juostas (14 pav.). Jos yra 660 cm⁻¹ ir 891

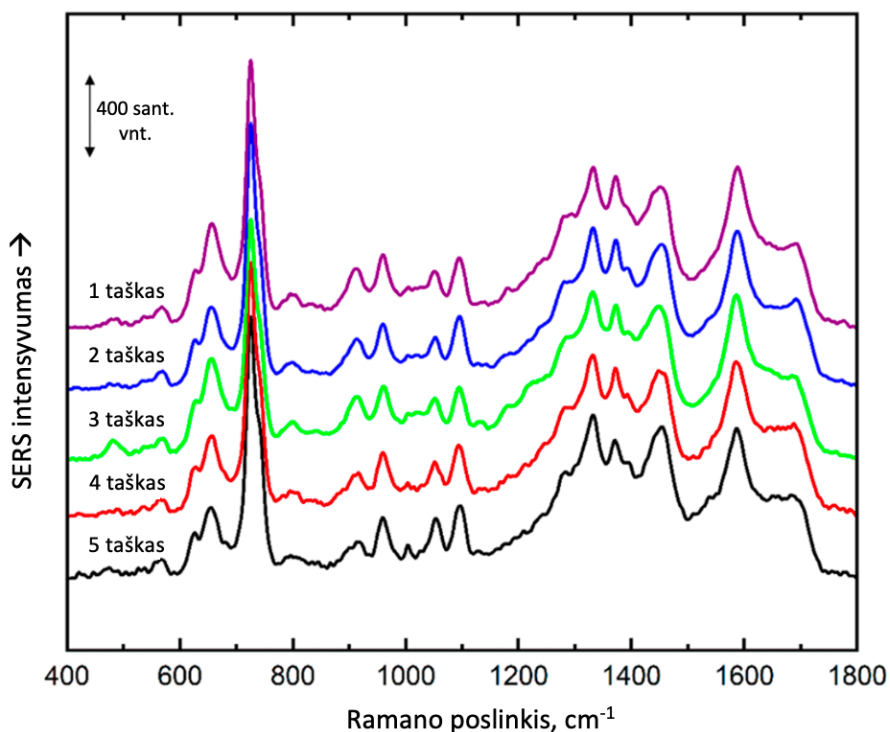
cm⁻¹. Be to, palyginus vėžinių ir normalių audinių spektrus su cistito pažeistų audinių SERS spektrais, buvo nustatytos trys SERS spektro juostos, kurių normalių ir vėžinių audinių spektruose nėra arba jų intensyvumas mažas. Šios juostos yra 724 cm⁻¹, 1222 cm⁻¹ ir 1438 cm⁻¹.

Siekiant įvertinti šlapimo pūslės vėžio ir cistito pažeistų šlapimo pūslės audinių spektrinių požymių patikimumą ir tikslumą, buvo atlikta pagrindinių komponenčių analizė (PCA) naudojant algoritmą, sukurtą "Origin Pro 9" programine įranga ("OriginLab Corporation", Northampton, MA).

Pagrindinių komponenčių analizėje buvo pasirinktos spektrinių juostų sritys, kurios gali būti naudojamos šlapimo pūslės audinių vėžiui ir cistitui nustatyti. Šlapimo pūslės audinio spektrų analizei buvo pasirinkti šie SERS spektrinės sritys: 700-750 cm⁻¹, 1190-1260 cm⁻¹ ir 1400-1460 cm⁻¹. Potencialių žymenų juostų spektro srityse atlikta PCA parodė, kad normalaus, vėžinio ir cistito paveikto audinio spektrų duomenų projekcijos iš dalies sutampa pagrindinių komponenčių plokštumoje. Aiškių ribų tarp taškų grupių, atitinkančių skirtingų audinių spektrus, nubrėžti negalima. Galima daryti prielaidą, kad spektrinių juostų, kurios šlapimo pūslės audinių tyrimuose buvo nustatytos kaip cistito pažeistų audinių spektriniai žymenys, intensyvumo svyravimai gali būti atsitiktiniai ir priklausyti tik nuo skirtingos paciento fiziologijos ir kitų veiksnių. Dėl šios priežasties atitinkamų juostų intensyvumo pokyčių negalima priskirti sveikų, vėžinių ar cistitu sergančių audinių grupėms, kurios tiesiog pasižymi šioms grupėms būdingais bruožais.

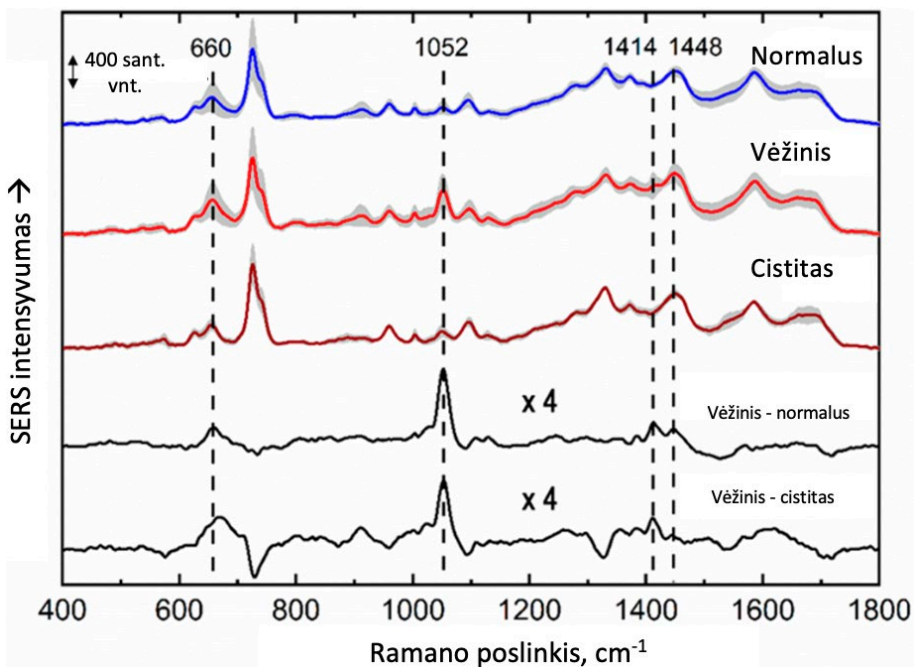
4.3. Šlapimo pūslės tarpląstelinio skysčio tyrimai SERS metodu

Šiame darbe buvo pasirinktas audinių tepinėlių metodas, nes jis jau buvo naudotas ankstesniuose tyrimuose, kuriuose buvo įrodyta, kad tarpląstelinio skysčio mėginiuose taip pat yra pavienių audinių ląstelių, o spektrinių juostų intensyvumo pokyčiai nedideli lyginant su audinių tyrimais.^{119,120} Tarpląstelinio skysčio SERS spektrai taip pat buvo registruojami penkiuose atsitiktinai parinktuose kiekvieno mėginio taškuose. SERS signalo surinkimą tokiu būdu galima laikyti spektrinės informacijos vidurkiu. Norint parodyti tipinio mėginio atkuriamumą, 15 paveiksle pateikti SERS spektrai, surinkti penkiuose atsitiktinai parinktuose normalaus šlapimo pūslės audinio tarpląstelinio skysčio taškuose. Kaip galima pastebėti, matavimo taške atsiranda tik nedideli intensyvumo skirtumai.



15 pav. Vieno tiriamojo normalios šlapimo pūslės tarpląstelinio skysčio SERS spektrai, surinkti penkiuose atsitiktinai pasirinktuose mėginio taškuose.

Sveiko, navikinio ir cistito paveikto audinio tarpląstelinio skysčio, kuriame yra pavienių ląstelių, SERS spektrai pateikti 16 paveiksle. Pažymėtina, kad spektrinių juostų intensyvumo standartinis nuokrypis (vizualizuotas pilkuoju plotu) šiuose spektruose gali būti siejamas ne tik su individualiais pokyčiais dėl skirtingo kiekvieno paciento gyvenimo būdo, bet ir su mėginio paruošimu dėl nelygaus paviršiaus tarpląstelinio skysčio sluoksnio. Taip yra todėl, kad įprastinės ir paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos signalų intensyvumas priklauso nuo tiriamojo mėginio storio (prie Ramano signalo prisidedančių molekulių skaičiaus). Labai plonas tarpląstelinio skysčio sluoksnis su pavienėmis ląstelėmis lemia pakankamai stiprų SERS signalą, o storo sluoksnio SERS spektras gali būti panašus į viso audinio Ramano spektrą.



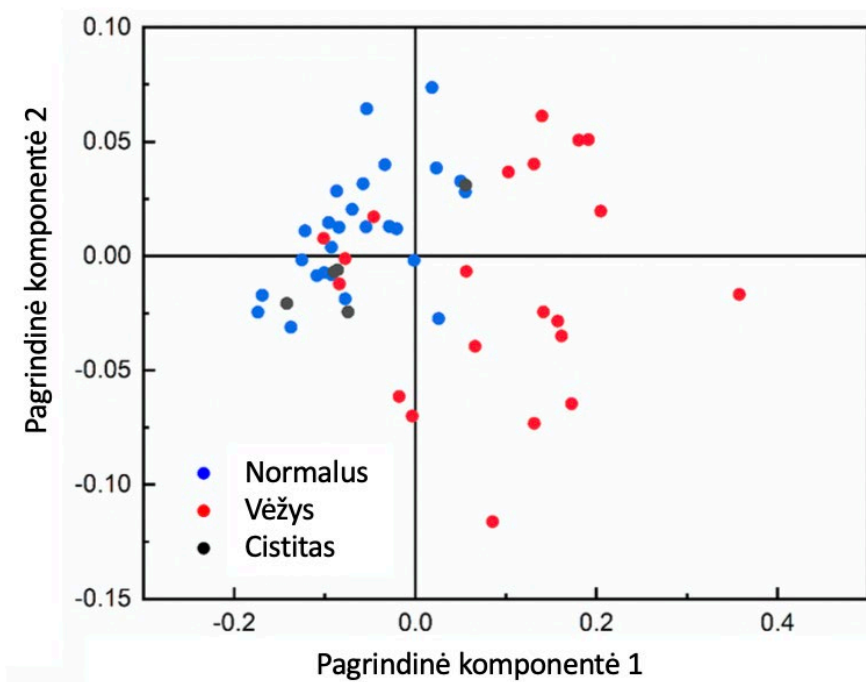
16 pav. Visų tiriamųjų cistito pažeistų, vėžinių ir normalių šlapimo pūslės audinių tarpląstelinio skysčio SERS spektrų vidurkiai ir padidinto intensyvumo ($\times 4$) skirtumo spektrai tarp vėžinių ir normalių bei vėžinių ir cistito pažeistų audinių tarpląstelinio skysčio vidurkių. Pilkos spalvos plotai spektruose rodo intensyvumo standartinę nuokrypį.

Pagrindiniai spektriniai skirtumai, leidžiantys atskirti sveikus ir vėžinius audinius, pavaizduoti 16 paveiksle pateiktuose tarpląstelinio skysčio SERS spektruose. Šios spektrinės juostos yra atitinkamai ties 1052 cm^{-1} ir 1414 cm^{-1} . Vėžinio šlapimo pūslės audinio tarpląstelinio skysčio SERS juosta ties 1052 cm^{-1} yra gana intensyvi, o sveikų ir cistito pažeistų audinių spektruose juosta ties 1414 cm^{-1} yra mažiau intensyvi. Kai kuriuose sveikų audinių SERS spektruose šių juostų apskritai nėra.

Spektriniai pokyčiai aiškiau matomi SERS skirtuminiame spektre (16 pav.), sudarytame iš vėžinių ir normalių bei vėžinių ir cistito paveiktų šlapimo pūslės audinių spektrų vidurkių. Šiame spektre esantys teigiami požymiai yra susiję su vėžiniams mėginiam būdingomis papildomomis arba sustiprėjusiomis juostomis. Taigi, intensyviausia juosta matoma ties 1052 cm^{-1} , o dvi mažesnio intensyvumo juostos atsiranda ties 1414 ir 660 cm^{-1} .

Analizuojant tarpląstelinio skysčio SERS juostas PCA analizei, buvo pasirinktos $600\text{-}750 \text{ cm}^{-1}$, $1020\text{-}1080 \text{ cm}^{-1}$ ir $1390\text{-}1440 \text{ cm}^{-1}$ spektrinės sritys.

600-750 cm^{-1} ir 1390-1440 cm^{-1} spektrinių sričių PCA diagramų taškai plačiai išsidėstę ir dauguma skirtingų tiriamųjų grupių taškai sutampa, todėl nebuvo įmanoma nustatyti tiriamųjų susikaupimo sričių, pagal kurias būtų galima atskirti sveiko, vėžio ir cistitinio šlapimo pūslės audinio grupes. Tuo tarpu, 1020-1080 cm^{-1} spektrinės srities PCA diagramoje aiškiai išskiriama taškų grupė, atitinkanti sveiko šlapimo pūslės audinio tiriamųjų spektrinius duomenis (17 pav.).



4 lentelė. Apibendrinta šlapimo pūslės vėžio tarpląstelinio skysčio SERS spektroskopijos rezultatų pagrindinių komponentių analizės (PCA) rezultatų jautrumo, specifiskumo, teigiamosios prognostinės vertės (TPV) ir neigiamosios prognostinės vertės (NPV) vertės.

	Metodas	
	PCA	
	Rezultatas	95 % PI
Jautrumas	85 %	64 – 95 %
Specifiškumas	97 %	84 – 100 %
TPV	95 %	75 – 99 %
NPV	89 %	77 – 95 %

Santrumpos: PI – pasikliautinis intervalas

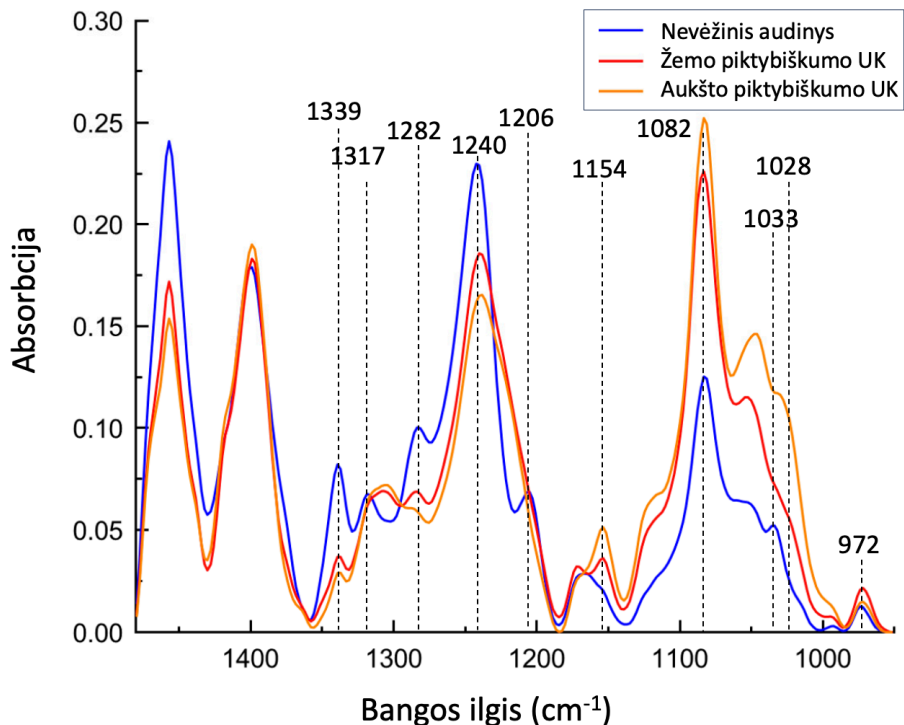
4.4. Šlapimo pūslės audinio tyrimai IR metodu

Šioje tyrimo dalyje įtraukti 54 tiriamieji. Apibendrinti duomenys pateikiami 5 lentelėje. Daugeliu atvejų kiekvieno paciento spektrinei analizei buvo gauti dviejų tipų audinių mėginiai (nevėžiniai ir vėžiniai). Keliais atvejais iš konkretaus paciento analizei buvo gautas tik nevėžinis arba tik vėžinis audinys, todėl analizuoti tik 49 nevėžiniai ir 47 vėžiniai audinių mėginiai.

5 lentelė. Tyrimo metu surinkti audinių tipai ir pacientų charakteristikos. Informacija, pagrįsta operacijos metu gauta informacija ir galutinių patologinio ištyrimo duomenimis.

Audinio tipas	Mėginių skaičius
Nevėžinis ŠP audinys	49
Navikinis audinys	
Aukšto laipsnio UK	34
Žemo laipsnio UK	13
Tiriamųjų charakteristika	Tiriamųjų skaičius
Tumoro dydis ŠPTUR metu	
<10 mm	12
10–30 mm	18
>30 mm	17
Tumorių skaičius ŠPTUR metu	
Vienas	15
Du - trys	15
Daugiau nei trys	17
Papildoma informacija	
Viso dalyvavo tiriamųjų	54
Vidutinis tiriamųjų amžius (metais)	70,5

Tiriamųjų nevėžinio ir vėžinio šlapimo pūslės audinio vidutiniai IR spektrai pateikti 18 paveiksle.



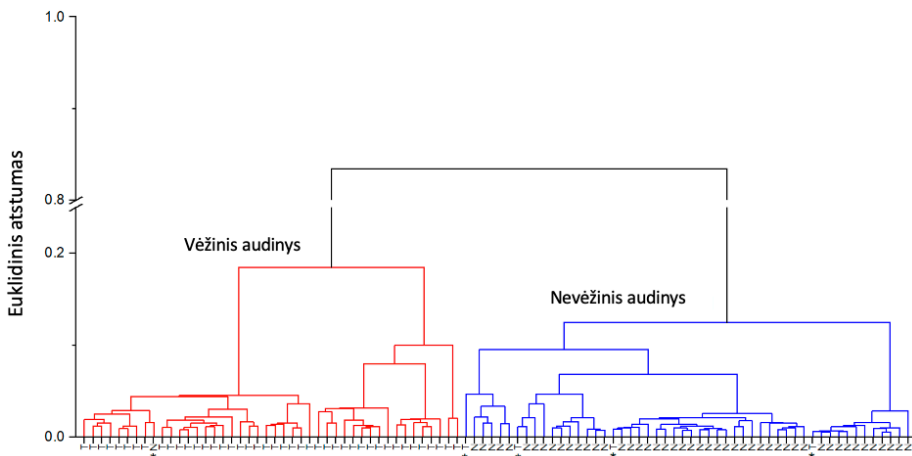
18 pav. Visų tiriamųjų imties nevėžinių ir šlapimo pūslės karcinomos (aukšto laipsnio naviko ir žemo laipsnio urotelio karcinomos) audinių vidutiniai IR spektrai. Spektrams atlikta bazinės linijos korekcija ir vektorinis normavimas. Nevėžinio audinio spektras pasižymėjo ryškesnėmis 1033 cm⁻¹, 1206 cm⁻¹, 1240 cm⁻¹, 1282 cm⁻¹, 1317 cm⁻¹ ir 1339 cm⁻¹ spektrinėmis juostomis. Vėžinio audinio spektras pasižymėjo ryškesnėmis spektrinėmis juostomis ties 972 cm⁻¹, 1082 cm⁻¹, 1028 cm⁻¹ ir 1154 cm⁻¹.

Statistinė analizė (hierarchinė klasterinė analizė (HCA) ir pagrindinių komponentų analizė (PCA)) atlikta naudojant duomenų analizės programinę įrangą OriginPro (OriginLab corporation). Prieš atliekant statistinę analizę spektrai buvo iš anksto apdoroti: atmosferos kompensavimas, bazinės linijos korekcija, vektoriaus normalizavimas ir poslinkio korekcija buvo atlikti naudojant spektroskopijos programinę įrangą OPUS (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Vokietija). Prieš atliekant HCA analizę, pirmoji spektrų išvestinė buvo apskaičiuota naudojant spektroskopijos programinę įrangą OPUS. Statistinė analizė atlikta taikant standartinę "OriginPro" programinės įrangos paketo procedūras (hierarchinę klasterinę analizę ir pagrindinių komponentų

analizę). Atliekant HCA buvo pasirinktas Ward klasterių algoritmas, Euklidinio atstumo tipas.

Siekiant įvertinti metodo patikimumą, buvo apskaičiuotas jautrumas, specifiškumas, teigiama prognostinė vertė (PPV) ir neigiama prognostinė vertė (NPV). 95 % pasikliautinieji intervalai (PI) apskaičiuoti naudojant internetinę statistinės analizės priemonę MedCalc ("MedCalc Software Ltd.", Ostendė, Belgija).

IR spektroskopijos gebėjimo atskirti navikinius ir nevėžinius audinius įvertinimui, buvo taikoma HCA ir PCA analizė. 19 paveiksle pavaizduota HCA analizės dendrograma. Vėžinių ir nevėžinių audinių spektrai suskirstyti į du klasterius (raudonasis klasteris kairėje ir mėlynasis klasteris dešinėje dendrogramos pusėje atitinka vėžinių ir nevėžinių audinių klases), didelis atstumas tarp klasterių rodo, kad abi audinių klasės yra gerai atskirtos. Tik 1 spektras iš 49 nevėžinių audinių spektrų ir 4 spektrai iš 47 navikinių audinių spektrų buvo priskirti klaidingoms klasėms (šie spektrai pažymėti * simboliu), o tai atitinka 91 % jautrumą ir 98 % specifiškumą (6 lentelė).



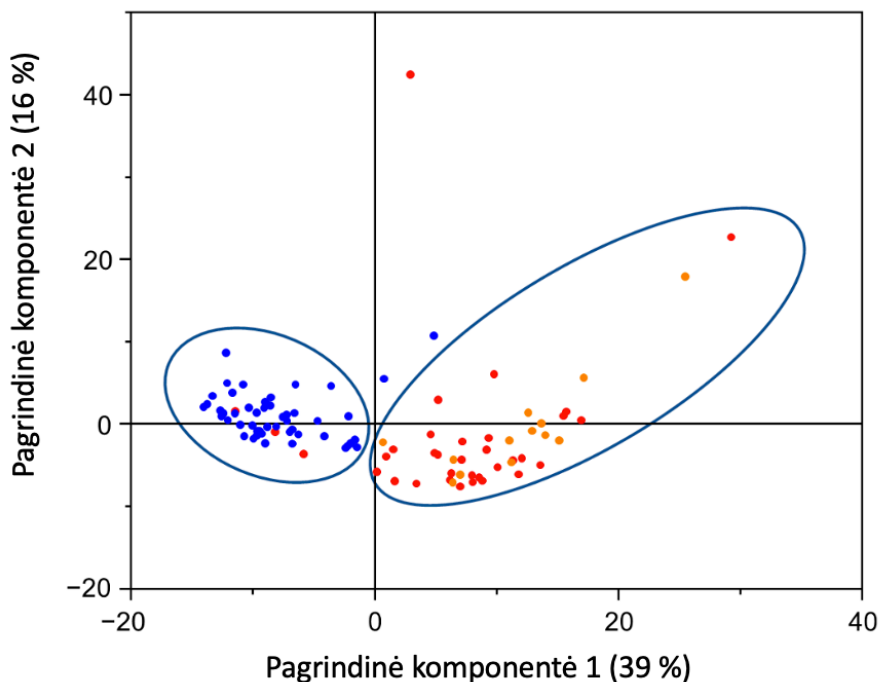
19 pav. HCA dendrograma. Raudonas klasteris atitinka navikinių audinių klasę, mėlynas klasteris - nevėžinių audinių klasę. Raidės T ir N žymi atitinkamai kiekvieno navikinio ir normalaus audinio mėginio spektrus. * Simbolis žymi spektrus, kurie buvo priskirti neteisingai audinių klasei.

6 lentelė. Apibendrintos šlapimo pūslės vėžio audinio IR spektroskopijos rezultatų hierarchinės klasterių analizės (HCA) ir pagrindinių komponentių analizės (PCA) rezultatų jautrumo, specifiškumo, teigiamosios prognostinės vertės (TPV) ir neigiamosios prognostinės vertės (NPV) vertės.

	Metodas			
	HCA		PCA	
	Rezultatas	95 % PI	Rezultatas	95 % PI
Jautrumas	91 %	80 – 98 %	91 %	80 – 98 %
Specifiškumas	98 %	89 – 100 %	96 %	86 – 100 %
TPV	98 %	86 – 100 %	96 %	85 – 99 %
NPV	92 %	82 – 97 %	92 %	87 – 98 %

PI – pasikliautinis intervalas

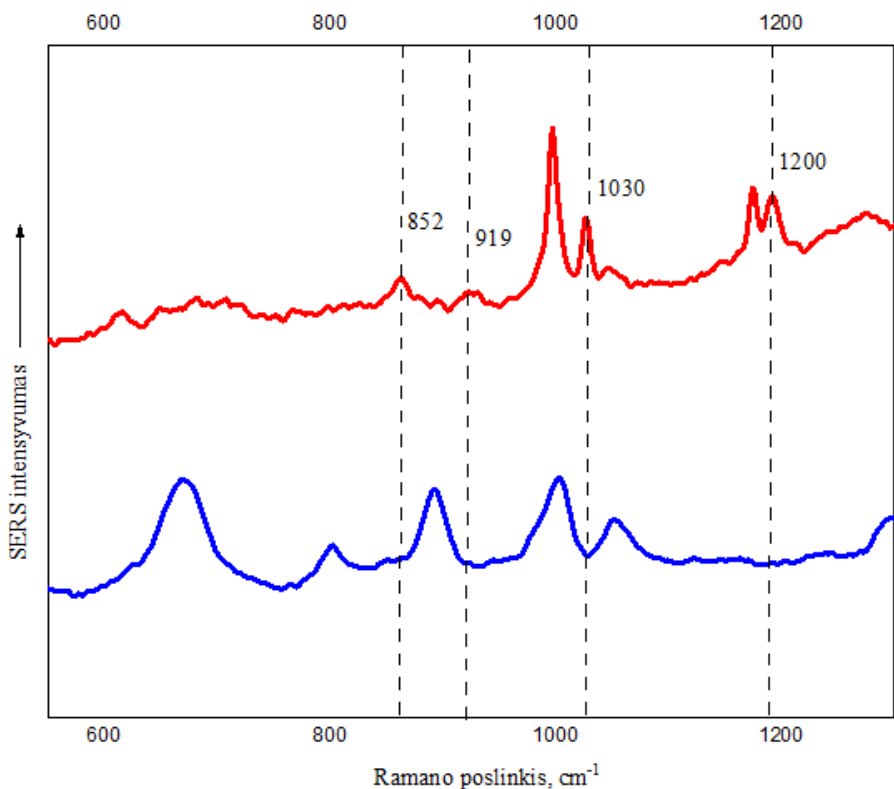
PCA analizės rezultatai pateikti 20 paveiksle. Spektrai normalizuoti, todėl didžiąją dispersijos dalį paaiškina pirmoji ir antroji pagrindinės komponentės (PC) (pirmosios ir antrosios PC dispersijos procentinė dalis yra atitinkamai 39 % ir 16 %). Reikšmingiausias cheminis pokyčius audinių mėginiuose apibrėžia pirmoji ir antroji PC, todėl pateikiamas šių dviejų PC grafikas. Kairėje ir dešinėje diagramos pusėje esantys klasteriai atitinka atitinkamai nevēžinio ir vēžinio audinio klases. Mėlynais taškais pažymėti kiekvieno nevēžinio audinio spektrai, raudonais ir oranžiniais taškais pažymėti kiekvieno navikinio (atitinkamai aukšto ir žemo piktybiškumo laipsnio) audinio mėginių spektrai. Klasės yra gerai atskirtos, tik 2 spektrai iš 49 normaliojo audinio spektrų ir 4 spektrai iš 47 navikinio audinio spektrų buvo priskirti klaidingoms klasėms, o tai atitinka 91 % jautrumą ir 96 % specifiškumą (6 lentelė).



20 pav. PCA diagrama. Mėlynais taškais pažymėti visų nevėžinio audinių mėginių spektrai, raudonais ir oranžiniais taškais pažymėti kiekvieno vėžinio (atitinkamai aukšto ir žemo piktybiškumo laipsnio) audinio spektrai. Skliausteliuose nurodyta procentinė PC dispersijos dalis.

4.5. Šlapimo pūslės nuoplovų tyrimas SERS metodu

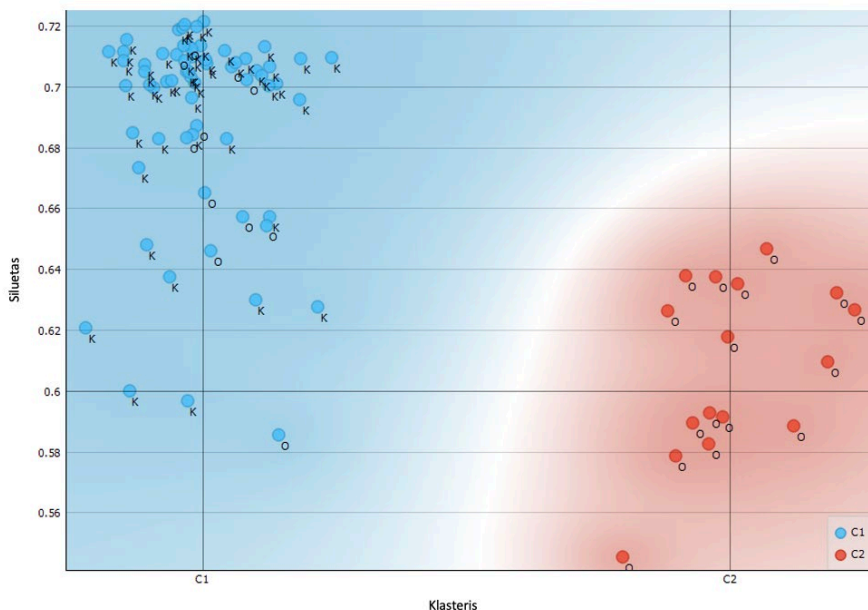
Ekspimento metu, siekiant patikrinti, ar spektriniai skirtumai nėra atsitiktiniai ir galima juos panaudoti šlapimo pūslės vėžio identifikavimui, buvo užfiksuoti 81 skirtingų pacientų šlapimo pūslės nuoplovų (27 vėžinių ir 54 nevėžinių) SERS spektrai. Šio tyrimo metu šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai buvo suvidurkinti siekiant įsitikinti, kad charakteringų žymenų pasikartojimas nėra atsitiktinis. Be to, spektrų vidurkinimas buvo taikomas siekiant padidinti signalo ir triukšmo santykį, palengvinant spektrų analizę. Tai leidžia aiškiau išskirti esminius spektrų skirtumus ir panašumus, ypač kai spektrinės juostos turi mažą intensyvumą. Spektrų vidurkiai pateikti 21 paveiksle.



21 pav. Visų tiriamųjų šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų vidurkiai. Šlapimo pūslės vėžiu sergančių tiriamųjų spektrinė juosta pažymėta raudona spalva, sveikų pacientų – mėlyna spalva.

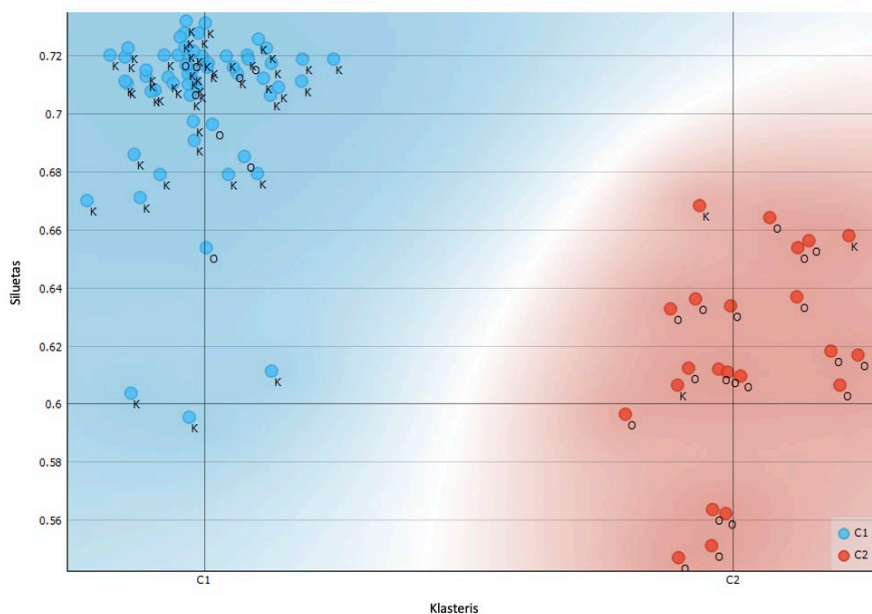
Šio tyrimo metu užregistruotų vėžinių ir nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektruose nustatyti keturi reikšmingiausi skirtumai, kai spektrinės juostos buvo nestebimos nevėžiniuose, bet stebimos vėžiniuose šlapimo pūslės nuoplovų spektruose. Skirtumai buvo stebimi visuose bandiniuose, kurie buvo paruošti iš vėžinių ir nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų. Visų pirma, vėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektruose matoma intensyvi spektrinė juosta ties 852 cm^{-1} , kurios nebuvo stebima sveikų pacientų spektruose. Dar viena intensyvi spektrinė juosta vėžinių pacientų spektruose buvo stebima ties 919 cm^{-1} , kurios sveikų pacientų spektruose nėra, ar yra nedidelio intensyvumo. Taip pat vėžinių audinių spektruose stebimos intensyvios ar vidutinio intensyvumo juostos ties 1200 cm^{-1} ir 1030 cm^{-1} , kurių nebuvo matoma sveikų pacientų spektruose.

Metodo tikslumas diagnozuoti vėžinius atvejus buvo nustatytas atlikus statistinės analizės metodą – K-vidurkių analizę, naudojant kompiuterinę programą Quasar. K-vidurkių analizė atlikta pasirinkus atvejį, kur duomenys yra skirstomi į 2 (vėžinis, nevėžinis) klasterius ir yra pavaizduota 22 paveiksle. Klaidingai suklasifikuoti buvo 11 spektrų (11 vėžinių, 0 nevėžinių). Tai aiškiai rodo, jog vėžiniuose ir nevėžiniuose SERS spektruose spektrinės juostos pasikartoja, leidžiant klasifikuoti spektrus ir palengvinti tolimesnę analizę. Šio analizės metodo specifiškumas yra 100 % (95 % PI 93 – 100 %), o jautrumas siekia 59 % (95 % PI 38 – 77 %).

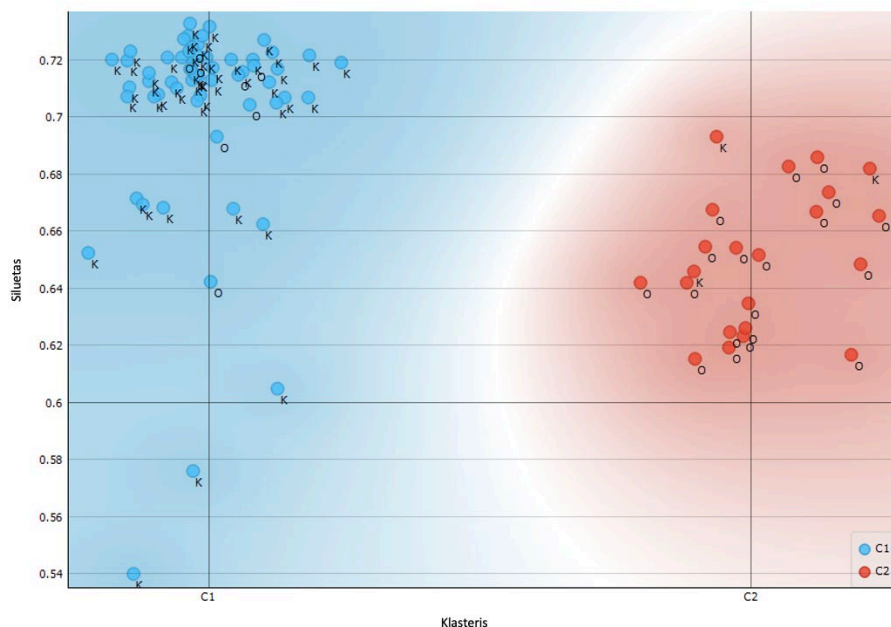


22 pav. Šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų K-vidurkių analizės rezultatai, intervale 0 – 4000 cm^{-1} . (O – vėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai; K – nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai)

Analizuojant spektrus ir remiantis identifikuotais spektriniais skirtumais, buvo atlikta K-vidurkių analizė, kuriai pasirinkti skirtingi spektrų intervalai. Atitinkamos K-vidurkių analizės rezultatai pateikti 23-24 paveiksluose.



23 pav. Šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų K-vidurkių analizės rezultatai, intervale 450 – 1300 cm^{-1} . (O – vėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai; K – nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai)



24 pav. Šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų K-vidurkių analizės rezultatai, intervale 900 – 1200 cm^{-1} . (O – vėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai; K – nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai)

Sumažinus intervalą iki 450 – 1300 cm⁻¹, buvo neteisingai priskirti 11 spektrų (3 nevėžiniai, 8 vėžiniai), o intervale 900 – 1200 cm⁻¹ – 10 spektrų (3 nevėžiniai, 7 vėžiniai). Abiem atvejais buvo apskaičiuotas analizės metodo specifiškumas ir jautrumas, siekiant palyginti, kaip skiriasi duomenų klasifikavimas, pasirenkant specifinį duomenų diapazoną. Sumažinus intervalą iki 450 – 1300 cm⁻¹ specifiškumas sumažėjo iki 94 % (95 % PI 84 – 98 %), tačiau jautrumas padidėjo iki 70 % (95 % PI 49 – 86 %). Dar labiau sumažinus intervalą iki 900 – 1200 cm⁻¹ specifiškumas nepakito ir išliko 94 % (95 % PI 85 – 99 %), o jautrumas padidėjo iki 74 % (95% PI 53 – 89 %). Apibendrintas K-vidurkių analizės visuose tirtuose spektriniuose intervaluose reikšmės nurodytos 7 lentelėje.

7 lentelė. Apibendrintos šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų K-vidurkių analizės įvairiuose spektriniuose intervaluose rezultatų jautrumo, specifiškumo, teigiamosios prognostinės vertės (TPV) ir neigiamosios prognostinės vertės (NPV) vertės.

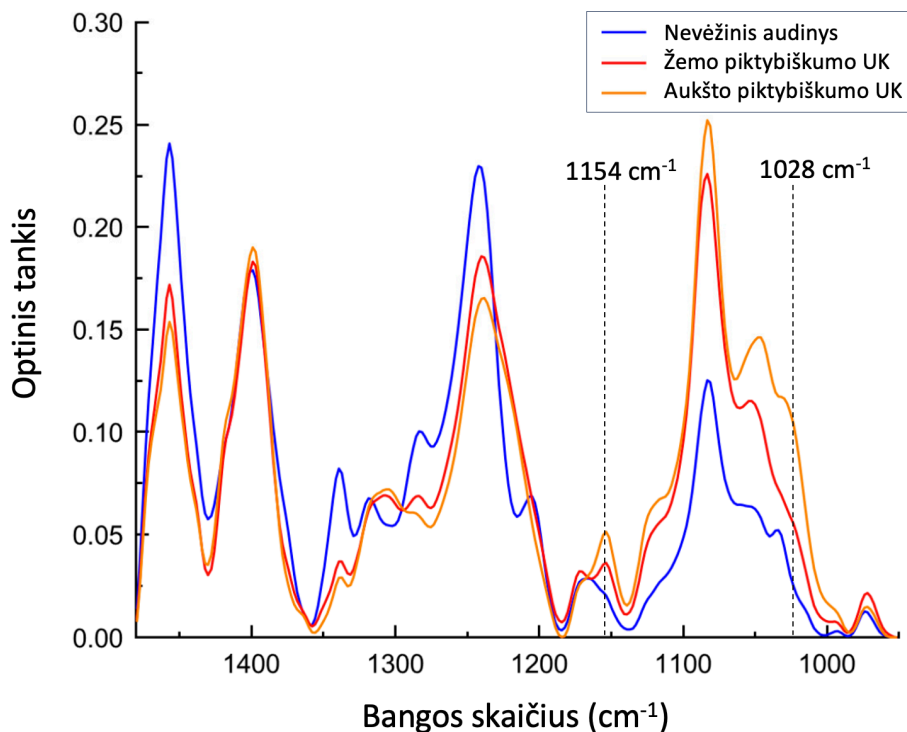
	Intervalas					
	0 – 4000 cm ⁻¹		450 – 1300 cm ⁻¹		900 – 1200 cm ⁻¹	
	Rezultatas	95 % PI	Rezultatas	95 % PI	Rezultatas	95 % PI
Jautrumas	59 %	38 – 77 %	70 %	49 – 86 %	74 %	53 – 89 %
Specifiškumas	100 %	93 – 100 %	94 %	84 – 98 %	94 %	85 – 99 %
TPV	100 %	79 – 100 %	86 %	67 – 95 %	87 %	68 – 95 %
NPV	83 %	75 – 88 %	86 %	78 – 92 %	88 %	79 – 93 %

PI – pasikliautinis intervalas

4.6. Šlapimo pūslės vėžio piktybiškumo vertinimas spektroskopiniais metodais

Pirmojoje tyrimo dalyje, kai buvo atlikti SERS spektroskopiniai bandymai su šlapimo pūslės audiniu dėl mažos pacientų imties navikiniai audiniai nebuvo išskirti pagal piktybiškumo laipsnį. Tyrimas apsiribojo metodo galimybe diferencijuoti vėžinį audinį nuo nevėžinio.

Šlapimo pūslės audinio tyrimuose IR spektroskopijos metodu pastebėta, kad urotelio karcinomos audinių spektruose stebimos didesnės optinio tankio vertės 1028 cm⁻¹ juostų ir 1154 cm⁻¹ juostų virpesiams, kurios taip vizualiai skiriasi tarp aukšto ir žemo piktybiškumo UK vidutinių spektrų (25 pav.).



25 pav. Normalaus ir šlapimo pūslės karcinomos (aukšto laipsnio naviko ir žemo laipsnio urotelio karcinomos) audinių vidutiniai ATR IR spektrai. Spektrams atlikta bazinės linijos korekcija ir vektorinis normavimas. Punktyrine linija pažymėtos didesnės optinio tankio vertės 1028 cm^{-1} juostų ir 1154 cm^{-1} juostų virpesiams

Siekiant patikrinti IR spektroskopijos galimybę diferencijuoti aukšto ir žemo piktybiškumo urotelio karcinomos audinius, buvo taikoma hierarchinė klasterinė analizė (HCA) navikinio audinio spektro pirmajai išvestinei. Ši analizė atliekama spektrinį diapazoną nuo 950 iki 1183 cm^{-1} , kuris apima spektrines juostas 1028 cm^{-1} ir 1154 cm^{-1} , kurios vizualiai išsiskyrė vertinant vidutinius spektrus. Dauguma aukšto laipsnio navikų spektrų (29 iš 34) sudarė vieną klasterį kartu su 7 spektrais (iš 13) iš žemo laipsnio navikų. Kitame klasteryje 6 spektrai iš žemo laipsnio navikų buvo sugrupuoti su 5 spektrais iš aukšto laipsnio navikų. Apibendrinant šiuos rezultatus, galima daryti išvadą, kad aukšto laipsnio navikus galima nustatyti 85 % tikslumu, o žemo laipsnio navikus - tik 46 % tikslumu. Apibendrinti šlapimo pūslės vėžinio audinio diferencijavimo pagal piktybiškumo laipsnį HCA analizės rezultatai pateikti 8 lentelėje.

8 lentelė. Apibendrintos šlapimo pūslės vėžinio audinio diferencijavimo FTIR spektroskopijos būdu pagal piktybiškumo laipsnį hierarchinės klasterių analizės (HCA) rezultatų jautrumo, specifiškumo, teigiamosios prognostinės vertės (TPV) ir neigiamosios prognostinės vertės (NPV) vertės.

	Urotelio karcinomos variantas			
	APUK		ŽPUK	
	Rezultatas	95 % PI	Rezultatas	95 % PI
Jautrumas	85 %	68 – 95 %	46 %	19 – 75 %
Specifiškumas	46 %	19 – 74 %	85 %	69 – 95 %
TPV	80 %	71 – 87 %	55 %	31 – 77 %
NPV	54 %	30 – 77 %	81 %	71 – 87 %

PI – pasikliautinis intervalas

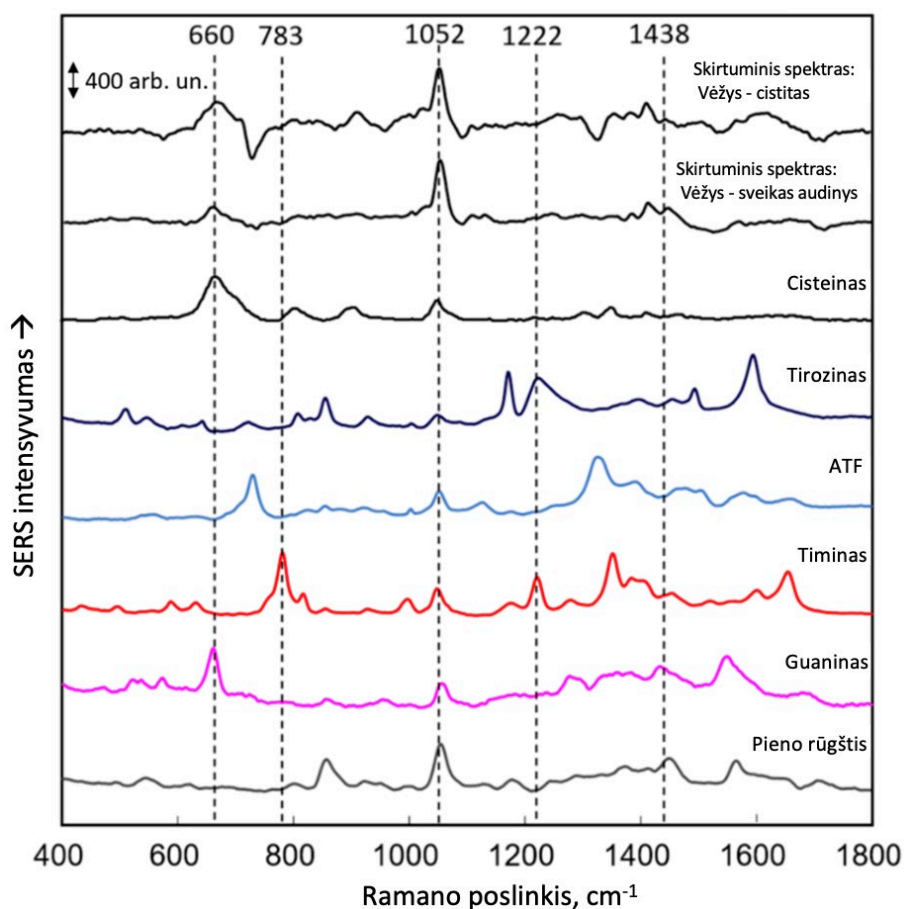
APUK – aukšto piktybiškumo urotelio karcinoma

ŽPUK – žemo piktybiškumo urotelio karcinoma

5. REZULTATŲ APTARIMAS

5.1. Spektroskopinių tyrimų nustatytų žymenų juostų analizė

Siekiant paaiškinti pastebėtus šlapimo pūslės audinių ir nuoplovų spektrų skirtumus, buvo atliktas preliminarus spektrinių juostų priskyrimas pagal literatūros duomenis. SERS spektroskopijos audinių ir tarpląstelinio skysčio tyrimo metu taip pat buvo užregistruota tirpalų su pavienėmis biomolekulėmis spektrai, kad būtų galima lengviau suprasti šlapimo pūslės vėžio tyrimo spektrinių juostų pokyčius (26 pav.).



26 pav. Skirtuminis spektras tarp šlapimo pūslės vėžinių ir sveikų šlapimo pūslės audinių tarpląstelinio skysčio. Palyginimui taip pat pateikiami skirtingų biomolekulių (1 mM) tirpalų SERS spektrai. ATF – adozin trifosfatas.

Visų pirma, SERS spektroskopijos audinių tyrimo metu statistškai reikšmingų skirtumų nebuvo stebėta, tačiau lyginant vėžinius ir sveikų

pacientų spektrus buvo pastebėtos dvi dominuojančios juostos 660 cm^{-1} ir 891 cm^{-1} (14 pav.). Pagal literatūros šaltinių duomenis ir registruotų biomolekulių tirpalų SERS spektrus, galime teigti, kad šios juostos rodo didesnę cisteino koncentraciją navikiniame šlapimo pūslės audinyje.¹²³ Taip pat biomolekulių tirpalų spektre guaninas turi ryškią juostą ties 660 cm^{-1} , tačiau kitos guanino išreikštos juostos ties 1600 cm^{-1} šlapimo pūslės vėžio spektre nestebima. Dėl šios priežasties negalime teigti, kad šlapimo pūslės vėžio spektro išreikštą 660 cm^{-1} juostą lemia didesnė guanino koncentracija.

Cisteinas yra nepakeičiamoji aminorūgštis, svarbi baltymų gamybai ir kitoms medžiagų apykaitos funkcijoms. Jo yra beta-keratino sudėtyje. Tai pagrindinis nagų, odos ir plaukų baltymas. Cisteinas svarbus kolagenui gaminti. Cisteinas, kaip daugialypis pirmtakas, atlieka pagrindinį vaidmenį ląstelių metabolizme ir prisideda prie vėžinių ląstelių išlikimo ir dauginimosi.¹²⁴

Šlapimo pūslės tarpląstelinio skysčio tyrimo SERS metodu metu vėžinių audinių spektruose buvo stebimos intensyvesnės juostos ties 1052 cm^{-1} ir 1414 cm^{-1} . Vėliau sudarytame skirtuminiame spektre tarp vėžinių ir sveikų audinių be šių juostų išryškėjo ir anksčiau minėta cisteinui būdinga 660 cm^{-1} juosta (16 pav.). Pagal atliktą biomolekulių spektrų lentelę (26 pav.) galime pastebėti, kad visos tirtos molekulės (cisteinas, tirozinas, ATF, timinas, guaninas ir pieno rūgštis) galėjo prisidėti prie vėžinio spektro juostos intensyvumo ties 1052 cm^{-1} . Vis dėlto, skirtingai nei kitų molekulių nedidelio intensyvumo ties 1052 cm^{-1} juosta, pieno rūgšties tirpalo šioje vietoje buvo didžiausio intensyvumo ir neturi ryškių intensyvumo juostų kitose srityse. Taip pat šiai zonai galėjo turėti įtakos jau minėtas cisteinas, kurio tirpalo SERS spektre 1052 cm^{-1} juosta taip pat buvo intensyvesnė. Ši juosta yra ryškiausias žymuo šio tyrimo rezultatuose ir pagal šią juostą įtraukiantį intervalą $1020\text{--}1080\text{ cm}^{-1}$ buvo atlikti tyrimo tikslumo skaičiavimai.

Pieno rūgštis vėžinėse ląstelėse kaupiasi dėl energijos gavimo būdo – glikolizės, kai gliukozė virsta galutiniu metabolitu šlapimo rūgštimi. Vėžinėms ląstelėms būdinga glikolizė kaip pirminis energijos gavimo būdas, net ir aerobinėmis sąlygomis. Šią vėžinių ląstelių savybę pirmas pastebėjo vokiečių fiziologas Otto Warburg.¹²⁵ Šis „aerobinės glikolizės“, ar kitaip vadinamo „Warburg'o efekto“ procesas yra mažiau efektyvus nei oksidacinio fosforilimo kelias.¹²⁶ Dėl šio proceso padidėja vėžinių ląstelių gliukozės poreikis lyginant su sveikų ląstelių. Be to, vėžinės ląstelės gauna energijos ir iš kitų nuo gliukozės nepriklausomų energijos gavimo kelių kaip gliutaminolizė.¹²⁷ Aerobinė glikolizė ir padidėjusi gliutaminolizė bendrai laikomos "perprogramuota energijos apykaita" - reiškiny, kuris dabar visuotinai pripažįstamas kaip pagrindinis vėžio metabolinis požymis.¹²⁸

Abiem energijos gavimo būdais kaip galutinis produktas išskiriama pieno rūgštis, todėl jos padidėjusi koncentracija vėžinėse ląstelėse, lyginant su sveikomis ir galėjo būti nustatyta mūsų tyrimo metu.

Kita šlapimo pūslės vėžio audinių tarpląstelinio skysčio SERS spektruose stebima intensyvesnė juosta ties 1414 cm^{-1} gali būti siejama didesne baltymų, lipidų, DNR ir pieno rūgšties virpesiams, bęsitęsiantiems 1414 cm^{-1} - 1448 cm^{-1} regione. Intensyvios juostos šioje spektro srityje būdingos lipidų molekulėms.¹²⁹

Lipidai atlieka ląstelės energijos kaupimo funkciją ir dalyvauja signalų perdavimo, ląstelių dauginimosi ir augimo procesuose. Kadangi nekontroliuojamo vėžinių ląstelių dalijimosi ir augimo metu sunaudojama daugiau energijos, naviko ląstelėse sutrinka lipidų apykaita.¹³⁰ Nors dauguma somatinių ląstelių lipidų gauna iš maisto šaltinių arba iš kepenų sintetinamų lipidų, įvairios vėžio ląstelės atlieka de novo lipogenezę, todėl jos tampa labiau nepriklausomos nuo iš išorės gaunamų lipidų.¹³¹ Dėl pakitusios šių molekulių apykaitos lipidų koncentracija sveikose ir vėžinėse ląstelėse gali skirtis.

9 lentelė. Šlapimo pūslės vėžio SERS žymenų juostos remiantis audinių ir tarpląstelinio skysčio mėginių analize.

Bangos skaičius, cm^{-1}	Molekulių grupė
660	cisteinas
1052	Pieno r., cisteinas
1414/1448	Lipidai, baltymai, nukleorūgštys

Aiškinamoji ryškiausiai besiskiriančių spektrinių juostų analizė pagal literatūros duomenis atlikta ir IR spektroskopijos tyrime. Šlapimo pūslės vėžio audinių tyrimuose FTIR spektroskopijos metodu vidutinis normalios šlapimo pūslės audinio spektras pasižymėjo ryškesnėmis 1033 cm^{-1} , 1206 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} , 1282 cm^{-1} , 1317 cm^{-1} ir 1339 cm^{-1} spektrinėmis juostomis, kurias pagal literatūros šaltinius galime priskirti kolagenui (18 pav.).^{132,133} Šios spektrinės juostos rodo didesnę kolageno kiekį normalios šlapimo pūslės audinyje nei navikiniame.

Kolagenas yra viena iš šlapimo pūslės pogleivio sudedamųjų dalių ir užtikrina tempimo stiprumą, perduodamas šlapimo pūslės lygiųjų raumenų ląstelių įtampą organui plečiantis ir kaupiant šlapimą.¹³⁴ Sumažėjęs kolageno kiekis navikiniame šlapimo pūslės audinyje gali būti susijęs su padidėjusia fermentų kolagenazės sekrecija į audinių tarpląstelinį skystį ir šeimininko audinių destrukcija.⁶²

Navikinio šlapimo pūslės audinio spektrai rodo ryškesnes spektrines juostas ties 972 cm^{-1} , kurias galima priskirti nukleino rūgščių virpesiams. Panašiose padėtyse esančias spektrines juostas galima priskirti ir kai kurių baltymų ir polisacharidų grupių molekulių virpesiams, tačiau didėjant 972 cm^{-1} spektrinės juostos optinio tankio vertėms, ryškėja ir 1082 cm^{-1} vėžinio audinio spektrinė juosta, kuri priskiriama nukleino rūgščių virpesiams (18 pav.). Dėl šios priežasties galime teigti, kad šie pakitimai spektruose susiję su padidėjusia nukleino rūgščių kiekiu urotelio karcinomos audinyje.¹³²

Nukleorūgštys yra dvių pagrindinių klasių: deoksiribonukleorūgštis (DNR) ir ribonukleorūgštis (RNR). Yra žinoma, kad genetinės DNR mutacijos vaidina pagrindinį vaidmenį vėžio vystymuisi.¹³⁵ RNR yra svarbi genų raiškai, dalyvaujant transkripcijoje (DNR segmento kopijavime į RNR procesas), translacijoje (procesas, kurio metu informacija, užkoduota pasiuntinių RNR (mRNA), nukreipia aminorūgščių pridėjimą baltymų sintezės metu) ir ją reguliuojant. Tyrimų duomenimis nustatyta, kad navikinio RNR apykaita yra pakitusi ir turi įtakos navikų augimui ir progresavimui.¹³⁶ Taip pat yra nustatyta su naviku susijusių genų hiperekspresija navikiniame audinyje, didesnė cirkuliuojančių nukleino rūgščių koncentracija vėžiu sergančių pacientų kraujyje.¹³⁷ Vėžinėms ląstelėms būdingi didesni branduoliai, lyginant su sveikomis ląstelėmis, o ląstelių branduoliuose nustatoma didžiausia nukleorūgščių koncentracija.¹³⁸

Dar dvi IR spektroskopijos šlapimo pūslės vėžio audinio tyrime didesnės optinio tankio vertės pastebėtos ties 1028 cm^{-1} ir 1154 cm^{-1} gali būti priskiriamos glikogeno virpesiams (18 pav.). Glikogenui priskiriamų spektrinių juostų padidėjusios optinio tankio vertės yra susijusios su padidėjusiu glikogeno kiekiu vėžiniuose šlapimo pūslės audiniuose. Padidėjęs glikogeno kiekis pastebimas kai kurių tipų navikuose ir naudojamas kaip energijos šaltinis ląstelėms daugintis.^{60,139} Be to, didesnis glikogeno kiekis stebimas žemo laipsnio urotelio karcinomos audiniuose, palyginti su aukšto laipsnio naviko audiniais. Pastebėta atvirkštinė glikogeno kiekio ir naviko piktybiškumo laipsnio priklausomybė gali būti susijusi su didesniu aukšto laipsnio navikų proliferacijos greičiu. Kai kurių tipų navikuose stebimas atvirkštinis glikogeno kiekio ir proliferacijos greičio santykis, kuris gali būti susijęs su didesniu glikogeno suvartojimu naviko augimui palaikyti.⁶⁰

10 lentelė. Šlapimo pūslės vėžio IR spektroskopijos žymenų juostos remiantis audinių mėginių analize.

Bangos skaičius, cm^{-1}	Molekulių grupė
1033, 1206, 1240, 1282, 1317, 1339	Kolagenas
972, 1082	Nukleorūgštys
1028, 1154	Glikogenas

Šlapimo pūslės nuoplovų tyrimo SERS metodu pagrindiniai skirtumai buvo nustatyti ties 852 cm^{-1} , 919 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} ir 1200 cm^{-1} spektrinėmis juostomis. Remiantis literatūros šaltiniais atliktas spektrinių juostų, stebimų SERS šlapimo pūslės nuoplovu tyrime priskyrimas, kuris yra pateikiamas 11 lentelėje.

Pastebėta, kad vėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektruose matoma intensyvi spektrinė juosta ties 852 cm^{-1} , bet nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektruose ji nėra stebima. Ši spektrinė juosta gali būti siejama su tirozinu ir jo virpesiais.^{87,140}

Tirozinas arba 4-hidroksifenilalaninas yra viena iš 20 standartinių aminorūgščių, kurias ląstelės naudoja baltymams sintetinti. Tirozinas yra ne tik proteogeninė aminorūgštis, bet ir ypatinga aminorūgštis dėl fenolinės funkcijos. Jis aptinkamas baltymuose, kurie yra signalų perdavimo procesų dalis, ir veikia kaip fosfatinių grupių, kurios perduodamos baltymų kinazių pagalba, priėmėjas. Vienas tokių baltymų yra tirozinkinazė. Tirozinkinazės signalų keliai paprastai užkerta kelią iškreiptai proliferacijai arba prisideda prie jautrumo apoptoziniams dirgikliams. Šie signaliniai keliai vėžinėse ląstelėse dažnai genetiškai arba epigenetiniu būdu pakeičiami, kad vėžinėms ląstelėms būtų suteiktas atrankos pranašumas ir tirozinkinazės būtų nekontroliuojamai aktyvios. Tai lemia nekontroliuojamą vėžio proliferaciją.¹⁴¹

Kitas spektrinis skirtumas buvo stebimas ties 919 cm^{-1} spektrinė juosta, kuri buvo intensyvesnė vėžinių nuoplovų spektruose. Šis skirtumas literatūros duomenimis gali būti siejamas su didesne tam tikrų baltymų ir glikogeno koncentracija vėžiniame audinyje.^{142,143}

Trečias ir ketvirtas pastebėti skirtumai tarp intensyvumų spektrinių juostų ties 1030 cm^{-1} ir 1200 cm^{-1} gali būti susiję su fenilalanino virpesiniais.^{87,143} Šlapimo pūslės vėžio nuoplovų spektruose išryškėjo nedidelio intensyvumo spektrinė juosta, o nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų spektruose šios juostos nestebimos.

Fenilalaninas yra nepakeičiama α -amino rūgštis. L-fenilalaninas biologiškai paverčiamas į L-tiroziną – anksčiau aprašytą pakeičiamąją aminorūgštį.¹⁴⁴

11 lentelė. Šlapimo pūslės vėžio SERS spektroskopijos žymenų juostos remiantis šlapimo pūslės nuoplovų mėginių analize.

Bangos skaičius, cm ⁻¹	Molekulių grupė
852	Tirozinas
919	Baltymai, glikogenas
1030, 1200	Fenilalaninas

5.2. Spektroskopinių metodų rezultatų palyginimas

Šlapimo pūslės vėžio audinio tyrimai buvo atlikti ir gauti reikšmingi rezultatai dviem metodais – SERS spektroskopijos tarpląstelinio skysčio mėginiais ir IR spektroskopijos audinių mėginiais. Apžvelgiant metodus tarpusavyje, galime matyti, kad IR spektroskopija parodė geresnius jautrumo, TPV ir NPV rezultatus, tačiau SERS spektroskopijos metodas parodė aukštesnį specifškumo rezultatą. Metodų tikslumo rezultatai sugretinti ir pateikti 12 lentelėje. Rezultatai tik apžvalginiai, nes FTIR tyrimo metu buvo ištirta beveik dvigubai daugiau mėginių.

12 lentelė. Šlapimo pūslės vėžio tarpląstelinio skysčio tyrimo SERS spektroskopijos ir šlapimo pūslės vėžio audinio tyrimo FTIR metodu tikslumo rezultatų palyginimas.

	Metodas			
	SERS		FTIR	
	Rezultatas	95 % PI	Rezultatas	95 % PI
Jautrumas	85 %	64 – 95 %	91 %	80 – 98 %
Specifiškumas	97 %	84 – 100 %	96 %	86 – 100 %
TPV	95 %	75 – 99 %	96 %	85 – 99 %
NPV	89 %	77 – 95 %	92 %	87 – 98 %

(SERS – angl. Surface Enhanced Raman Spectroscopy; FTIR – angl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy).

Šiuo metu plačiausiai taikomas endoskopinis metodas šlapimo pūslės vėžiui diagnozuoti yra baltos šviesos cistoskopija, kurio jautrumas 71 % (95 % PI, 49-93 %), o specifškumas - 72 % (95 % PI, 47-96 %).³⁸ PDD metodas parodė geresnius jautrumo rodiklius – 92 % (95 % PI, 80-100 %), tačiau žemesnį specifškumą – 57 % (95 % PI, 36-79 %).³⁸ Dar vienas naujos kartos endoskopinis metodas, NBI, pasižymi dideliu jautrumu – 96 % (95 % PI = 93-98 %), tačiau, kaip ir PDD, žemu specifškumu - 65 % (95 % PI = 54-75 %).³⁸

Mūsų tyrimas parodė daug žadančius rezultatus, leidžiančius atskirti nevėžinį ir vėžinį šlapimo pūslės audinį *ex vivo* sąlygomis, kurie artimi auksiniam standartui – histologinei analizei. Šviesolaidinė IR spektroskopija tiriant šlapimo pūslės audinius ir SERS spektroskopija tarpląsteliniam šlapimo

pūslės audinio skysčiui parodė panašius jautrumo rezultatus, kaip ir literatūroje pateikiami PDD ir NBI rezultatai, nesumažindama specifiskumo. Spektroskopinių tyrimų integravimas į endoskopinę šlapimo pūslės vėžio diagnostiką galėtų patobulinti šiuo metu naudojamus diagnostinius įrankius. Be to, dėl didelio tyrimo specifiskumo galėtų sumažėti perteklinių rezekcijų skaičius, kas lemtų mažesnę komplikacijų riziką ir mažesnę skaičių patologinių tyrimų, reikalingų stebint pacientą, o tai sumažintų ekonominę našą.

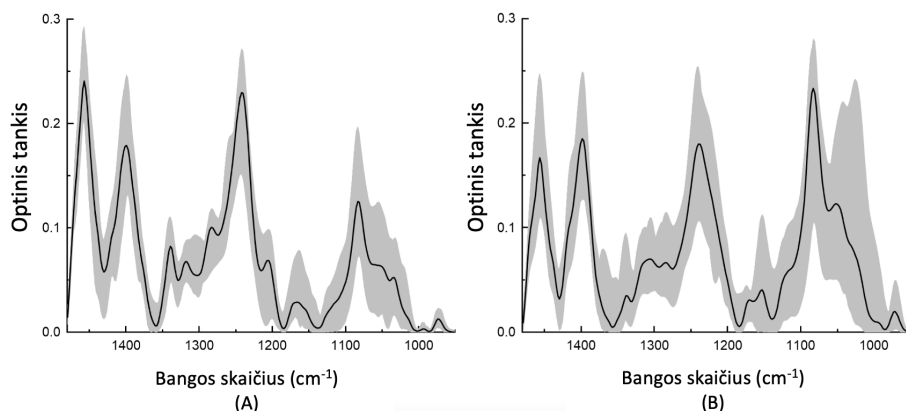
Šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektroskopijos tyrimo dalyje tyrimo tikslumas buvo vertintas keliuose spektriniuose intervaluose, kol galiausiai sumažinus tiriamąjį spektrų intervalą iki $900 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ gauti tokie tyrimo rezultatai: jautrumas 74 % (95 % PI, 53 – 89 %), specifiskumas 94 % (95 % PI, 85 – 99 %). Šiuo metu plačiausiai klinikinėje praktikoje naudojamas šlapimo pūslės nuoplovų tyrimas pasižymi dideliu jautrumu aukšto piktybiškumo urotelio karcinomai (84 %), tačiau yra žemo piktybiškumo ligai jautrumas siekia tik 16 %. Tyrimo specifiskumas siekia 95-100 %.³⁹ Mūsų tyrime gauti rezultatai nenusileidžia citologinio tyrimo specifiskumo rodikliams, bei beveik siekia citologinio tyrimo jautrumo rezultatus diagnozuojant aukšto piktybiškumo urotelio karcinomą. Be to, tyrimų duomenimis nustatyta, kad citologinio tyrimo rezultatams įtakos gali turėti specialisto patirtis.¹⁴⁵ Standartizavus SERS spektroskopijos metu stebimus skirtumus tarp sveikų pacientų ir šlapimo pūslės vėžiu sergančių pacientų šlapimo pūslės nuoplovų ir pritaikius SERS spektroskopijos tyrimą klinicinei praktikai, būtų galima išvengti šio žmogaus faktoriaus sukkelto trūkumo.

5.3. Veiksniai, galėję įtakoti tyrimo rezultatus

Šio tyrimo rezultatams įtakos galėjo turėti galimi tyrimo trūkumai. Visų pirma, mums nepavyko iš kiekvieno paciento gauti ir vėžinių, ir normalių šlapimo pūslės audinių mėginių. Operacijos buvo atliekamos pacientams, kuriems buvo įtariami piktybiniai šlapimo pūslės navikai. Chirurgas makroskopiškai įvertino rezekuotą audinį, vėliau patologiškai atrodantis audinys buvo laikytas navikiniu ir spektroskopinei analizei paimtas rezekuoto navikinio audinio mėginys, likęs navikinis rezekuotas audinys nusiųstas įprastiniam patologiniam tyrimui. Atlikus pataloginį tyrimą, dalis navikinių audinių buvo ekskliuduoti, nenustačius vėžinio audinio mėginyje. Daliai pacientu buvo stebima pakitusi šlapimo pūslė visame plote, be sveikos gleivinės endoskopinių požymių ir mums nepavyko gauti nevėžinės šlapimo pūslės audinio mėginių.

Antra, nepaisant pastebėtų žemo ir aukšto laipsnio navikų vidutinių spektrų skirtumų IR spektroskopijos tyrimo dalyje, žemo ir aukšto laipsnio vėžinių audinių spektriniai profiliai turi panašių bruožų, todėl jų negalima išskirti į atskiras grupes. Tai galima paaiškinti skirtingu į tyrimą įtrauktų žemo ir aukšto laipsnio navikų atvejų skaičiumi. Aukšto laipsnio navikų atvejų skaičius yra daug didesnis nei žemo laipsnio navikų atvejų (atitinkamai 34 ir 13 atvejų), todėl išsamesnėms išvadoms padaryti būtų naudinga didesnė žemo laipsnio navikų atvejų apimtis.

Trečia, didesni vėžinių audinių spektro klasės skirtumai, palyginti su normalių audinių spektro klase, gali būti susiję su skirtinga vėžinių ląstelių diferenciacija. Vystantis navikui, ląstelės praranda savo funkcijas ir pakeičia morfologines savybes. Taigi, priklausomai nuo naviko savybių ir vystymosi, atskirais atvejais gali skirtis konkrečių komponentų kiekių variacijos. Tuo tarpu normalių audinių spektro klasės svyravimai yra mažesni, palyginti su navikinių audinių klase (27 pav.). Taigi, spektrinius skirtumus gali lemti individualūs audinių sandaros skirtumai.



27 pav. Vidutiniai spektrai (juoda ištisinė linija) ir iš skirtingų pacientų paimtų normalaus (A) ir vėžinio urotelio karcinomos (B) audinių spektrų variacijos (pilkas plotas). Paveiksle spektrų variacijos hipotezei paaiškinti pateiktas pavyzdys iš IR spektroskopijos tyrimo dalies.

Ketvirta, spektroskopinės analizės netikslumus galėjo lemti biologinės medžiagos degradacija transportuojant ją iš audinio paėmimo vietos į analizavimo laboratoriją. Šiame tyrime audiniai buvo transportuojami tą pačią dieną po atliktos šlapimo pūslės operacijos į spektroskopinės analizės laboratoriją. Transportuojant nebuvo naudota specifinė audinių fiksuojančios medžiagos, tik 0,9 % natrio chlorido tirpalas, kuris naudojamas ir endoskopinių šlapimo pūslės operacijų metu. Nors spektroskopinė analizė

buvo atlikta tą pačią dieną, galima tikėtis, kad tam tikro lygio biologinė audinių degradacija įvyko, o tai gali lemti tyrimo rezultatų netikslumus.

Penkta, SERS spektroskopijos metu tų pačių pacientų audinių ir audinių tarpląstelinio skysčio tyrimuose gauti skirtingi rezultatai. Tai yra, audinių tyrimuose reikšmingų skirtumų tarp šlapimo pūslės sveikų ir vėžinių audinių nebuvo stebėta. Tuo tarpu, tarpląstelinio audinio tyrimuose nustatyčios aiškios juostos, pagal kurias galima diferencijuoti sveikus ir vėžinius audinius 85 % jautrumu ir 97 % specifiškumu. Tokių tyrimų sėkmės skirtumą galima paaiškinti skirtinga tarpląstelinio skysčio ir audinio molekuline struktūra. Tarpląstelinį skystį sudaro šios pagrindinės baltyminės molekulės: kolagenas, elastinas, fibronektinas, lamininas, tenascinas, augimo faktoriai.¹⁴⁶ Tuo tarpu audinių preparatuose molekulinę struktūrą sudaro ne tik tarpląstelinis skystis, bet ir ląstelės, kuriuose nustatomos šios pagrindinės molekulės: glikogenas, lipidai (fosfolipidai, triacilglicerolis ir kt.), nukleorūgštys (DNR,RNR), įvairūs baltymai ir amino rūgštys.¹⁴⁷ Taigi, skirtinga molekulinė audinių ir tarpląstelinio audinių skysčio struktūra galėjo lemti skirtingus rezultatus.

IŠVADOS

1. SERS spektroskopija *ex vivo* sąlygomis gali diferencijuoti šlapimo pūslės vėžio ir sveikos šlapimo pūslės audinių tarpląstelinio skysčio mėginius. Spektrinių juostų, esančių ties 1052 cm^{-1} ir ties 660 cm^{-1} , intensyvumas yra didesnis vėžinių audinių tarpląstelinio skysčio SERS spektruose, lyginant su sveikos gleivinės. Spektrinės juostos esančios ties 1052 cm^{-1} siejamos su pieno rūgštimi ir cisteinu, o juostos ties 660 cm^{-1} – su cisteinu. Šviesolaidžio pagrindu veikianti IR spektroskopija *ex vivo* sąlygomis gali diferencijuoti šlapimo pūslės vėžio ir nevėžinius šlapimo pūslės audinius. Spektrinės juostos, esančios ties 1033 , 1206 , 1240 , 1282 , 1317 , 1339 cm^{-1} – intensyvesnės nevėžinio šlapimo pūslės audinio spektruose ir siejamos su kolagenu, 972 , 1082 cm^{-1} – intensyvesnės vėžinio audinio spektruose ir siejamos nukleorūgštimis, 1028 , 1154 cm^{-1} – intensyvesnės vėžinio audinio spektruose ir siejamos su glikogenu.
2. SERS spektroskopijos metodas gali diferencijuoti šlapimo pūslės nuoplovas tarp sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu ir sveikų pacientų tokiu tikslumu, kuris nenusileidžia šiuo metu plačiausiai naudojamam klinikinėje praktikoje citologiniam tyrimui.
3. SERS spektroskopija *ex vivo* sąlygomis gali diferencijuoti šlapimo pūslės vėžio ir sveikos šlapimo pūslės audinių tarpląstelinio skysčio mėginius 85 % jautrumu ir 97 % specifiškumu. Tuo tarpu, IR spektroskopija *ex vivo* sąlygomis gali diferencijuoti šlapimo pūslės vėžio ir nevėžinius šlapimo pūslės audinius 91 % jautrumu ir 98 % specifiškumu.
4. Diferencijuojant aukšto ir žemo laipsnio piktybiškumo urotelio karcinomos mėginius IR spektroskopijos metodu spektrinėse juostose nustatyti skirtumai, tačiau jautrumo ir specifiškumo rezultatai buvo reikšmingai prastesni, lyginant su histologinio tyrimo rezultatais. Tyrimo jautrumas nustatant APUK – 85 %, specifiškumas – 46 %, tuo tarpu nustatant ŽPUK jautrumas – 46 %, specifiškumas – 85 %.
Tiriant audinius SERS metodu, skirtumų tarp aukšto ir žemo laipsnio piktybiškumo urotelio karcinomos mėginių nebuvo nustatyta.

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

1. Paviršiaus sustiprinta Ramano sklaidos spektroskopija (SERS) gali būti naudojama šlapimo pūslės nuoplovų tyrimui, diferencijuojant sergančiuosius šlapimo pūslės vėžiu ir sveikus pacientus.
2. IR spektroskopijos metodas dėl savo šviesolaidinio elemento, galėtų būti toliau tiriamas *in vivo* sąlygomis, integravus jį į šiuo metu naudojamą endoskopinę techniką šlapimo pūslės vėžiui nustatyti, siekiant nustatyti metodo vertę klinikinėje praktikoje.
3. Virpesinės spektroskopijos metodai, integravus juos į klinikinę praktiką, galėtų būti naudojami skubiai šlapimo pūslės vėžio diagnostikai. Tai galėtų būti papildomas, automatizuotas įrankis, naudojamas kartu su šiuo metu turimais endoskopinės diagnostikos metodais.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020 QUESTIONS AND ANSWERS (Q&A) – IARC. Accessed August 7, 2023. <https://www.iarc.who.int/faq/latest-global-cancer-data-2020-qa/>
2. Wong MCS, Fung FDH, Leung C, Cheung WWL, Goggins WB, Ng CF. The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. *Sci Rep.* 2018;8(1):1129. doi:10.1038/s41598-018-19199-z
3. Lenis AT, Lec PM, Chamie K, Mshs MD. Bladder Cancer: A Review. *JAMA.* 2020;324(19):1980-1991. doi:10.1001/jama.2020.17598
4. Compérat E, Larré S, Roupret M, et al. Clinicopathological characteristics of urothelial bladder cancer in patients less than 40 years old. *Virchows Arch Int J Pathol.* 2015;466(5):589-594. doi:10.1007/s00428-015-1739-2
5. Josephson D, Pasin E, Stein JP. Superficial bladder cancer: part 2. Management. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2007;7(4):567-581. doi:10.1586/14737140.7.4.567
6. Treatment of muscle-invasive bladder cancer: Expert Review of Anticancer Therapy: Vol 7, No 9. Accessed August 7, 2023. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/14737140.7.9.1279>
7. Sylvester RJ, van der Meijden APM, Oosterlinck W, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol.* 2006;49(3):466-465; discussion 475-477. doi:10.1016/j.eururo.2005.12.031
8. Daneshmand S, Bazargani ST, Bivalacqua TJ, et al. Blue light cystoscopy for the diagnosis of bladder cancer: Results from the US prospective multicenter registry. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2018;36(8):361.e1-361.e6. doi:10.1016/j.urolonc.2018.04.013
9. Grossman HB, Soloway M, Messing E, et al. Surveillance for Recurrent Bladder Cancer Using a Point-of-Care Proteomic Assay. *JAMA.* 2006;295(3):299-305. doi:10.1001/jama.295.3.299

10. Kim LHC, Patel MI. Transurethral resection of bladder tumour (TURBT). *Transl Androl Urol.* 2020;9(6):3056-3072. doi:10.21037/tau.2019.09.38
11. Nagaya T, Nakamura YA, Choyke PL, Kobayashi H. Fluorescence-Guided Surgery. *Front Oncol.* 2017;7:314. doi:10.3389/fonc.2017.00314
12. Cui S, Zhang S, Yue S. Raman Spectroscopy and Imaging for Cancer Diagnosis. *J Healthc Eng.* 2018;2018:e8619342. doi:10.1155/2018/8619342
13. Characterization of a Raman spectroscopy probe system for intraoperative brain tissue classification. Accessed August 7, 2023. <https://opg.optica.org/boe/fulltext.cfm?uri=boe-6-7-2380&id=320157>
14. Al-Muslet NA, Ali EE. Spectroscopic analysis of bladder cancer tissues using Fourier transform infrared spectroscopy. *J Appl Spectrosc.* 2012;79(1):139-142. doi:10.1007/s10812-012-9575-5
15. Witzke KE, Großerueschkamp F, Jütte H, et al. Integrated Fourier Transform Infrared Imaging and Proteomics for Identification of a Candidate Histochemical Biomarker in Bladder Cancer. *Am J Pathol.* 2019;189(3):619-631. doi:10.1016/j.ajpath.2018.11.018
16. Gok S, Aydin OZ, Sural YS, Zorlu F, Bayol U, Severcan F. Bladder cancer diagnosis from bladder wash by Fourier transform infrared spectroscopy as a novel test for tumor recurrence. *J Biophotonics.* 2016;9(9):967-975. doi:10.1002/jbio.201500322
17. Lobo N, Shariat SF, Guo CC, et al. What Is the Significance of Variant Histology in Urothelial Carcinoma? *Eur Urol Focus.* 2020;6(4):653-663. doi:10.1016/j.euf.2019.09.003
18. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer.* 2021;149(4):778-789. doi:10.1002/ijc.33588
19. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
20. Jubber I, Ong S, Bukavina L, et al. Epidemiology of Bladder Cancer in 2023: A Systematic Review of Risk Factors. *Eur Urol.* 2023;84(2):176-190. doi:10.1016/j.eururo.2023.03.029

21. Mossanen M, Nassar AH, Stokes SM, et al. Incidence of Germline Variants in Familial Bladder Cancer and Among Patients With Cancer Predisposition Syndromes. *Clin Genitourin Cancer*. 2022;20(6):568-574. doi:10.1016/j.clgc.2022.08.009
22. Vosoughi A, Zhang T, Shohdy KS, et al. Common germline-somatic variant interactions in advanced urothelial cancer. *Nat Commun*. 2020;11(1):6195. doi:10.1038/s41467-020-19971-8
23. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association Between Smoking and Risk of Bladder Cancer Among Men and Women. *JAMA*. 2011;306(7):737-745. doi:10.1001/jama.2011.1142
24. Jacob L, Freyn M, Kalder M, Dinas K, Kostev K. Impact of tobacco smoking on the risk of developing 25 different cancers in the UK: a retrospective study of 422,010 patients followed for up to 30 years. *Oncotarget*. 2018;9(25):17420-17429. doi:10.18632/oncotarget.24724
25. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*. 2016;70(1):106-119. doi:10.1016/j.eururo.2016.02.028
26. Linn JF, Sesterhenn I, Mostofi FK, Schoenberg M. The molecular characteristics of bladder cancer in young patients. *J Urol*. 1998;159(5):1493-1496. doi:10.1097/00005392-199805000-00022
27. Babjuk M, Burger M, Capoun O, et al. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1, and Carcinoma in Situ). *Eur Urol*. 2022;81(1):75-94. doi:10.1016/j.eururo.2021.08.010
28. Dahm P, Gschwend JE. Malignant Non-Urothelial Neoplasms of the Urinary Bladder: A Review. *Eur Urol*. 2003;44(6):672-681. doi:10.1016/S0302-2838(03)00416-0
29. Helpap B. Nonepithelial neoplasms of the urinary bladder. *Virchows Arch*. 2001;439(4):497-503. doi:10.1007/s004280100479
30. Aragon-Ching JB, Wang H. Contemporary treatment and survival differences in patients with urothelial versus nonurothelial bladder and upper tract carcinomas: Analyses from the National Cancer Database (NCDB). *J Clin Oncol*. 2022;40(6_suppl):463-463. doi:10.1200/JCO.2022.40.6_suppl.463

31. Dinney CPN, McConkey DJ, Millikan RE, et al. Focus on bladder cancer. *Cancer Cell*. 2004;6(2):111-116. doi:10.1016/j.ccr.2004.08.002
32. López-Knowles E, Hernández S, Malats N, et al. PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors. *Cancer Res*. 2006;66(15):7401-7404. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1182
33. van Rhijn BWG, Zuiverloon TCM, Vis AN, et al. Molecular grade (FGFR3/MIB-1) and EORTC risk scores are predictive in primary non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*. 2010;58(3):433-441. doi:10.1016/j.eururo.2010.05.043
34. Montironi R, Lopez-Beltran A. The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. *Int J Surg Pathol*. 2005;13(2):143-153. doi:10.1177/106689690501300203
35. Netto GJ, Amin MB, Berney DM, et al. The 2022 World Health Organization Classification of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Urinary Tract Tumors. *Eur Urol*. 2022;82(5):469-482. doi:10.1016/j.eururo.2022.07.002
36. Jichlinski P, Leisinger HJ. Fluorescence cystoscopy in the management of bladder cancer: a help for the urologist! *Urol Int*. 2005;74(2):97-101. doi:10.1159/000083277
37. Whitmore Jr. WF, Bush IM, Esquivel E. Tetracycline ultraviolet fluorescence in bladder carcinoma. *Cancer*. 1964;17(12):1528-1532. doi:10.1002/1097-0142(196412)17:12<1528::AID-CNCR2820171203>3.0.CO;2-#
38. Mowatt G, N'Dow J, Vale L, et al. Photodynamic diagnosis of bladder cancer compared with white light cystoscopy: Systematic review and meta-analysis. *Int J Technol Assess Health Care*. 2011;27(1):3-10. doi:10.1017/S0266462310001364
39. Yafi FA, Brimo F, Steinberg J, Aprikian AG, Tanguay S, Kassouf W. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol*. 2015;33(2):66.e25-31. doi:10.1016/j.urolonc.2014.06.008
40. Karakiewicz PI, Benayoun S, Zippe C, et al. Institutional variability in the accuracy of urinary cytology for predicting recurrence of transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU Int*. 2006;97(5):997-1001. doi:10.1111/j.1464-410X.2006.06036.x

41. Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, et al. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology*. 2005;66(6 Suppl 1):35-63. doi:10.1016/j.urology.2005.08.064
42. Lee LJ, Kwon CS, Forsythe A, Mamolo CM, Masters ET, Jacobs IA. Humanistic and Economic Burden of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: Results of Two Systematic Literature Reviews. *Clin Outcomes Res CEOR*. 2020;12:693-709. doi:10.2147/CEOR.S274951
43. Matuszczak M, Kiljańczyk A, Salagierski M. A Liquid Biopsy in Bladder Cancer—The Current Landscape in Urinary Biomarkers. *Int J Mol Sci*. 2022;23(15):8597. doi:10.3390/ijms23158597
44. van Rhijn BWG, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol*. 2005;47(6):736-748. doi:10.1016/j.eururo.2005.03.014
45. Lotan Y, Shariat SF, Schmitz-Dräger BJ, et al. Considerations on implementing diagnostic markers into clinical decision making in bladder cancer. *Urol Oncol*. 2010;28(4):441-448. doi:10.1016/j.urolonc.2009.11.004
46. Liem EIML, Oddens JR, Vernooij RWM, et al. The Role of Fluorescence In Situ Hybridization for Predicting Recurrence after Adjuvant bacillus Calmette-Guérin in Patients with Intermediate and High Risk Nonmuscle Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Individual Patient Data. *J Urol*. 2020;203(2):283-291. doi:10.1097/JU.0000000000000566
47. Lotan Y, Inman BA, Davis LG, et al. Evaluation of the Fluorescence In Situ Hybridization Test to Predict Recurrence and/or Progression of Disease after bacillus Calmette-Guérin for Primary High Grade Nonmuscle Invasive Bladder Cancer: Results from a Prospective Multicenter Trial. *J Urol*. 2019;202(5):920-926. doi:10.1097/JU.0000000000000355
48. Kamat AM, Karam JA, Grossman HB, Kader AK, Munsell M, Dinney CP. Prospective trial to identify optimal bladder cancer surveillance protocol: reducing costs while maximizing sensitivity. *BJU Int*. 2011;108(7):1119-1123. doi:10.1111/j.1464-410X.2010.10026.x
49. Beukers W, van der Keur KA, Kandimalla R, et al. FGFR3, TERT and OTX1 as a Urinary Biomarker Combination for Surveillance of Patients with Bladder Cancer in a Large Prospective Multicenter Study. *J Urol*. 2017;197(6):1410-1418. doi:10.1016/j.juro.2016.12.096

50. Kavalieris L, O'Sullivan P, Frampton C, et al. Performance Characteristics of a Multigene Urine Biomarker Test for Monitoring for Recurrent Urothelial Carcinoma in a Multicenter Study. *J Urol.* 2017;197(6):1419-1426. doi:10.1016/j.juro.2016.12.010
51. Ribal MJ, Mengual L, Lozano JJ, et al. Gene expression test for the non-invasive diagnosis of bladder cancer: A prospective, blinded, international and multicenter validation study. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2016;54:131-138. doi:10.1016/j.ejca.2015.11.003
52. Critelli R, Fasanelli F, Oderda M, et al. Detection of multiple mutations in urinary exfoliated cells from male bladder cancer patients at diagnosis and during follow-up. *Oncotarget.* 2016;7(41):67435-67448. doi:10.18632/oncotarget.11883
53. Roperch JP, Grandchamp B, Desgrandchamps F, et al. Promoter hypermethylation of HS3ST2, SEPTIN9 and SLIT2 combined with FGFR3 mutations as a sensitive/specific urinary assay for diagnosis and surveillance in patients with low or high-risk non-muscle-invasive bladder cancer. *BMC Cancer.* 2016;16(1):704. doi:10.1186/s12885-016-2748-5
54. Ward DG, Baxter L, Gordon NS, et al. Multiplex PCR and Next Generation Sequencing for the Non-Invasive Detection of Bladder Cancer. *PloS One.* 2016;11(2):e0149756. doi:10.1371/journal.pone.0149756
55. van der Aa MNM, Zwarthoff EC, Steyerberg EW, et al. Microsatellite analysis of voided-urine samples for surveillance of low-grade non-muscle-invasive urothelial carcinoma: feasibility and clinical utility in a prospective multicenter study (Cost-Effectiveness of Follow-Up of Urinary Bladder Cancer trial [CEFUB]). *Eur Urol.* 2009;55(3):659-667. doi:10.1016/j.eururo.2008.05.001
56. Rouprêt M, Hupertan V, Yates DR, et al. A comparison of the performance of microsatellite and methylation urine analysis for predicting the recurrence of urothelial cell carcinoma, and definition of a set of markers by Bayesian network analysis. *BJU Int.* 2008;101(11):1448-1453. doi:10.1111/j.1464-410X.2008.07591.x
57. Mamede AP, Santos IP, Batista de Carvalho ALM, et al. A New Look into Cancer—A Review on the Contribution of Vibrational Spectroscopy on Early Diagnosis and Surgery Guidance. *Cancers.* 2021;13(21):5336. doi:10.3390/cancers13215336
58. Cree IA. Cancer biology. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2011;731:1-11. doi:10.1007/978-1-61779-080-5_1

59. Schmidt DR, Patel R, Kirsch DG, Lewis CA, Vander Heiden MG, Locasale JW. Metabolomics in cancer research and emerging applications in clinical oncology. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(4):333-358. doi:10.3322/caac.21670
60. Zois CE, Favaro E, Harris AL. Glycogen metabolism in cancer. *Biochem Pharmacol.* 2014;92(1):3-11. doi:10.1016/j.bcp.2014.09.001
61. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(9):582-598. doi:10.1038/nrc.2016.73
62. Baba AI, Cătoi C. *Comparative Oncology*. The Publishing House of the Romanian Academy; 2007. Accessed February 1, 2024. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9557/>
63. Palombo F, Tamagnini F, G. Jeynes JC, et al. Detection of A β plaque-associated astrogliosis in Alzheimer's disease brain by spectroscopic imaging and immunohistochemistry. *Analyst.* 2018;143(4):850-857. doi:10.1039/C7AN01747B
64. Lopes J, Correia M, Martins I, et al. FTIR and Raman Spectroscopy Applied to Dementia Diagnosis Through Analysis of Biological Fluids. *J Alzheimers Dis JAD.* 2016;52(3):801-812. doi:10.3233/JAD-151163
65. Coopman R, Van de Vyver T, Kishabongo AS, et al. Glycation in human fingernail clippings using ATR-FTIR spectrometry, a new marker for the diagnosis and monitoring of diabetes mellitus. *Clin Biochem.* 2017;50(1):62-67. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.09.001
66. Roman M, Kamińska A, Drożdż A, et al. Raman spectral signatures of urinary extracellular vesicles from diabetic patients and hyperglycemic endothelial cells as potential biomarkers in diabetes. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2019;17:137-149. doi:10.1016/j.nano.2019.01.011
67. Moor K, Ohtani K, Myrzakozha D, Zhanserkenova O, Andriana BB, Sato H. Noninvasive and label-free determination of virus infected cells by Raman spectroscopy. *J Biomed Opt.* 2014;19(6):067003. doi:10.1117/1.JBO.19.6.067003
68. Sánchez-Purrà M, Carré-Camps M, de Puig H, Bosch I, Gehrke L, Hamad-Schifferli K. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy-Based Sandwich Immunoassays for Multiplexed Detection of Zika and Dengue Viral Biomarkers. *ACS Infect Dis.* 2017;3(10):767-776. doi:10.1021/acscinfecdis.7b00110

69. Rymysza T, Ribeiro EA, de Carvalho LF das C e S, Bhattacharjee T, de Azevedo Canevari R. Human papillomavirus detection using PCR and ATR-FTIR for cervical cancer screening. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2018;196:238-246. doi:10.1016/j.saa.2018.02.004
70. Zhang X, Zhang X, Luo C, et al. Volume-Enhanced Raman Scattering Detection of Viruses. *Small.* 2019;15(11):1805516. doi:10.1002/sml.201805516
71. Matousek P, Stone N. Development of deep subsurface Raman spectroscopy for medical diagnosis and disease monitoring. *Chem Soc Rev.* 2016;45(7):1794-1802. doi:10.1039/c5cs00466g
72. Frost J, Ludeman L, Hillaby K, et al. Raman spectroscopy and multivariate analysis for the non invasive diagnosis of clinically inconclusive vulval lichen sclerosus. *The Analyst.* 2017;142(8):1200-1206. doi:10.1039/c6an02009g
73. Lewis AT, Gaifulina R, Guppy NJ, et al. Developing Raman spectroscopy as a diagnostic tool for label-free antigen detection. *J Biophotonics.* 2018;11(2). doi:10.1002/jbio.201700028
74. Lasch P, Stämmler M, Zhang M, Baranska M, Bosch A, Majzner K. FT-IR Hyperspectral Imaging and Artificial Neural Network Analysis for Identification of Pathogenic Bacteria. *Anal Chem.* 2018;90(15):8896-8904. doi:10.1021/acs.analchem.8b01024
75. Bird B, Miljković M, Remiszewski S, Akalin A, Kon M, Diem M. Infrared spectral histopathology (SHP): a novel diagnostic tool for the accurate classification of lung cancer. *Lab Invest.* 2012;92(9):1358-1373. doi:10.1038/labinvest.2012.101
76. Saha A, Barman I, Dingari NC, et al. Raman spectroscopy: a real-time tool for identifying microcalcifications during stereotactic breast core needle biopsies. *Biomed Opt Express.* 2011;2(10):2792-2803. doi:10.1364/BOE.2.002792
77. Zhao J, Lui H, McLean DI, Zeng H. Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical Raman spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 2007;61(11):1225-1232. doi:10.1366/000370207782597003
78. Teh SK, Zheng W, Ho KY, Teh M, Yeoh KG, Huang Z. Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the stomach: differentiating dysplasia from normal tissue. *Br J Cancer.* 2008;98(2):457-465. doi:10.1038/sj.bjc.6604176

79. 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. doi:10.1053/j.gastro.2013.11.002
80. Jeng MJ, Sharma M, Sharma L, et al. Raman Spectroscopy Analysis for Optical Diagnosis of Oral Cancer Detection. *J Clin Med*. 2019;8(9):1313. doi:10.3390/jcm8091313
81. Jermyn M, Mok K, Mercier J, et al. Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans. *Sci Transl Med*. 2015;7(274):274ra19. doi:10.1126/scitranslmed.aaa2384
82. Widjaja E, Zheng W, Huang Z. Classification of colonic tissues using near-infrared Raman spectroscopy and support vector machines. *Int J Oncol*. 2008;32(3):653-662.
83. Ramos IRM, Malkin A, Lyng FM. Current Advances in the Application of Raman Spectroscopy for Molecular Diagnosis of Cervical Cancer. *BioMed Res Int*. 2015;2015:561242. doi:10.1155/2015/561242
84. Minamikawa T, Harada Y, Takamatsu T. Ex vivo peripheral nerve detection of rats by spontaneous Raman spectroscopy. *Sci Rep*. 2015;5(1):17165. doi:10.1038/srep17165
85. Davis RM, Kiss B, Trivedi DR, Metzner TJ, Liao JC, Gambhir SS. Surface-Enhanced Raman Scattering Nanoparticles for Multiplexed Imaging of Bladder Cancer Tissue Permeability and Molecular Phenotype. *ACS Nano*. 2018;12(10):9669-9679. doi:10.1021/acsnano.8b03217
86. Pezzeri C, Brunner A, Bonn GK, Huck CW. Fourier transform infrared imaging analysis in discrimination studies of bladder cancer. *Analyst*. 2013;138(19):5719-5725. doi:10.1039/C3AN01101A
87. Li S, Li L, Zeng Q, et al. Characterization and noninvasive diagnosis of bladder cancer with serum surface enhanced Raman spectroscopy and genetic algorithms. *Sci Rep*. 2015;5(1):9582. doi:10.1038/srep09582
88. Chen S, Zhu S, Cui X, et al. Identifying non-muscle-invasive and muscle-invasive bladder cancer based on blood serum surface-enhanced Raman spectroscopy. *Biomed Opt Express*. 2019;10(7):3533-3544. doi:10.1364/BOE.10.003533
89. Hu D, Xu X, Zhao Z, et al. Detecting urine metabolites of bladder cancer by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2021;247:119108. doi:10.1016/j.saa.2020.119108

90. Liang X, Zhang P, Ma M, et al. Multiplex ratiometric gold nanoprobe based on surface-enhanced Raman scattering enable accurate molecular detection and imaging of bladder cancer. *Nano Res.* 2022;15(4):3487-3495. doi:10.1007/s12274-021-3902-1
91. Ai EF, Dm S, Nm L, et al. Rapid Detection of Recurrent Non-Muscle Invasive Bladder Cancer in Urine Using ATR-FTIR Technology. *Mol Basel Switz.* 2022;27(24). doi:10.3390/molecules27248890
92. Ferraro JR, Nakamoto K, Brown CW. Introductory Raman Spectroscopy: Second Edition. *Introd Raman Spectrosc Second Ed.* Published online January 1, 2003:1-434.
93. Kenry, Nicolson F, Clark L, Panikkanvalappil SR, Andreiuk B, Andreou C. Advances in Surface Enhanced Raman Spectroscopy for in Vivo Imaging in Oncology. *Nanotheranostics.* 2022;6(1):31-49. doi:10.7150/ntno.62970
94. Blackie EJ, Le Ru EC, Etchegoin PG. Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy of nonresonant molecules. *J Am Chem Soc.* 2009;131(40):14466-14472. doi:10.1021/ja905319w
95. Wang X, Liu G, Hu R, et al. Chapter 1 - Principles of surface-enhanced Raman spectroscopy. In: Wang Y, ed. *Principles and Clinical Diagnostic Applications of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy.* Elsevier; 2022:1-32. doi:10.1016/B978-0-12-821121-2.00004-4
96. Pérez-Jiménez AI, Lyu D, Lu Z, Liu G, Ren B. Surface-enhanced Raman spectroscopy: benefits, trade-offs and future developments. *Chem Sci.* 11(18):4563-4577. doi:10.1039/d0sc00809e
97. Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical, Biophysical and Life Science Applications | Wiley. Wiley.com. Accessed January 31, 2024. <https://www.wiley.com/en-ae/Surface+Enhanced+Raman+Spectroscopy%3A+Analytical%2C+Biophysical+and+Life+Science+Applications-p-9783527632756>
98. Fleischmann M, Hendra PJ, McQuillan AJ. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem Phys Lett.* 1974;26:163-166. doi:10.1016/0009-2614(74)85388-1
99. Ru E, Etchegoin P. Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: And Related Plasmonic Effects. In: ; 2008. Accessed January 31, 2024. <https://www.semanticscholar.org/paper/Principles-of-Surface-Enhanced-Raman-Spectroscopy%3A-Ru-Etchegoin/e140f6531122ba9cbd81c8af225fe13002946c17>

100. Malynych S. Estimation of Size and Concentration of Silver Nanoparticles in Aqueous Suspensions from Extinction Spectra. *J Nano- Electron Phys.* 2010;78.
101. Morozhenko V. *Infrared Radiation.*; 2012. doi:10.5772/2031
102. Finlayson D, Rinaldi C, Baker MJ. Is Infrared Spectroscopy Ready for the Clinic? *Anal Chem.* 2019;91(19):12117-12128. doi:10.1021/acs.analchem.9b02280
103. Mohamed HT, Untereiner V, Sockalingum GD, Brézillon S. Implementation of infrared and Raman modalities for glycosaminoglycan characterization in complex systems. *Glycoconj J.* 2017;34(3):309-323. doi:10.1007/s10719-016-9743-6
104. Woernley DL. Infrared absorption curves for normal and neoplastic tissues and related biological substances. *Cancer Res.* 1952;12(7):516-523.
105. Le Naour F, Sandt C, Peng C, et al. In situ chemical composition analysis of cirrhosis by combining synchrotron fourier transform infrared and synchrotron X-ray fluorescence microspectroscopies on the same tissue section. *Anal Chem.* 2012;84(23):10260-10266. doi:10.1021/ac302072t
106. Su KY, Lee WL. Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Cancer Screening and Diagnostic Tool: A Review and Prospects. *Cancers.* 2020;12(1):115. doi:10.3390/cancers12010115
107. Lima KMG, Gajjar KB, Martin-Hirsch PL, Martin FL. Segregation of ovarian cancer stage exploiting spectral biomarkers derived from blood plasma or serum analysis: ATR-FTIR spectroscopy coupled with variable selection methods. *Biotechnol Prog.* 2015;31(3):832-839. doi:10.1002/btpr.2084
108. Baker MJ, Gazi E, Brown MD, Shanks JH, Clarke NW, Gardner P. Investigating FTIR based histopathology for the diagnosis of prostate cancer. *J Biophotonics.* 2009;2(1-2):104-113. doi:10.1002/jbio.200810062
109. Paraskevaidi M, Morais CLM, Lima KMG, et al. Potential of mid-infrared spectroscopy as a non-invasive diagnostic test in urine for endometrial or ovarian cancer. *The Analyst.* 2018;143(13):3156-3163. doi:10.1039/c8an00027a

110. Untereiner V, Sockalingum GD, Garnotel R, et al. Bile analysis using high-throughput FTIR spectroscopy for the diagnosis of malignant biliary strictures: a pilot study in 57 patients. *J Biophotonics*. 2014;7(3-4):241-253. doi:10.1002/jbio.201300166
111. Lewis PD, Lewis KE, Ghosal R, et al. Evaluation of FTIR spectroscopy as a diagnostic tool for lung cancer using sputum. *BMC Cancer*. 2010;10:640. doi:10.1186/1471-2407-10-640
112. Walsh MJ, Singh MN, Stringfellow HF, et al. FTIR Microspectroscopy Coupled with Two-Class Discrimination Segregates Markers Responsible for Inter- and Intra-Category Variance in Exfoliative Cervical Cytology. *Biomark Insights*. 2008;3:179-189. doi:10.4137/bmi.s592
113. Krishna H, Majumder SK, Chaturvedi P, Sidramesh M, Gupta PK. In vivo Raman spectroscopy for detection of oral neoplasia: A pilot clinical study. *J Biophotonics*. 2014;7(9):690-702. doi:10.1002/jbio.201300030
114. (13) (PDF) Clinical utility of Raman spectroscopy: current applications and ongoing developments. Accessed February 1, 2024. https://www.researchgate.net/publication/304341022_Clinical_utility_of_Raman_spectroscopy_current_applications_and_ongoing_developments
115. Bergholt MS, Lin K, Wang J, et al. Simultaneous fingerprint and high-wavenumber fiber-optic Raman spectroscopy enhances real-time in vivo diagnosis of adenomatous polyps during colonoscopy. *J Biophotonics*. 2016;9(4):333-342. doi:10.1002/jbio.201400141
116. Draga ROP, Grimbergen MCM, Vijverberg PLM, et al. In Vivo Bladder Cancer Diagnosis by High-Volume Raman Spectroscopy. *Anal Chem*. 2010;82(14):5993-5999. doi:10.1021/ac100448p
117. Querido W, Kandel S, Pleshko N. Applications of Vibrational Spectroscopy for Analysis of Connective Tissues. *Molecules*. 2021;26(4):922. doi:10.3390/molecules26040922
118. Heise H, Delbeck S, Küpper L. Recent Advances in Sensor Developments Based on Silver Halide Fibers for Mid-Infrared Spectrometric Analysis * *Part of this research was performed, when the authors L.K. and H.M.H. were with the Leibniz-Institute for Analytical Sciences – ISAS, formerly known as Institute of Spectrochemistry and Applied Spectroscopy – ISAS, D-44139 Dortmund, Germany. In: *Molecular and Laser Spectroscopy*. ; 2018:39-63. doi:10.1016/B978-0-12-849883-5.00003-6

119. Pucetaite M, Velicka M, Urboniene V, et al. Rapid intra-operative diagnosis of kidney cancer by attenuated total reflection infrared spectroscopy of tissue smears. *J Biophotonics*. 2018;11(5). doi:10.1002/jbio.201700260
120. Velicka M, Pucetaite M, Urboniene V, Ceponkus J, Jankevicius F, Sablinskas V. Detection of cancerous kidney tissue by means of SERS spectroscopy of extracellular fluid. *J Raman Spectrosc*. 2017;48(12):1744-1754. doi:10.1002/jrs.5232
121. Trevethan R. Sensitivity, Specificity, and Predictive Values: Foundations, Pliabilities, and Pitfalls in Research and Practice. *Front Public Health*. 2017;5:307. doi:10.3389/fpubh.2017.00307
122. Chen H, Li X, Broderick N, et al. Identification and characterization of bladder cancer by low-resolution fiber-optic Raman spectroscopy. *J Biophotonics*. 2018;11(9):e201800016. doi:10.1002/jbio.201800016
123. Yao G, Huang Q. DFT and SERS Study of l -Cysteine Adsorption on the Surface of Gold Nanoparticles. *J Phys Chem C*. 2018;122. doi:10.1021/acs.jpcc.8b00949
124. Min JY, Chun KS, Kim DH. The versatile utility of cysteine as a target for cancer treatment. *Front Oncol*. 2023;12:997919. doi:10.3389/fonc.2022.997919
125. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 1956;124(3215):269-270.
126. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 2008;134(5):703-707. doi:10.1016/j.cell.2008.08.021
127. DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*. 2010;29(3):313-324. doi:10.1038/onc.2009.358
128. Daye D, Wellen KE. Metabolic reprogramming in cancer: unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2012;23(4):362-369. doi:10.1016/j.semcdb.2012.02.002
129. Czamara K, Majzner K, Pacia MZ, Kochan K, Kaczor AA, Baranska M. Raman spectroscopy of lipids: A review. *J Raman Spectrosc*. 2015;46(1):4-20. doi:10.1002/jrs.4607
130. Long J, Zhang CJ, Zhu N, et al. Lipid metabolism and carcinogenesis, cancer development. *Am J Cancer Res*. 2018;8(5):778-791.

131. Snaebjornsson MT, Janaki-Raman S, Schulze A. Greasing the Wheels of the Cancer Machine: The Role of Lipid Metabolism in Cancer. *Cell Metab.* 2020;31(1):62-76. doi:10.1016/j.cmet.2019.11.010
132. Talari ACS, Martinez MAG, Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Advances in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Appl Spectrosc Rev.* 2017;52(5):456-506. doi:10.1080/05704928.2016.1230863
133. Belbachir K, Noreen R, Gouspillou G, Petibois C. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem.* 2009;395(3):829-837. doi:10.1007/s00216-009-3019-y
134. Stevenson K, Kucich U, Whitbeck C, Levin RM, Howard PS. Functional changes in bladder tissue from type III collagen-deficient mice. *Mol Cell Biochem.* 2006;283(1):107-114. doi:10.1007/s11010-006-2388-1
135. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059
136. Goodall GJ, Wickramasinghe VO. RNA in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2021;21(1):22-36. doi:10.1038/s41568-020-00306-0
137. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—A survey. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer.* 2007;1775(1):181-232. doi:10.1016/j.bbcan.2006.10.001
138. Denais C, Lammerding J. Nuclear Mechanics in Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2014;773:435-470. doi:10.1007/978-1-4899-8032-8_20
139. Bannasch P. Sequential cellular changes during chemical carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1984;108(1):11-22. doi:10.1007/BF00390968
140. Lin D, Feng S, Pan J, et al. Colorectal cancer detection by gold nanoparticle based surface-enhanced Raman spectroscopy of blood serum and statistical analysis. *Opt Express.* 2011;19(14):13565-13577. doi:10.1364/OE.19.013565
141. Paul MK, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. *Int J Med Sci.* 2004;1(2):101-115.
142. Mert S, Özbek E, Ötünçtemur A, Çulha M. Kidney tumor staging using surface-enhanced Raman scattering. *J Biomed Opt.* 2015;20(4):047002. doi:10.1117/1.JBO.20.4.047002

143. Mert S, Çulha M. Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Detection of Cancerous Renal Cells. *Appl Spectrosc.* 2014;68(6):617-624. doi:10.1366/13-07263
144. Choi BH, Coloff JL. The Diverse Functions of Non-Essential Amino Acids in Cancer. *Cancers.* 2019;11(5):675. doi:10.3390/cancers11050675
145. Mp R, R A, E R, et al. Differences between local and review urinary cytology in diagnosis of bladder cancer. An interobserver multicenter analysis. *Eur Urol.* 2002;41(3). doi:10.1016/s0302-2838(02)00006-4
146. Kular JK, Basu S, Sharma RI. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *J Tissue Eng.* 2014;5:2041731414557112. doi:10.1177/2041731414557112
147. Cooper GM. The Molecular Composition of Cells. In: *The Cell: A Molecular Approach. 2nd Edition.* Sinauer Associates; 2000. Accessed May 23, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9879/>

CURRICULUM VITAE

Asmeniniai duomenys	
Vardas	Gediminas
Pavardė	Platkevičius
Gimimo data	1991-09-19
Lytis	Vyras
Šalis	Lietuva
Telefono nr.	+370 683 87170
El. paštas	gediminas.platkevičius@santa.lt
Išsilavinimas	
2019 – 2023	Doktorantūros studijos; Medicinos fakultetas, Vilniaus universitetas
2016 – 2021	Urologijos rezidentūra; Medicinos fakultetas, Vilniaus universitetas
2010 – 2016	Aukštasis išsilavinimas; Medicinos studijų programa, Medicinos fakultetas, Vilniaus universitetas.
1998 – 2010	Vidurinis išsilavinimas; Šiaulių Universiteto gimnazija; Šiaulių Ragainės pagrindinė mokykla
Darbo patirtis	
2021 – dabar	Gydytojas urologas; Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos, Urologijos centras.
2021 – dabar	Gydytojas urologas; UAB „Tavo profilaktika“.
2023 – dabar	Gydytojas urologas; UAB „UAB „Medicinos namai šeimai“
2021 – 2024	Gydytojas urologas; UAB „Medicinos klinika Innmed“
2016 – 2021	Gydytojas rezidentas; Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos, Nacionalinis vėžio institutas, Respublikinė Vilniaus universitetinė ligoninė, Vilniaus miesto klinikinė ligoninė.
2019 – 2021	Medicinos gydytojas; Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos, Urologijos centras.
2017 – 2019	Medicinos gydytojas; Molėtų ligoninė, Priėmimo-skubios pagalbos skyrius.
Kvalifikacijos kėlimas	
2023 m. lapkričio 13 – 14 d.	Medical Expert Training in 3D Nephrectomy; Barselona, Ispanija
2023 m. balandžio 13 – 14 d.	Medical Expert Training in Flexible Laser Ablation of Bladder Tumors; Roskilde, Danija

2023 m. gegužės 26 – 27 d.	8 th Baltic Meeting in conjunction with EAU 2023 (BALTIC23); Ryga, Latvija
2022 m. lapkričio 10 – 13 d.	14 th European Multidisciplinary Congress on Urological Cancer (EMUC22); Budapeštas, Vengrija
2022 m. gegužės 27 – 28 d.	7 th Baltic Meeting in conjunction with EAU 2022 (BALTIC22); Vilnius, Lietuva
2022 m. balandžio 7 – 8 d.	Virtual: ESU-ESOU Masterclass on Muscle-invasive bladder cancer
2022 m. vasario 4 – 8 d.	19 th European Urology Residents Education Programme (EUREP21); Praha, Čekija
2021 m. spalio 28 – 29 d.	ESU-ESTU Masterclass on Kidney Transplant; Madridas, Ispanija
2021 m. rugsėjo 7 d.	UROwebinar: Robotic retro-peritoneal partial nephrectomy
2021 m. liepos 8 – 12 d.	Virtual: 36th Annual EAU Congress
2021 m. balandžio 27 d.	UROwebinar: Robotic partial nephrectomy: The evolution of a technique
2021 m. vasario 22 – 25 d.	EBU training 2021: Annual Interdisciplinary Localized and Advanced Prostate Cancer Conference. Vilnius, Lietuva
2021 m. vasario 4 – 5 d.	Virtual ESU-ESOU Masterclass on Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer
2020 m. lapkričio 6 – 7 d.	Virtual: ERUS-DRUS20 – 17th Meeting of EAU Robotic Urology Section
2020 m. spalio 17 d.	ESU Online: EAU Update on Prostate Cancer
2019 m. gruodžio 3 – 5 d.	ESU: Advanced Resident training in Flexible. Step 2; Berlynas, Vokietija
2019 m. lapkričio 14 – 17 d.	11th European Multidisciplinary Congress on Urological Cancers - EMUC19
2019 m. liepos 15 – 17 d.	ESU: Advanced Resident training in Flexible. Step 1; Berlynas, Vokietija
2019 m. gegužės 24 – 25 d.	6 th Baltic Meeting in conjunction with the EAU (BALTIC19)
2019 m. kovo 15 – 19 d.	34 th Annual EAU Congress (EAU19); Barselona, Ispanija
2018 m. gegužės 25 – 26 d.	5 th Baltic Meeting in conjunction with the EAU (BALTIC18)
2018 m. kovo 16 – 20 d.	33 rd Annual EAU Congress (EAU18); Kopenhaga, Danija

Geros klinikinės**praktikos mokymai**

2022 m. birželio 10 d.

Geros klinikinės praktikos pagrindų mokymai, Biomedicininių tyrimų skyrius, Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos; Vilnius, Lietuva

Apdovanojimai

1. 8th Baltic Meeting in conjunction with EAU 2023 (BALTIC23), Best Poster Presentation 2nd Prize: Platkevicius G. et al. „Bladder tumor detection using SERS study of bladder washout“. 2023 gegužės 26 – 27 d., Ryga, Latvija

Narystė profesinėse organizacijose

2018 – dabar

Europos Urologų Asociacijos (EAU) narys

2018 – dabar

Lietuvos Urologų Draugijos (LUD) narys

PRIEDAI

1 priedas. Lietuvos bioetikos komiteto leidimo kopija



440

VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS
sui generis darinys prie VILNIAUS UNIVERSITETO

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2019-12-03 Nr.2019/12-1178-665

Tyrimo pavadinimas:

Šlapimo pūslės vėžio diagnostikos rezultatų palyginimas audinių atspindžio infraraudonosios spektroskopijos, citologijos ir histologijos metodais

Protokolo Nr.: 01
Versija: II
Data: 2019 11 27

Informuoto asmens sutikimo forma: 2
2019 11 27

Pagrindinis tyrėjas: **Arūnas Želvys**

Ištaigos pavadinimas: VšĮ Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos
Adresas: Santariškių g. 2, Vilnius
Vilniaus universiteto Fizikos fakultetas
Saulėtekio al. 9, Vilnius

Leidimas galioja iki: **2023 12**

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 2019/12), vykusio 2019 m. gruodžio 3 d. sprendimu.

Pirmininkas

prof. dr. (HP) Saulius Vosylius

Viešoji įstaiga
Universiteto g. 3
01513 Vilnius

Duomenys kaupiami ir saugomi
Juridinių asmenų registre
Kodas 211950810

Komiteto duomenys:
M. K. Čiurlonio g. 21, LT-03101 Vilnius
Tel. (8 5) 268 6998, el. p. rbetck@mif.vu.lt

SUMMARY

1. LIST OF ABBREVIATIONS

SERS - surface-enhanced Raman scattering spectroscopy

ATR - attenuated total reflection

IR – infrared

TURBT - transurethral resection of the bladder

RC – radical cystectomy

HCA - hierarchical cluster analysis

PCA – principal component analysis

PPV – positive predictive value

NPV- negative predictive value

CI – confidence interval

VULSK – Vilniaus Universiteto Ligoninės Santaros Klinikos (Vilnius University Hospital Santaros Clinics)

UC – urothelial carcinoma

2. AIM OF THE THESIS

To optimize the diagnosis of patients with bladder cancer based on tissue reflectance vibrational spectroscopy, cytology, and histology.

3. OBJECTIVES OF THE THESIS

1. Evaluate the capabilities of vibrational spectroscopy methods to diagnose bladder cancer by analyzing bladder tissue smears.
2. Evaluate the capabilities of the vibrational spectroscopy method to diagnose bladder cancer by analyzing bladder wash sediment.
3. Determine the accuracy of the vibrational spectroscopy method in diagnosing bladder cancer.
4. Evaluate the capability of the vibrational spectroscopy method to differentiate bladder cancer by histological (differentiation) grade.

4. NOVELTY AND PRACTICAL SIGNIFICANCE OF THE THESIS

The current literature focuses on the indirect detection of oncological diseases, better known as "liquid biopsies." Their principle is to determine in a non-invasive way whether the target organ contains cancerous lesions. This study used two oscillatory spectroscopy techniques, surface-enhanced Raman scattering spectroscopy (SERS) and fiber-based attenuated total reflection infrared spectroscopy (ATR IR). The first method was used to study bladder cancer and healthy bladder tissue preparations, interstitial fluid preparations, and bladder washings between patients with and without bladder cancer. The second method was used to study cancer and healthy tissue preparations.

The first method (SERS) was used to study bladder cancer and healthy bladder tissue preparations, their interstitial fluid preparations, and bladder washings between patients with and without bladder cancer.

Key spectral differences distinguishing healthy from cancerous tissue were identified in the SERS spectra of interstitial fluid. These spectral bands are located at 1052 cm^{-1} , 1414 cm^{-1} , and 660 cm^{-1} . The spectral band at 1052 cm^{-1} is assigned to lactic acid and cysteine molecules, the spectral band at 1414 cm^{-1} to lipid, nucleic acid, and protein molecules, and the spectral band at 660 cm^{-1} to cysteine molecules.

A spectral region at $1020\text{-}1080\text{ cm}^{-1}$ has been identified. When analyzed by principal component analysis, it clearly distinguishes a group of points that allows the differentiation of healthy bladder tissue from cancerous tissue.

Differences in the spectral bands at 852 cm^{-1} , 919 cm^{-1} , 1200 cm^{-1} , and 1030 cm^{-1} have been identified in bladder casts of healthy and bladder cancer patients. By K-means analysis, the spectral band at $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ was identified as the range with the best sensitivity and specificity results for bladder washings.

The second method (IR spectroscopy) was used to analyze cancerous and healthy tissue specimens. The main spectral differences were found to distinguish between healthy and cancerous tissues in the IR spectra of bladder tissue. These spectral bands are located at 972 cm^{-1} , 1028 cm^{-1} , 1033 cm^{-1} , 1082 cm^{-1} , 1154 cm^{-1} , 1206 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} , 1282 cm^{-1} , 1317 cm^{-1} and 1339 cm^{-1} .

Only isolated oscillatory spectroscopy studies with bladder cancer specimens are available in the literature. To the knowledge of the PhD student, the fiber optic spectroscopy study on freshly resected bladder tissue described in this thesis was the first in the literature. Infrared spectroscopy with bladder scrapings has been reported only once in the literature.¹⁶

The work described in this thesis aims to simplify the diagnosis of bladder cancer and reduce the rate of interventions and associated complications. The theoretical significance of this work is to determine whether there are objective signs of bladder cancer in the bladder tissue before the planning of surgical intervention and disruption of bladder tissue integrity using automated diagnostic methods.

5. STATEMENTS TO BE DEFENDED

1. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) and Infrared (IR) spectroscopy can differentiate bladder cancer and healthy bladder tissues under *ex vivo* conditions.
2. SERS can differentiate washings from patients with bladder cancer and healthy patients.
3. SERS and IR spectroscopy methods exhibit high sensitivity and specificity in differentiating bladder cancer and healthy tissues under *ex vivo* conditions.
4. The IR spectroscopy method can differentiate bladder cancer tissues by the degree of malignancy under *ex vivo* conditions.

6. MATERIAL AND METHODS

The study was authorized by the Vilnius Regional Ethics Committee for Biomedical Research (M.K. Čiurlionio g. 21, 03101 Vilnius, Lithuania) (2019-12-03 No. 2019/12-1178-665; see Annex 1).

All patients treated at the Vilnius University Hospital Santaros Clinics (VUL SK) Urology Centre (Santariškių g. 2, 08661 Vilnius, Lithuania) who met the inclusion criteria and had no exclusion criteria were invited to participate in the study.

Spectroscopic studies were performed at the Institute of Chemical Physics, Faculty of Physics, Vilnius University (Saulėtekio al. 3, 10257 Vilnius, Lithuania).

The study's sample size was calculated considering that our research aims to evaluate the diagnostic method's ability to distinguish bladder cancer tissues from healthy ones. The planned statistical method in the study is the calculation of sensitivity and specificity. The significance level was set—Alfa (α): 0,05, power—(1- β): 0,80.

The sample size was calculated to assess sensitivity and specificity with the desired precision. For this purpose, we will use the sample size calculation formula for diagnostic studies:

$$n = \left(\frac{Z^2 \cdot \hat{P} \cdot (1 - \hat{P})}{d^2} \right)$$

- Z is the Z-value corresponding to the desired confidence level (for 95% confidence, $Z \approx 1,96$).
- P is the estimated proportion (sensitivity or specificity).
- d is the desired margin of error.

Assume we want to estimate sensitivity and specificity with a 5% margin of error ($d = 0.05$), and we expect sensitivity or specificity P to be 90% (0.90):

$$n = \left(\frac{(1.96)^2 \cdot 0.90 \cdot (1 - 0.90)}{(0.05)^2} \right)$$

$$n = \left(\frac{3.8416 \cdot 0.90 \cdot 0.10}{0.0025} \right)$$

$$n = \left(\frac{3.45744}{0.0025} \right)$$

$$n = 138.3$$

So, approximately 139 samples will be needed to evaluate sensitivity with a 5% margin of error. Two samples from each patient—healthy and cancerous tissue—are planned. The targeted number of study patients is 70.

Additionally, we can predict the probability of significant results based on the study¹¹⁷ using intraoperative kidney cancer diagnostics by infrared spectroscopy, where an identical research method was utilized. High reliability of the study results was obtained at three spectrogram positions ($p < 0.001$ (1034 cm^{-1}), $p < 0.001$ (1358 cm^{-1}), and $p < 0.5$ (1393 cm^{-1})), using cluster analysis of registered spectra. The sample size of the mentioned study was 105 patients.

6.1. Inclusion criteria

1. Patients suspected of having bladder cancer by co-clinical and radiological methods.
2. Patients with already diagnosed and confirmed bladder cancer, where diagnostic cystoscopy, transurethral bladder resection, or radical cystectomy is indicated according to the latest guidelines of the European Association of Urology.
3. Patients over 18 years of age.

6.2. Exclusion criteria

1. Active urinary tract infection diagnosed by urine culture.
2. Uncontrolled coagulopathy (partial activated thromboplastin time - aPTT more than 40 seconds; international normalized ratio - INR more than 1.5)
3. Severe overall condition (according to the ECOG scale, four or more points)
4. Refusal to participate in the study
5. In the conclusion of the histological examination of the bladder cancer patients, an atypical variant of bladder cancer was diagnosed (not urothelial carcinoma).

6.3. Clinical and pathological characteristics

6.3.1. Collection of clinical and pathological data

Clinical and pathological data of all subjects who agreed to participate in the biomedical study were collected from the patients' documentation of the procedures and post-procedure pathology reports: subject's age at the time of the procedure, sex, date of procedure, cTNM, pTNM, bladder cancer grade, histological type of the resected tissue, and bladder smear cytology response.

All subjects enrolled in the biomedical study received timely and complete treatment for bladder cancer. Their participation in the study did not influence the choice, initiation, course, or outcome of bladder cancer treatment.

6.4. Biological samples and their molecular analysis

6.4.1. Collection of biological samples

Samples of bladder cancer tissues and bladder washings were collected from subjects who agreed to participate in the biomedical study for spectroscopic studies.

Bladder tissue samples for SERS and IR spectroscopic studies were obtained between December 2019 and September 2021 at the Urology Centre of Vilnius University Hospital Santaros Clinics during transurethral resection of the bladder (TURBT) or radical cystectomy (RC).

At the start of the TURBT procedure, before cutting the tumor, one sample of healthy bladder tissue, 2-5 mm in diameter, was taken for spectral analysis using an endoscopic resectoscope with an electric loop. After the TURBT procedure, one sample of tumor-lesioned tissue up to 5 mm was taken for spectral analysis. Malignancy was confirmed by pathological examination of the remaining excised tissue. The healthy tissue group consisted of tissues with no bladder cancer component. In cases of RC, samples of healthy and malignant tissue were taken from the removed bladder after the procedure. Immediately after surgery, bladder tissue samples were submitted for histological and spectroscopic analysis. Histological analysis followed the standard protocol applied at the treatment facility, with tissues fixed in a 10% buffered formalin solution. Spectroscopic analysis was performed on the same day as the surgery, with the test material transported in 0.9% sodium chloride solution. Thus, each set of samples collected for spectroscopic analysis contained tumor tissue and healthy tissue taken from the bladder of the same patient.

The bladder washings for SERS spectral analysis were collected between January 2022 and March 2023 by washing the urinary tract with saline solution (before any manipulation of the urinary tract). They were submitted for spectral analysis immediately upon receipt. Subjects who subsequently had a histologically confirmed diagnosis of bladder cancer from the resected material were considered to be in the tumor group. A separate group was recruited from healthy patients with no suspicion of bladder cancer and no history of urinary tract oncology. In these patients, bladder samples were taken during cystoscopy when the test was performed for other non-oncological indications. The clinical diagnoses of the patients enrolled in the healthy bladder group after urological examination were chronic cystitis - in 20

patients, idiopathic microhaematuria - in 17 patients, urinary incontinence - in 8 patients, microhaematuria of nephrogenic origin - in 4 patients, benign prostatic hyperplasia - 4 patients, and renal calculi - 1 patient. 33 out of 54 patients underwent abdominal and pelvic computed tomography for excision of upper urinary tract urothelial carcinoma, including all patients with idiopathic microhaematuria. The CT scan was performed according to clinical indications without the investigators influencing the examination tactics in healthy patients. All patients in the healthy bladder washings group also underwent cytology, which was negative.

6.4.2. Spectroscopic analysis of biological samples

This study aims to determine the ability of spectroscopic techniques to differentiate between bladder cancer and healthy bladder tissues, as well as between healthy and bladder cancer patients' voids. Based on existing spectroscopic studies on biological tissues, the study of the interstitial fluid of bladder tissue is foreseen in combination with the analysis of bladder tissue^{119,120} Raman scattering spectra of the interstitial fluid can provide crucial information on the type of cells in the areas of the tissue from which the fluid has been collected. Interstitial fluid samples are prepared for spectral studies by stamping the biopsy tissue against a sample holder. After removal of the tissue, a film of interstitial fluid 0,1 μm to 1 μm thick is left on the holder, the oscillatory spectrum of which must be recorded. Due to the low thickness of the interstitial fluid layer, the Raman scattering spectra are very weak and are not suitable for tissue diagnosis. The Raman scattering spectrum of such a thin film can only be captured using surface-enhanced Raman scattering (SERS). For the same reason, bladder scrapings have been investigated in this way using SERS spectroscopy. In addition, in the hope of bringing the laboratory studies closer to clinical practice, it was decided to perform the studies in combination with IR spectroscopy because of the following advantages of this method: it is a non-damaging method, rapid recording of spectra, no complex tissue preparation is required, the possibility of using fiber-optic techniques, thus allowing the process to be used in situ, the spectrometers are small and transportable.

When designing the endoscopic use of fiber optic IR spectroscopy in vivo, it was decided to investigate the potential of IR to differentiate healthy bladder tissue from cancerous tissue. Therefore, it was decided to limit IR spectroscopy studies to bladder tissue preparations.

6.4.2.1. Analysis of SERS whole tissue and interstitial tissue fluid samples

6.4.2.1.1. Sample preparation

Samples for whole tissue SERS analysis were prepared as follows. A small part of the tissue was cut with a clean scalpel blade. The bladder cancer tissues excised were relatively small due to the limitations of the surgery (resection procedure). Therefore, on average, the tissue samples analyzed were approximately 1,5-2 mm in diameter. Subsequently, the tissue section was cut side up, and a small amount of concentrated colloidal nanoparticle solution was dripped on top and dried. SERS spectra were then recorded directly from the tissue surface.

The interstitial fluid samples of healthy and cancerous bladder tissues analyzed in this work were prepared as follows. A small section of bladder tissue was cut from the primary tissue and applied to an aluminum substrate pre-cleaned with methanol. (The reason for preparing this plate surface is that aluminum reflects the infrared radiation incident well. Also, the aluminum surface is hydrophobic, which prevents the droplet of the colloidal nanoparticle solution from spreading). The resulting layer of intercellular fluid was dried in an open environment at room temperature and used for further investigations. This sample preparation procedure results in a thin film of interstitial fluid, which also contains individual tissue cells. Since the intracellular fluid samples were taken by stamping the tissue on a glass slide, the stamp preserves information about the morphology of the tissue. The cancerous areas of the tissue are located in the same areas of the stamp but with a much lower concentration of cells. Before recording the SERS spectra, a drop of colloidal nanoparticle solution was placed on top of the dried interstitial fluid film. To avoid time-dependent changes in the biological sample and to increase the reproducibility of the measurements, the time for preparing the sample with the colloidal nanoparticle solution and obtaining the SERS spectra was kept sufficiently short, to a maximum of 5 minutes.

Silver nanoparticles were prepared as follows: 18 mg of silver nitrate (AgNO_3 , 99%, Merck, Germany) dissolved in 100 ml of distilled water. The aqueous solution of AgNO_3 was then heated to boiling point with constant stirring. After reaching boiling point, 2 ml of a 1 % solution of trisodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 99 %, Merck, Germany) was added, and the whole

mixture was left to boil for a further hour with stirring. After 1 hour, the solution was cooled to room temperature in an ice bath. A greyish-green solution of silver nanoparticles was obtained. The colloidal solution was centrifuged for 10 min to increase the nanoparticle concentration at 6500 rpm. Then, 15 ml of the initial 30 ml solution was removed as a supernatant. The remaining concentrated solution was used for Raman scattering measurements.

Based on transmission electron microscopy image analysis, the average diameter of the spherical nanoparticles was around 80 nm. The suitability of the Ag nanoparticles for SERS studies was verified using uric acid as an adsorbate. The calculated analytical amplification factor for the nanoparticles was 8×10^4 .

6.4.2.1.2. Analysis equipment

SERS spectra were recorded using a Fourier transform (FT-Raman) MultiRAM spectrometer (Bruker GmbH, Germany). Samples were irradiated with a 1064 nm Nd: YAG laser. A gold-plated hyperbolic 90° mirror lens coupled to a CCD camera was used. The focal length of the lens was 33 mm, and the diameter of the focused laser beam was 100 μm (average theoretical intensity in the sample is 1270 W/cm², at a laser power of 100 mW, but the actual expected laser power due to losses in the laser beam path is 955 W/cm²). A liquid nitrogen-cooled Ge detector was used to collect the scattered light. All spectra were recorded in the wavenumber range 100-3600 cm⁻¹ with a resolution of 4 cm⁻¹.

6.4.2.2. Infrared spectroscopic analysis of the entire tissue

The freshly cut tissue samples' IR spectra were recorded using an ATR IR fiber optic probe. The system consists of an ATR silver halide fiber optic probe (Art Photonics GmbH, Berlin, Germany) connected to a standard FT-IR (Fourier transform infrared) spectrometer Alpha (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany), coupled with an externally liquid nitrogen-cooled MCT (mercury-cadmium-telluride) detector (Infrared Associates, Inc., model IRA-20-00131).

Small sections of normal and cancerous bladder tissue were prepared. Spectra were collected by pressing the ATR fiber probe against the freshly cut tissue surface. Several spectra were recorded for each sample, and the average was taken for analysis. Spectra were recorded in the spectral range from 400

to 4000 cm^{-1} , with a resolution of 4 cm^{-1} . During each measurement, 64 interferograms were recorded, and the ATR IR spectrum was obtained by performing Fourier transformation on their average. Blackman-Harris 3-term apodization function and a zero-filling factor of 2 were used during Fourier transformation. Before each measurement, the ATR crystal was cleaned with distilled water and ethanol, and the background spectrum of the ambient air was measured.

6.4.2.3. Urinary bladder wash analysis using the SERS method

The sample preparation procedure follows: a small drop of bladder wash is deposited onto an aluminum foil-covered glass slide using a pipette. Before preparing nanoparticle layers on aluminum-coated glass, the substrate was wiped with methanol to remove deposited dust, fingerprints, or other impurities that may have settled on the surface of the aluminum foil. Then, the sample is left to dry at room temperature, and a drop of colloidal nanoparticle solution is deposited and allowed to dry. This creates an oval-shaped sample on the substrate, with enhanced Raman scattering spectra observed at the edges.

SERS spectra are recorded using a Fourier-transform Raman (FT-Raman) MultiRAM spectrometer (Bruker GmbH, Germany), the parameters of which are described above (see section 3.4.2.1.2). To increase the signal-to-noise ratio, all spectra were averaged. Each spectrum was recorded 200 times, and the obtained results were averaged.

6.5. Author's contributions

PhD student Gediminas Platkevičius enrolled all subjects in the biomedical study and collected all clinical and pathological data. He collected biological material in the operating room and performed post-operative monitoring of the subjects. Gediminas Platkevičius analyzed the spectroscopic results and correlated them with the clinical and pathological data. He was one of the principal authors of the scientific articles based on the study data and presented biomedical research data at scientific conferences.

The spectroscopic part of the research was carried out by a team from the Institute of Chemical Physics, Faculty of Physics, led by Prof. Valdas Šablinskas, PhD, Rimantė Bandzevičiūtė, PhD, Prof. Justinas Čeponkus, PhD, Edvinas Zacharovas, Martynas Velička, PhD. Edvinas Zacharovas and Martynas Velička, PhD were the principal co-authors of the first scientific

publication. Rimantė Bandzevičiūtė, PhD and Prof. Justinas Čeponkus, PhD were the principal co-authors of the second publication.

Rimantė Bandzevičiūtė, PhD introduced the PhD student to spectroscopic instruments and demonstrated how spectroscopic studies are performed on living tissues.

Prof. Valdas Šablinskas, PhD was the principal consultant responsible for the physical part of the biomedical research. Prof. Šablinskas, PhD critically evaluated the prepared scientific publications and provided valuable comments on their content and presentation to the press.

Prof. A. Želvys, PhD was the thesis supervisor responsible for the biomedical study design and the principal consultant on clinical issues. He was also critical of the scientific publications he prepared and provided valuable comments on their content and presentation to the press.

7. RESULTS

7.1. General characteristics of the subjects

A total of 157 subjects were included in the study who were treated at the VULSK for bladder cancer. Of these, 76 were enrolled in the bladder cancer tissue studies. These patients underwent TURBT or RC procedures, and healthy and neoplastic bladder tissue samples were taken when possible. In cases where the healthy bladder lining could not be visualized during the procedure, no healthy tissue samples were taken, so the tissue analysis does not show equal amounts of healthy and cancerous tissue.

The tissue tests were performed in stages. The first 30 patients were examined using both SERS and IR spectroscopy techniques. Subsequent patients were tested by IR only. These study samples are presented separately, describing the results of each method. In the first phase of the study, part of the tissue evaluated macroscopically as neoplastic was assessed as inflammatory (cystitis) on histological examination, and this group was therefore excluded from the spectroscopic studies. In the IR evaluation, all subjects with a final histological response of non-urethral carcinoma (e.g., non-specific cystitis, neuroendocrine carcinoma, adenocarcinoma) were excluded. Then, 54 subjects remained in the IR spectroscopy study.

The bladder wash study included 81 subjects, of whom 27 subjects were in the bladder cancer group and 54 subjects in the healthy group who had never been diagnosed with bladder cancer.

7.2. Bladder tissue SERS analysis

In this study, 58 bladder tissue samples from 30 different patients (28 healthy, 25 cancer, and five cystitis patients) were collected and analyzed. A healthy tissue sample was not possible to obtain in two patients. The results of the histological analysis of the bladder tissues used in this study are shown in Table 1. Cancers were classified according to the TNM classification system.

Table 1. Tissue types and patient characteristics were collected in the study. Information based on intraoperative information and final pathological findings.

Tissue type	No. of samples
Normal bladder tissue	28
Altered tissue	
Cystitis	5
High grade UC	16
Low grade UC	9
Subject characteristics	No. of subjects
Tumor size on TURBT	
<10 mm	8
10–30 mm	10
>30 mm	7
No. Of tumors on TURBT	
One	10
Two - three	9
More than three	6
Additional information	
Total No. of subjects	30
Average age (years)	71,3

UC – urothelial carcinoma

TURBT – transurethral resection of the bladder

SERS spectra were recorded to determine the spectral differences between healthy, cancerous, and cystitis-affected bladder tissues. Spectra were collected from five different points for each bladder tissue sample to account for possible differences in spectra at different measurement points. The mean SERS spectra of the bladder tissues are presented in Figure 1.

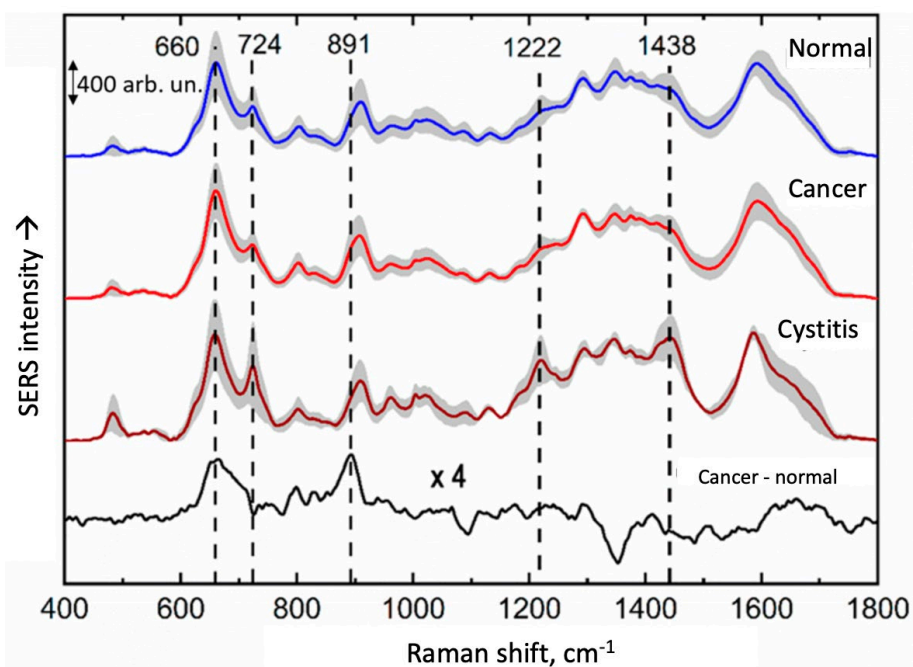


Figure 1. Mean SERS spectra of cystitis-affected, cancerous, and healthy bladder tissue samples, and the difference spectrum, with increased intensity ($\times 4$), between the mean spectra of cancerous and healthy tissues. The grey areas in the spectra represent the standard deviation of the intensity. The excitation wavelength is 1064 nm.

The grey areas show the standard deviation of the intensity of the SERS spectrum bands. Concentration variations can explain these variations due to the uneven distribution of structural molecules. The distribution of cancer-relevant molecules in the human body depends on physiology, lifestyle, physical activity, food intake, medications, diseases, and other factors. In addition, in the case of cancer, the concentration of such molecules in the tissues may vary depending on the tumor type, stage, and morphological changes in the cancer cells. It is also important to note that the exact boundary between normal and cancerous tissues is not visible during surgery. Therefore, cancer cells can be detected in a healthy tissue sample and vice versa.

The analysis of the mean SERS spectra of healthy and cancerous bladder tissue showed no significant spectral differences between them. To highlight the minor spectral deviations between the samples, we constructed a difference spectrum (a method that has been previously used for detailed Raman/SERS analysis of bladder cancer^{88,89,122}). The difference spectrum showed two spectral bands of interest (Figure 1). They are 660 cm^{-1} and 891

cm⁻¹. Furthermore, comparing these spectra with the SERS spectra of cystitis-affected tissues revealed three SERS spectral bands that are absent or of low intensity in the spectra of normal and cancerous tissues. These bands are 724 cm⁻¹, 1222 cm⁻¹ and 1438 cm⁻¹.

To assess the reliability and accuracy of the spectral signatures of bladder cancer and cystitis-affected bladder tissues, principal component analysis (PCA) was performed using an algorithm developed in Origin Pro 9 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA).

In the principal component analysis, regions of vibrational bands were selected that could be used to detect bladder tissue cancer and cystitis. The SERS spectral regions chosen to analyze bladder tissue spectra were 700-750 cm⁻¹, 1190-1260 cm⁻¹ and 1400-1460 cm⁻¹. PCA performed on the spectral regions of the potential marker bands showed that the projections of the data from the spectra of normal, cancerous, and cystic tissue overlap in the plane of the principal components. No clear boundaries can be drawn between the groups of points corresponding to the spectra of different tissues. It can be assumed that the variations in the intensity of the vibrational bands identified as spectral markers of cystitis-affected tissues in the bladder tissue studies may be random and depend only on the different physiology of the patient and other factors. For this reason, changes in the intensity of the corresponding bands cannot be attributed to groups of healthy, cancerous, or cystitic tissues, which exhibit features characteristic of these groups.

7.3. Bladder extracellular fluid SERS analysis

The tissue smear method was chosen in this study because it has been used in previous studies where extracellular fluid samples have also been shown to contain single tissue cells, and the changes in the intensity of the spectral bands are small compared to tissue studies.^{119,120} Extracellular fluid SERS spectra were collected from five randomly selected points in each sample. The collection of the SERS signal in this way can be considered an average of the spectral information. To demonstrate the reproducibility of a representative sample, the SERS spectra collected at five randomly selected points in the extracellular fluid of normal bladder tissue are shown in Figure 2. As can be seen, only minor differences in intensity occur at the measurement point.

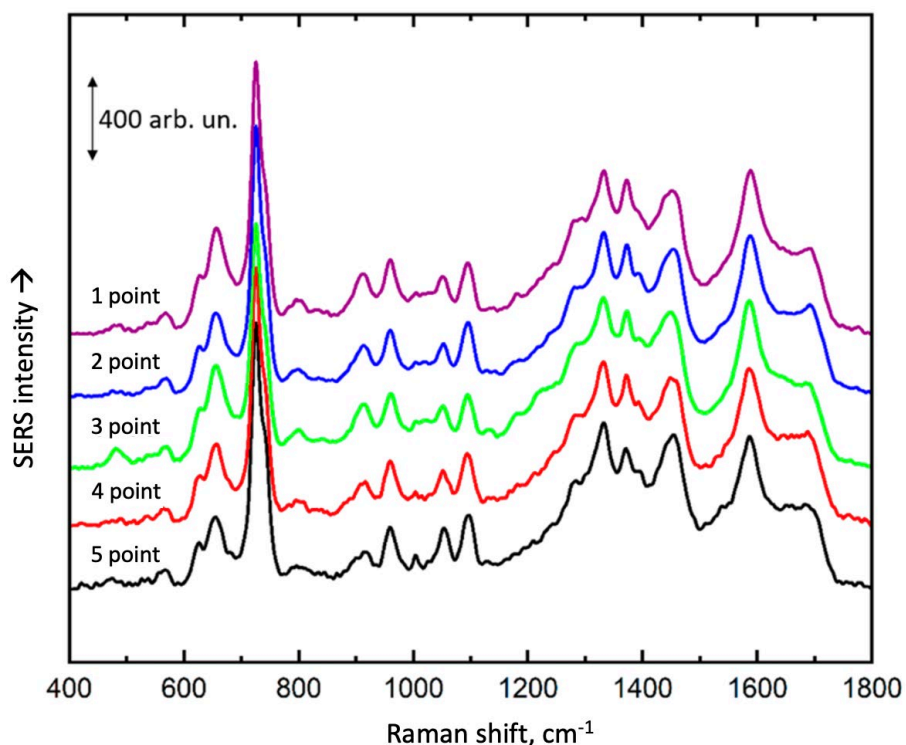


Figure 2. SERS spectra of normal bladder extracellular fluid were collected at five randomly selected sample points.

The SERS spectra of the extracellular fluid containing single cells from the healthy tumor and cystitis tissue are shown in Figure 3. It should be noted that the standard deviation of the intensity of the vibrational bands (visualized by the grey area) in these spectra can be attributed not only to individual variations due to the different lifestyles of each patient but also to sample preparation due to the unevenness of the surface of the extracellular fluid layer. This is because the intensity of the Raman scattering signals, both conventional and surface-enhanced, depends on the thickness of the sample (the number of molecules contributing to the Raman signal). A very thin layer of intracellular fluid with single cells produces a sufficiently strong SERS signal. In contrast, a thick layer may have a SERS spectrum similar to the Raman spectrum of the whole tissue.

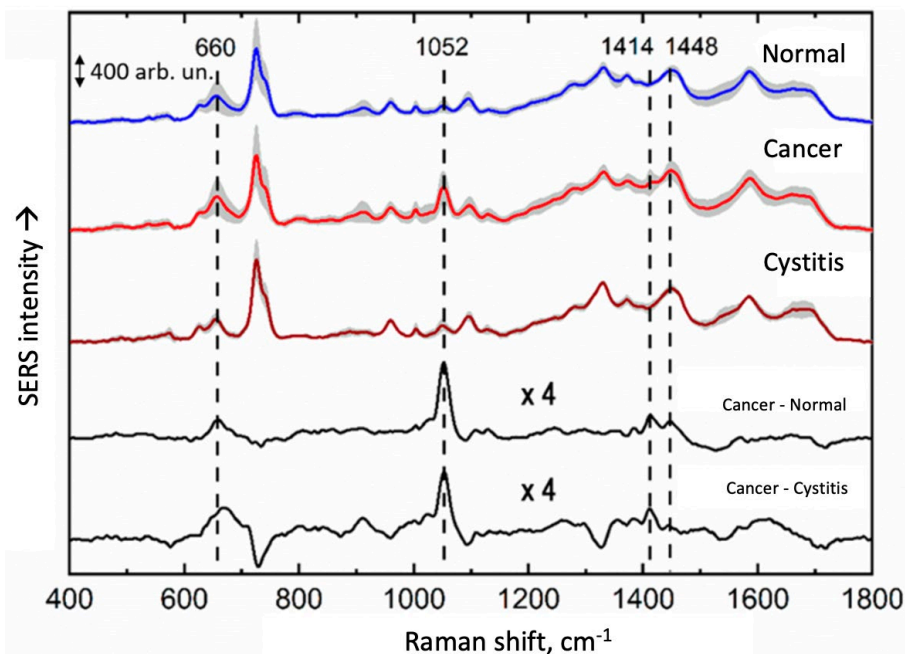


Figure 3. Mean SERS spectra of extracellular fluid from cystitis-affected, cancerous, and normal bladder tissues, and enhanced intensity ($\times 4$) difference spectra between cancerous and healthy and cancerous and cystitis-affected tissues. The grey areas in the spectra indicate the standard deviation of the intensity.

The main spectral differences that distinguish healthy and cancerous tissue are shown in the SERS spectra of the extracellular fluid in Figure 3. These vibrational spectral bands are located at 1052 cm^{-1} and 1414 cm^{-1} , respectively. The SERS band at 1052 cm^{-1} in the extracellular fluid of the cancerous bladder tissue is quite intense, whereas the band at 1414 cm^{-1} is less intense in the spectra of the healthy and the cystitis-affected tissues. In some SERS spectra of healthy tissues, these bands are not present.

The spectral changes are more clearly visible in the SERS difference spectrum (Figure 3), which consists of the average of the spectra of cancerous and normal bladder tissues and the spectra of cancerous and cystitis-affected bladder tissue. Positive features in this spectrum are associated with additional or enhanced bands characteristic of cancerous samples. Thus, the most intense band is seen at 1052 cm^{-1} , while two bands of lower intensity appear at 1414 and 660 cm^{-1} .

The spectral regions $600\text{-}750\text{ cm}^{-1}$, $1020\text{-}1080\text{ cm}^{-1}$, and $1390\text{-}1440\text{ cm}^{-1}$ were chosen for PCA analysis of the extracellular fluid SERS bands. The PCA plots of the spectral regions $600\text{-}750\text{ cm}^{-1}$ and $1390\text{-}1440\text{ cm}^{-1}$ show a wide spread of PCA plotted points, with most overlapping points between different groups of subjects. It was not, therefore, possible to identify areas of concentration of the subjects that would allow the distinction of the groups of healthy, cancerous, and cystitis bladder tissue. In contrast, the PCA plot of $1020\text{-}1080\text{ cm}^{-1}$ spectral region identifies a group of points corresponding to the spectral data of the healthy bladder tissue subjects (Figure 4).

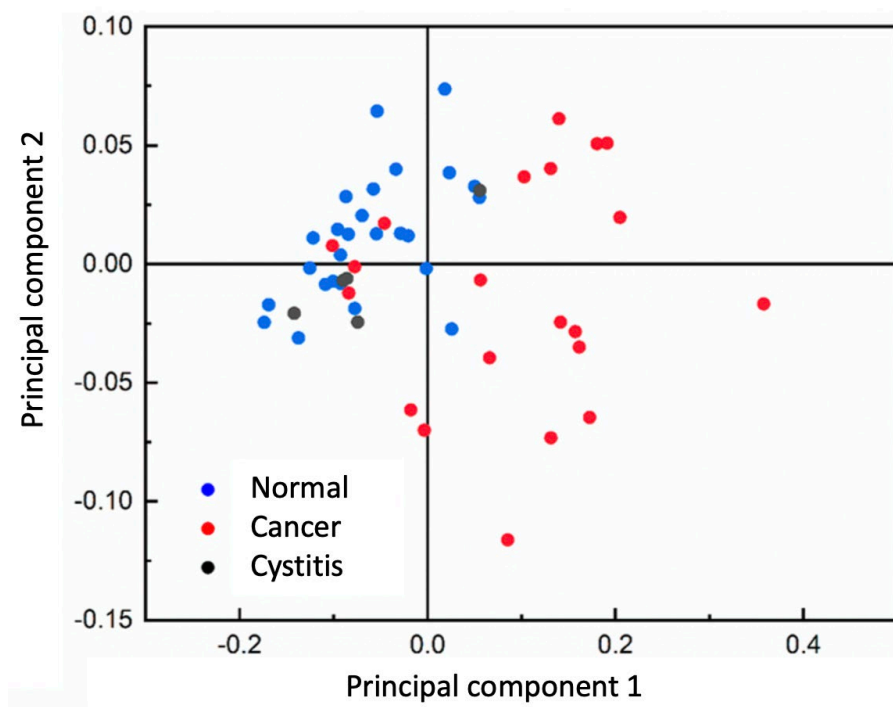


Figure 4. Principal Component Analysis (PCA) plot of the SERS spectra of extracellular fluid from normal, cancerous, and cystitis-affected bladder tissue samples in the $1020\text{-}180\text{ cm}^{-1}$ wavenumber range.

Principal component analysis of the $1020\text{-}1080\text{ cm}^{-1}$ spectral data showed that 81 % of the cancerous tissue samples could be assigned to a separate group, with a higher variance than the healthy and cystitis samples. Separating cancerous samples from other tissues yields the following accuracy results: sensitivity 85 % and specificity 97 %.

Table 2. Summary of the sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) values of SERS spectroscopy results of the principal component analysis (PCA) of extracellular fluid from bladder cancer.

	Method	
	PCA	
	Results	95 % CI
Sensitivity	85 %	64 – 95 %
Specificity	97 %	84 – 100 %
PPV	95 %	75 – 99 %
NPV	89 %	77 – 95 %

CI - Confidence Interval

7.4. Bladder tissue analysis by IR

This part of the study included 54 subjects. The summary data is presented in Table 3. In most cases, two types of tissue samples (normal and cancerous) were obtained for spectral analysis in each patient. In some instances, only normal or only tumor tissue was obtained from a given patient for analysis, resulting in only 49 healthy and 47 tumor tissue samples being analyzed.

Table 3. The study collected tissue types and patient characteristics. Information based on intraoperative information and final pathological findings.

Tissue type	No. of samples
Normal bladder tissue	49
Cancerous tissue	
High grade UC	34
Low grade UC	13
Subject characteristics	No. of subjects
Tumor size on TURBT	
<10 mm	12
10–30 mm	18
>30 mm	17
No. of tumors on TURBT	
One	15
Two - three	15
More than three	17
Additional information	
Total No. of subjects	54
Average subject age (years)	70,5

The mean IR spectra of normal and cancerous bladder tissue are shown in Figure 5.

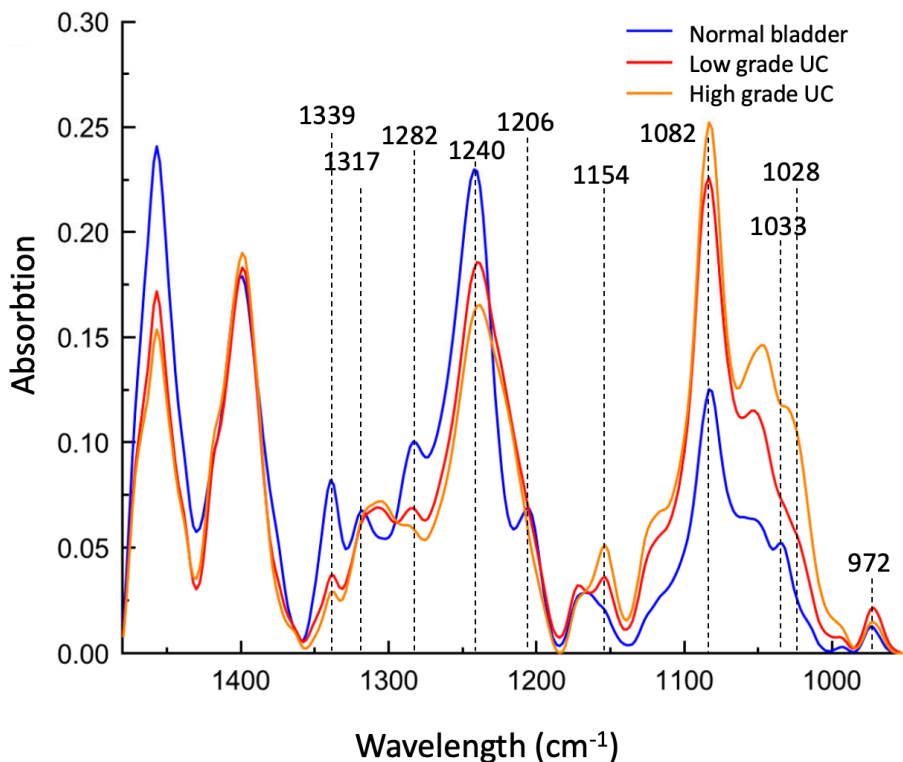


Figure 5. Mean IR spectra of healthy and bladder carcinoma (high-grade tumor and low-grade urothelial carcinoma) tissues. Spectra are baseline corrected and vector normalized.

Statistical analysis (hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA)) was performed using OriginPro data analysis software (OriginLab corporation). Before statistical analysis, the spectra were pre-processed: atmospheric compensation, baseline correction, vector normalization, and bias correction were performed using the spectroscopy software OPUS (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany). Before the HCA analysis, the first spectra derivative was calculated using OPUS spectroscopy software. Statistical analysis was performed using standard procedures of the OriginPro software package (hierarchical cluster analysis and principal component analysis). The Ward clustering algorithm, Euclidean distance type, was chosen for HCA.

Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) were calculated to assess the method's robustness. 95 % confidence intervals (CI) were calculated using the web-based statistical analysis tool MedCalc (MedCalc Software Ltd., Ostend, Belgium).

Figure 6 shows a dendrogram of HCA analysis. The spectra of cancerous and normal tissues are divided into two clusters (the red cluster on the left and the blue cluster on the right side of the dendrogram correspond to the classes of cancerous and normal tissues), with a considerable distance between the clusters indicating that the two classes of tissues are well separated. Only one spectrum out of 49 healthy tissue spectra and 4 out of 47 tumor tissue spectra were assigned to the wrong class (these spectra are marked with *), corresponding to a sensitivity of 91 % and a specificity of 98 % (Table 4).

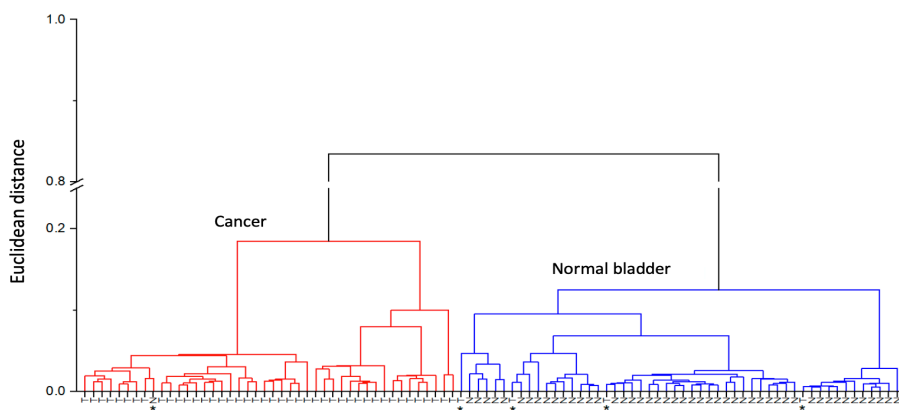


Figure 6. HCA dendrogram. The red cluster corresponds to the tumor tissue class, and the blue cluster corresponds to the healthy tissue class. The letters T and N denote the spectra of each tumor and healthy tissue sample, respectively. The * symbol indicates spectra assigned to the wrong tissue class.

Table 4. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) values of the Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Principal Component Analysis (PCA) results of IR spectroscopy of bladder cancer tissue are summarised.

	Method			
	HCA		PCA	
	Result	95 % CI	Result	95 % CI
Sensitivity	91 %	80 – 98 %	91 %	80 – 98 %
Specificity	98 %	89 – 100 %	96 %	86 – 100 %
PPV	98 %	86 – 100 %	96 %	85 – 99 %
NPV	92 %	82 – 97 %	92 %	87 – 98 %

CI - Confidence Interval

The results of the PCA analysis are shown in Figure 7. The spectra are normalized so that most of the variance is explained by the first and second principal components (PCs) (the percentage of the variance of the first and second PCs is 39 % and 16 %, respectively). The first and second PCs define the most significant chemical changes in the tissue samples, and a plot of the scores of these two PCs is presented. The clusters on the left and right of the graph correspond to the healthy and cancerous tissue classes, respectively. The blue dots represent the spectra of each normal tissue, while the red and orange dots represent the spectra of each tumor tissue sample (high and low malignancy, respectively). The classes are well separated, with only 2 out of 49 healthy tissue spectra and 4 out of 47 tumor tissue spectra assigned to the wrong class, corresponding to a sensitivity of 91 % and a specificity of 96 % (Table 4).

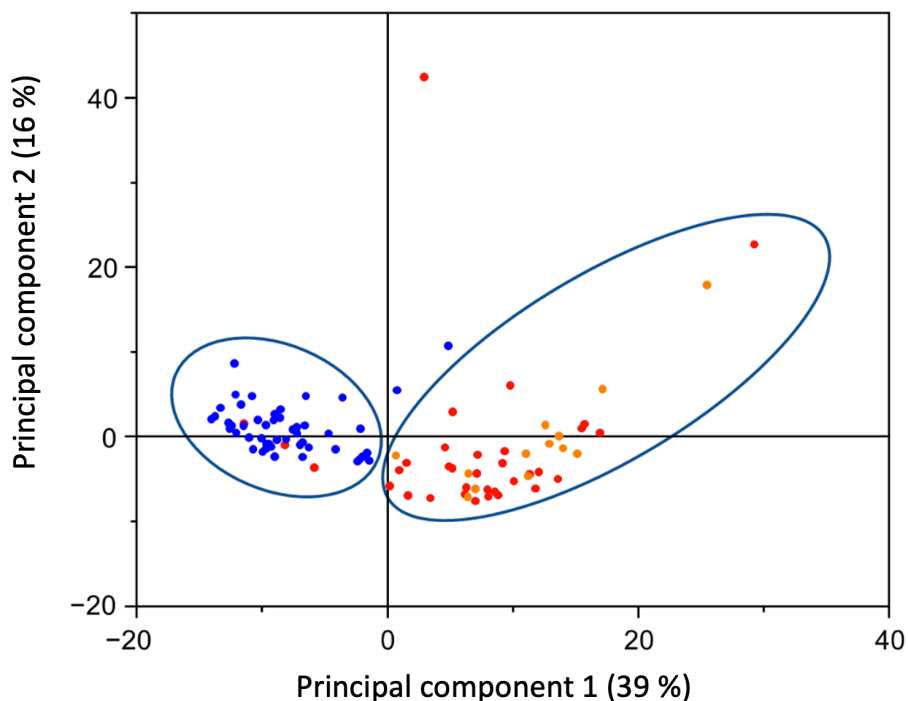


Figure 7. PCA diagram. The blue dots indicate the spectra of all healthy tissue samples, and the red and orange dots indicate the spectra of each cancerous tissue (high and low malignancy, respectively). The percentage of PC variance is shown in parentheses.

7.5. Bladder washings analysis by SERS

In an experiment to test whether the spectral differences are not random and can be used to identify bladder cancer, SERS spectra of bladder washings from 81 different patients (27 cancerous and 54 non-cancerous) were recorded. In this study, the SERS spectra of the bladder washings were averaged to ensure that the recurrence of characteristic markers was not random. In addition, spectral averaging was applied to increase the signal-to-noise ratio, facilitating the spectra analysis. This allows for a more apparent distinction of spectra's fundamental differences and similarities, especially when the spectral bands have low intensities. The averages of the spectra are shown in Figure 8.

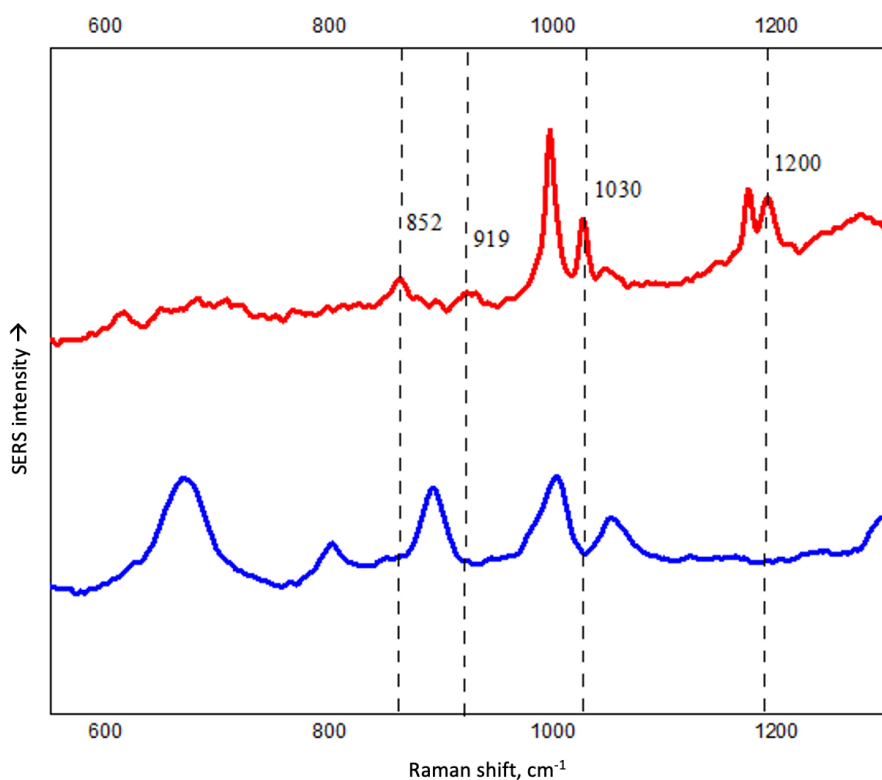


Figure 8. Averages of SERS spectra of bladder washings. The curve for bladder cancer patients is shown in red, and for healthy subjects, it is in blue.

During this study, four significant differences were identified in the SERS spectra of cancerous and non-cancerous bladder washings, where spectral bands were absent in non-cancerous but present in cancerous bladder

washings spectra. These differences were observed in all samples prepared from cancerous and non-cancerous bladder washings. Firstly, an intense spectral band was observed at 852 cm^{-1} in the SERS spectra of cancerous bladder washings, which was not seen in the spectra of healthy patients. Another intense spectral band observed in the spectra of cancer patients was at 919 cm^{-1} , which is either absent or of low intensity in the spectra of healthy patients. Additionally, intense or moderate bands were observed at 1200 cm^{-1} and 1030 cm^{-1} in the spectra of cancer patients, which were not present in the spectra of healthy patients.

The accuracy of the method to diagnose cancer cases was determined by performing a statistical analysis - K-means analysis, using the computer program Quasar. K-means analysis was conducted by selecting a case where the data is divided into 2 clusters (cancerous, non-cancerous), and Figure 9 depicts 11 misclassified spectra (11 cancerous, 0 non-cancerous). This indicates that spectral bands repeat in cancerous and non-cancerous SERS spectra, allowing the classification of spectra and facilitating further analysis, including identifying characteristic spectral bands for vibrations. The specificity of this analysis method is 100 % (95 % CI 93 – 100 %), while the sensitivity reaches 59 % (95 % CI 38 – 77 %).

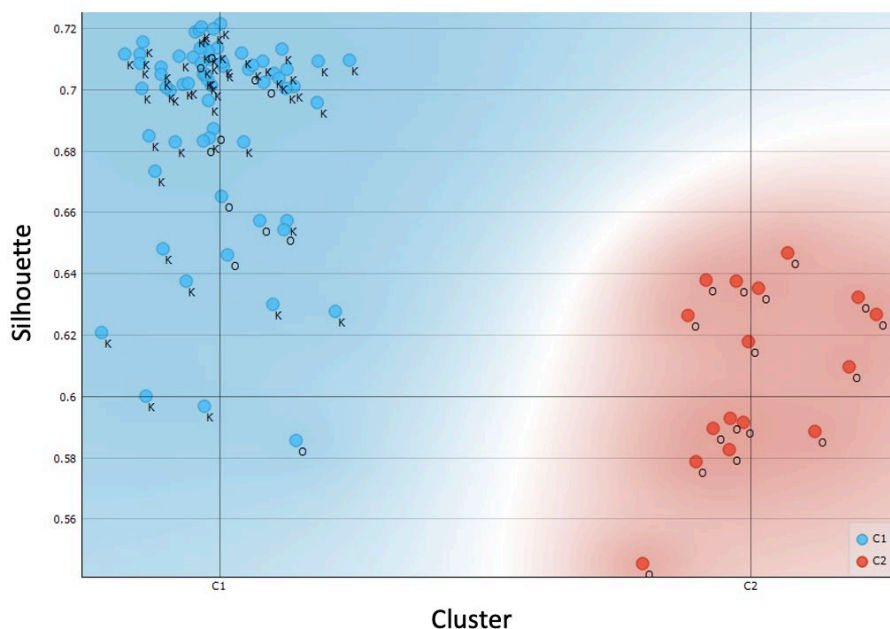


Figure 9. Results of K-means analysis of bladder washings SERS spectra, within the range of $0 - 4000\text{ cm}^{-1}$. (O - spectra of cancerous bladder washings; K - spectra of non-cancerous bladder washings)

After analyzing the spectra and identifying spectral differences, a K-means analysis was performed, and different spectral intervals were chosen. The respective results of the K-means analysis are presented in Figures 10-11.

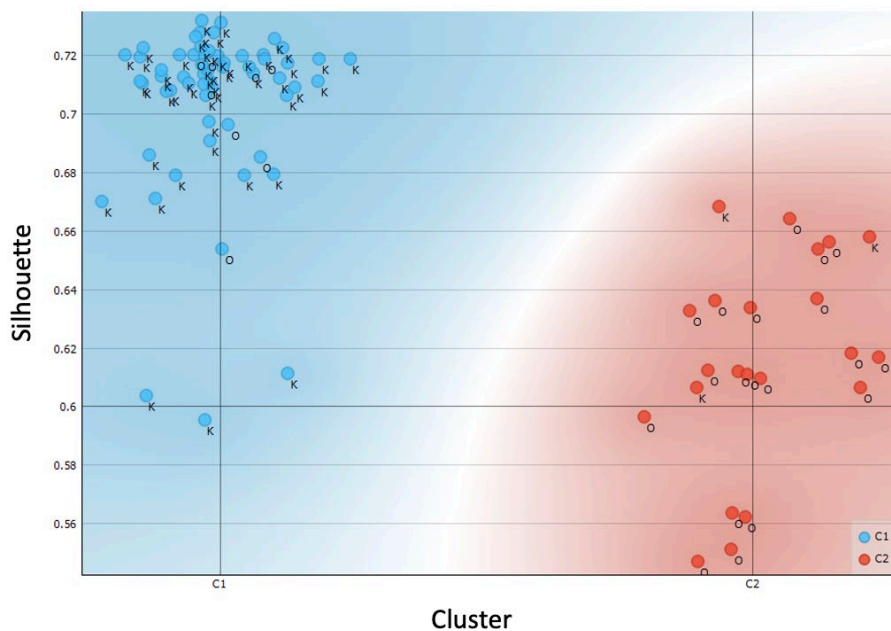


Figure 10. Results of K-means analysis of bladder washings SERS spectra, within the 450 – 1300 cm^{-1} range. (O – spectra of cancerous bladder washings; K – spectra of non-cancerous bladder washings)

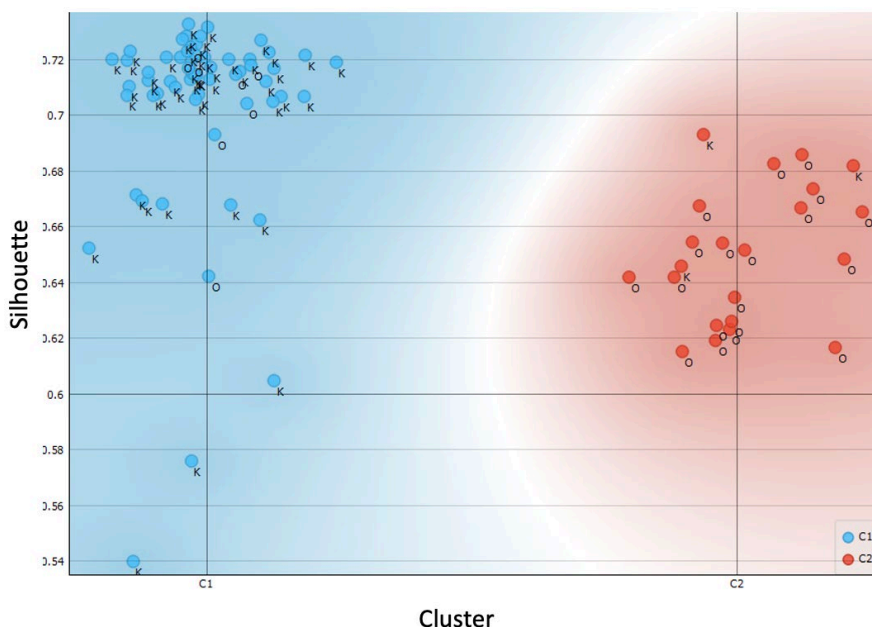


Figure 11. Results of K-means analysis of bladder washings SERS spectra, within the 900 – 1200 cm^{-1} range. (O – spectra of cancerous bladder washings; K – spectra of non-cancerous bladder washings)

By narrowing the interval to 450–1300 cm^{-1} , 11 spectra were misclassified (three non-cancerous, eight cancerous), while from 900 to 1200 cm^{-1} , ten spectra were misclassified (three non-cancerous, seven cancerous). In both cases, the specificity and sensitivity of the analysis method were calculated to compare how data classification differs when selecting a specific data range. When reducing the interval to 450–1300 cm^{-1} , the specificity decreased to 94 % (95 % CI 84 – 98 %), but the sensitivity increased to 70 % (95 % CI 49 – 86 %). Further narrowing the interval to 900-1200 cm^{-1} , the specificity remained unchanged at 94 % (95 % CI 85 – 99 %), while the sensitivity increased to 74 % (95 % CI 53 – 89 %).

From the provided figures, it can be seen that narrowing the interval improves the distribution; more cancerous spectra are correctly classified, but a few non-cancerous spectra also appear, which was not noticed when analyzing the entire spectral range. This happens because the previous, relatively narrow spectral interval identified the main spectral differences. Therefore, performing statistical analysis in this area improves the distribution of cancerous clusters but slightly complicates the non-cancerous cases.

The summarized values of the K-means analysis in all studied spectral intervals are shown in Table 5.

Table 5. The summarized sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) values of K-means analysis of bladder washings SERS spectra in various spectral intervals.

	Interval					
	0 – 4000 cm ⁻¹		450 – 1300 cm ⁻¹		900 – 1200 cm ⁻¹	
	Result	95 % CI	Result	95 % CI	Result	95 % CI
Sensitivity	59 %	38 – 77 %	70 %	49 – 86 %	74 %	53 – 89 %
Specificity	100 %	93 – 100 %	94 %	84 – 98 %	94 %	85 – 99 %
PPV	100 %	79 – 100 %	86 %	67 – 95 %	87 %	68 – 95 %
NPV	83 %	75 – 88 %	86 %	78 – 92 %	88 %	79 – 93 %

CI – Confidence Interval

7.6. Evaluation of bladder cancer malignancy using spectroscopic methods

In the first part of the study, when SERS spectroscopic tests were conducted on bladder tissue, malignant tissues were not distinguished based on the degree of malignancy due to the small sample size of patients. The study focused on the method's potential to differentiate cancerous from non-cancerous tissue.

In bladder tissue studies using IR spectroscopy, it was observed that urothelial carcinoma tissues exhibit higher absorption values at the vibrations of 1028 cm^{-1} bands and 1154 cm^{-1} bands, which visually differentiate between high and low malignancy urothelial carcinoma average spectra. (Figure 12).

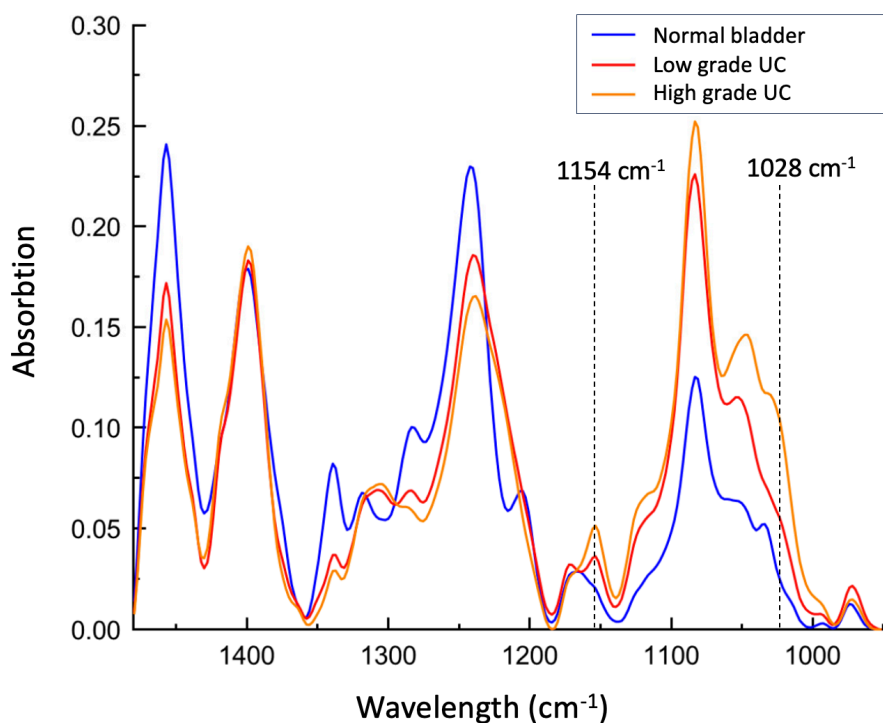


Figure 12. Average ATR IR spectra of normal bladder tissue and bladder carcinoma (high-grade tumor and low-grade urothelial carcinoma) tissue. Spectra are baseline-corrected and vector-normalized. The dotted lines indicate higher absorption values at the vibrations of 1028 cm^{-1} bands and 1154 cm^{-1} bands.

To assess the capability of IR spectroscopy to differentiate between high-grade and low-grade urothelial carcinoma tissues, hierarchical cluster analysis (HCA) was applied to the first derivative of tumor tissue spectra. This analysis

focused on the spectral range from 950 to 1183 cm^{-1} , which includes the spectral bands at 1028 cm^{-1} and 1154 cm^{-1} , visually distinct in evaluating average spectra. Most high-grade tumor spectra (29 out of 34) formed one cluster, with seven spectra (out of 13) from low-grade tumors. In another cluster, six spectra from low-grade tumors were grouped with five spectra from high-grade tumors. Summarizing these results, it can be concluded that high-grade tumors can be identified with 85 % accuracy, while low-grade tumors can only be identified with 46 % accuracy. The summarized results of bladder cancer tissue differentiation by malignancy level using HCA analysis are presented in Table 6.

Table 6. Summarized sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) values of hierarchical cluster analysis (HCA) results for differentiation of bladder cancer tissue by malignancy level using IR spectroscopy.

	Urothelial carcinoma grade			
	HGUC		LGUC	
	Result	95 % CI	Result	95 % CI
Sensitivity	85 %	68 – 95 %	46 %	19 – 75 %
Specificity	46 %	19 – 74 %	85 %	69 – 95 %
PPV	80 %	71 – 87 %	55 %	31 – 77 %
NPV	54 %	30 – 77 %	81 %	71 – 87 %

CI – Confidence Interval

HGUC – High-grade Urothelial Carcinoma

LGUC – Low-grade Urothelial Carcinoma

8. DISCUSSION

8.1. Analysis of spectral markers identified in spectroscopic studies

To explain the observed differences in the spectra of bladder tissues and washings, a preliminary assignment of spectral bands was performed based on literature data. Spectra of solutions containing individual biomolecules were also recorded during SERS spectroscopy of tissues and intracellular investigation to facilitate a better understanding of the spectral band changes in bladder cancer research (Figure 13).

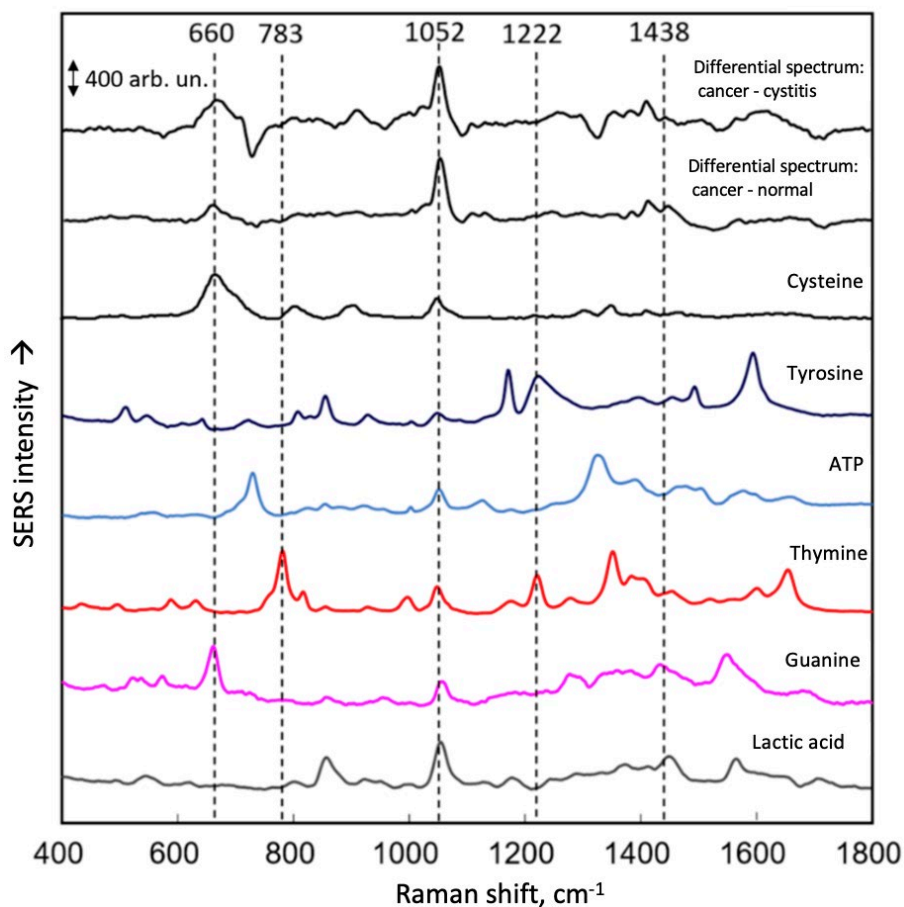


Figure 13. Differential spectrum between bladder cancer and healthy bladder tissue extracellular fluid. SERS spectra of solutions containing different biomolecules (1 mM) are also provided for comparison. ATF - adenosine triphosphatase.

Firstly, no statistically significant differences were observed during SERS spectroscopy tissue analysis. However, when comparing spectra of cancerous and healthy patients, two dominant bands were noticed at 660 cm⁻¹ and 891 cm⁻¹ (Figure 1). According to literature sources and the obtained SERS spectra of biomolecule solutions, we can conclude that these bands indicate a higher concentration of cysteine in the tumorous bladder tissue.¹²³ In the biomolecule solutions spectrum, guanine exhibits a prominent band at 660 cm⁻¹, but other guanine-related bands at 1600 cm⁻¹ are not observed in the bladder cancer spectrum. Therefore, we cannot assert that the 660 cm⁻¹ band expressed in the bladder cancer spectrum is due to a higher concentration of guanine.

Cysteine is a non-essential amino acid crucial for protein synthesis and other metabolic functions. It is present in the composition of beta-keratin, the main protein in nails, skin, and hair. Cysteine is vital for collagen production. As a multifaceted precursor, cysteine plays a central role in cellular metabolism and contributes to the survival and proliferation of cancer cells.¹²⁴

During the study of bladder interstitial fluid using the SERS method, more intense bands were observed at 1052 cm^{-1} and 1414 cm^{-1} in the spectra of cancerous tissues. Subsequently, in the generated differential spectrum between cancerous and healthy tissues without these bands, the previously mentioned cysteine-associated band at 660 cm^{-1} became prominent (Figure 3). According to the table of biomolecule spectra conducted (Figure 13), we can observe that all investigated molecules (cysteine, tyrosine, ATF, thymine, guanine, and lactic acid) could contribute to the intensity of the cancerous spectrum band at 1052 cm^{-1} . However, unlike other molecules with low intensity at the 1052 cm^{-1} band, lactic acid solution in this position exhibited the highest intensity and lacked distinct intensity bands in different areas. As mentioned earlier, this zone could also be influenced by the cysteine, whose SERS spectrum of the solution also showed increased intensity at the 1052 cm^{-1} band. This band serves as the most prominent marker in the results of this study, and precision calculations were performed for the interval including this band, from 1020 to 1080 cm^{-1} .

Urinary acid accumulates in cancerous cells due to the mode of energy acquisition - glycolysis, where glucose is converted into the final metabolite, uric acid. Glycolysis is characteristic of cancer cells as the primary mode of energy acquisition, even under aerobic conditions. The German physiologist Otto Warburg first observed this property of cancer cells.¹²⁵ This "aerobic glycolysis" process, known as the "Warburg effect," is less efficient than the oxidative phosphorylation pathway.¹²⁶ Due to this process, the glucose requirement of cancer cells increases compared to healthy cells.

Additionally, cancer cells obtain energy from other glucose-independent energy pathways, such as glutaminolysis.¹²⁷ Aerobic glycolysis and increased glutaminolysis are collectively called "reprogrammed energy metabolism" - a phenomenon now universally recognized as a primary metabolic hallmark of cancer.¹²⁸ In both energy acquisition pathways, uric acid is produced as the final product; hence, its increased concentration in cancer cells compared to healthy ones could have been identified during our study.

Another more intense band observed in the SERS spectra of the extracellular fluid of bladder cancer tissues at 1414 cm^{-1} may be associated with higher stretching vibrations of proteins, lipids, DNA, and lactic acid

adjacent to spectral bands in the region of 1414 cm^{-1} - 1448 cm^{-1} . Intense bands in this spectral region are characteristic of lipid molecules.¹²⁹

Lipids are crucial in cellular energy storage, signal transduction, cell proliferation, and growth processes. As more energy is consumed during the uncontrolled division and growth of cancer cells, lipid metabolism is disrupted in tumor cells.¹³⁰ While most somatic cells obtain lipids from dietary sources or lipids synthesized in the liver, various cancer cells undergo de novo lipogenesis, making them more independent of externally acquired lipids.¹³¹ Due to these molecules' altered metabolism, lipid concentration can vary between healthy and cancerous cells.

Table 7. Bladder cancer SERS marker bands based on tissue and extracellular fluid sample analysis.

Wavenumber, cm^{-1}	Molecular group
660	Cysteine
1052	Lactic acid, cysteine
1414/1448	Lipids, proteins, nucleic acids

The explanatory analysis of the most distinct spectral bands was carried out based on literature data and performed in the IR spectroscopy study. In studies of bladder cancer tissues using FTIR spectroscopy, the average spectrum of normal bladder tissue was characterized by more prominent spectral bands at 1033 cm^{-1} , 1206 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} , 1282 cm^{-1} , 1317 cm^{-1} , and 1339 cm^{-1} , which according to literature sources can be attributed to collagen.^{132,133} These spectral bands indicate a higher amount of collagen in normal bladder tissue compared to tumor tissue.

Collagen is one of the constituents of the bladder's submucosa and provides tensile strength, transmitting tension from the smooth muscle cells of the bladder to the organ as it expands and stores urine.¹³⁴ The reduced amount of collagen in tumor bladder tissue may be associated with increased secretion of collagenase enzymes into the interstitial fluid of tissues and subsequent destruction of host tissues.⁶²

The spectra of tumor bladder tissue show more pronounced spectral bands at absorption values around 972 cm^{-1} , which can be attributed to vibrations of nucleic acids. Similar spectral bands in similar positions can also be attributed to vibrations of specific protein and polysaccharide group molecules. However, as the absorption values of the 972 cm^{-1} spectral band increase, the spectral band at 1082 cm^{-1} , attributed to nucleic acid vibrations, becomes more prominent in cancerous tissue. Therefore, we can conclude that these changes

in the spectra are associated with an increased amount of nucleic acids in urothelial carcinoma tissue.¹³²

Nucleic acids are of two main classes: deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA). It is known that genetic DNA mutations play a significant role in cancer development.¹³⁵ RNR is essential for gene expression, participating in transcription (copying DNA segments into RNA processes), translation (the process where information encoded in messenger RNA directs the addition of amino acids during protein synthesis), and regulating it. Research data shows that altered tumor RNR metabolism influences tumor growth and progression.¹³⁶ Additionally, there is evidence of hyperexpression of tumor-related genes in tumor tissue and higher concentrations of circulating nucleic acids in the blood of cancer patients.¹³⁷

Cancer cells typically have larger nuclei than healthy cells, and the nuclei of cells exhibit the highest concentration of nucleic acids.¹³⁸

Two other higher absorption values observed in IR spectroscopy in the study of bladder cancer tissue, at 1028 cm^{-1} and 1154 cm^{-1} , can be attributed to vibrations of glycogen. The increased absorption values of spectral bands attributed to glycogen are associated with increased glycogen content in bladder cancer tissues. Increased glycogen content is observed in certain types of tumors and is used as an energy source for cell proliferation.^{60,139}

Additionally, higher glycogen levels are observed in low-grade urothelial carcinoma tissues compared to high-grade tumor tissues. The observed inverse relationship between glycogen levels and the degree of tumor malignancy may be related to a higher proliferation rate in high-grade tumors. In certain tumors, an inverse relationship between glycogen levels and proliferation rate is observed, which may be associated with higher glycogen consumption to sustain tumor growth.⁶⁰

Table 8. Bladder cancer IR spectroscopy marker bands based on analysis of tissue samples.

Wavenumber, cm^{-1}	Molecular group
1033, 1206, 1240, 1282, 1317, 1339	Collagen
972, 1082	Nucleic acids
1028, 1154	Glycogen

The main differences in bladder washings analyzed by the SERS method were identified at vibrational bands of 852 cm^{-1} , 919 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} , and 1200 cm^{-1} . Based on literature sources, a spectral band assignment of observed

SERS bands in the bladder washing study is provided, which is presented in Table 9.

In the SERS spectra of bladder washings from cancerous samples, there is a prominent spectral band at 852 cm^{-1} , which is not present in the SERS spectra of non-cancerous bladder washings. This spectral band may be associated with tyrosine and its vibrations.^{87,140}

Tyrosine, or 4-hydroxyphenylalanine, is one of the 20 standard amino acids cells use to synthesize proteins. Tyrosine is a proteogenic amino acid and a particular amino acid due to its phenolic function. It is found in proteins that are part of signal transduction processes and acts as a receptor for phosphate groups, which are transferred with the help of protein kinases. One such protein is tyrosine kinase. The signaling pathways of tyrosine kinases typically prevent distorted proliferation or contribute to sensitivity to apoptotic stimuli. These signaling pathways in cancer cells are often genetically or epigenetically altered to give cancer cells a selective advantage and to make tyrosine kinases uncontrollably active. This results in uncontrolled cancer proliferation.¹⁴¹

Another spectral difference was observed at the vibrational band of 919 cm^{-1} , which was more intense in the spectra of cancerous washings. According to data from the literature, this difference may be associated with a higher concentration of specific proteins and glycogen in cancerous tissue.^{142,143}

The third and fourth observed differences between the intensities of vibrational bands at 1030 cm^{-1} and 1200 cm^{-1} may be related to phenylalanine vibrations.^{87,143} A low-intensity vibrational band was highlighted in the spectra of bladder cancer washings, whereas these bands were not observed in the spectra of non-cancerous bladder washings.

Phenylalanine is an essential α -amino acid. L-phenylalanine is biologically converted into L-tyrosine – those above non-essential amino acids.¹⁴⁴

Table 9. Bladder cancer SERS spectroscopy marker bands based on analysis of bladder washings samples.

Wavenumber, cm^{-1}	Molecular group
852	Tyrosine
919	Proteins, glycogen
1030, 1200	Phenylalanine

8.2. Comparing the results of spectroscopic methods

Bladder cancer tissue studies were conducted using SERS spectroscopy and IR spectroscopy. IR spectroscopy showed better sensitivity, PPV, and NPV results, while the SERS spectroscopy method demonstrated higher specificity results. The accuracy results of the methods are compared and presented in Table 10. The results are only illustrative, as two heterogeneous groups were compared.

Table 10. Comparison of precision results between Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) analysis of interstitial fluid in bladder cancer and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis of bladder cancer tissue.

	Method			
	SERS		FTIR	
	Result	95% CI	Result	95% CI
Sensitivity	85%	64 - 95%	91%	80 - 98%
Specificity	97%	84 - 100%	96%	86 - 100%
PPV	95%	75 - 99%	96%	85 - 99%
NPV	89%	77 - 95%	92%	87 - 98%

The most widely used endoscopic method for diagnosing bladder cancer is white light cystoscopy, with a sensitivity of 71 % (95 % CI, 49-93 %) and specificity of 72 % (95 % CI, 47-96 %).³⁸ The photodynamic diagnostics (PDD) method showed better sensitivity rates at 92 % (95 % CI, 80-100 %) but lower specificity at 57 % (95 % CI, 36-79 %).³⁸ Another endoscopic method of the new generation, narrow band imaging (NBI), is characterized by high sensitivity – 96 % (95 % CI = 93-98 %), but like PDD, it has low specificity – 65 % (95 % CI = 54-75 %).³⁸

Our study has shown promising results, allowing differentiation between healthy and cancerous bladder tissue under ex vivo conditions, close to the gold standard of pathological examination. Fiber optic IR spectroscopy of bladder tissues and SERS spectroscopy of interstitial bladder tissue fluid demonstrated similar sensitivity results to those reported in the literature for PDD and NBI without compromising specificity. This could lead to a less invasive diagnostic method, avoiding the need for extensive bladder resection for accurate diagnosis. Furthermore, due to the high specificity of the study, the number of pathological examinations required for patient monitoring could be reduced, thereby reducing the economic burden.

In the study part evaluating SERS spectroscopy of bladder washings, the accuracy of the study was assessed in several spectral intervals, and

ultimately, by reducing the spectral range to 900 – 1200 cm^{-1} , the following results were obtained: sensitivity of 74 % (95 % CI, 53 – 89 %), specificity of 94 % (95 % CI, 85 – 99 %). Currently, the most widely used in clinical practice for bladder washings exhibits high sensitivity for high-grade urothelial carcinoma (84 %), but sensitivity for low-grade disease is only 16 %. The specificity of the study reaches 95-100 %.³⁹ The results obtained in our study are comparable to the specificity indicators of cytological examination and almost get the sensitivity results of cytological examination in diagnosing high-grade urothelial carcinoma. According to the research data, cytological examination results depend on the specialist's experience performing bladder washings.¹⁴⁵ Standardizing the differences observed during SERS spectroscopy between bladder washings of healthy patients and those with bladder cancer and applying SERS spectroscopy research to clinical practice could help avoid the limitations caused by this human factor.

8.3. Limitations of the study

Potential shortcomings could have influenced the study results. Firstly, we could not obtain every patient's cancerous and normal bladder tissue samples. Surgeries were performed on patients suspected of having malignant bladder tumors. The surgeon macroscopically evaluated the resected tissue, with tissue that appeared pathological being considered tumor tissue and used for spectroscopic analysis. In contrast, the remaining tumor tissue was sent for routine pathological examination. After pathological examination, some tumor tissues were excluded due to the absence of cancerous tissue in the sample. Some patients exhibited diffuse bladder involvement without endoscopic signs of healthy mucosa, and we could not obtain healthy bladder tissue samples.

Secondly, despite observing average spectral differences between low and high-grade tumors in the IR spectroscopy part of the study, the spectral profiles of low and high-grade cancerous tissues share similar characteristics, making it impossible to distinguish them as separate groups. This could be explained by the study's different numbers of low and high-grade tumors. The number of high-grade tumor cases was much higher than that of low-grade tumors (34 and 13 cases, respectively), so a larger sample size of low-grade tumor cases would be beneficial for more detailed conclusions.

Thirdly, more significant spectral class differences of cancerous tissues compared to normal tissues may be related to different cancer cell differentiation. As the tumor develops, cells lose their functions and undergo

morphological changes. Thus, variations in specific component quantities may differ in individual cases depending on the tumor characteristics and progression. Meanwhile, fluctuations in normal tissue spectral classes are more minor than in cancerous tissue classes (Figure 14). Therefore, spectral differences may be influenced by individual tissue structural differences.

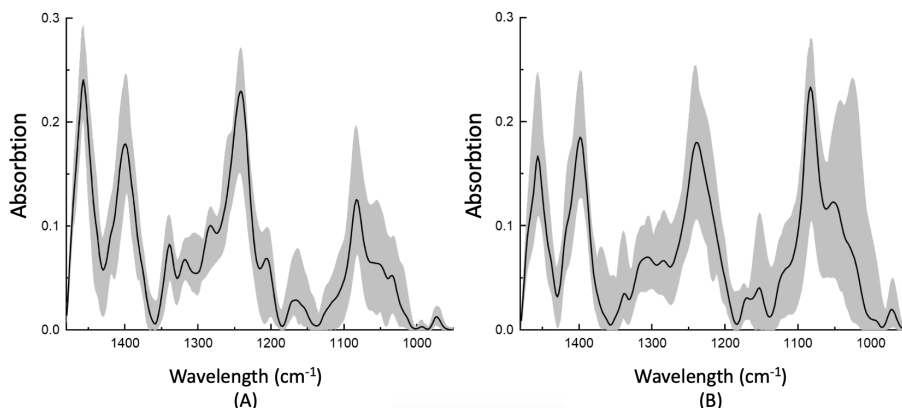


Figure 14. The average spectra (solid black line) and spectral variations (shaded area) of normal (A) and urothelial carcinoma (B) tissues were taken from different patients. The example from the IR spectroscopy part of the study is provided to explain the hypothesis of spectral variations.

Fourthly, inaccuracies in spectroscopic analysis could have been caused by the degradation of biological material during transportation from the tissue sampling site to the analysis laboratory. In this study, tissues were transported to the spectroscopic analysis laboratory the same day after bladder surgery. Specific tissue-fixing agents were not used during transportation; only a 0.9 % sodium chloride solution was used during endoscopic bladder surgeries. Although spectroscopic analysis was performed on the same day, it can be expected that some level of biological tissue degradation occurred, which could lead to inaccuracies in the study results.

Fifth, SERS spectroscopy yielded different tissue and tissue interstitial fluid results in the same patients. No significant differences were observed between healthy and cancerous bladder tissues in the tissue studies. In contrast, the interstitial tissue studies showed clear bands that could differentiate between healthy and cancerous tissues with a sensitivity of 85 % and a specificity of 97 %. The different molecular structures of the interstitial fluid and tissue can explain this difference in the success of the tests. The intracellular fluid comprises the following major protein molecules: collagen, elastin, fibronectin, laminin, tenascin, and growth factors.¹⁴⁶ In contrast, the

molecular structure of tissue preparations consists not only of the intracellular fluid but also of the cells in which the following key molecules are detected: glycogen, lipids (phospholipids, triacylglycerol, etc.), nucleic acids (DNA, RNA), various proteins and amino acids.¹⁴⁷ Thus, different molecular structures in the tissue and interstitial fluid could have led to different results.

9. CONCLUSIONS

1. SERS spectroscopy under ex vivo conditions can differentiate between extracellular fluid samples of bladder cancer and healthy bladder tissues. Spectral bands at 1052 cm^{-1} and 660 cm^{-1} exhibit higher intensity in the SERS spectra of cancerous tissue extracellular fluid than healthy mucosa. Spectral bands at 1052 cm^{-1} are linked with lactic acid and cysteine, and spectral bands at 660 cm^{-1} are linked with cysteine.
Fiber optic-based IR spectroscopy under ex vivo conditions can also differentiate between bladder cancer and healthy bladder tissues. Spectral bands at 1033 , 1206 , 1240 , 1282 , 1317 , and 1339 cm^{-1} are more intense in healthy bladder tissue spectra and are linked with collagen. Spectral bands at 972 cm^{-1} and 1082 cm^{-1} are more intense in cancerous bladder tissue and are linked to nucleic acids. Spectral bands at 1028 cm^{-1} and 1154 cm^{-1} are more intense in cancerous bladder tissue and are linked with glycogen.
2. The SERS spectroscopy method can accurately differentiate urine sediments from bladder cancer patients from healthy individuals, matching the most widely used cytological examination in clinical practice.
3. SERS spectroscopy under ex vivo conditions can differentiate between extracellular fluid samples of bladder cancer and healthy bladder tissues with 85% sensitivity and 97% specificity. Meanwhile, IR spectroscopy under ex vivo conditions can differentiate between bladder cancer and healthy bladder tissues with 91% sensitivity and 98% specificity.
4. Differences in spectral bands were detected when distinguishing samples of high-grade and low-grade urothelial carcinoma, but the sensitivity and specificity results were significantly poorer than those from histological examination.

The test's sensitivity and specificity for HGUC were 85% and 46%, respectively, while the sensitivity and specificity for LGUC were 46% and 85%, respectively.

No differences between high and low-grade urothelial carcinoma samples were found when tissues were examined using the SERS method.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo moksliniam vadovui ir mokytojui prof. dr. Arūnui Želviui už pasitikėjimą, patarimus, empatiją ir suteiktą galimybę doktorantūros studijoms.

Dėkoju fizikų komandai – prof. dr. (HP) Valdui Šablinskiui, prof. dr. Justinui Čeponkui, dr. Rimantei Bandzevičiūtei, dr. Martynui Veličkai, Edvinui Zacharovui su kuriais aktyviai bendradarbiavome visus doktorantūros metus - už profesionalumą, kantrybę tiriant biologinę medžiagą ir tai, kad pasidalinote savo didžiule patirtimi virpesinės spektroskopijos srityje. Ypač nuoširdi padėka Rimantei ir Martynui už jų patarimus ruošiant šią disertaciją.

Dėkoju visam VUL Santaros klinikų Urologijos centro kolektyvui už pagalbą atliekant šį biomedicininį tyrimą. Dėkoju kolegoms urologams, operacinės ir skyriaus slaugytojų komandai padedant surinkti biologinę medžiagą. Ypač buvusių doktorantų kabineto nariams – dr. Tomui Januškevičiui, dr. Mariui Snicoriui ir dr. Augustinui Matulevičiui už vienybę ne visada lengvoje kasdienybėje.

Dėkoju recenzentams – prof. dr. Eligijui Poškui, doc. dr. Aušvydui Patašiui, dr. Martynui Talaikiui – už laiką, skirtą disertacijos peržiūrai, ir vertingas pastabas.

Dėkoju visiems tiriamiesiems, kurie pasitikėjo ir sutiko dalyvauti šiame tyrime.

Galiausiai, visa širdimi dėkoju savo žmonai Silvijai – už kantrybę, palaikymą ir visas nuostabias akimirkas, kurias patyrėme ir kurių, pažadu, dar bus.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Straipsniai disertacijos tema:

1. E. Zacharovas, M. Velička, **G. Platkevičius**, A. Čekauskas, A. Želvys, G. Niaura, V. Šablinskas. Toward a SERS Diagnostic Tool for Discrimination between Cancerous and Normal Bladder Tissues via Analysis of the Extracellular Fluid. *ACS Omega*. 2022 Mar 17;7(12):10539-10549. doi: 10.1021/acsomega.2c00058.
2. R. Bandzevičiūtė R, **G. Platkevičius**, J. Čeponkus, A. Želvys, A. Čekauskas, V. Šablinskas. Differentiation of Urothelial Carcinoma and Normal Bladder Tissues by Means of Fiber-Based ATR IR Spectroscopy. *Cancers (Basel)*. 2023 Jan 13;15(2):499. doi: 10.3390/cancers15020499. PMID: 36672447; PMCID: PMC9857111.

Kiti straipsniai publikuoti doktorantūros metais:

1. M. Anglickis, **G. Platkevičius**, R. Stulpinas, L. Miklyčiūtė, G. Anglickienė, V. Keina, E. Štarolis, A. Gradauskas. Giant prostatic hyperplasia and its causes. *Acta Med Litu*. 2019;26(4):237-243. doi: 10.6001/actamedica.v26i4.4209.
2. Vėželis, **G. Platkevičius**, M. Kinčius, I. Naruševičiūtė, A. Ulys, F. Jankevičius. Prostate 3D ultrasound-guided imaging device (HistoScanning) performance detecting clinically significant prostate cancer. *J BUON*. 2020 Jan-Feb;25(1):460-463;
3. A. Vėželis, **G. Platkevičius**, M. Kinčius, L. Gumbys, I. Naruševičiūtė, R. Briedienė, D. Petroška, A. Ulys, F. Jankevičius. Systematic and MRI-Cognitive Targeted Transperineal Prostate Biopsy Accuracy in Detecting Clinically Significant Prostate Cancer after Previous Negative Biopsy and Persisting Suspicion of Malignancy. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Jan 10;57(1):57. doi: 10.3390/medicina57010057.
4. M. Snicorius, A. Bakavičius, A. Čekauskas, M. Miglinas, **G. Platkevičius**, A. Želvys. Factors influencing extracorporeal shock wave lithotripsy efficiency for optimal patient selection. *Wideochir Inne Tech Maloinwazyjne*. 2021 Jun;16(2):409-416. doi: 10.5114/wiitm.2021.103915.

Pranešimai disertacijos tema:

1. **G. Platkevičius**, E. Zacharovas, M. Velička, Čekauskas A., Želvys A., Niaura G., Šablinskas V. SERS spectroscopy to discriminate between bladder cancer tissue and urothelium. EAU21 - 36th Annual EAU Congress. 2021 liepos 11d. (Kongresas vyko nuotoliniu būdu).
2. **G. Platkevičius**, R. Bandzevičiūtė, J. Čeponkus, A. Čekauskas, A. Želvys, V. Šablinskas. Ex vivo analysis of bladder urothelium and bladder cancer tissues by means of fiber based attenuated total reflection infrared spectroscopy. 7th Baltic meeting in conjunction with the EAU. 2022 gegužės 27 - 28 d., Vilnius (Lietuva)
3. **G. Platkevičius**, J. Čeponkus, D. Grasyte, S. Adomavičiūtė-Gabrusovė, A. Čekauskas, V. Šablinskas, A. Želvys. Bladder tumor detection using SERS study of bladder washout. 8th Baltic meeting in conjunction with the EAU. 2023 gegužės 26 - 27, Ryga (Latvija) (*Antrosios vietos „Berlin Chemie Award“ apdovanojimas geriausio pranešimo*)
4. R. Bandzevičiūtė, **G. Platkevičius**, J. Čeponkus, G. Mickūnaitė, A. Čekauskas, A. Želvys, V. Šablinskas, Detection of Malignant Human Bladder Tissue by Means of Fiber Based ATR IR Spectroscopy, Open Readings 64, Vilnius, Lithuania, 2021.
5. R. Bandzevičiūtė, J. Čeponkus, C. Teske, K. Liedel, **G. Platkevičius**, A. Želvys, V. Šablinskas, G. Steiner, Application of Fiber-based FT- IR ATR Spectroscopy for Tissue Diagnostics During Oncological Surgery, 3rd Baltic Biophysics Conference, Vilnius, Lithuania, 2022.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 20 egz.