

Vilniaus universitetas  
Fizikos fakultetas  
Cheminės fizikos institutas

Rimantė Bandzevičiūtė

PAŽEISTOJO VISIŠKOJO VIDAUS ATSPINDŽIO INFRARAUDONOSIOS  
SPEKTROSKOPIJOS METODU PAGRĮSTA AUTOMATINĖ INKSTŲ NAVIKŲ  
ATPAŽINIMO SISTEMA

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Aplinkos ir cheminės fizikos studijų programa

Studentas

Rimantė Bandzevičiūtė

Leista ginti

2018-05-23

Darbo vadovas

doc. dr. Vidita Urbonienė

Instituto direktorius

prof. dr. (HP) Valdas Šablinskas

Vilnius 2018

## Turinys

<b>ĮVADAS</b> .....	<b>4</b>
<b>1. Literatūros apžvalga</b> .....	<b>5</b>
1.1. Inkstų vėžys.....	5
1.2. Infraraudonosios spektrometrijos taikymas biologinių audinių tyrimams.....	6
1.3. Ankstesnio tyrimo apžvalga .....	10
1.4. Kokybinė spektrinė analizė .....	13
1.5. Diagnostinio metodo patikimumo įvertinimas.....	15
<b>2. Eksperimentinė dalis</b> .....	<b>18</b>
2.1. Bandinių paruošimas ir spektrų registravimas .....	18
2.1.1. Žmogaus inkstų normalaus ir navikinio audinių bandinių paruošimas ir spektrų registravimas spektrometru „ALPHA“ .....	18
2.1.2. Kiaulės skirtingų organų audinių tarpląstelinės medžiagos <i>ATR IR</i> sugerties spektrų registravimas .....	19
2.1.3. Žmogaus pirštų odos <i>ATR IR</i> sugerties spektrų registravimas .....	20
2.1.4. Glikogeno tirpalų įvairiose terpėse paruošimas ir spektrų registravimas .....	20
2.1.5. Žmogaus inkstų normalaus ir navikinio audinių bandinių paruošimas ir spektrų registravimas šviesolaidine spektrine sistema .....	20
2.2. Tyrimo rezultatų analizė.....	21
2.2.1. Glikogeno tirpalo įvairiose terpėse spektrinių pokyčių tyrimo analizė.....	21
2.2.2. Audinių automatinės atpažinimo sistemos kūrimas .....	23
2.2.2.1. Integrinių intensyvumų santykių analizė .....	23
2.2.2.2. Programos, kurios veikimas remiasi spektrinių juostų skaičiaus nustatymu 1200 - 950 cm <sup>-1</sup> intervale, kūrimas.....	26
2.2.2.2.1. Audinio atpažinimo tikslumo įvertinimas.....	28
2.2.2.3. Spektrų bibliotekų sukūrimas bei spektrų paieškos bibliotekoje atlikimas .....	30
2.2.2.4. Automatinio audinių atpažinimo programos, kurios veikimas remiasi spektrų palyginimu bibliotekoje, kūrimas .....	34
2.2.2.4.1. Audinio atpažinimo tikslumo įvertinimas.....	36
2.2.2.5. Skirtingi inkstų susirgimų tipai ir jų tinkamumas automatinei audinių analizei .....	37
2.2.2.6. Skirtingų organų bei atskirų inksto sričių audinių tarpląstelinės medžiagos <i>ATR IR</i> sugerties spektrų tinkamumas automatinei analizei.....	38
2.2.2.7. Metodo tinkamumas žmogaus pirštų odos <i>ATR IR</i> sugerties spektrų identifikavimui .....	42

2.2.2.8. Automatinės audinių atpažinimo sistemos pritaikymas <i>in situ</i> inkstų navikinių audinių diagnostikai .....	43
2.2.3. Skirtingų analizės metodų palyginimas ir rezultatų aptarimas.....	45
<b>Pagrindiniai rezultatai ir išvados .....</b>	<b>48</b>
<b>Literatūros šaltinių sąrašas .....</b>	<b>49</b>
<b>Summary .....</b>	<b>54</b>
<b>Santrauka .....</b>	<b>56</b>
<b>PRIEDAI .....</b>	<b>58</b>
1 priedas <i>Spektrinių juostų padėtys ir jas atitinkantys molekulių virpesiai.....</i>	59
2 priedas <i>Glikogeną ir baltymų Amidas I grupę atitinkančių sugerties juostų integrinių intensyvumų santykių skaičiavimo rezultatai.....</i>	60
3 priedas <i>Programos, kurios veikimas remiasi spektrinių juostų skaičiaus nustatymu 1200 cm<sup>-1</sup> - 950 cm<sup>-1</sup> intervale, kodas .....</i>	64
4 priedas <i>Programos, kurios veikimas remiasi spektrinių juostų skaičiaus nustatymu 1200 cm<sup>-1</sup> - 950 cm<sup>-1</sup> intervale, blokinė schema.....</i>	66
5 priedas <i>Paieškos spektrų bibliotekoje atlikimas .....</i>	67
6 priedas <i>Paieškos spektrų bibliotekose rezultatai .....</i>	69
7 priedas <i>Audinio tarpląstelinės medžiagos ATR IR sugerties spektrai kintant laikui .....</i>	70
8 priedas <i>ATR IR sugerties spektrai, patalpinti spektrų bibliotekoje .....</i>	71
9 priedas <i>Programos, kurios veikimas remiasi spektrų palyginimu bibliotekoje, kodas .....</i>	72
10 priedas <i>Programos, kurios veikimas remiasi spektrų palyginimu bibliotekoje, blokinė schema .....</i>	75
11 priedas <i>Kiaulės inkstų audinio tyrimas.....</i>	76
12 priedas <i>Programos, galinčios klasifikuoti audinius į 3 grupes, blokinė schema.....</i>	77

## IVADAS

Vėžys yra viena vyraujančių mirties priežasčių pasaulyje. Kasmet užregistruojama vis daugiau susirgimų piktybiniais navikais atvejų [1-2]. Vienas svarbiausių veiksnių, lemiančių tolimesnę paciento ligos prognozę, recidyvo tikimybę bei sėkmingą ligos gydymą, - tikslios ribos tarp naviko ir sveiko audinio nustatymas chirurginės operacijos metu. Neretai operacijos metu ši riba vizualiai sunkiai nustatoma, todėl ieškoma naujų intraoperatyvių diagnostikos būdų, kurie neprailgintų operacijos ir anestezės laiko bei garantuotų tikslų ir patikimą rezultatą.

Siekiant surasti naujų metodų, leidžiančių diferencijuoti normalų ir piktybinį audinį, sparčiai nustatyti ribą, skiriančią normalų ir patologinį audinį, atliekami moksliniai tyrimai taikant molekulių virpesinės spektrometrijos metodus įvairių žmogaus organų audiniams tirti [3-5]. Vilniaus universiteto Fizikos fakulteto mokslininkų grupės atliktais tyrimais [6-9] su žmogaus inkstų audiniais siekiama nustatyti naudojamo metodo galimybes normalaus ir navikinio audinių diferenciacijai. Šiuo metu, Vilniaus universiteto Fizikos fakulteto Cheminės fizikos instituto mokslininkams bendradarbiaujant kartu su Vilniaus universiteto ligoninės Santaros Klinikų medikais, siekiama sukurti metodiką, leidžiančią identifikuoti inkstų navikinį ir normalų audinį chirurginės operacijos metu *in vivo*. Tuo tikslu taikomas infraraudonosios spinduliuotės pažeistojo visiškojo vidaus atspindžio (angl. *Attenuated Total Reflection - ATR*) metodas inkstų audinių tarpląstelinės medžiagos tyrimui. Šio metodo taikymas audinio tarpląstelinės medžiagos tyrimui yra ypatingas tuo, jog nėra reikalingas specialus bandinio paruošimas, o audinių spektriniai duomenys gali būti gaunami operacinėje iškart po chirurginės operacijos audiniui dar nepradėjus irti. Metodikos, tinkamos *in vivo* tyrimams, sukūrimui yra kaupiama inkstų normalaus ir navikinio audinių tarpląstelinės medžiagos spektrinių duomenų bazė, kuria remiantis būtų galima atlikti automatinę spektrinę analizę.

Šio darbo tikslas – sukurti inkstų vėžinių audinių atpažinimo sistemą.

Siekiant įvykdyti šiame darbe suformuluotą tikslą, iškeliami šie uždaviniai:

1. Užregistruoti žmogaus inkstų normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrus ir tokiu būdu papildyti spektrų duomenų bazę.
2. Atlikti kokybinę spektrinę analizę ir nustatyti spektrinius požymius bei metodus, tinkamus audinių atpažinimo sistemai.
3. Įvertinti skirtingų spektrų atpažinimo metodų tikslumą.
4. Įvertinti sistemos pritaikymo galimybes *in situ* audinių diagnostikai.

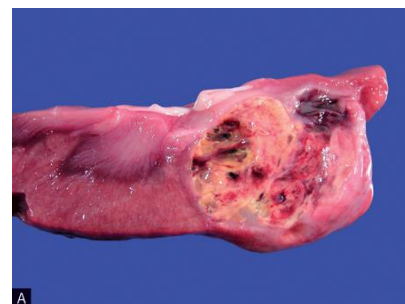
## 1. Literatūros apžvalga

### 1.1. Inkstų vėžys

Inkstų vėžys yra septinta pagal dažnumą diagnozuojama vėžio rūšis pasaulyje, 2012 m. inkstų vėžys sudarė 3,3 % visų diagnozuojamų piktybinių susirgimų atvejų [10]. Lietuvoje inkstų vėžys diagnozuojamas itin dažnai – Lietuva yra antra pasaulyje valstybė pagal šio susirgimo atvejų dažnumą [11].

Kaip ir kitos vėžio rūšys, inkstų vėžys atsiranda dėl nekontroliuojamo ląstelių dalijimosi. Navikas formuojasi normaliose ląstelėse atsiradus genetinėms mutacijoms, kurios lemia ląstelių proliferacijos (dauginimosi) paspartėjimą, žemą diferenciacijos laipsnį, invazyvumą bei naujo kraujagyslių tinklo susidarymą [12]. Remiantis Pasaulio sveikatos organizacija (angl. *World Health Organization* – *WHO*), inksto navikai klasifikuojami į dešimt tipų, iš kurių dažniausiai diagnozuojama inksto ląstelių karcinoma (angl. *renal cell carcinoma*) (diagnozuojama apie 90 % pacientų). Šis tipas skirstomas į daugiau nei dešimt potipių, iš kurių dažniausiai pasitaikantis yra šviesiųjų inksto ląstelių karcinoma (angl. *clear cell renal cell carcinoma*), sudaranti apie 70 % diagnozuojamų inksto ląstelių karcinomos atvejų bei nulemianti daugiausia mirčių, linkusi metastazuoti į įvairias organizmo vietas. Šio susirgimo pavadinimas kilęs dėl šviesios navikinių ląstelių išvaizdos atliekant histologinius audinio tyrimus. Šviesią, skaidrią spalvą lemia citoplazmoje susikaupęs glikogenas bei lipidai, neleidžiantys ląstelei nusidažyti histologiniuose tyrimuose naudojamu dažu eosinu. Dėl susikaupusio glikogeno ir lipidų, apimančių cholesterolį, natūralius lipidus bei fosfolipidus, atliekant makroskopinę analizę, naviko pjūvio paviršius yra geltonas, jam būdingas vaskuliarizuotumas, hemoraginės, nekrotinės, cistinės sritys (1 pav.). Kiti dažniausiai diagnozuojami piktybiniai inkstų navikai - tranzitinių ląstelių karcinoma, nefroblastoma, inksto sarkoma, papildinių ląstelių karcinoma, chromofobinė karcinoma bei nepiktybiniai navikai – inksto adenoma, onkocitoma bei angiomiolipoma [13-17].

Dažniausiai taikomas inkstų navikų gydymo būdas – chirurginė operacija, kurios metu pašalinami naviko pažeisti audiniai. Priklausomai nuo naviko dydžio, išplitimo organe, gali būti atliekama nefrektomija – pašalinamas visas naviko pažeistas inkstas, arba rezekcija – pašalinamas navikas su aplink esančio normalaus audinio atsarga tam, kad būtų įsitikinta, jog pašalintas visas piktybinis audinys. Atliekant operaciją stengiamasi išsaugoti kuo daugiau normalaus audinio siekiant užtikrinti kuo įmanoma geresnį organo funkcionavimą, tačiau nepaliekant teigiamų naviko kraštų.



1 pav. Šviesiųjų inksto ląstelių karcinomos navikas (adaptuota pagal [17])

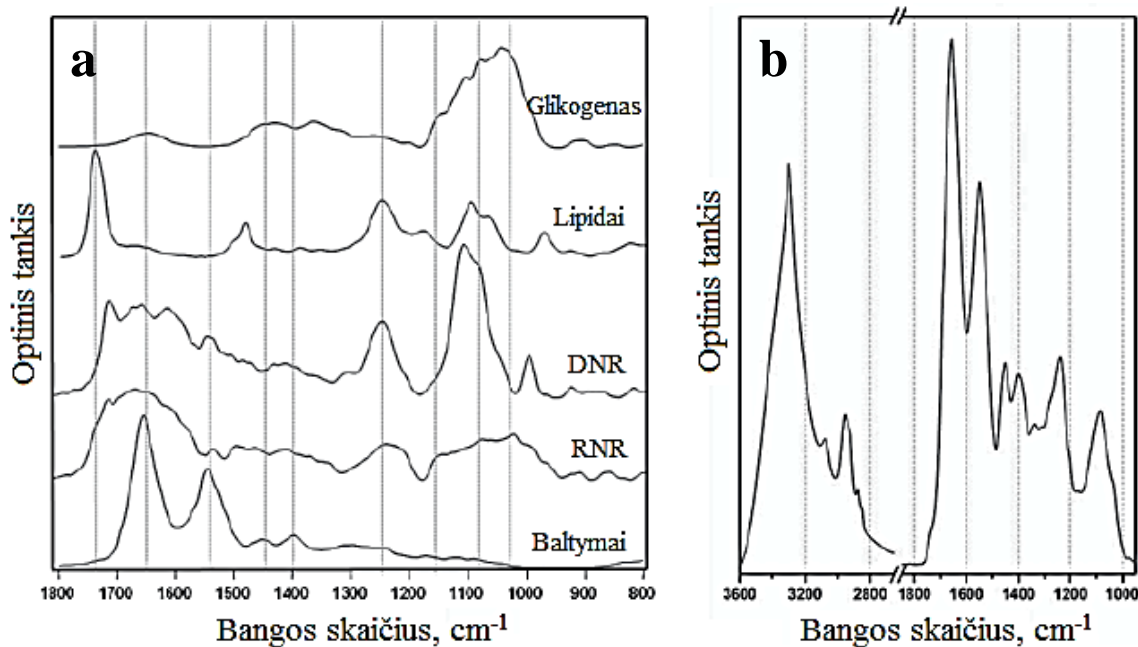
Likusios piktybinės ląstelės gali lemti ligos recidyvavimą ateityje, todėl siekiant sumažinti ligos atsinaujinimo riziką labai svarbu nustatyti tikslią ribą tarp normalaus ir piktybinio audinio operacijos metu. Vizualiai ši riba ne visuomet lengvai nustatoma, todėl gali būti atliekamas skubus intraoperacinis histologinis tyrimas – užšaldytų pjūvių ištyrimas (angl. *frozen section examination*). Atliekant šį tyrimą, operacijos metu paimti bandiniai yra užšaldomi, supjaustomi, nudažomi histologiniuose tyrimuose naudojamais dažais hematoksinu ir eosinu bei tiriami mikroskopu. Šis tyrimo metodas turi nemažai trūkumų. Vienas jų – tyrimo trukmė. Tyrimo metu atliekamas bandinio šaldymas, dažymas, transportavimas, analizė gali užtrukti apie trisdešimt minučių, kai kuriais atvejais tyrimas kartojamas. Tokiu būdu prailgėja operacijos bei anestezės laikas, inksto išemijos (siekiant sumažinti kraujavimą operacijos metu gali būti atliekamas organo kraujagyslių užspaudimas) trukmė. Išemijos trukmė labai reikšminga tolesniam organo funkcionavimui, kiekviena minutė laikant inkstą išemiškai yra svarbi - gali nulemti suprastėjusią inksto veiklą ateityje. Tyrimas atliekamas išpjaunant dalį organo audinio, kas gali padidinti organo pažeidimų riziką. Taip pat, šio tyrimo metodo tikslumas yra ribojamas tam tikrų veiksnių – gydytojo patologo patirties, bandinio kokybės ir dydžio. Ne visais atvejais šio tyrimo rezultatas yra patikimas – atlikus auksiniu standartu laikomą histologinį audinio ištyrimą po operacijos, galimi abiejų tyrimo metodų rezultatų neatitikimai [14, 18-21]. Todėl siekiant patikimo bei skubaus, neprailginančio chirurginės operacijos trukmės audinių diagnozavimo, yra ieškoma naujų tyrimo metodų.

## **1.2. Infraraudonosios spektrometrijos taikymas biologinių audinių tyrimams**

Infraraudonosios spektrometrijos metodai pasižymi selektyvumu – kiekviena *IR* spektre aktyvi molekulė turi savo branduolių virpesių dažnių rinkinį, būdingas spektrines juostas infraraudonosios sugerties spektruose, kuriomis remiantis galima nustatyti bandinį sudarančius komponentus. Žmogaus, kaip ir visų gyvų organizmų, ląstelės ir audiniai yra sudaryti iš keturių pagrindinių molekulių grupių: baltymų, nukleorūgščių, lipidų ir angliavandenių [22, 23]. Kiekviena ši molekulių grupė turi būdingus spektrus, šių komponentų *IR* sugerties spektrų pavyzdžiai pateikiami 2 a pav.

Biologinis audinys yra kompleksinis junginys, jame medžiagos yra pasiskirsčiusios tam tikromis proporcijomis, kurios yra būdingos tik tam tikro audinio tipui (tipinis biologinio audinio *IR* sugerties spektro pavyzdys pateikiamas 2 b pav.). Esant įvairiems susirgimams, tarp jų ir vėžiui, dėl pakitusių metabolinių procesų ląstelėse, audiniuose atsiranda įvairūs biocheminiai pakitimai, sutrinka įprasta tam audiniui cheminių medžiagų pusiausvyra. Pakitusi audinio sudėtis bei medžiagų kiekis jame atsispindi ir infraraudonosios sugerties spektruose – pakinta spektrinių juostų padėtis, intensyvumas, būdingas naujų spektrinių juostų atsiradimas. Remiantis spektriniais požymiais galima nustatyti biologinio audinio komponentų biocheminius pakitimus molekuliniam

lygmenyje, todėl taikant infraraudonosios spektrometrijos metodus siekiama atpažinti vėžinius audinius. Daugeliu atvejų biologinių audinių *IR* sugerties spektrai yra labai sudėtingi, tačiau atliekant audinių spektrų palyginimą ieškoma spektrinių žymenų, galinčių leisti atskirti navikinius audinius nuo normalių audinių ir ateityje tai pritaikyti vėžinių audinių diagnostikai [24-26].

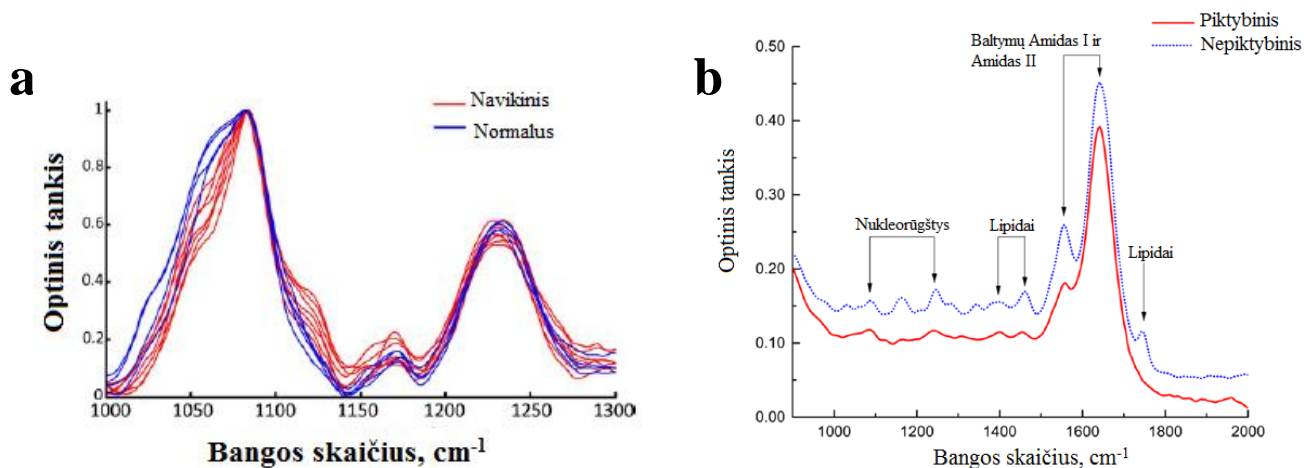


2 pav. a- baltymų, nukleorūgščių, lipidų ir angliavandenių *IR* sugerties spektrai, b – tipinis biologinio audinio *IR* sugerties spektras (adaptuota pagal [22]).

Pastaruosiu metu atliekama nemažai tyrimų taikant virpesinės spektrometrijos metodus įvairių žmogaus audinių vėžio formų identifikavimui. Infraraudonosios spektrometrijos metodai taikomi įvairių žmogaus organų (plaučių [27-29], smegenų [30-32], gaubtinės žarnos [33-34], inkstų [6-9], krūties [18, 35], skrandžio [36, 37], prostatos [38-41] ir kitų organų) vėžio tyrimams. Šių tyrimų rezultatai leido sėkmingai identifikuoti vėžinius audinius, tačiau bandiniams reikalingas tam tikras paruošimas, kuris priklauso nuo bandinio tipo (užaugintos ląstelės, operacijos metu pašalinti audiniai ar išskirti biologiniai skysčiai), laiko trukmės tarp bandinio paėmimo ir eksperimento atlikimo (neretai eksperimentas atliekamas praėjus kiek laiko po audinio pašalinimo, todėl bandinys turi būti apdorojamas siekiant apsaugoti nuo sugedimo). Įvairių autorių darbuose medžiaga tyrimui yra specialiai paruošiama, neretai bandinių paruošimas yra sudėtingas bei užimantis nemažai laiko.

Tyrimus atliekant su vėžinėmis ląstelėmis, šios gali būti paimamos iš organizmo biopsijos metu arba užauginamos laboratorijoje. Tiriant melanomos metastazes limfmazgiuose [3], paėmus audinio mėginio biopsiją, bandinys fiksuojamas formalinu ir parafinu, tačiau prieš registruojant *IR* sugerties spektrus parafinas iš bandinių pašalinamas. Šio tyrimo metu sėkmingai identifikuotos melanomos metastazes sudarančios ląstelės: eritrocitai, melanomos, T ir B imuninės bei jungiamojo ir endotelio audinio ląstelės.

Daugiausia tyrimų atliekama su audiniais, kurie spektrometriniams tyrimams įvairių autorių darbuose paruošiami skirtingai (gali būti užšaldomi, fiksuojami formalinu ir parafinu ar taikant kitus metodus). Pavyzdžiui, smegenų navikų tyrimams [30] panaudoti formalinu ir parafinu fiksuoti bandiniai, prieš spektrų registravimą pašalinant parafiną. Pritaikius *ATR* metodą, identifikuotas normalus bei skirtingų navikų (meningiomas, gliomos, metastazinių navikų) audinys. Formalinu ir parafinu fiksuoti audiniai panaudoti ir tiriant kiaušidžių vėžio atvejus – taikant *ATR* metodą identifikuoti gerybinių bei epitelinės karcinomos navikų atvejai [5] bei taikant *IR* pralaidumo metodą atskirtos skirtingos krūties naviką sudarančios ląstelių rūšys (fibroblastai, imuninės bei naviko epitelio ląstelės) [35]. *IR* sugerties metodu sėkmingai nustatytas skrandžio vėžinis audinys, prieš tyrimą audinio mėginį nuplaunant distiliuotu vandeniu [37], *ATR* metodu identifikuotas normalus ir vėžinis plaučių audinys bandinius užšaldant skystu azotu [28]. Infraraudonosios spektrometrijos metodai taikomi ne tik minkštųjų audinių tyrimams, tačiau ir diagnozuojant metastazes kauliniame audinyje [42]. Krūties vėžio metastazių kauluose bandiniai paimti chirurginės operacijos metu. Aktyviosios kaulinės medžiagos bandiniai paruošiami įmerkiant juos į vandenilio peroksido tirpalą ir acetoną, tokiu būdu sumažinant riebalinio audinio ir kraujo chromoforų kiekį šviežiame kauliniame audinyje. Taip paruošus mėginį ir ištyrus jį *ATR* metodu, sėkmingai identifikuotas sveikas bei metastazių pažeistas kaulinis audinys. Smegenų glioblastomos ir normalaus audinių bei krūties piktybinio ir nepiktybinio audinių *ATR IR* sugerties spektrai pateikiami 3 pav.

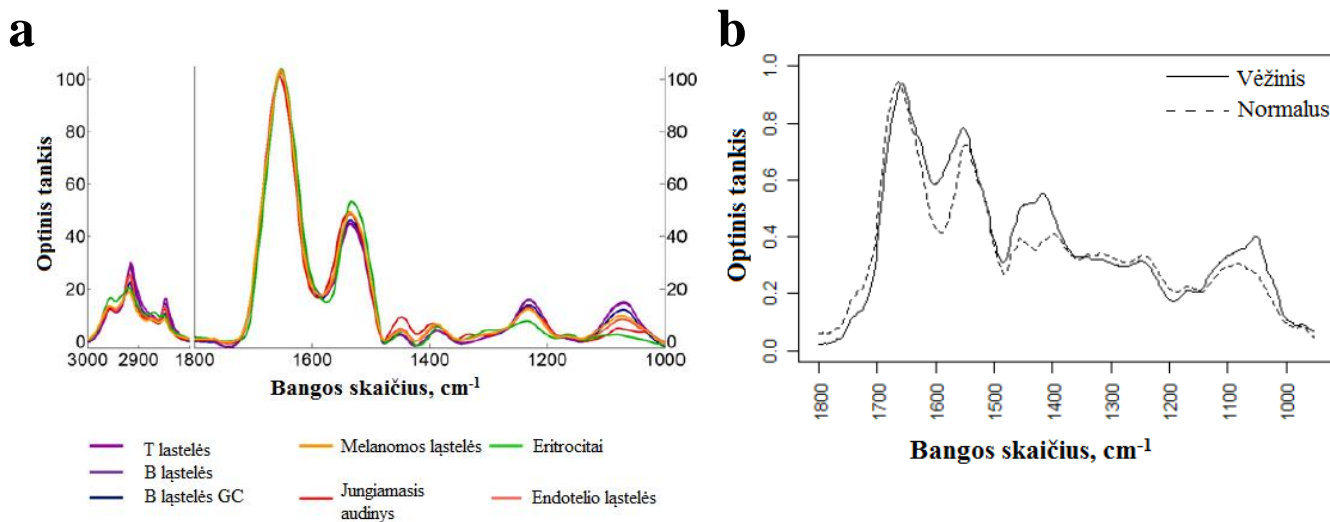


3 pav. a - smegenų glioblastomos ir normalaus audinio (adaptuota pagal [32]), b - žmogaus krūties piktybinio ir nepiktybinio audinių (adaptuota pagal [18]) *ATR IR* sugerties spektrai.

*IR* spektrometriniai tyrimai atliekami ir su biologiniais skysčiais. Biologiniai skysčiai – tai organizmo išskiriami skysčiai, tokie kaip kraujas, serumas, seilės, šlapimas, ašaros, tarpląstelinis skystis ir kiti. Šie skysčiai išskiriami skirtinguose audiniuose, atlieka skirtingas funkcijas, todėl jų sudėtis labai varijuoja. Esant tam tikriems susirgimams, skysčio cheminė sudėtis pakinta, atsiranda



specifinių žymenų [29, 43-44]. Vienas sėkmingų tyrimų – plaučių vėžio nustatymas iš seilių [29]. Seilių bandiniai paruošti juos užšaldant iki  $-80^{\circ}\text{C}$ , vėliau atšildant kambario temperatūroje, nuo gleivių atskiriant ląsteles. Tyrimai atliekami ir su krauju – paėmus periferinio kraujo bandinį ir paruošus atskirtų kraujyje esančių ląstelių bei kraujo plazmos mėginius, abiem atvejais *ATR* metodu nustatyti piktybinio susirgimo ir sveiko audinio atvejai [45]. Žmogaus seilių sergant ir nesergant plaučių vėžiu bei žmogaus melanomos metastazes sudarančių skirtingų ląstelių *IR* sugerties spektrai pateikiami 4 pav.



4 pav. a - žmogaus melanomos metazes sudarančių skirtingų ląstelių (adaptuota pagal [3]), b - žmogaus seilių sergant ir nesergant plaučių vėžiu (adaptuota pagal [29]) *IR* sugerties spektrai.

Apžvelgus įvairių autorių darbus, apibendrintai galima teigti, jog infraraudonosios spektrometrijos metodai yra tinkami vėžio identifikavimui juos taikant skirtingiems bandiniams: atskiroms ląstelėms, audiniams, biologiniams skysčiams. Metodas tinkamas tiek pirminio židininio naviko, tiek metastazinių navikų atpažinimui. Tačiau šie tyrimai paprastai atliekami tik mokslinėse laboratorijose, o jų priartinimas prie klinikinių tyrimų *in vivo* turi tam tikrų kliūčių. Atliekant spektrometrinius tyrimus, prietaisai paprastai yra sąlyginai dideli, juos sudėtinga turėti operacinėje, o bandinys turi būti patalpinamas į specialų bandinių skyrių, kas lemia bandinio pažeidimą ir riboja eksperimento atlikimą *in vivo*. Kita kliūtis – bandinio apdorojimo trukmė. Siekiant spektrometrinius tyrimo metodus taikyti audinių diagnostikai chirurginės operacijos metu, bandinių paruošimas turi būti labai greitas. Vilniaus universiteto Fizikos fakulteto Cheminės fizikos instituto mokslininkų grupė atlieka tyrimus taikant infraraudonosios spektrometrijos metodus žmogaus inkstų vėžinių audinių identifikavimui, tiriant inkstų audinio tarpląstelinę medžiagą *ATR* metodu [8]. Atliekant tyrimą, specialus bandinio paruošimas nereikalingas, pakanka tik prispausti ir atitraukti bandinį nuo *ATR* kristalo, ant kurio lieka tarpląstelinio skysčio, pavienių ląstelių mišinys, o *ATR IR* sugerties spektro registravimas užtrunka vos kelias minutes. Vykstant medžiagų apykaitos procesams

ląstelėse, metabolinių procesų metu išsiskyrusios medžiagos, ląstelių sekretuojami junginiai patenka į tarpląstelinį skystį; bandinio plovimo metu atsiskyrusios pavienės ląstelės, sužalotų ląstelių turinys taip pat atsiduria tarpląsteliniam skystyje, tokiu būdu tarpląstelinė medžiaga suteikia cheminę informaciją apie audinį, kuri stebima infraraudonosios sugerties spektruose. Todėl taikomas metodas audinio tarpląstelinės medžiagos tyrimui yra daug žadantis priartinant *IR* spektrometrijos taikymą *in situ* ar *in vivo* diagnostikoje.

Siekiant spektrometrinius tyrimus priartinti prie klinikinių tyrimų *in vivo*, yra reikalinga automatinė audinių atpažinimo sistema su specialia spektrometrine bei programine įranga. Tyrimo metu turi būti užregistruojamas dominančios audinio srities *IR* sugerties spektras ir iškart atliekama analizė, kuri pateiktų greitą ir patikimą rezultatą. Įrangos naudojimas turi būti paprastas tam, kad chirurginės operacijos metu nereikalautų papildomo laiko ir neprailgintų operacijos trukmės, gydytojams bei kitam medicinos personalui nebūtų būtinos specifinės su spektrometrija susijusios žinios.

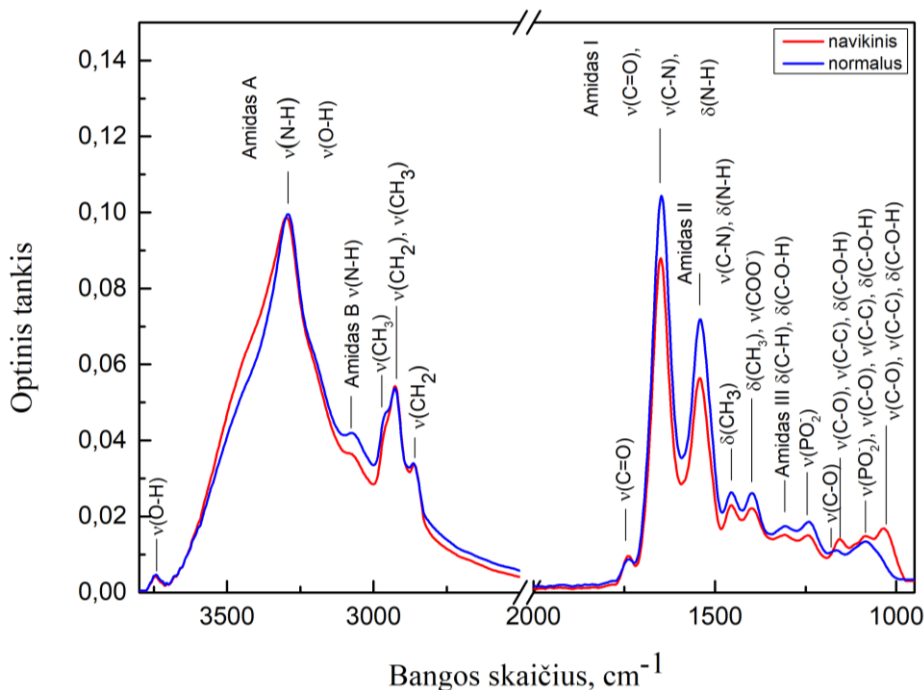
### 1.3. Ankstesnio tyrimo apžvalga

Siekiant sukurti audinių atpažinimo sistemą, galinčią automatiškai identifikuoti normalų ir piktybinį audinį, yra labai svarbu suprasti bei parinkti tinkamus analizei spektrinius požymius. Šiame mokslo tiriamajame darbe toliau tęsiami pagrindinių studijų baigiamojo darbo [46] rengimo metu pradėti tyrimai, panaudojami svarbiausi rezultatai. Todėl šiame skyrelyje glaustai apžvelgiami minėto darbo metu gauti pagrindiniai rezultatai bei svarbiausi tyrimo etapai.

Pagrindinių studijų baigiamojo darbo metu atlikta 45 pacientų normalaus ir navikinio žmogaus inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų analizė. Analizuojamų spektrų registravimo periodas apima laikotarpį nuo 2015 m. rugsėjo 8 d. iki 2016 m. balandžio 12 d. Spektrai registruojami operaciniame bloke iškart po chirurginės operacijos, iš pašalinto normalaus ir navikinio audinio atpjaunant nedidelį gabalėlį bandiniams (plačiau apie bandinių paruošimą žiūrėti 2.1.1. skyrelyje). Kiekvieno paciento atveju registruojama po du spektrus: normalaus ir navikinio audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai. [46].

**Svarbiausi spektriniai skirtumai tarp normalaus ir navikinio audinių tarpląstelinės medžiagos spektrų.** Siekiant nustatyti reikšmingiausius spektrinius skirtumus tarp normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų, apskaičiuoti visų užregistruotų ir tinkamų analizei normalaus ir piktybinio audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų vidurkiai. Šie spektrai analizuojami bei nustatomos spektrinių juostų padėty, jas atitinkantys molekulių virpesiai. Prieš atliekant analizę, naudojantis programiniu paketu „Opus“ normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrams atliktas 25

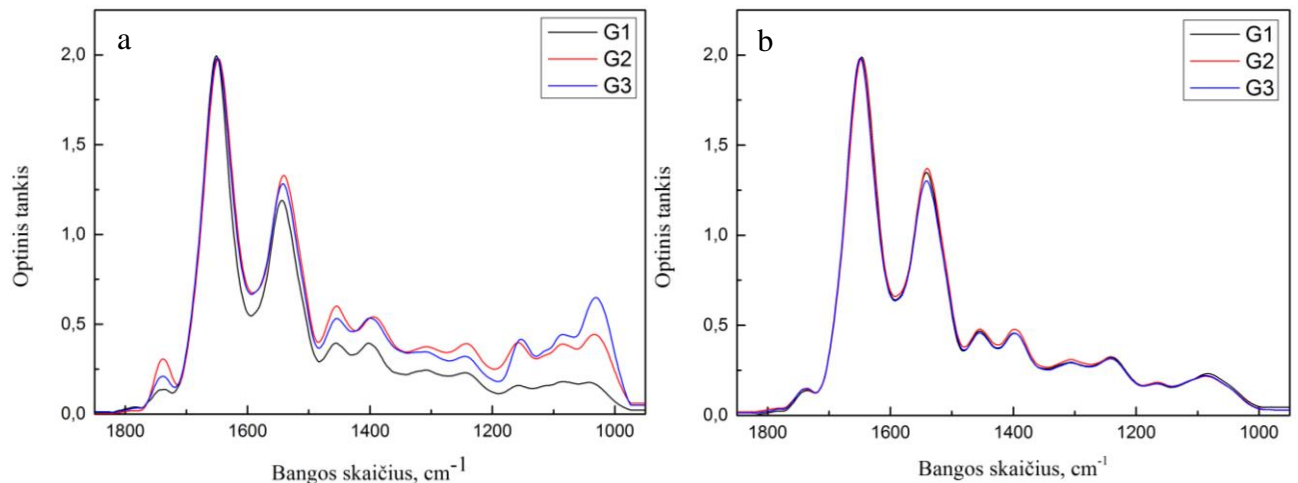
taškų glotninimas, bazinės linijos korekcija bei vektorinis normavimas tam, kad būtų lengviau palyginti spektrus. Svarbiausias spektrines juostas atitinkantys cheminių grupių virpesiai normalaus ir navikinio audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* spektruose pateikiami 5 pav., o spektrinių juostų padėtys bei jas atitinkantys virpesiai – 1 priedo 1 lentelėje.



5 pav. Inkstų normalaus (mėlyna linija) ir navikinio (raudona linija) audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai (adaptuota pagal [46]).

Iš normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos spektrų matyti, jog ryškiausi spektriniai skirtumai pastebimi srityje nuo  $1200\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$ . Šioje srityje normalaus audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrams būdingos dvi spektrinės juostos, esančios ties  $1165\text{ cm}^{-1}$  ir  $1085\text{ cm}^{-1}$  bangos skaičiais. Juosta, esanti ties  $1165\text{ cm}^{-1}$  atitinka baltymų ir angliavandenių  $\nu(\text{C-O})$  virpesius, o juosta esanti ties  $1085\text{ cm}^{-1}$  – nukleorūgščių  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$  ir glikogeno  $\nu(\text{C-O})$ ,  $\nu(\text{C-C})$  bei  $\delta(\text{C-O-H})$  virpesius. Tuo tarpu navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektras (srityje nuo  $1200\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$ ) turi tris būdingas juostas, esančias ties  $1156\text{ cm}^{-1}$ ,  $1085\text{ cm}^{-1}$  bei  $1035\text{ cm}^{-1}$  bangos skaičiais. Spektrinė juosta, esanti ties  $1156\text{ cm}^{-1}$  atitinka baltymų ir angliavandenių  $\nu(\text{C-O})$ , glikogeno  $\nu(\text{C-O})$ ,  $\nu(\text{C-C})$  bei  $\delta(\text{C-O-H})$  virpesius. Juosta, esanti ties  $1085\text{ cm}^{-1}$  sutampa su normalaus audinio tarpląstelinės medžiagos spektre esančia juosta ir atitinka nukleorūgštyse esančių fosfodiesterių grupių fosfatų  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$  ir glikogeno  $\nu(\text{C-O})$ ,  $\nu(\text{C-C})$  bei  $\delta(\text{C-O-H})$  virpesius. Navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos spektre, bangos skaičių intervale nuo  $1200\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$ , glikogeną atitinkančios spektrinės

juostos tampa intensyvesnės. Kuo audinio piktybiškumo laipsnis  $G^1$  didesnis, tuo glikogeną atitinkančios spektrinės juostos yra intensyvesnės. Normalaus audinio atveju, esant skirtingiems naviko piktybiškumo laipsniams, šių juostų intensyvumas yra labai panašus. 6 pav. pateikiami suvidurkinti visų normalaus (6 pav., a) ir visų navikinio (6 pav., b) audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* spektrai esant skirtingiems naviko piktybiškumo laipsniams. Spektrai sugrupuoti į skirtingas grupes G1, G2, G3 remiantis gydytojų histologų išvadomis po chirurginės operacijos ištyrus pašalintus audinius. Spektrams atlikta bazinės linijos korekcija ir minimumo – maksimumo normavimas [46].



6 pav. a – navikinio, b- normalaus audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai, esant G1, G2, G3 navikų piktybiškumo laipsniams (adaptuota pagal [46]).

Glikogeną atitinkančių spektrinių juostų suintensyvėjimas didėjant naviko piktybiškumo laipsniui gali būti paaiškintas tuo, jog piktybėjant audiniui ir naviko augimo metu sparčiai besidalijant ląstelėms, ląstelių energijos poreikis išauga. Siekdamos apsirūpinti energija, vėžinės ląstelės citozolyje kaupia angliavandenius glikogeno (šakoto gliukozės polimero) pavidalu. Ląstelėse vienas energijos gamybos būdų – gliukozės metabolizmas. Pastebėta, jog vėžinėms ląstelėms būdingas padidėjęs gliukozės suvartojimas, ypač esant invazinėms vėžio rūšims. Didelis gliukozės suvartojimas vėžiniame audinyje gali būti siejamas tiek su sparčia ląstelių proliferacija, kai ląstelėms dalijantis reikia vis daugiau energijos, tiek su pasikeitusia naviko mikroaplinka, kuomet ląstelės prastai aprūpinamos krauju. Didėjant atstumui nuo kraujo kapiliarų, ląstelių aprūpinimas deguonimi prastėja, pakankamas deguonies kiekis pasiekia ląsteles, esančias ne toliau nei 150  $\mu\text{m}$  nuo kraujagyslės. Vėžinės ląstelės proliferuoja labai sparčiai, naviko tūris auga, todėl dalis naviko (ypač centrinė naviko sritis) nėra aprūpinama užtektinu deguonies kiekiu, o gliukozės

<sup>1</sup> Organizme ląstelės yra diferencijuotos, t. y. prisitaikiusios atlikti tam tikras funkcijas. Audiniui piktybėjant ląstelės tampa vis mažiau diferencijuotos, navikas greičiau auga, yra agresyvesnis. Pagal tai, kaip audinys yra diferencijuotas, piktybiškumo laipsniai yra skirstomi į tris grupes: **G1** – gerai diferencijuotas audinys, **G2** – vidutiniškai diferencijuotas audinys, **G3** – mažai diferencijuotas audinys.

metabolizmas vykdomas hipoksijos<sup>2</sup> sąlygomis. Gliukozės molekulė skaidoma į piruvatą, taip pagaminant 2 *ATP*<sup>3</sup> (adenosintrifosfato) molekules. Esant pakankamam deguonies kiekiui, piruvatas ląstelės mitochondrijoje oksiduojamas į CO<sub>2</sub> ir H<sub>2</sub>O, pagaminant dar 36 papildomas *ATP* molekules. Esant hipoksijos sąlygoms, piruvatas skaidomas į pieno rūgštį, kuri pernešama už ląstelės ribų. Palyginus abu procesus, kuomet gliukozės metabolizmas vyksta aerobinėmis ir anaerobinėmis sąlygomis, galima pastebėti, jog anaerobinė glikolizė yra labai neefektyvus procesas (pagaminamos tik 2 *ATP* molekulės, kai normoksijos<sup>4</sup> sąlygomis pagaminamos 38 molekulės), todėl padidėja ir gliukozės suvartojimas. Ląstelės, kaupdamos glikogeną, užsitikrina pakankamą gliukozės kiekį, kuris prireikus energijos gali būti pasiektas suskaidžius glikogeną. Esant tokiems energijos šaltiniams kaip riebiosios rūgštys, energijai išsiskirti yra reikalingas deguonis, kurio trūksta audinyje, tačiau naudojant glikogeną, ląstelių apsirūpinimui energija deguonis yra nėra būtinas [46-48].

**Spektrinių juostų padėtys normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektruose.** Suskirsčius navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos spektrus į tris grupes, atitinkančias G1, G2 bei G3 piktybiškumo laipsnius, šie bei normalaus audinio tarpląstelinės medžiagos spektrai buvo skaidomi kontūrais parenkant Gauso kontūrą bei nustatomos spektrinių juostų padėtys. Esant skirtingiems naviko piktybiškumo laipsniams, nepastebėta koreliacijos tarp juostos maksimumo padėties bei piktybiškumo laipsnio. Tai reikštų, jog kintant naviko piktybiškumo laipsniui, naviko cheminė sudėtis nepasikeičia [46].

#### 1.4. Kokybinė spektrinė analizė

Siekiant nustatyti užregistruoto nežinomos sudėties bandinio spektro komponentus, nustatomos spektrinės juostos, kurių padėtys atitinka tam tikrų medžiagų funkcines grupes. Juostų priskyrimas atliekamas ieškant informacijos žinyuose ar lyginant užregistruotą spektrą su turimais žinomų grynų medžiagų spektrais.

Dirbant įvairiais programiniais paketais bei ieškant spektrinių juostų padėčių, gali pasitarnauti automatinis juostos maksimumo padėties nustatymas (angl. *peak picking*). Automatinis juostos padėties nustatymas paprastai apima du žingsnius: juostos atpažinimą bei bangos skaičiaus nustatymą ties maksimalia sugerties spektro juostos verte. Paprastai yra parenkama slenkstinė sugerties vertė tam, kad mažo intensyvumo juostos būtų praleistos. Daugelyje programinių paketų apskaičiuojama pirmos eilės išvestinė tose ribose, kuriose yra viršijama nurodyta slenkstinė vertė, o juostos maksimumo padėtis nustatoma pagal tai, kurioje vietoje funkcija keičia ženklą [49].

<sup>2</sup> Hipoksija – deguonies trūkumas, badas audinyje.

<sup>3</sup> *ATP* (adenosintrifosfatas) – pagrindinis energijos šaltinis ląstelėse. *ATP* molekulei skylant į *ADP* (adenosindifosfatą) išsiskiria energija, kuri panaudojama ląstelės veiklai užtikrinti.

<sup>4</sup> Normoksija – normalus, pakankamas deguonies kiekis audinyje.

Atliekant kokybinę spektrinę analizę, užregistruoto nežinomos sudėties bandinio spektras lyginamas su žinomų medžiagų spektrais. Siekiant sparčiai bei efektyviai atlikti kokybinę analizę, gali būti pasitelkiama automatinė spektrų paieška (angl. *spectral search*). Atliekant automatinę spektrų paiešką, yra būtinos iš anksto sudarytos spektrų bibliotekos. Bibliotekos gali būti sudarytos savarankiškai iš užregistruotų žinomų medžiagų spektrų arba pasinaudojama programiniuose paketuose iš anksto įdiegtomis ar įsigytomis bibliotekomis. Vienos populiariausių kompanijų, parduodančių *FT-IR* spektrų bibliotekas – tai Bruker (Opus), BioRad/Sadtler (KnowItAll, SearchMaster), FDM (SearchFaster), ST Japan [50]. Atliekant automatinę spektrų paiešką programiniu paketu, naudojamosi tam tikrais paieškos algoritmais. Vienas iš jų – Euklidinių atstumų metodas. Euklidinis atstumas  $E_d$  apskaičiuojamas:

$$E_d = \sqrt{(x_i - r_i)^2}, \quad (1)$$

čia  $x_i$  atitinka užregistruoto bandinio spektro, o  $r_i$  – bibliotekos spektrų juostų intensyvumus ties  $i$ -ąja bangos skaičiaus verte. Svarbu paminėti, jog tiek bibliotekoje esantys, tiek analizuojami spektrai turi būti normuojami prieš atliekant Euklidinių atstumų skaičiavimą tam, kad būtų išvengta netikslumų dėl skirtingos medžiagos koncentracijos bandiniuose. Atlikus Euklidinių atstumų skaičiavimą, gali būti nustatomas procentinis spektrų atitikimas  $M$ , apskaičiuojant intensyvumų skirtumų kvadratų sumą, aprašomas (2) formule:

$$M_{SQ} = \left(1 - \frac{N}{D}\right) \times 100, \quad (2)$$

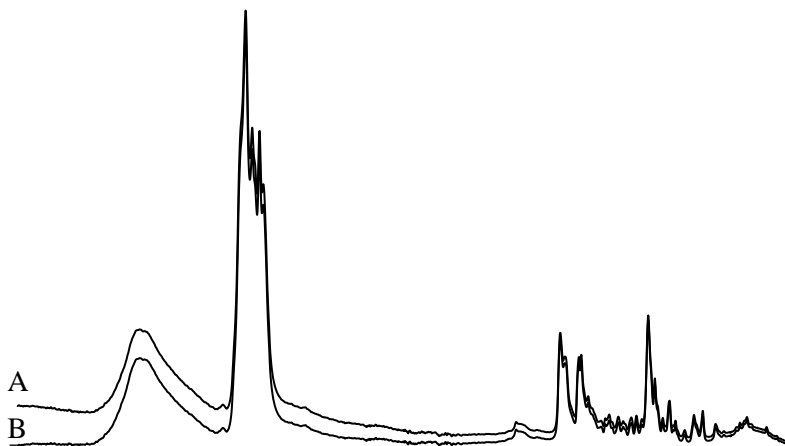
čia  $N = \sum |x_i - r_i|^2$  ir  $D = \sum (x_i)^2$ ,

arba absoliučių skirtumų sumą, aprašomas (3) formule:

$$M_{AB} = \left(1 - \frac{N}{D}\right) \times 100, \quad (3)$$

čia  $N = \sum |x_i - r_i|$  ir  $D = \sum |x_i|$ . Kadangi didelės intensyvumų skirtumų kvadratų vertės dažnai yra nulemtos skirtumo tarp intensyvių ir mažo intensyvumo juostų, todėl procentinis spektrų atitikimas  $M_{AB}$ , apskaičiuojant intensyvumo absoliučių skirtumų sumą, gali duoti geresnius rezultatus [49].

Jei analizuojamo spektro bazinė linija nėra lygi nuliui, tuomet geriau Euklidinių atstumų skaičiavimo metodą taikyti ne sugerties spektrui, bet jo pirmos eilės išvestinei. Minėto algoritmo metu, analizuojamo spektro kiekvieno taško vertė palyginama su duomenų bazėje esančių spektrų



7 pav. *IR* sugerties spektrai esant nuožulniai bazinei linijai (A) ir horizontaliai bazinei linijai (B).

taškų vertėmis, įskaitant ir bazinės linijos taškus. Skirtingas bazinės linijos aukštis ar nuožulnumas suprantamas kaip skirtumas tarp dviejų spektrų. 7 pav. pateikiami IR sugerties spektrai esant nuožulniai (A spektras) bei horizontaliai (B spektras) bazinei linijai. Jei šie spektrai būtų lyginami taikant Euklidinių atstumų metodą, spektrų bazinės linijos nuožulnumo skirtumai padidintų neatitikimą tarp spektrų. Pritaikius pirmos išvestinės metodą, šis efektas eliminuojamas. Vietoje analizuojamo ir duomenų bazėje esančio spektrų palyginimo, pastarasis algoritmas remiasi taškų poros nežinomame spektre ir atitinkamos taškų poros bibliotekos spektre palyginimu [51]. Šiuo atveju, (2) ir (3) formulėse esantys nariai  $N$  ir  $D$  aprašomi:  $N = \sum (y_i - s_i)^2$  ir  $D = \sum (y_i)^2$ , čia  $y_i = x_i - x_{i+1}$ , o  $s_i = r_i - r_{i+1}$ . Jei bazinė linija nėra tiesi, o yra išlenkta, tuomet išvestinių metodas savo rezultatu nusileidžia standartiniam Euklidinių atstumų metodui, taikomam sugerties spektrui. Mišinių spektrų atveju, parankiau naudoti pirmos eilės išvestinės metodą, taip pagrindinis mišinio komponentas nustatomas tiksliau [49]. Esant horizontaliai bazinei linijai, tinkamesnis variantas rinktis standartinį Euklidinių atstumų algoritmą, esant nuožulniai – arba atlikti bazinės linijos korekciją prieš spektrų paiešką arba naudoti pirmos eilės išvestinės metodą [51].

Yra galima ir Euklidinių atstumų metodo modifikacija, vadinama spektrų koreliacijos algoritmu (angl. *correlation algorithm*). Šis algoritmas pagrįstas pirmos eilės išvestinės spektro išskaidymu į kelias sritis ir Euklidinių atstumų apskaičiavimu atskiroms nežinomo spektro dalims bei jas atitinkančioms bibliotekos spektro dalims. Visų sričių rezultatai suvidurkinami ir gaunamas galutinis rezultatas [49, 51].

Siekiant įvertinti nežinomo spektro atitikimą su tam tikru bibliotekos spektru, įvedamas *HQI* – atitikimo kokybės indeksas (angl. *hit quality index*). Paprastai spektrinės analizės programiniuose paketuose šis indeksas apima vertes nuo 0 iki 1000. Šiuo atveju atitikimo kokybės indeksas, atitinkantis vertę 0, reikštų visišką spektrų nesutapimą, o vertę 1000 – identiškus spektrus. Verta paminėti, jog ne visais atvejais didelė *HQI* vertė reiškia teisingą spektrų atitikimą, todėl tyrėjas neturėtų visiškai pasikliauti automatinės analizės rezultatu pats vizualiai neįsitikinęs, jog analizuojamas bei bibliotekos spektrai iš tiesų yra tapatūs. Netikslus automatinės analizės rezultatas gali būti nulemtas didelio bangos skaičiaus poslinkio tarp ieškomo ir bibliotekos spektrų, ieškomos medžiagos spektro neįtraukimo į biblioteką [49, 51].

### 1.5. Diagnostinio metodo patikimumo įvertinimas

Šiame darbe siekiama sukurti naują vėžinių audinių diagnostinį metodą. Įvertinant naujo diagnostinio metodo patikimumą ir tinkamumą diagnostikai, metodo rezultatai palyginami su „Auksinio standarto“ (angl. *gold standard*) rezultatais, apskaičiuojant specifinius rodiklius. „Auksinis standartas“ – labiausiai patikimą rezultatą duodantis, rutiniškai taikomas diagnostinis

tyrimo metodas esant tam tikram susirgimui. „Auksinis standartas“ gali būti sudėtingesnis, rizikingesnis, brangesnis diagnostikos metodas, tačiau turi nedviprasmiškai nustatyti, ar susirgimas yra, ar jo nėra. Įvairių susirgimų diagnozės nustatomos remiantis „Auksinio standarto“ rezultatais, kiekvienam susirgimui taikomas kitas diagnostikos metodas. Tam tikrais atvejais, kai idealus auksinio standarto tyrimas nėra galimas, gali būti naudojama tyrimų kombinacija, atitinkanti „Auksinį standartą“.

Naujo diagnostinio metodo patikimumui įvertinti apskaičiuojami rodikliai: jautrumas, specifiškumas, teigiama ir neigiama prognostinės vertės. Jautrumas parodo testo gebėjimą nustatyti susirgimą tuomet, kai pacientas iš tiesų serga. Specifiškumas parodo testo gebėjimą nutatyti, jog susirgimo nėra, kai jo iš tiesų nėra. Šie du rodikliai gali būti apskaičiuojami palyginant naujo metodo rezultatus su „auksiniu standartu“ laikomo diagnostinio tyrimo rezultatais. Rodikliai apskaičiuojami sudarant lentelę, kurioje pateikiami tikrinamojo diagnostinio metodo ir „auksinio standarto“ testų rezultatai. Tokios lentelės pavyzdys pateikiamas 1 lentelėje.

1 lentelė. 2×2 lentelė, skirta tyrimo patikimumo rodiklių apskaičiavimui [52].

		„Auksinio standarto“ rezultatai	
		Teig.	Neig.
Naujo diagnostinio metodo rezultatai	Teig.	a	b
	Neig.	c	d

Čia a atitinka sergančių pacientų skaičių, kuriems taikant naują diagnostikos metodą nustatytas susirgimas, kai pacientai iš tikrųjų serga (teisingas teigiamas rezultatas), b – pacientų skaičių, kuriems nustatytas susirgimas, tačiau jie yra sveiki (klaidingas teigiamas rezultatas), c – sergančių pacientų skaičių, kuriems nenustatytas susirgimas (klaidingas neigiamas rezultatas), d – sveikų pacientų skaičių, kuriems nenustatytas susirgimas (teisingas neigiamas rezultatas).

Jautrumas apskaičiuojamas:

$$Jautrumas = \frac{a}{a+c}. \quad (4)$$

Specifiškumas apskaičiuojamas:

$$Specifiškumas = \frac{d}{b+d}. \quad (5)$$

Jautrumas ir specifiškumas yra rodikliai, aprašantys testą, tačiau nenurodo tikimybės dydžio, kuriuo taikant naują metodą bus nustatyta tiksli diagnozė. Siekinat įvertinti tikslios diagnozės nustatymo tikimybę, įvedamos teigiama ir neigiama testo prognostinės vertės (atitinkamai angl.



*Positive predictive value – PPV, negative predictive value – NPV*). Teigiama testo prognostinė vertė atitinka santykį tarp sergančių pacientų, kurių testo rezultatas yra teigiamas ir visų tirtųjų, kurių testo rezultatas yra teigiamas, skaičiaus:

$$PPV = \frac{a}{a+b}. \quad (6)$$

Neigiama testo prognostinė vertė atitinka santykį tarp sveikų asmenų, kurių testo rezultatas yra neigiamas ir visų tirtųjų, kurių rezultatas yra neigiamas, skaičiaus [52]:

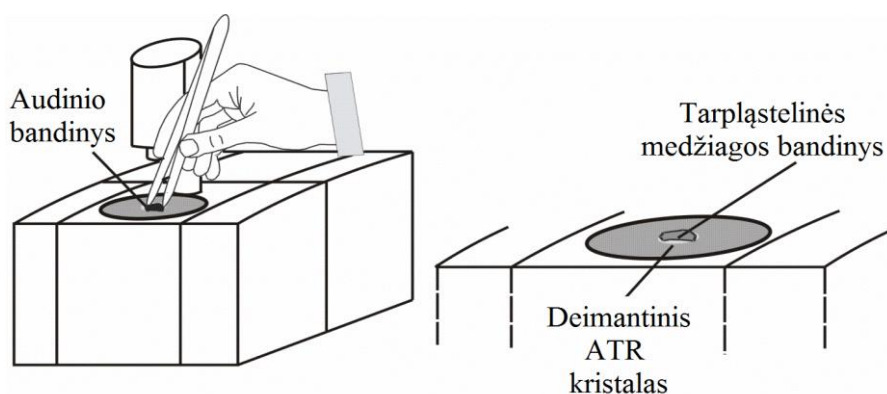
$$NPV = \frac{d}{c+d}. \quad (7)$$

## 2. Eksperimentinė dalis

### 2.1. Bandinių paruošimas ir spektrų registravimas

#### 2.1.1. Žmogaus inkstų normalaus ir navikinio audinių bandinių paruošimas ir spektrų registravimas spektrometru „ALPHA“

Siekiant sukurti žmogaus inkstų normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos spektrinių duomenų bazę, Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų III operacijų bloke registruojami normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai. Tyrimai atliekami iš karto po chirurginės operacijos (inkstų rezekcijos – naviko su aplink jį esančio sveiko audinio atsarga pašalinimo, arba nefrektomijos – viso inksto pašalinimo) operaciniame bloke, patalpoje, esančioje prie operacinės. Kiekvienos operacijos atveju, chirurgui vizualiai nustatius pašalinto audinio tipą, tyrimui paruošiami dviejų audinių tipų bandiniai: iš naviko pažeistos dalies bei toliausiai nuo naviko esančio pašalinto normalaus audinio srities (distalinės srities). Bandiniai paruošiami atpjaunant nedidelį kiekį audinio, jį pjūvio puse prispaudžiant bei atitraukiant nuo *ATR* kristalo. Tokiu būdu ant kristalo lieka tarpląstelinės medžiagos (tarpląstelinio skysčio, pažeistų ląstelių turinio bei atplėštų nuo audinio ląstelių ir tarpląstelinės matricos mišinio), kurios *ATR IR* sugerties spektras yra registruojamas. Bandinio paruošimo schema pateikiama 8 pav.



8 pav. Bandinio paruošimo schema (adaptuota pagal [7]).

Spektrai registruojami operaciniame bloke naudojantis *FT-IR* spektrometru „ALPHA“ (Bruker) su „Platinum ATR“ priedėliu, kuriame įmontuotas deimantinis vieno atspindžio *ATR* kristalas. Prieš atliekant kiekvieno bandinio spektro registravimą, kristalas švariai nuvalomas distiliuotu vandeniu ir etanoliu, naudojantis paviršiaus nepažeidžiančiomis popierinėmis servetėlėmis bei užregistruojamas atraminis spektras. Spektrų registravimas atliekamas programiniu paketu „Opus“, parenkant 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$  intervalą, 4  $\text{cm}^{-1}$  spektrinę skyrą, matuojant ir suvidurkinant 4 spektrus. Kiekvieno bandinio atveju atliekama po 20 matavimų tam, jog būtų įsitikinta, kad tarpląstelinės medžiagos bandinyje esantis vanduo išgaravo.

Tyrimo metu nuo 2016 m. rugsėjo 22 d. iki 2018 m. gegužės 14 d. užregistruota 32 pacientų normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos spektrai, tačiau šiame darbe naudojami visi nuo tyrimo pradžios (2014 m. birželio 30 d.) užregistruoti spektrai. Nuo tyrimo pradžios užregistruota 139 pacientų normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos spektrai, iš kurių duomenų analizei naudojama 115 pacientų audinių spektrai, nes siekiant tikslesnių rezultatų į analizę neįtraukiami tie spektrai, kuriems nėra pateiktos gydytojų histologų išvados. Diagnozuotų susirgimų atvejai pateikiami 2 lentelėje.

2 lentelė. Diagnozuotų inkstų susirgimų atvejai.

Naviko tipas	Naviko rūšis	Diagnozuotų atvejų skaičius
Piktybiniai (vėžys)	šviesiųjų ląstelių karcinoma	98
	papilinė karcinoma	5
	multilokulinė karcinoma	2
	chromofobinė karcinoma	1
	tubulocistinė karcinoma	1
Gerybiniai	onkocitoma	6
	angiomiolipoma	1
Kita	nespecifiniai fibroziniai uždegiminiai pakitimai	1

### 2.1.2. Kiaulės skirtingų organų audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų registravimas

Siekiant automatizuotai identifikuoti audinio tipą, labai svarbu, jog automatinio audinių atpažinimo programa veiktų tiksliai. Atliekant tyrimus *in vivo*, gali pasitaikyti atveju, kuomet atsitiktinai užregistruojamas ne inksto, o kokio nors kito organo audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektras. Siekiant išvengti galimų programos veikimo netikslumų ir nustatyti pagrindinius spektrinius požymius, kuriais remiantis būtų galima identifikuoti skirtingus audinių tipus, užregistruota kiaulės įvairių organų audinių (inkstų, plaučio, kepenų, smegenų, širdies ir riebalinio audinio) tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai.

Kiaulės organų audinių tarpląstelinės medžiagos bandinių paruošimas ir spektrų registravimas atliekamas taip pat, kaip ir žmogaus inkstų audinių tarpląstelinės medžiagos bandinių (žr. 2.1.1. skyrelyje). Registruojant skirtingų organų audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrus, kiekviename organe atliekama po kelis kontrolinius pjūvius skirtingose organo vietose, tokiu būdu siekiant nustatyti iš tos pačios vietos paimtų bandinių *ATR IR* sugerties spektrų atsikartojamumą bei skirtumus tarp atskirų organo dalių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų.

### 2.1.3. Žmogaus pirštų odos *ATR IR* sugerties spektrų registravimas

Siekiant nustatyti, ar taikant paieškos spektrų bibliotekoje metodą, galima automatizuotai identifikuoti skirtingų audinių grupių spektrus, užregistruota 62 žmonių pirštų odos spektrai. Spektrai registruojami spektrometru „ALPHA“ (Bruker) su „Platinum ATR“ priedėliu, pirštą pridėdant ir laikant prie *ATR* kristalo tol, kol bus užregistruotas spektras. Spektrai registruojami spektriniame intervale nuo 4000 iki 400  $\text{cm}^{-1}$ , parenkant 4  $\text{cm}^{-1}$  skyrą, registruojant ir suvidurkinant 32 spektrus.

### 2.1.4. Glikogeno tirpalų įvairiose terpėse paruošimas ir spektrų registravimas

Vykstant audinio piktybėjimui bei vystantis navikui, dėl pakitusio metabolizmo audinyje yra būdingas terpės rūgštėjimas [48]. Vienas svarbiausių požymių, skiriančių normalų audinį nuo piktybinio, yra glikogeno kiekio padidėjimas pastarajame audinyje [47, 53], piktybinio audinio spektruose yra matomi pakitimai, nulemti biologinės aplinkos pokyčių. Siekiant nustatyti, ar glikogeno, esančio biologinėje aplinkoje, spektre neatsiranda reikšmingų spektrinių pokyčių keičiantis terpės pH ir NaCl kiekiui, užregistruoti glikogeno vandeninių tirpalų *ATR IR* sugerties spektrai esant neutraliai, šarminiai, rūgštinei pH bei panašiose į biologinį audinį terpėse – į tirpalą įlašinus žmogaus kraujo, ištirpinus natrio chlorido.

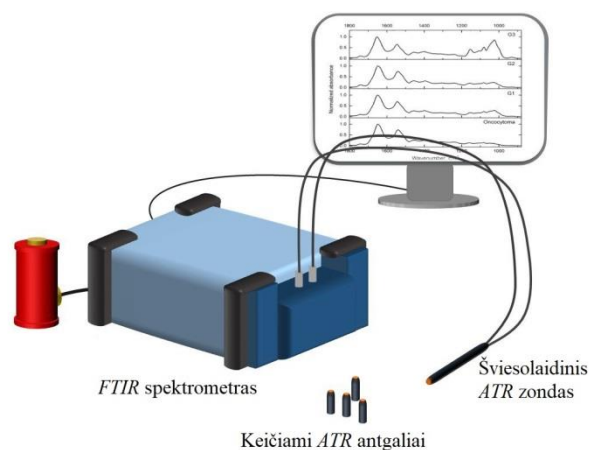
Vandeniniai glikogeno tirpalai paruošiami ištirpinant glikogeno ( $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_{21}$ ) miltelius nedideliame kiekyje dejonizuoto vandens. Terpės rūgštinimui į tirpalą pridėdama acto rūgšties  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$  (pH 3), šarminimui - pridėdant natrio šarmo NaOH (pH 11,2), pH matuokliu nustatoma tirpalų pH. Tirpalai su krauju paruošiami į tirpalą įlašinant žmogaus kraujo. Spektrai registruojami spektrometru „ALPHA“ (Bruker) su „Platinum ATR“ priedėliu, ant *ATR* kristalo užlašinant tiriamojo tirpalo naudojantis automatine pipete. Prieš kiekvieno spektro registravimą *ATR* kristalas nuvalomas distiliuotu vandeniu ir etanoliu, užregistruojamas atraminis spektras. Spektrai registruojami naudojantis programiniu paketu „Opus“, spektrinėje srityje nuo 4000  $\text{cm}^{-1}$  iki 400  $\text{cm}^{-1}$ , nustatant 4  $\text{cm}^{-1}$  skyrą, matuojant ir suvidurkinant 32 spektrus. Matavimai atliekami tol, kol bandiniuose esantis vanduo išgaruoja. Tam, kad vanduo iš bandinių išgaruotų greičiau, buvo naudojamosi plaukų džiovintuvu.

### 2.1.5. Žmogaus inkstų normalaus ir navikinio audinių bandinių paruošimas ir spektrų registravimas šviesolaidine spektrine sistema

Siekiant priartinti *IR* spektrometrinius tyrimus prie audinių diagnostikos *in vivo* chirurginės operacijos metu, Fizikos fakulteto Cheminės fizikos institute bendradarbiaujant su Vokietijos įmone „Art photonics“ sukurta *FT-IR* šviesolaidinė spektrometrinė sistema. Sistema sudaryta iš *FT-IR*

spektrometro, sidabro halogenido šviesolaidžiu sujungto su germanio *ATR* elementu (sistemos schema pateikiama 9 pav.). Sistema yra ypatinga tuo, jog yra nedidelių matmenų ir gali būti lengvai perkeliama, kas yra labai svarbu darbui operacinėje. Taip pat svarbu yra ir tai, jog matavimai gali būti atliekami *in situ*, o siekiant užtikrinti zondo sterilumą ir greitą bandinio analizę, zondo antgaliai operacijos metu gali būti pakeičiami, po operacijos sterilizuojami.

Siekiant nustatyti automatinės audinių atpažinimo sistemos tinkamumą audinių diagnostikai, registruojami žmogaus inkstų normalaus ir navikinio audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai. Bandiniai paruošiami steriliu skalpeliu padarant pjūvį bandinyje, prie pjūvio vietos priglaudžiant ir atitraukiant šviesolaidinį zondą su įmontuotu germanio *ATR* elementu. Ant *ATR* elemento lieka tarpląstelinės medžiagos



9 pav. Šviesolaidinės spektrometrinės sistemos schema (adaptuota pagal [54]).

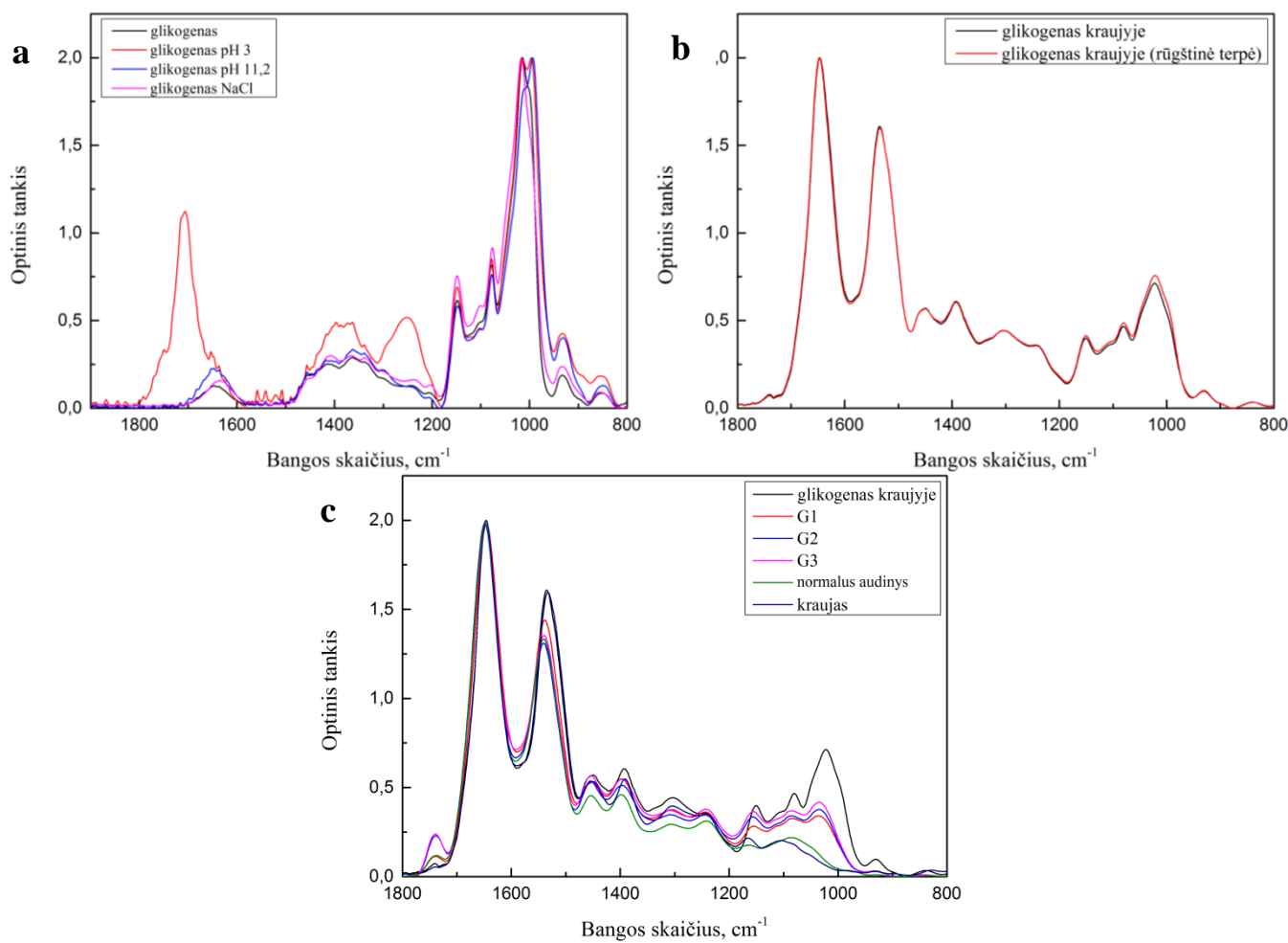
bandinys, kurios *ATR IR* sugerties spektras yra užregistruojamas. Prieš registruojant bandinio spektrą *ATR* elementas nuvalomas distiliuotu vandeniu ir etanoliumi bei užregistruojamas atraminis spektras. Spektrai registruojami  $4000\text{ cm}^{-1} - 400\text{ cm}^{-1}$  intervale, nustačius  $4\text{ cm}^{-1}$  skyrą, registruojant ir suvidurkinant 64 spektrus.

Tyrimo metu užregistruota 8 pacientų normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai, spektrai registruoti nuo 2018 m. balandžio 4 d. iki 2018 m. gegužės 14 d.

## 2.2. Tyrimo rezultatų analizė

### 2.2.1. Glikogeno tirpalo įvairiose terpėse spektrinių pokyčių tyrimo analizė

Biologinių audinių *IR* sugerties spektrų analizė yra sudėtinga, spektrinių juostų padėtys turi savybę pasislinkti. Kadangi svarbiausi spektriniai skirtumai tarp normalaus ir piktybinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų stebimi glikogeną atitinkančioje spektrinėje srityje, todėl siekiant nustatyti, kaip biologinė aplinka paveikia glikogeno *ATR IR* sugerties spektrus, darbo metu atliktas eksperimentas, paruošiant tirpalus, artimus biologinei terpei audinyje. 10 pav. pateikiami tyrimo rezultatai.



10 pav. Glikogeno tirpalų įvairiose aplinkose bei audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai: a - glikogeno tirpalo, glikogeno tirpalo esant rūgštinei (pH 3) ir šarminei (pH 11,2) terpei bei glikogeno tirpalo pridėjus NaCl; b - glikogeno tirpalo kraujyje bei glikogeno tirpalo kraujyje esant rūgštinei terpei; c - glikogeno tirpalo kraujyje ir palyginimui suvidurkinti navikinio audinio (esant G1, G2 ir G3 piktybiškumo laipsniams) ir normalaus audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai.

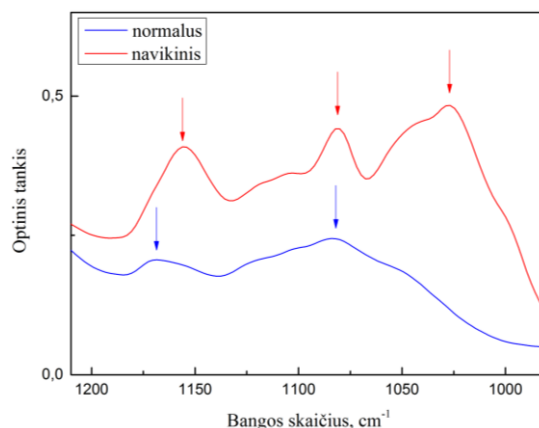
Glikogeno tirpalų *ATR IR* sugerties spektrams (10 pav. a) atlikta bazinės linijos korekcija bei minimumo - maksimumo normavimas, glikogeno tirpalų esant kraujo ir suvidurkintiems inkstų audinių tarpląstelinės medžiagos spektrams atlikta bazinės linijos korekcija, 25 taškų glotninimas bei minimumo - maksimumo normavimas. 10 a pav. pateikiami glikogeno tirpalo, glikogeno tirpalo esant rūgštinei ir šarminei terpei bei glikogeno tirpalo pridėjus NaCl spektrai. Iš šių spektrų matyti, jog bangos skaičių intervale nuo 1200 iki 1000 cm<sup>-1</sup> matomas spektrinės juostos ties 1014 cm<sup>-1</sup> (glikogeno tirpalo dejonizuotame vandenyje) poslinkis. Esant glikogeno tirpalui pridėjus NaCl juostos padėtis yra ties 1016 cm<sup>-1</sup>, glikogeno tirpalui šarminėje terpėje ties 997 cm<sup>-1</sup>. Esant rūgštinei terpei, matomas spektrinės juostos skilimas į dvi juostas ties 1015 cm<sup>-1</sup> ir 997 cm<sup>-1</sup>. 10 b paveiksle pateikiama glikogeno tirpalo kraujyje bei glikogeno tirpalo kraujyje *ATR IR* sugerties spektrai parūgštintus terpę. Esminių spektro formos pokyčių nepastebima, todėl galima teigti, jog kraujo terpės parūgštėjimas glikogeno tirpalui kraujyje įtakos neturi. 10 c paveiksle pateikiama kraujo, glikogeno tirpalo kraujyje bei suvidurkinti normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinio užpildo

spektrai esant G1, G2 bei G3 piktybiškumo laipsniams. Galima pastebėti, jog normalaus audinio ir kraujo spektrai bei navikinio audinio tarpląstelinio užpildo ir glikogeno tirpalo kraujyje spektrai yra labai panašūs.

### 2.2.2. Audinių automatinės atpažinimo sistemos kūrimas

Siekiant sukurti žmogaus inkstų vėžinių audinių kokybinės spektrinės analizės sistemą, vienas svarbiausių žingsnių – tinkamų spektrinių požymių parinkimas. Remiantis rezultatais, aptartais pagrindinių studijų baigiamajame darbe [46], nuspręsta analizuoti spektrinę sritį, apimančią bangos skaičių intervalą nuo  $1200\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$  ir atitinkančią spektrines juostas, charakterizuojančias glikogeno  $\nu$  (C-O),  $\nu$  (C-C) bei  $\delta$  (C-O-H) virpesius. 11 pav. pateikiami normalaus ir navikinio audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai, jiems atlikus bazinės linijos korekciją bei minimumo – maksimumo normavimą. Šioje spektrinėje srityje vėžinio audinio tarpląstelinės

medžiagos *ATR IR* sugerties spektre yra būdingos trys, o normalaus audinio spektre – dvi spektrinės juostos. Taip pat, vėžinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektruose šiai sričiai būdingas didesnis intensyvumas, palyginus su normalaus audinio tarpląstelinės medžiagos spektrais. Kitas svarbus žingsnis – tinkamų analizės metodų parinkimas. Šiame darbe analizuojami glikogeną ( $1200\text{ cm}^{-1} - 950\text{ cm}^{-1}$ ) bei baltymų Amidas I grupę ( $1717\text{ cm}^{-1} - 1591\text{ cm}^{-1}$ ) atitinkančių spektrinių juostų integrinių intensyvumų santykiai, remiantis juostų skaičiumi minėtoje srityje atliekamas automatinis spektrų atpažinimas bei automatinis audinių atpažinimas atliekant spektrų paiešką bibliotekoje, sudarytoje iš ryškiausių spektrinius požymius turinčių sveiko ir vėžinio audinių tarpląstelinės medžiagos, vandens ir etanolio *ATR IR* sugerties spektrų.



11 pav. Normalaus (mėlyna linija) ir navikinio (raudona linija) audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai. Rodyklėmis pažymėtos svarbiausios spektrinės juostos.

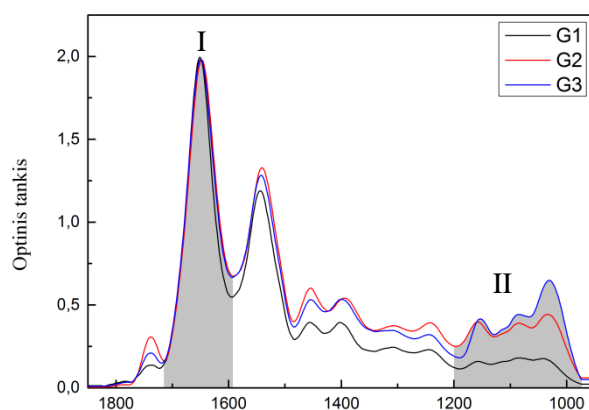
#### 2.2.2.1. Integrinių intensyvumų santykių analizė

Kaip minėta anksčiau, piktybinio audinio tarpląstelinės medžiagos spektrams būdingos intensyvesnės glikogeną atitinkančios spektrinės juostos bangos skaičių intervale nuo  $1200\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$ . Didėjant naviko piktybiškumo laipsniui, šios juostos intensyvėja, todėl siekiant nustatyti audinio tipą (normalus ar piktybinis audinys) pasirinkta analizuoti šios srities ir baltymų Amidas I

grupę atitinkančios sugerties juostos integrinių intensyvumų santykį. Nustačius integrinių intensyvumų santykių verčių ribas, kurioms esant audinys būtų įvardijamas kaip normalus ar navikinis, būtų galima automatizuotai palyginti nežinomo tiriamojo spektro ir nustatytas ribines vertes bei taip priskirti spektrą normaliam arba navikiniam audiniui.

Pirmiausia, išanalizavus turimus audinių spektrus, pasirinkti integravimo režiai, kurie bus taikomi integruojant visus (tiek normalaus, tiek navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos) spektrus ir geriausiai atitiktų analizuojamas spektrines juostas daugeliu spektrų atveju. Nustatyti ribas, kurios tiksliai apimtų visą sugerties juostą nuo vieno spektro minimumo taško iki kito yra sunku, nes kiekvieno paciento atveju, spektrinės juostos pasislenka tiek į didesnių, tiek į mažesnių bangos skaičių pusę bei yra skirtingo pločio. Baltymų Amidas I grupės spektrinei juostai parinkti integravimo režiai nuo  $1717\text{ cm}^{-1}$  iki  $1591\text{ cm}^{-1}$ .

Nustatyti režius, kurie apimtų glikogeną atitinkančią spektrinę sritį tiek normalaus, tiek navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos spektruose, yra sunkiau nei baltymų Amidas I grupės atveju, kadangi ši sritis atskirais atvejais skiriasi savo pločiu. Iš pradžių šiai sričiai integruoti pasirinktos ribos nuo  $1198\text{ cm}^{-1}$  iki  $960\text{ cm}^{-1}$  (12 pav. pilka spalva pažymėtos spektrų integravimui naudotos spektrinės sritys: I sritis atitinka Amidas I, II sritis – glikogeno spektrines juostas. Spektrams atlikta bazinės linijos korekcija ir minimumo-maksimumo normavimas). Integruojamas plotas po spektrine juosta iki abscisių ašies.



12 pav. Žmogaus inkstų piktybinio audinio tarpląstelinės medžiagos ATR IR sugerties spektrai esant skirtingiems naviko piktybiškumo laipsniams G. Pilka spalva pažymėtos spektrinės sritys, taikytos integrinių intensyvumų santykių analizėje.

Integriniai intensyvumai analizuojami tik piktybinių navikų (inksto šviesiųjų ląstelių karcinomos, papilinės karcinomos, multilokulinės cistinės karcinomos bei chromofobinės karcinomos) atvejais, kuomet histologų išvadose yra nurodytas naviko piktybiškumo laipsnis. Analizės metu suintegruota 85 pacientų normalaus ir navikinio audinių tarpląstelinės medžiagos ATR IR sugerties spektrai (85 spektrai normalaus audinio atveju bei 87 spektrai navikinio audinio atveju, kadangi dviejų pacientų atvejais gauta po du navikinio audinio bandinius). Integravimo rezultatai, esant skirtingiems naviko piktybiškumo laipsniams, pateikiami 2 priede.

Integravimas atliekamas skirtingai apdorojus analizuojamus spektrus. Pirmiausia spektrai suintegruoti atlikus bazinės linijos korekciją ir 25 taškų glotninimą. Šiuo atveju apskaičiuotos glikogeno ir Amidas I grupę atitinkančių integrinių intensyvumų santykių vertės visuose (tiek navikinio, tiek normalaus audinio) spektruose apima vertes nuo 0,164 iki 1,195. Esant normaliam



audiniui, integrinių intensyvumų santykiai kinta nuo 0,164 iki 0,436, o navikinio audinio atveju – nuo 0,198 iki 1,195. Palyginus šias vertes esant normaliam ir navikiniam audiniui, akivaizdu, jog didžiausia integrinių intensyvumų santykio vertė esant navikiniam audiniui yra kelis kartus didesnė nei esant normaliam audiniui. Esant G1 naviko piktybiškumo laipsniui, integrinių intensyvumų santykių vertės kinta nuo 0,203 iki 1,099, esant G2 piktybiškumo laipsniui – nuo 0,198 iki 1,167, esant G3 piktybiškumo laipsniui - nuo 0,231 iki 1,195. Matyti, jog didėjant naviko piktybiškumo laipsniui, didžiausia integrinių intensyvumų santykio vertė didėja, todėl galima teigti, jog didėjant naviko piktybiškumo laipsniui, glikogeno kiekis audinyje auga. Išanalizavus integravimo rezultatų duomenis, nustatyta, jog į intervalą nuo 0,198 iki 0,436 patenka vertės esant tiek normaliam, tiek navikiniam audiniui. Tai sudaro 62 % atvejų. Šiais atvejais negalima pasakyti, ar audinys yra navikinis, ar normalus.

Gavus didelį netikslumą ir siekiant nustatyti to priežastį, nuspręsta praplėsti glikogeną atitinkančios spektrinės srities integravimo intervalą nuo  $1198 - 960 \text{ cm}^{-1}$  iki  $1198 - 892 \text{ cm}^{-1}$ . Šiuo atveju integravimo režiai nustatyti nuo  $1717 \text{ cm}^{-1}$  iki  $1591 \text{ cm}^{-1}$  esant baltymų Amidas I grupę atitinkančiai spektrinei sričiai bei nuo  $1198 \text{ cm}^{-1}$  iki  $892 \text{ cm}^{-1}$  esant glikogeną atitinkančiai spektrinei sričiai. Apskaičiavus integrinių intensyvumų santykius, nustatyta, jog intervalas, į kurį patenka integrinių intensyvumų santykių vertės esant tiek normalaus, tiek navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrams, apima 61 % verčių. Gautas panašus rezultatas kaip ir pirmuoju atveju reiškia, jog glikogeną atitinkančios spektrinės srities integravimo režijų pakeitimas nuo  $1198 - 960 \text{ cm}^{-1}$  iki  $1198 - 892 \text{ cm}^{-1}$  rezultatų tikslumui įtakos neturi.

Gavus netikslius rezultatus abiem atvejais, nuspręsta patikrinti, ar rezultatai nepriklauso nuo operacijos tipo – inkstų rezekcijos ir nefrektomijos<sup>5</sup>. Nagrinėjami integrinių intensyvumų santykiai abiejų operacijų atvejais, kai glikogeną atitinkančios spektrinės srities integravimo režiai yra nuo  $1198 \text{ cm}^{-1}$  iki  $960 \text{ cm}^{-1}$ . Esant rezekcijai, intervalas, į kurį patenka integrinių intensyvumų santykių vertės esant tiek sveikam, tiek navikiniam audiniui apima 57 % verčių. Esant nefrektomijai verčių sutapimas sudaro 50 % atvejų. Apibendrinus rezultatus, galima teigti, jog esant abiem operacijų tipams, verčių persiklojimas yra labai didelis, integrinių intensyvumų santykių didumas ir rezultatų tikslumas nuo operacijos tipo nepriklauso.

Siekiant nustatyti netikslumo priežastį, nuspręsta spektrams atlikti tik bazinės linijos korekciją, spektrų neglotninant, nes atliekant glotninimą spektro kontūro forma pakinta. Spektrai suintegruojami srityse nuo  $1717 \text{ cm}^{-1}$  iki  $1591 \text{ cm}^{-1}$  bei nuo  $1190 \text{ cm}^{-1}$  iki  $950 \text{ cm}^{-1}$  ir apskaičiuojami integrinių intensyvumų santykiai. Šiuo atveju integrinių intensyvumų verčių intervalas, į kurį patenka vertės esant tiek normalaus, tiek navikinio audinio atvejams, apima 63 %

---

<sup>5</sup> Rezekcijos atveju normalaus audinio bandinys yra paimamas iš srities, esančios netoli naviko, o nefrektomijos atveju – iš bet kurios pašalinto inksto srities, todėl pastaruoju atveju paties inksto audinio struktūra gali būti kitokia, kitokios audinių tipų proporcijos.

visų atvejų. Rezultatas savo tikslumu artimas anksčiau aptartiems atvejams, todėl galima teigti, jog spektrų glotninimas gautam rezultatui nedaro įtakos.

Nagrinėjamoje spektrinėje srityje, apimančioje bangos skaičių intervalą nuo  $1800\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$ , spektrų normavimas rezultatams neturėtų turėti poveikio. Siekiant tuo įsitikinti, spektrams atlikta bazinės linijos korekcija bei minimumo - maksimumo normavimas, spektrai suintegruoti srityse nuo  $1717\text{ cm}^{-1}$  iki  $1591\text{ cm}^{-1}$  bei nuo  $1190\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$  ir apskaičiuoti integrinių intensyvumų santykiai. Šiuo atveju, integrinių intensyvumų santykių vertės, apimančios intervalą į kurį patenka normalaus ir navikinio audinio atvejai, sudaro 64 % visų verčių. Taigi, palyginus rezultatus su ankstesniais skaičiavimais, įsitikinta, jog spektrų normavimas tikslumui įtakos neturi.

Palyginus rezultatus, gautus keičiant glikogeną atitinkančios spektrinės srities integravimo režius, atliekant skirtingą spektrų apdorojimą prieš integruojant, matyti, jog aptartais atvejais intervalas, į kurį patenka integrinių intensyvumų santykių vertės yra panašus, o audinio atpažinimo tikslumas pasitelkiant šį metodą žemas. Viena galimų tokio netikslumo priežasčių galėtų būti tai, jog integrinių intensyvumų santykių vertės esant normaliam ir G1 naviko piktybiškumo laipsnio audiniui yra artimos. Tai reikštų, kad navikas yra žemo piktybiškumo laipsnio ir jį labai sunku atskirti nuo normalaus audinio arba audinys, chirurgo priskiriamas kaip normalus, yra supiktybėjęs, tačiau vizualiai to nustatyti dar negalima. Tačiau į persiklojimo intervalą pakliūva visų piktybiškumo laipsnių navikai, tad gydytojų klaidingo diagnozavimo atvejų skaičius negali būti toks didelis (tuomet klaidingai nustatoma būtų daugiau nei pusė visų atvejų). Kita galima verčių persiklojimo priežastis – galbūt bandinys buvo atpjaunamas „nešvariai“: matavimų atlikimo metu ant sveiko audinio buvo navikinio audinio likučių arba atvirkščiai. Tačiau ir šis atvejis mažai tikėtinas, nes analizuojant spektrus vizualiai, skirtumai tarp normalaus ir navikinio audinių yra stebimi. Taip pat, skirtumai tarp normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos spektrų yra nusakomi ne tik integriniu spektrinių juostų intensyvumu, tačiau ir spektro kontūro forma. Kaip minėta anksčiau, navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos spektrai turi tris, o normalaus audinio spektrai – dvi sugerties juostas glikogeną atitinkančioje spektrinėje srityje. Apibendrinus šiuos rezultatus galima teigti, jog glikogeną ir baltymų Amidas I grupės sugerties juostų integrinių intensyvumų santykių palyginimas siekiant identifikuoti normalų ir navikinį audinį yra netinkamas, reikia ieškoti kitų spektrinių požymių.

#### **2.2.2.2. Programos, kurios veikimas remiasi spektrinių juostų skaičiaus nustatymu $1200 - 950\text{ cm}^{-1}$ intervale, kūrimas**

Siekiant sukurti programą, skirtą automatiniam audinių atpažinimui, nutarta remtis tuo, jog navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektre,  $1200\text{ cm}^{-1} - 950\text{ cm}^{-1}$

intervale, yra būdingos trys, o normalaus audinio spektre – dvi spektrinės juostos, ir pritaikyti šį spektrinį požymį automatinei spektrinei analizei.

Automatinio audinių atpažinimo programos kūrimui naudotasi programiniame pakete „Opus“ esančia „Macro“ skiltimi, leidžiančia automatizuoti duomenų surinkimą bei apdorojimą, nurodant pasirinktus parametrus bei pageidaujamą atliekamų veiksmų seką. Programos kodas gali būti rašomas tekstinėje aplinkoje, laikantis „Macro“ sintaksės reikalavimų, arba grafinėje aplinkoje pasirenkant reikalingus veiksmus bei komandas programiniame pakete „Opus“.

Automatinės audinių atpažinimo „Macro“ programos kūrimas pradėtas reikiamų kintamųjų sukūrimu. Pirmiausia sukuriama failo tipo kintamasis, atitinkantis nežinomą ir norimą patikrinti žmogaus inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrą, nurodant, jog tai yra „Opus spectrum“ formato failas. Toliau sukuriama du tekstinio tipo kintamieji, atitinkantys tikrinamojo spektro vietą kompiuteryje (katalogą) bei pavadinimą. Jiems priskiriamos pradinės vertės atitinkamai „Nurodykite katalogą“ ir „Nurodykite spektro pavadinimą“. Taip pat sukuriama skaičiaus tipo kintamasis, atitinkantis spektrinių juostų skaičių. Jam nurodoma pradinė vertė lygi 0. Tam, kad naudojantis sukurta programa būtų galima pasirinkti tikrinti vieną failą ar daugiau, sukuriama du mygtuko tipo kintamieji, nukreipiantys į programos pradžią (norint tikrinti dar vieną spektrą) arba pabaigą (nebenorint tikrinti daugiau spektrų).

Programa prasideda sukuriant lentelę pavadinimu „Spektro įkėlimas“, kuri parodoma vartotojui. Joje prašoma į laukelius įvesti spektro vietą kompiuteryje („Nurodykite katalogą“) bei spektro pavadinimą („Nurodykite spektro pavadinimą“). Šis spektras prilyginamas sukurtam failo tipo „Opus spectrum“ formato kintamajam ir komanda „Load“ įkeliamas į programinį paketą „Opus“. Toliau tikrinamajam spektrui atliekamas 25 taškų glotninimas, bazinės linijos korekcija bei iškerpama sritis nuo  $1800\text{ cm}^{-1}$  iki  $800\text{ cm}^{-1}$ . Pakoreguotame spektre ieškoma spektrinių juostų srityje nuo  $1200\text{ cm}^{-1}$  iki  $1000\text{ cm}^{-1}$  naudojantis komanda „Peak Picking“. Nurodomas 0,1 % jautrumas. Rastų juostų skaičius parodomas lentelėje. Nustatytas juostų skaičius palyginamas su vertėmis, būdingomis piktybiniam arba normaliam audiniui. Jei tikrinamajame spektre randama mažiau nei dvi spektrinės juostos, vartotojui parodoma lentelė, skelbianti, jog „Tikrinamasis spektras negali būti priskiriamas sveikam arba vėžiniam audiniui, nes rastų spektrinių juostų skaičius mažesnis nei 2“. Jei randamos dvi spektrinės juostos – audinys identifikuojamas kaip normalus ir lentelėje parašoma „Tikrinamasis spektras priskiriamas normaliam audiniui“. Jei randamos trys ar keturios (daugeliu piktybinio audinio atvejų analizuojamoje srityje matomos trys spektrinės juostos, tačiau kai kuriais atvejais išryškėja keturios juostos) spektrinės juostos, audinys identifikuojamas kaip piktybinis, atitinkamai lentelėje pranešant „Tikrinamasis spektras priskiriamas piktybiniam audiniui“. Radus didesnį spektrinių juostų skaičių, audinio identifikuoti neįmanoma, vartotojui parodoma lentelė su užrašu „Tikrinamasis spektras negali būti priskirtas nei

normaliam, nei piktybiniam audiniui, nes rastų spektrinių juostų skaičius yra didesnis nei 4“. Patikrinus spektrą, vartotojui parodoma lentelė, kurioje klausiama „Ar norėtumėte tikrinti dar vieną spektrą?“. Tuo tikslu sukurtoje lentelėje nėra numatytųjų mygtukų, o sukuriama „Taip“ ir „Ne“ mygtukai. Paspaudus „Taip“, grįžtama į programos pradžią, vėl paprašoma įvesti spektrą. Pasirinkus „Ne“ programos langas užsidaro. 3 ir 4 prieduose pateikiama parašytas programos kodas ir blokinė schema. Eilutėse, prasidėnančiomis „REM“ pateikiami paaiškinimai bei komentarai. Programoje eilutės, prasidedančios fraze „REM“ yra automatiškai praleidžiamos.

#### 2.2.2.2.1. Audinio atpažinimo tikslumo įvertinimas

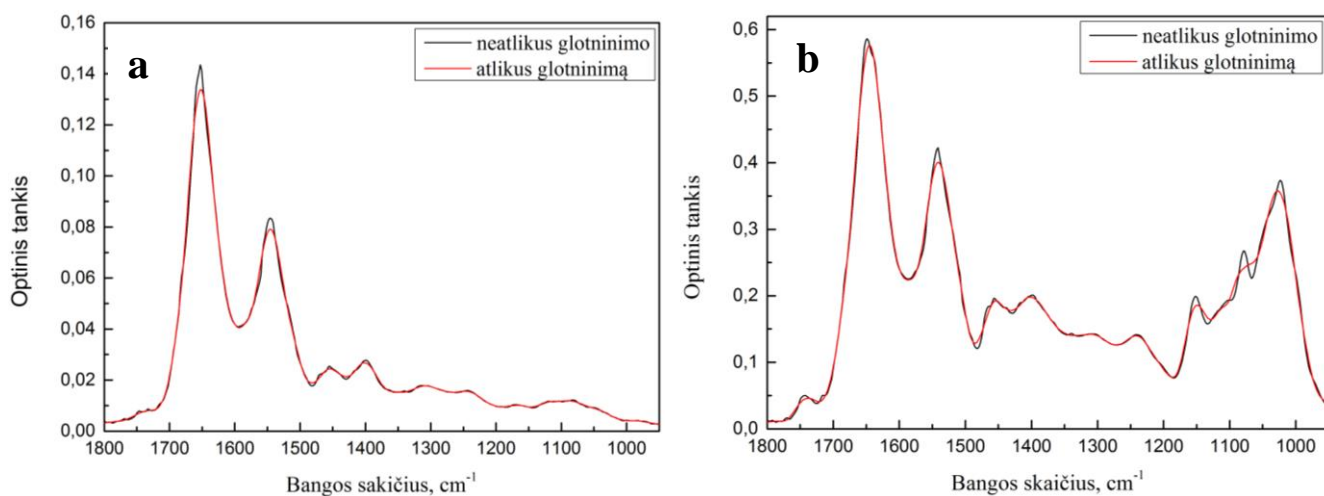
Siekiant nustatyti parašytos programos patikimumą bei įvertinti tinkamumą spektrų identifikavimui, jos veikimas patikrintas su 114 pacientų normalaus ir 107 pacientų piktybinio navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrais. Kai kurių pacientų atvejais, išoperuojami keli navikai bei užregistruojami kelių navikų bandinių *ATR IR* sugerties spektrai, todėl programa patikrinta 114 *ATR IR* sugerties spektrų normalaus audinio atveju ir 113 *ATR IR* sugerties spektrų piktybinio audinio atveju.

Patikrintus piktybinio navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrus, remiantis gydytojų histologų išvadomis, būtų galima suskirstyti į dvi grupes: piktybinio audinio, kuriems yra nurodytas piktybiškumo laipsnis (G1, G2 ar G3) ir piktybinio audinio su nenurodytu piktybiškumo laipsniu G. Išanalizavus piktybinio inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos spektrų su nurodytu piktybiškumo laipsniu G (103 pacientų 108 navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos spektrai) patikrinimo duomenis, navikinis audinys teisingai priskiriamas piktybiniam audiniui 85 % tikslumu. Išanalizavus rezultatus detaliau, susiteminti audinio atpažinimo rezultatai esant skirtingiems naviko piktybiškumo laipsniams pateikiami 3 lentelėje.

3 lentelė. Programos patikrinimo rezultatai.

Audinio tipas	Piktybiškumo laipsnis	Tikslumas, %
Piktybinis	Nurodytas (įtraukta G1, G2 bei G3)	85
	G1	60
	G2	89
	G3	85
	Nenurodytas	60
	Visi (įtraukta su nenurodytu piktybiškumo laipsniu bei G1, G2,G3)	84
Normalus	-	98

Apžvelgus parašytos programos patikrinimo rezultatus, galima teigti, jog sveikas audinys identifikuojamas 98 % tikslumu, o piktybinis audinys - 84 % tikslumu. Ne 100 % tikslumą lemia šios programos algoritmo tam tikri apribojimai. Šioje programoje analizuojamiems spektrams atliekamas 25 taškų glotninimas, kas kai kuriais atvejais daro įtaką netikslumams. Kai kuriais atvejais, atlikus 25 taškų glotninimą, spektro kontūras išlieka nepakitęs, tai nulemia programos netikslumą, tačiau yra atvejų, kuomet atlikus glotninimą pakinta spektro forma ir audinys identifikuojamas klaidingai. 13 pav. pateikiami pavyzdžiai, kuomet atlikus glotninimą spektro kontūro pokyčiai minimalūs (13 pav. a) ir kuomet po atlikto glotninimo spektro forma analizuojamoje srityje žymiai pakinta (13 pav. b).



13 pav. Skirtumai tarp spektrų atlikus 25 taškų glotninimą: a – skirtumai nėra reikšmingi spektro kontūrai, b – spektro kontūro forma analizuojamoje spektrinėje srityje (nuo 1200  $\text{cm}^{-1}$  iki 950  $\text{cm}^{-1}$ ) pakinta taip, jog naudojantis komanda „peak picking“ vietoje trijų spektrinių juostų randamos dvi.

Nors atlikus glotninimą kai kuriais atvejais suprastėja programos tikslumas, tačiau atsisakius šio veiksmo su spektrais, iškyla daugiau sunkumų ir dar labiau sumažėja programos tikslumas. Taip yra todėl, jog kai kuriuose spektruose yra triukšmų, kurie gali būti identifikuojami kaip spektrinė juosta. Norint sumažinti šią problemą, galima būtų mažinti „Peak picking“ komandos jautrumą, tam, kad triukšmai nebūtų identifikuojami. Tačiau šiuo atveju toks pasirinkimas ne visada pasitvirtina, kai kuriuose spektruose aiškiai išskiriamos spektrinės juostos nerandamos automatinio būdu. Siekiant gauti geriausią variantą, buvo atliekama spektrinių juostų paieška keičiant parametrus: tiek juostų paieškos jautrumą, tiek spektrui atliekamo glotninimo taškų skaičių. Pastebėta, jog geriausi rezultatai pasiekiami esant 25 taškų glotninimui bei 0,1 % spektrinių juostų paieškos jautrumui, todėl rašant programos kodą pasirinkti šie parametrai.

Dėl aprašytų programos netobulumų ir siekiant optimalaus audinių automatinio atpažinimo programos veikimo nutarta pereiti prie standartizuotų spektrinės kokybinės analizės metodų.

### 2.2.2.3. Spektrų bibliotekų sukūrimas bei spektrų paieškos bibliotekoje atlikimas

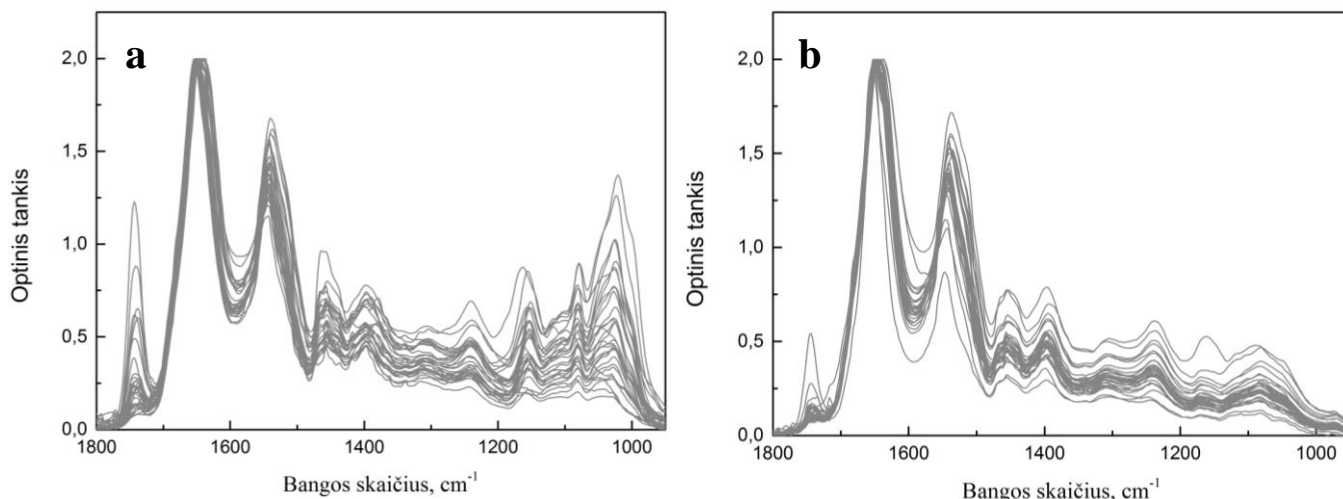
Apžvelgus rezultatus, aptartus ankstesniuose skyreliuose, galima teigti, jog nors ir yra stebimas bendras skirtumų buvimo tarp normalaus ir piktybinio audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų dėsningumas, tačiau atskirais atvejais spektrų identifikavimas gali būti komplikuoatas. Audinių spektrai yra labai sudėtingi, todėl automatiniame audinių atpažinime didelę reikšmę turi ne tik tam tikro vieno konkretaus spektrinio požymio buvimas, tačiau ir spektro kontūro forma. Siekiant kuo tiksliau identifikuoti audinio tipą, taikomas paieškos atlikimo sukurtoje spektrų bibliotekoje metodas ir įvertinamas jo tinkamumas audinio atpažinimui.

Spektrų biblioteka kuriama iš charakteringiausių žmogaus inkstų normalaus ir piktybinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų. Šio darbo metu, siekiant parašyti kuo optimaliau veikiančią programą, buvo sukurta keletas spektrų bibliotekų (keičiant bibliotekos spektrų sudėtį bei apdorojimą). Tyrimo metu sudaromų bibliotekų kūrimas gali būti išskirtas į du etapus, kurie toliau aprašomi šiame skyrelyje.

**Pirmasis bibliotekos kūrimo etapas.** Pirmajame etape, spektrų biblioteka sudaroma tik iš žmogaus inkstų normalaus ir piktybinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų. Tuo tikslu, atlikus vizualinę analizę, iš visų tyrimo metu užregistruotų spektrų atrinkta po 30 navikinio (sergančiųjų šviesiųjų ląstelių karcinoma) ir normalaus audinio tarpląstelinės medžiagos ryškiausius spektrinius požymius turinčių spektrų. Bibliotekai spektrai parinkti taip, kad turėtų ryškius spektrinius požymius, būdingus normaliam arba piktybiniam audiniui ir būtų kuo įvairesni, skirtingo intensyvumo. Naudojantis programiniu paketu „Opus“, šiems spektrams atlikta bazinės linijos korekcija bei minimumo-maksimumo amplitudės normavimas. Kadangi svarbiausi skirtumai tarp normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos spektrų pastebimi srityje nuo  $1800\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$ , spektrų režiai paliekami šiame bangos skaičiaus intervale. Tokiu būdu paruošti 30 normalaus audinio, 30 navikinio audinio bei suvidurkinti visų normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai įkeliami į biblioteką. Biblioteką sudarantys spektrai pateikiami 14 pav.

Sukūrus spektrų biblioteką, į kurią patalpinti ryškiausius spektrinius požymius turintys normalaus ir vėžinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai, atliekama paieška joje. Programiniame pakete „Opus“ spektrų paieška gali būti vykdoma trimis paieškos algoritmais: standartiniu („Standard“), sukurtos spektrinių juostų padėčių lentelės („Use existing peak table“) ar koreliacijos („Spectrum correlation“) algoritmu. Analizės metu, išbandyta atlikti paiešką taikant standartinį bei spektrų koreliacijos (sugerties spektrų be išvestinės, skaičiuojant pirmos ir antros eilės išvestines) metodus. Taikant standartinį paieškos algoritmą, paieškos metu registruojama informacija apie spektrinės juostos padėtį, santykinį intensyvumą kitų juostų atžvilgiu ir juostos

pusplotį (plotį ties puse aukščio). Bibliotekoje esančio spektro juosta gali būti priskirta tiriamajam spektrui, kai tiriamojo spektro sugerties juostos padėtis yra pasislinkusi per pusę bibliotekoje esančio spektro juostos puspločio. Spektų koreliacijos algoritmas remiasi Euklidinių atstumų skaičiavimu. Pasirinkus šį metodą, paieškos algoritmas gali būti vykdomas sugerties spektrui neskaičiuojant išvestinės, skaičiuojant pirmos arba antros eilės išvestines. Paieškos lango pavyzdys ir paieškos atlikimo sekos aprašymas pateikiami 5 priede.

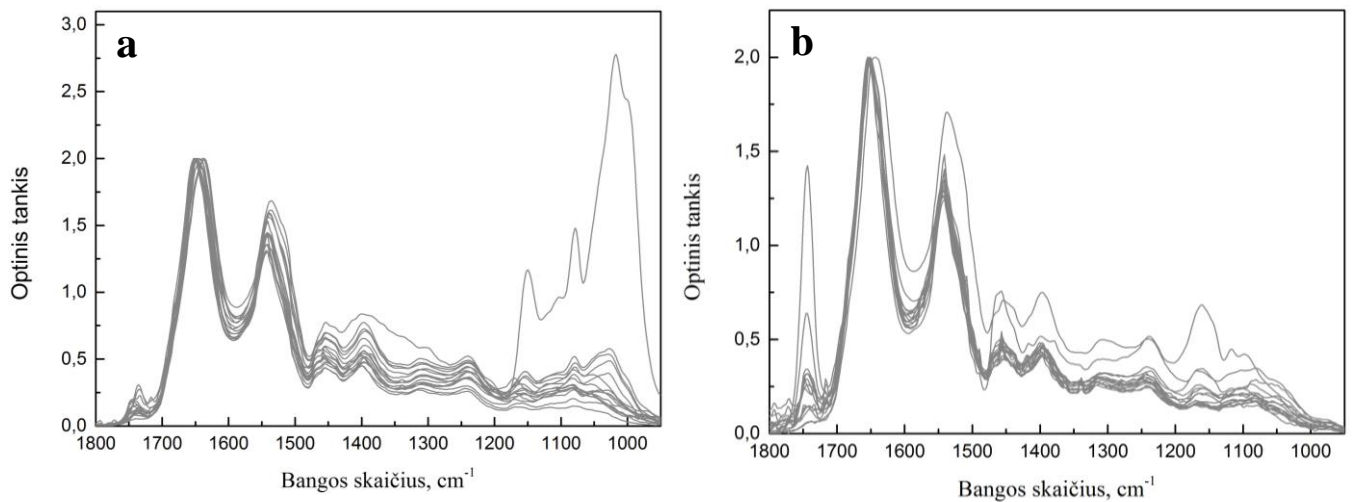


14 pav. a – piktybinio, b – normalaus audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai, patalpinti bibliotekoje.

Kokybinės analizės metu, spektų paieška atliekama su pacientų, sergančių piktybiniais inksto navikais (šviesiųjų ląstelių, papiline, multilokuline, chromofobine bei tubulocistine karcinomomis) navikinio audinio ir visų pacientų normalaus audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrais. Paieška neatliekama su į biblioteką įtrauktais spektrais, todėl analizės metu patikrinta 82 vėžinio audinio ir 85 normalaus audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai. Siekiant rezultatų tikslumo, visi normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai, kuriems bus atliekama paieška bibliotekoje, apdorojami lygiai taip pat, kaip ir į biblioteką talpinami spektrai: atliekama bazinės linijos korekcija, minimumo – maksimumo normavimas bei iškerpami bangos skaičių intervale nuo 1800  $\text{cm}^{-1}$  iki 950  $\text{cm}^{-1}$ .

Atlikus paiešką spektriniame intervale nuo 1800  $\text{cm}^{-1}$  iki 950  $\text{cm}^{-1}$  taikant standartinį ir spektų koreliacijos (neskaičiuojant *IR* sugerties spektro išvestinės, skaičiuojant pirmos ir antros eilės išvestines) algoritmus, nustatyta, jog geriausiai piktybinis audinys atpažįstamas taikant koreliacijos algoritmą, kai skaičiuojama pirmos eilės išvestinė (detalesni paieškos atlikimo rezultatai pateikiami 6 priedo 1 lentelėje, 1 – 5 eilutėse). Dėl šios priežasties, toliau analizuojami audinių atpažinimo rezultatai taikant šį algoritmą.

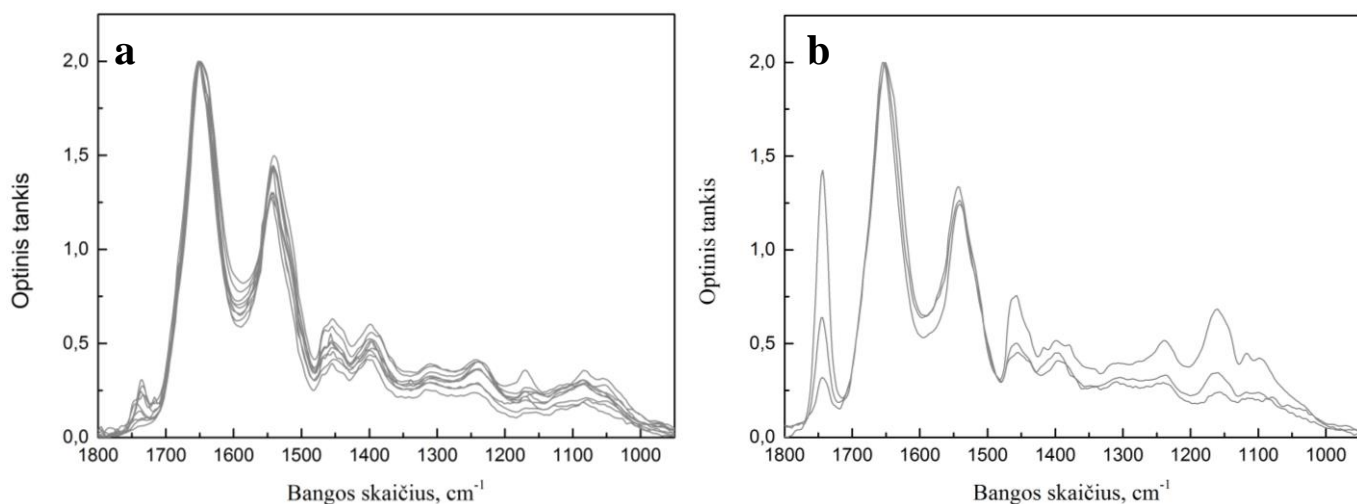
Patikrinus 82 vėžinio ir 85 normalaus audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrus, nustatyta, jog vėžinis audinys gali būti atpažįstamas 79 %, o normalus – 82 % tikslumu. Neteisingai priskirti spektrai pateikiami 15 pav.



15 pav. Neteisingai priskirti audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai, atliekant spektrų paiešką intervale nuo  $1800\text{cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$ : a – vėžinio audinio tarpląstelinės medžiagos spektrai atpažįstami kaip normalaus audinio, b – normalaus audinio tarpląstelinės medžiagos spektrai atpažįstami kaip vėžinio audinio tarpląstelinės medžiagos spektrai.

Iš šių spektrų matyti, jog tarp šių spektrų pastebimi ir spektrai, spektrinėje srityje nuo  $1200\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$  turintys būdingą kontūrą, ryškius spektrinius požymius, kuriais remiantis galima identifikuoti audinio tipą. Siekiant padidinti audinio atpažinimo tikslumą, spektrų paieška atlikta nurodant bangos skaičių intervalą nuo  $1200\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$ . Atlikus paiešką šiame intervale, audinių atpažinimo tikslumas pagerėjo: vėžinis audinys atpažįstamas 89 % tikslumu. Kadangi buvo tikrinami visų tipų piktybinių navikų audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai, nutarta patikrinti, kokios rūšies navikų audinių tarpląstelinės medžiagos spektrai priskirti sveikam audiniui. Palyginus su histologų išvadomis, paaiškėjo, jog 3 iš 9 spektrų atitinka papilinės karcinomos atvejus. Atmetus visus papilinės karcinomos atvejus (šio susirgimo atvejai pasitaiko palyginus retai) iš visų tirtų atvejų, piktybinio audinio atpažinimo tikslumas siekia 92 %. Patikrinus 85 normalaus audinio tarpląstelinės medžiagos spektrus, nustatyta, jog normalus audinys gali būti atpažintas 96 % tikslumu. Tačiau atliekant vizualinę šių spektrų analizę, matyti, jog šie spektrai labai skiriasi nuo vidutinio normalaus audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektro (žiūrėti 1.3. skyrelyje 5 pav.). Šiems spektrams būdinga pakitusi spektro kontūro forma, suintensyvėjusios spektrinės juostos, esančios ties  $1736\text{ cm}^{-1}$  ir atitinkančios lipidų, polisacharidų bei riebiųjų rūgščių  $\nu_{\text{as}}(\text{C}=\text{O})$  virpesius bei ties  $1161\text{ cm}^{-1}$  esančios ir atitinkančios baltymų  $\nu(\text{C}-\text{OH})$  virpesius [55]. Audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai, įvardijami kaip neteisingai priskirtų audinių atlikus paiešką  $1200\text{ cm}^{-1} - 950\text{ cm}^{-1}$  intervale, pateikiami 16 pav.





16 pav. Neteisingai priskirti audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai, atliekant spektrų paiešką intervale nuo  $1200\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$ : a – vėžinio audinio tarpląstelinės medžiagos spektrai atpažįstami kaip normalaus audinio, b – normalaus audinio tarpląstelinės medžiagos spektrai atpažįstami kaip vėžinio audinio tarpląstelinės medžiagos spektrai.

Padidėjęs audinio tipo atpažinimo tikslumas atliekant paiešką srityje nuo  $1200\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$  palyginus su paieška intervale nuo  $1800\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$ , gali būti paaikšintas tuo, jog svarbiausi skirtumai tarp normalaus ir vėžinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų yra matomi srityje nuo  $1200\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$ , ši sritis palyginus su visu intervalu yra nedidelė, todėl jos įnašas atliekant analizę visame intervale yra nedidelis. Atliekant analizę visoje srityje, nesusiję su audinio piktybiškumu pakitimai spektruose gali nusverti reikšmingus požymius srityje nuo  $1200\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$ .

**Antrasis bibliotekos kūrimo etapas.** Antrame spektrų bibliotekos sudarymo etape biblioteka kuriama ne tik iš žmogaus inkstų normalaus ir piktybinio audinio tarpląstelinės medžiagos, bet ir vandens bei etanolio *ATR IR* sugerties spektrų. Tokia spektrų bibliotekos sudėtis pasirinkta dėl tos priežasties, jog audiniuose gali būti didelis šių medžiagų kiekis, kas gali trukdyti teisingai identifikuoti audinio tipą. Etanolis naudojamas audinių dezinfekcijai ir, jei audinyje yra likęs didelis kiekis etanolio, audinys gali būti neteisingai identifikuotas. Biologiniuose audiniuose yra didelis kiekis vandens, todėl užregistravus kačių prapjauto audinio spektrą, audinys gali būti identifikuojamas klaidingai. Daugeliu atvejų užregistravus kačių prapjauto bandinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrą, šis yra labai artimas vandens spektrui ir tik praėjus kiek laiko pradeda ryškėti biologiniam audiniui būdingos spektrinės juostos (tokio atvejo pavyzdys pateikiamas 7 priedo 1 pav.) Patalpinus į biblioteką vandens ir etanolio *ATR IR* sugerties spektrus, atlikus spektrų palyginimą spektrų bibliotekoje, tuo atveju, jei audinyje būtų didelis šių medžiagų kiekis, vartotojas gali būti informuojamas apie bandinio netinkamumą analizei ir bandinio spektro toliau nebeanalizuoti. Programos galutiniame variante naudojama biblioteka sudaryta iš 60 atrinktų ryškiausių spektrinius požymius turinčių inkstų audinių tarpląstelinės medžiagos spektrų: 30

normalaus ir 30 piktybinio (šviesių inksto ląstelių karcinoma sergančių pacientų) bei vandens ir etanolio *ATR IR* sugerties spektrų, jiems atlikus bazinės linijos korekciją. Spektrai į biblioteką keliami  $4000\text{ cm}^{-1} - 400\text{ cm}^{-1}$  intervale tam, kad būtų galima nustatyti bandinio tipą; nustatant audinio piktybiškumą paieška atliekama  $1200\text{ cm}^{-1} - 950\text{ cm}^{-1}$  intervale. 8 priede pateikiami normalaus, navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos, etanolio bei vandens *ATR IR* sugerties spektrai, esantys bibliotekoje.

Atliekant kokybinę spektrinę analizę, šioje spektrų bibliotekoje atlikta paieška: taikant spektrų koreliacijos algoritmą spektrinėje srityje nuo  $1200\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$  atliekant minimumo-maksimumo normavimą bei skaičiuojant pirmos arba antros eilės išvestines, atliekant vektorinį normavimą kuomet skaičiuojama pirmos eilės išvestinė ir atliekant minimumo-maksimumo normavimą, skaičiuojant pirmos eilės išvestinę pakeitus biblioteką sudarančių piktybinio inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų sudėtį. Paieškos atlikimo spektrų bibliotekoje rezultatai pateikiami 6 priedo 1 lentelėje, 6 – 9 eilutėse.

Geriausi rezultatai pasiekti taikant spektrų koreliacijos algoritmą atliekant minimumo-maksimumo normavimą, kuomet skaičiuojama pirmos eilės išvestinė. Nors taikant spektrų koreliacijos algoritmą, kai atliekamas vektorinis normavimas, skaičiuojama pirmos eilės išvestinė, audinio atpažinimo tikslumas sumažėjo, tačiau audinių atpažinimo automatinės analizės atveju vektorinis normavimas yra tinkamesnis metodas, kadangi atliekant minimumo – maksimumo normavimą spektras yra padauginamas iš tokio daugiklio taip, kad minimali spektro vertė būtų lygi 0, o maksimali 2. Šiuo atveju, pasitaikius netipiniam audinio spektrui, tiriamasis ir bibliotekos spektrai gali būti sunormuojami pagal skirtingas spektrines juostas, kas gali iškreipti galutinį programos pateikiamą rezultatą.

#### **2.2.2.4. Automatinio audinių atpažinimo programos, kurios veikimas remiasi spektrų palyginimu bibliotekoje, kūrimas**

Remiantis rezultatais, aptartais ankstesniame skyrelyje, parašyta programa, kurios veikimas remiasi analizuojamojo spektro palyginimu su sudarytos bibliotekos spektrais, turinčiais ryškiausius spektrinius požymius. Programos kūrimui naudotasi programiniame pakete „Opus“ esančia „Macro“ skiltimi.

Automatinės audinių atpažinimo „Macro“ programos kūrimas pradėtas reikiamų kintamųjų sukūrimu. Pirmiausia sukuriama failo tipo kintamasis, atitinkantis nežinomą ir norimą patikrinti žmogaus inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrą, nurodant, jog tai yra „Opus spectrum“ formato failas. Toliau sukuriama tekstinio tipo kintamieji, atitinkantys tikrinamojo spektro vietą kompiuteryje (katalogą) bei pavadinimą. Jiems priskiriamos pradinės vertės atitinkamai „Nurodykite katalogą“ ir „Nurodykite spektro pavadinimą“. Sukuriama tekstinio tipo

kintamieji „Pavadinimas“ ir „Pavadinimas 2“ reikalingi spektro pavadinimo iš sukurtos spektrų bibliotekos nuskaitymui, jiems pradinės vertės nenurodomos. Tam, kad naudojantis sukurta programa būtų galima pasirinkti tikrinti vieną failą ar daugiau, sukuriama du mygtuko tipo kintamieji, nukreipiantys į programos pradžią (norint tikrinti dar vieną spektrą) arba pabaigą (nebenorint tikrinti daugiau spektrų). Tam, kad vartotojas galėtų pasirinkti, tikrinti programos veikimo metu užregistruotą spektrą ar tikrinti anksčiau užregistruotą spektrą iš katalogo, sukuriama mygtukai „Registruoti spektrą“ ir „Tikrinti iš katalogo“, nukreipiantys į tam tikrą programos kodo dalį. Taip pat sukuriama mygtuko tipo kintamieji, skirti registruoti atraminiam („Registruoti atraminį spektrą“) bei bandinio („Registruoti bandinio spektrą“) spektrams, bei mygtukas, nukreipiantis į programos pabaigą („Baigti“).

Programa prasideda sukuriant dialogo su vartotoju lentelę, kurioje vartotojo prašoma pasirinkti vieną iš dviejų audinių tarpląstelinės medžiagos spektrų patikrinimo būdų – užregistruoti ir tikrinti ką tik užregistruotą spektrą arba tikrinti pasirinktą spektrą iš katalogo. Šioje lentelėje vartotojo klausama „Norėtumėte užregistruoti ar tikrinti jau esamą spektrą iš katalogo?“ Pasirinkus „Registruoti spektrą“, vartotojui parodoma kita lentelė, joje pranešama, jog „Bus registruojamas atraminis spektras. Įsitikinkite, jog *ATR* kristalas švarus.“ Šioje lentelėje pateikiami du pasirinkimai: „Registruoti atraminį spektrą“ ir „Baigti“. Paspaudus „Baigti“ programos langas užsidaro, pasirinkus „Registruoti atraminį spektrą“ – registruojamas atraminis spektras. Užregistravus atraminį spektrą, vartotojui parodoma kita lentelė, kurioje pranešama, jog „Bus registruojamas bandinio spektras. Pridėkite bandinį prie *ATR* kristalo.“ Šioje lentelėje taip pat pateikiami du pasirinkimo variantai: „Registruoti bandinio spektrą“ ir „Baigti“. Pasirinkus „Registruoti bandinio spektrą“ ir atlikus registravimą, nustatomas bandinio tipas (ar bandinio spektras priskiriamas audiniui, ar vandeniui arba etanoliui). Tuo tikslu atliekama paieška spektrų bibliotekoje, kurioje patalpinti žmogaus inkstų normalaus ir piktybinio audinių tarpląstelinės medžiagos bei vandens ir etanolio *ATR IR* sugerties spektrai. Paieška spektrų bibliotekoje atliekama spektriniame intervale nuo 4000 iki 400  $\text{cm}^{-1}$ , taikant spektrų koreliacijos algoritmą, atliekant vektorinį normavimą bei skaičiuojant pirmos eilės išvestinę. Jei, atliekant paiešką bibliotekoje, analizuojamas spektras geriausiai atitinka bibliotekoje esančius vandens arba etanolio spektrus, vartotojui atitinkamai parodoma lentelė su užrašu: „Spektras nėra priskiriamas audiniui, bandinyje gali būti didelis kiekis vandens“ arba „Spektras nėra priskiriamas audiniui, bandinyje gali būti didelis kiekis etanolio“. Šiais atvejais pasirinkto spektro analizė baigta, vartotojo klausama ar norima tikrinti dar vieną spektrą. Tuo tikslu sukurtoje lentelėje nėra numatytyjū mygtukų, o sukuriama „Taip“ ir „Ne“ mygtukai. Paspaudus „Taip“, grįžtama į programos pradžią, vėl paprašoma įvesti spektrą. Pasirinkus „Ne“ programos langas užsidaro. Jei tikrinamasis spektras geriausiai atitinka normalaus arba piktybinio audinio spektrą, vartotojui parodoma lentelė, kurioje pranešama, jog bandinys

priskiriamas audiniui. Toliau pakartotinai yra atliekama paieška sukurtoje spektrų bibliotekoje, tačiau paieškos atlikimas vyksta spektrinėje srityje nuo  $1200\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$ . Atlikus paiešką, iš rezultatų lentelės nuskaitytas geriausiai tikrinamąjį spektrą atitinkančio (turinčio didžiausią spektrų atitikimo indekso vertę) spektro pavadinimas. Priklausomai nuo to, ar tikrinamojo spektro pavadinimas nurodo piktybinį ar sveiką audinį, vartotojui parodoma lentelė, atitinkamai pranešanti, jog „Tikrinamasis spektras priskiriamas piktybiniam audiniui“ arba „Tikrinamasis spektras priskiriamas sveikam audiniui“. Nustačius audinio tipą, vartotojo klausama, ar norima tikrinti dar vieną spektrą. Priklausomai nuo vartotojo pasirinkimo, grįžtama į programos pradžią arba darbas su programa baigiamas.

Programos pradžioje pasirinkus „Tikrinti spektrą iš katalogo“, vartotojui parodoma lentelė pavadinimu „Spektro įkėlimas“, kurioje į laukelius prašoma įvesti spektro vietą kompiuteryje („Nurodykite katalogą“) bei spektro pavadinimą („Nurodykite spektro pavadinimą“). Nurodžius šiuos duomenis, programos veikimo seka tokia pati kaip ir tikrinant analizės metu užregistruotą spektrą. Parašytas programos kodas bei programos veikimą paaiškinanti blokinė schema pateikiami 9 ir 10 prieduose.

#### **2.2.2.4.1. Audinio atpažinimo tikslumo įvertinimas**

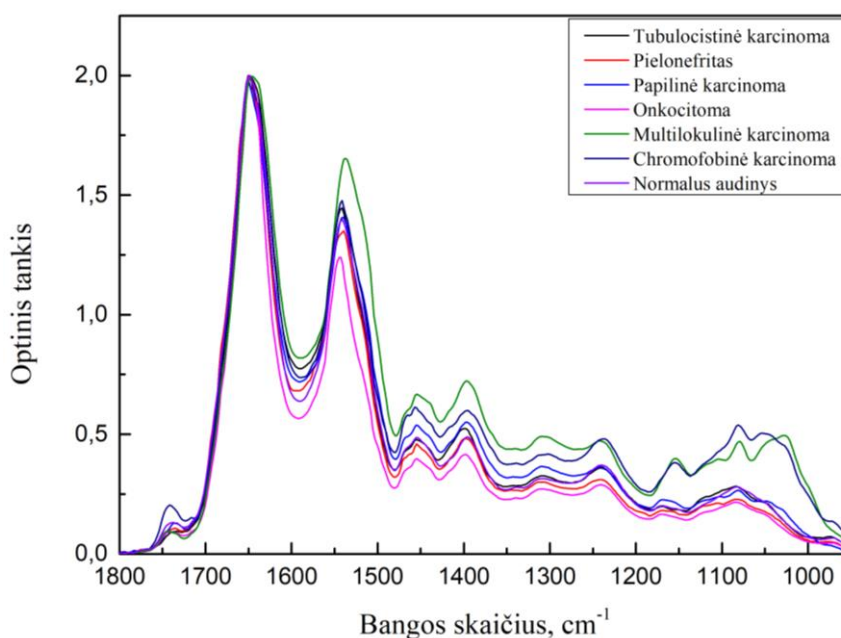
Tyrimo eigos metu parašyta keletas programos kodų, keičiant tam tikrus parametrus, įterpiant naujus veiksmus bei įvertinant tarpinius rezultatus. Programos testavimas atliekamas patikrinant normalaus audinio ir visų tipų piktybinių inkstų navikų (šviesiųjų ląstelių, papilinės, chromofobinės, tubulocistinės, multilokulinės karcinomos) audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrus.

Programos veikimo metu, spektrų paieška sukurtoje spektrų bibliotekoje atliekama du kartus: pirmiausia, siekiant nustatyti, ar tiriamasis bandinys priskiriamas audiniui, vandeniui arba etanolui, atliekama paieška platesnėje spektrinėje srityje (nuo  $4000\text{ cm}^{-1}$  iki  $400\text{ cm}^{-1}$ ), vėliau, identifikuojant audinio tipą – srityje, atitinkančioje glikogeną (nuo  $1200\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$ ). Įvertinus parašytos programos audinių atpažinimo tikslumą esant skirtingiems paieškos spektrų bibliotekoje vykdymo parametrams bei skirtingai bibliotekų sudėčiai, geriausi rezultatai pasiekiami kuomet remiamasi paieškos atlikimu spektrų bibliotekoje, kurioje patalpinta 30 normalaus, 30 piktybinio inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos, vandens bei etanolio *ATR IR* sugerties spektrai. Paieška atliekama taikant spektrų koreliacijos algoritmą, tikrinamajam bei bibliotekoje esantiems spektrams atliekant vektorinį normavimą bei skaičiuojant pirmos eilės išvestinę. Šiuo atveju programa normalų audinį identifikuoja 94 %, o piktybinį 88 % tikslumu. Papildžius biblioteką taip, kad joje būtų 40 normalaus, 40 piktybinio audinio tarpląstelinės medžiagos, vandens bei etanolio *ATR IR* sugerties spektrai, geresnių rezultatų nepasiekta. Identifikuojant normalius ir piktybinius

audinius ir praplėtus paieškai taikomą spektrinę sritį nuo  $1500\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$ , rezultatai suprastėjo: normalus audinys identifikuojamas 86 %, o piktybinis 79 % tikslumu.

### 2.2.2.5. Skirtingi inkstų susirgimų tipai ir jų tinkamumas automatinei audinių analizei

Šio tyrimo metu, kaip ir nurodoma literatūroje [14], dažniausiai pasitaikantis inkstų navikų tipas – šviesiųjų inksto ląstelių karcinoma (iš viso per šį laikotarpį nustatyta 98 šviesiųjų inksto ląstelių karcinomos atvejai), kiti inkstų navikų atvejai pasitaiko gerokai rečiau (16 atvejų). Palyginus tyrimo metu užregistruotus inkstų audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrus, esant įvairiems inkstų susirgimams, galima pastebėti, jog skirtingų susirgimų atvejais spektrai skiriasi (patologinio inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų vidurkiai įvairių inkstų susirgimų atvejais, atlikus bazinės linijos korekciją bei minimumo – maksimumo normavimą pateikiami 17 pav.).



17 pav. Skirtingų inksto susirgimų patologinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų vidurkiai.

Palyginus audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrus esant skirtingiems inkstų susirgimams, pielonefrito (nespecifinių fibrozinų uždegiminių pakitimų) bei onkocitomos atvejais spektrai yra panašūs į normalaus inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos spektrus. Patikrinus programos veikimą su šių susirgimų patologinio inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrais, audinys identifikuojamas kaip normalus inkstų audinys, todėl šie atvejai į analizę neįtraukiami.

Tubulocistinės ir multilokulinės karcinomos atvejais, navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai panašūs į normalaus audinio tarpląstelinės medžiagos spektrą, tačiau šio

susirgimo atvejų per visą tyrimo laikotarpį pasitaikė atitinkamai vienas ir du, todėl apie spektrų panašumą išvadų daryti negalima.

Papildinės karcinomos atveju, audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektro kontūro forma panaši į normalaus audinio spektrą, tačiau spektrinėje srityje nuo 1140 iki 984  $\text{cm}^{-1}$  galima pastebėti nežymiai persiklojusias spektrines juostas, kurių ryškiausiai matomos padėtys yra ties 1105  $\text{cm}^{-1}$ , 1081  $\text{cm}^{-1}$ , 1048  $\text{cm}^{-1}$ . Atlikus programos testavimą bei vizualinę inkstų audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų analizę, galima pastebėti, jog kai kurių inksto navikų atvejais, piktybinis audinys gali būti identifikuojamas kaip normalus audinys dėl spektro kontūro panašumo į normalaus audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrą. Todėl parašytos programos tinkamumo kitų naviko rūšių identifikavimo įvertinimui bei tikslesnėms išvadoms yra reikalinga didesnė kitų susirgimų piktybiniais inkstų navikais atvejų imtis. Siekiant didesnio tikslumo analizuojami tik šviesiųjų inksto ląstelių karcinomos atvejai.

Analizuojant tik tuos atvejus, kai diagnozuojama šviesiųjų inksto ląstelių karcinoma, programos tikslumas atpažįstant piktybinį audinį siekia 90 %, atpažįstant normalų – 94 %.

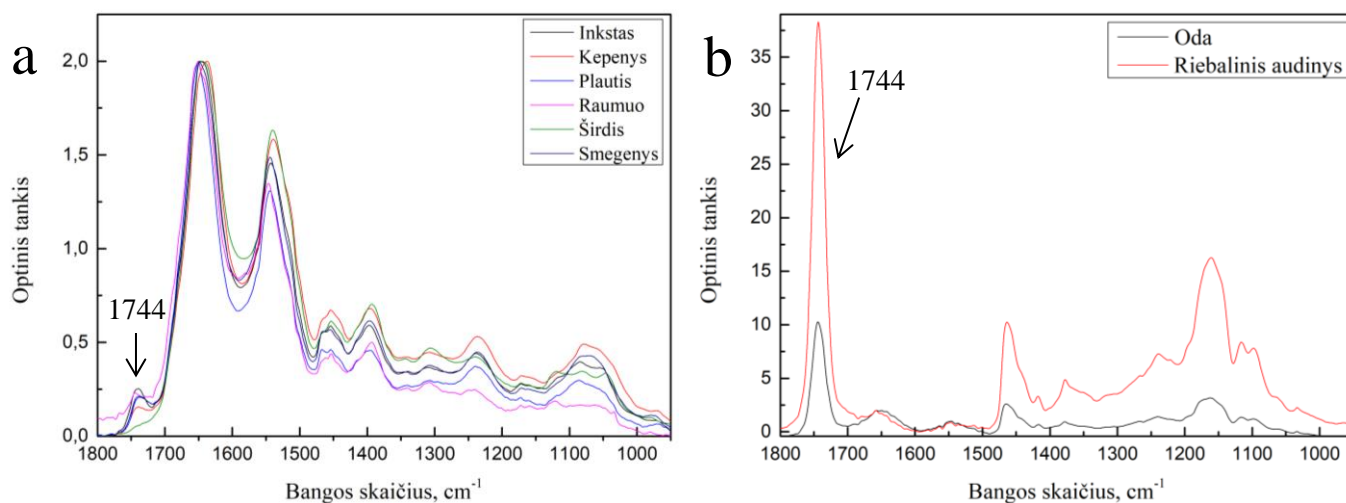
#### **2.2.2.6. Skirtingų organų bei atskirų inksto sričių audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų tinkamumas automatinei analizei**

Siekiant nustatyti pagrindinius skirtumus tarp skirtingų organų audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų ir jais remiantis automatizuotai identifikuoti audinio rūšį, užregistruota įvairių kiaulės organų (plaučių, inkstų, kepenų, smegenų, širdies, raumenų bei riebalinio audinio) audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai. Kiaulės audiniai tyrimui pasirinkti dėl žmogaus ir kiaulės anatomicinio bei histologinio panašumo [56].

Užregistruoti skirtingų organų audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai (spektrams atlikta bazinės linijos korekcija ir minimumo – maksimumo normavimas) pateikiami 18 pav.

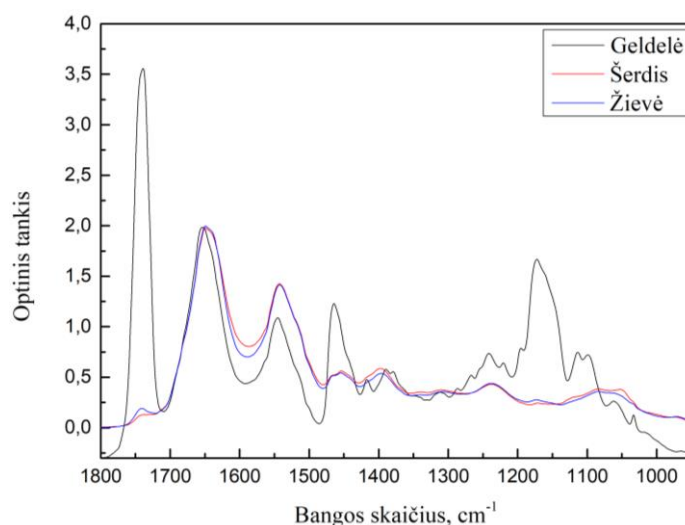
Palyginus skirtingų organų audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrus galima pastebėti, jog daugelio organų (inksto, kepenų, plaučio, raumens, širdies, smegenų) audinių tarpląstelinės medžiagos spektruose vyrauja baltymų Amidas I ir Amidas II atitinkančios spektrinės juostos. Audinių, kuriuose yra didelis lipidų kiekis, spektruose vyrauja spektrinės juostos, esančios ties 1744  $\text{cm}^{-1}$ , atitinkančios lipidų, polisacharidų bei riebiųjų rūgščių  $\nu(\text{C}=\text{O})$  virpesius [55]. Palyginus audinių, kuriuose lipidų kiekis nėra didelis, spektrus, matyti, jog ryškesni spektriniai skirtumai tarp skirtingų organų audinių spektrų stebimi spektrinėje srityje, apimančioje bangos skaičių intervalą nuo 1200 iki 950  $\text{cm}^{-1}$ . Šioje spektrinėje srityje skirtingų organų audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektruose pastebimas skirtingas spektrinių juostų skaičius bei intensyvumas. Tačiau, siekiant nustatyti specifinį spektrinį požymį, kuriuo remiantis

būtų galima nustatyti konkretaus audinio buvimą, lyginant spektrinių juostų padėtis, intensyvumų santykius ar atliekant palyginimą spektrų bibliotekoje, reikalinga didesnė kiekvieno organo bandinių imtis tam, kad būtų galima nustatyti rezultatų atsikartojamumą.



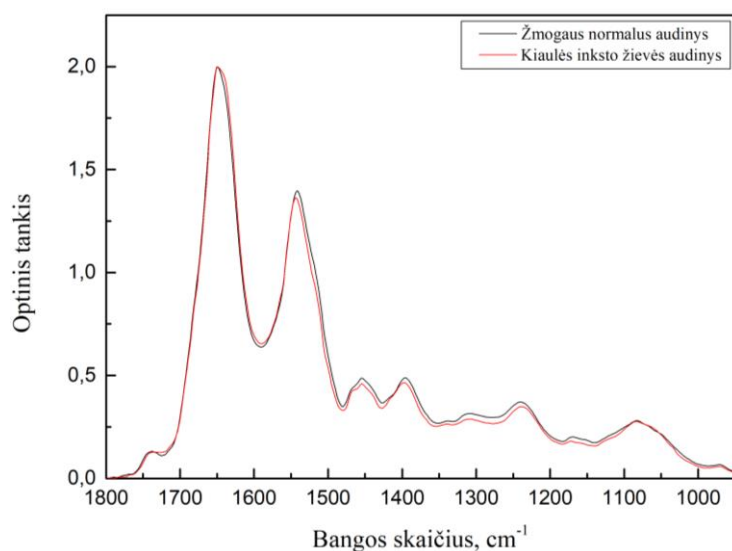
18 pav. Suvidurkinti įvairių kiaulės organų audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai: a pav. - audinių, kuriuose lipidų kiekis nedidelis (inksto, kepenų, plaučio, raumens, širdies, smegenų), b pav. – audinių, kuriuose didelis lipidų kiekis (oda, riebalinis audinys).

Siekiant nustatyti skirtumus tarp skirtingų inksto dalių audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų bei šių skirtumų galimą poveikį automatinio atpažinimo programos tikslumui, užregistruota kiaulės inkstų žievės, šerdies bei geldelės tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai (bandinių paėmimo vietos pateikiamos 11 priedo 1 pav.) dviejų individų atvejais. Suvidurkinti inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai, kai bandiniai paaimami iš skirtingų organo vietų, pateikiami 19 pav., kiekvienos inksto dalies visi užregistruoti spektrai dviejų individų atvejais pateikiami 11 priedo 2 pav. (spektrams atlikta bazinės linijos korekcija bei minimumo – maksimumo normavimas).



19 pav. Suvidurkinti kiaulės inkstų audinių, paimtų iš skirtingų inksto sričių, tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai.

Palyginus kiaulės inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrus, kai bandiniai paiimami iš skirtingų inksto vietų, galima pastebėti skirtumus tarp skirtingų inksto dalių spektrų. Remiantis tuo, jog kiaulės inksto skirtingų sričių audinių tarpląstelinės medžiagos spektrai skiriasi, galima daryti prielaidą, jog ir žmogaus atveju skirtingų inksto dalių spektrai skirsis. Palyginus kiaulės ir žmogaus inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrus, galima pastebėti, jog kiaulės inksto žievės spektras yra labai panašus į daugelio atvejų žmogaus normalaus inkstų audinio spektrą – palyginimui žmogaus normalaus inkstų audinio iš nenustatytos organo srities ir kiaulės inksto žievės audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai pateikiami 20 pav. (spektrams atlikta bazinės linijos korekcija ir minimumo maksimumo normavimas).

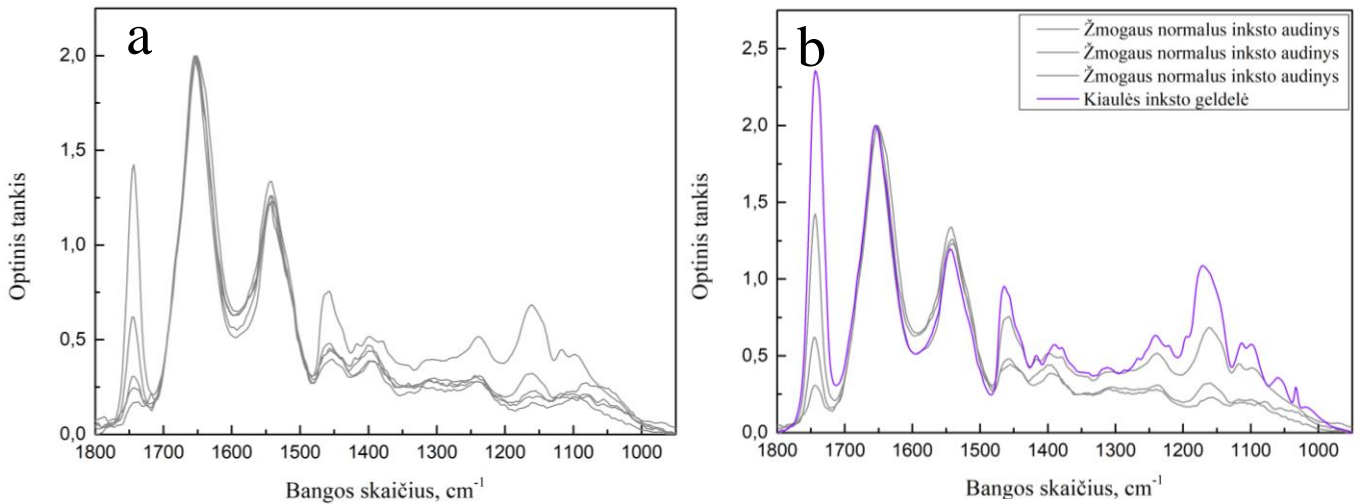


20 pav. Žmogaus normalaus inkstų audinio (iš nenurodytos organo srities) ir kiaulės inksto žievės audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai.

Kadangi dažniausiai pasitaikantis inkstų naviko atvejis yra šviesiųjų ląstelių karcinoma (šviesiųjų ląstelių karcinoma yra inksto žievės navikas), o operacijos metu pašalinamas navikas su aplink esančio normalaus audinio atsarga, tad gali būti, jog gaunamas normalaus audinio bandinys yra būtent inksto žievės bandinys. Jei keltume hipotezę, jog 20 pav. pateikiamas žmogaus normalaus inkstų audinio bandinys yra paimtas būtent iš inksto žievės, galėtume laikyti, jog kiaulės ir žmogaus inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai yra panašūs.

Atliekant parašytos audinių automatinio atpažinimo programos testavimą, pastebėta, jog dalis klaidingai identifikuojamų (kuomet normalus audinys identifikuojamas kaip piktybinis) žmogaus normalaus inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų yra netipiniai. Klaidingai identifikuojami žmogaus normalaus inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai pateikiami 21 a pav. (spektrams atlikta bazinės linijos korekcija ir minimumo – maksimumo normavimas).





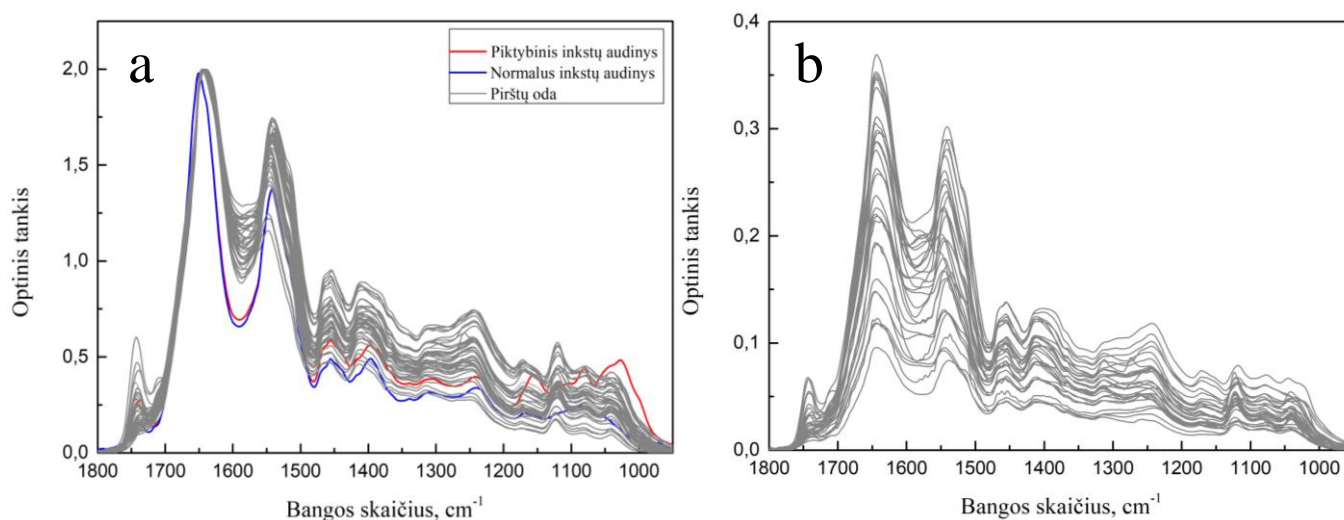
21 pav. Žmogaus normalaus ir kiaulės inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai: a pav. - klaidingai identifikuoti žmogaus normalaus inkstų audinio, b pav. – kai kurie klaidingai identifikuoti žmogaus normalaus inkstų audinio ir kiaulės inksto geldelės tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties

Palyginus klaidingai identifikuojamus žmogaus normalaus inkstų audinio ir kiaulės inksto geldelės tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrus, galima pastebėti, jog dalis klaidingai atpažintų žmogaus ir kiaulės inksto geldelės spektrų yra panašūs. Palyginimui kai kurie klaidingai identifikuoti žmogaus normalaus inkstų audinio ir kiaulės inksto geldelės tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai pateikiami 21 b pav. (spektrams atlikta bazinės linijos korekcija ir minimumo – maksimumo normavimas). Čia galima pastebėti, jog tiek kiaulės inksto geldelės, tiek žmogaus normalaus inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos spektrams būdinga suintensyvėjusi spektrinė juosta ties  $1746\text{ cm}^{-1}$ , atitinkanti lipidų, polisacharidų bei riebiųjų rūgščių  $\nu(\text{C}=\text{O})$  virpesius [55]. Jei remtumėmės hipotetine žmogaus ir kiaulės inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų analogija, galėtume manyti, jog dalis klaidingai identifikuojamų žmogaus normalaus audinio bandinių yra paimami iš inksto geldelės srities. Tokiu atveju sukūrus naują spektrų biblioteką, kurioje būtų patalpinta inksto geldelės tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai, būtų galima pagerinti audinių atpažinimo programos tikslumą. Tačiau tai galime laikyti tik prielaida, norint patikrinti šią hipotezę, reikalingi detalesni tyrimai su žmogaus skirtingų inksto dalių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrais. Turint skirtingų inksto dalių *ATR IR* sugerties spektrų pavyzdžių, būtų galima atlikti tiek vizualinę spektrų analizę, tiek papildyti programoje naudojamą spektrų biblioteką ir taip patobulinus programą siekti tikslesnių audinio atpažinimo rezultatų.

### 2.2.2.7. Metodo tinkamumas žmogaus pirštų odos ATR IR sugerties spektrų identifikavimui

Siekiant nustatyti, ar taikoma audinių atpažinimo metodika yra tinkama skirtingų audinių klasių spektrų identifikavimui, atlikta žmogaus pirštų odos ATR IR sugerties spektrų analizė. Tyrimo metu užregistruota 62 asmenų pirštų odos ATR IR sugerties spektrai.

Ryškiausius spektrinius požymius turintys pirštų odos bei normalaus ir piktybinio audinio tarpląstelinės medžiagos ATR IR sugerties spektrai pateikiami 22 a pav. (spektrams atlikta bazinės linijos korekcija bei minimumo-maksimumo normavimas). Palyginus pirštų odos ir inkstų normalaus bei piktybinio audinio tarpląstelinės medžiagos ATR IR sugerties spektrus galima pastebėti, jog svarbiausi skirtumai tarp pirštų odos ir inkstų audinių tarpląstelinės medžiagos ATR IR sugerties spektrų stebimi spektrinėje srityje nuo  $1200\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$ . Šioje srityje pirštų odos audinio ATR IR sugerties spektruose būdingos spektrinės juostos ties  $1171\text{ cm}^{-1}$  atitinkančios I tipo kolageno  $\nu(\text{C-O})$  bei ties  $1121\text{ cm}^{-1}$ ,  $1078\text{ cm}^{-1}$  ir  $1041\text{ cm}^{-1}$  atitinkančios nukleorūgščių fosfodiesterių grupės  $\nu_s(\text{PO}_2^-)$  virpesius [55].



22 pav. Žmogaus pirštų odos ATR IR sugerties spektrai: a pav. - ryškiausius spektrinius požymius turinčių žmogaus pirštų odos bei normalaus ir piktybinio audinio tarpląstelinės medžiagos ATR IR sugerties spektrų palyginimas; b pav. - biblioteką sudarantys žmogaus pirštų odos ATR IR sugerties spektrai.

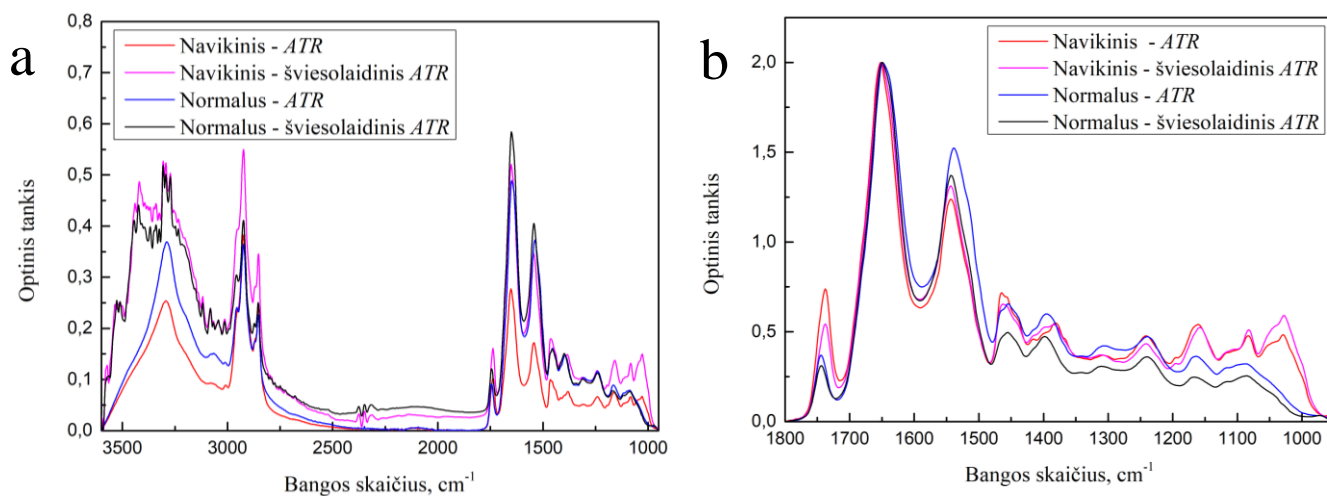
Turima spektrų biblioteka (aprašyta 2.2.2.3. skyrelyje, jos sudėtis pateikiama 8 priede) papildyta 30 žmogaus odos spektrų, programa pakoreguota taip, kad nustačius tiriamojo spektro atitikimą su žmogaus odos spektru, vartotojas būtų informuojamas, jog tiriamasis spektras priskiriamas odai (pirštų odos ATR IR sugerties spektrai, patalpinti bibliotekoje, pateikiami 22 b pav., pakoreguotos programos blokinė schema pateikiama 12 priede). Pakoreguotos programos veikimas patikrintas su 32 žmogaus pirštų odos bei 85 normalaus ir 82 piktybinio inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos ATR IR sugerties spektrais. Atlikus programos testavimą, nustatyta, jog žmogaus odos spektrai identifikuojami 100 % tikslumu. Programos tikslumas palyginus su programa, kurioje naudojama

žmogaus inkstų audinių tarpląstelinės medžiagos bei vandens ir etanolio *ATR IR* sugerties spektrų biblioteka, identifikuojant sveiką žmogaus inkstų audinį nepakito – normalus inkstų audinys identifikuojamas 94 % tikslumu. Identifikuojant piktybinį inkstų audinį, nustatyta, jog 10 iš 82 spektrų priskiriami normaliam inkstų audiniui (neteisingai identifikuojami spektrai sutampa su anksčiau parašytos programos neteisingai identifikuojamais spektrais), 1 iš 82 spektrų priskiriamas odai. Apibendrinus piktybinio audinio atpažinimo tikslumą, piktybinis audinys atpažįstamas 87 % tikslumu. Atsižvelgus į neteisingai identifikuojamų piktybinių audinių atvejų histologų pateikiamas išvadas ir įvertinant programos tikslumą atpažįstant šviesių inksto ląstelių karcinomos atvejus, šie atvejai atpažįstami 90 % tikslumu. Šio tipo navikų atpažinimas yra identiškas anksčiau aprašytos programos audinių atpažinimo tikslumui. Apibendrinus gautus rezultatus, galima teigti, jog turint didelę spektrų imtį (analizuojamu atveju 30 spektrų imtis yra pakankamas skaičius), galima sėkmingai identifikuoti skirtingų audinių tipų spektrus. Paieškos spektrų bibliotekoje metodas yra tinkamas ne tik standartiškai naudojamuose tyrimuose nustatant bandinį sudarančius komponentus, tačiau ir sudėtingų kompleksinių spektrų klasifikavimui. Analizuojamu atveju spektrai gali būti klasifikuojami į tris atskiras audinių grupes: normalaus, piktybinio inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos bei pirštų odos spektrus. Spektrinė sritis, apimanti bangos skaičių intervalą nuo  $1200\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$ , yra tinkama ne tik inkstų audinio piktybiškumo nustatymui, tačiau ir visai kito audinio tipo – odos – spektrų identifikavimui.

#### **2.2.2.8. Automatinės audinių atpažinimo sistemos pritaikymas *in situ* inkstų navikinių audinių diagnostikai**

Siekiant atlikti automatinį audinių identifikavimą *in situ*, atliekami matavimai su 2.1.5. skyrelyje aprašyta šviesolaidine spektrometrine sistema. Dėl spinduliuotės nuostolių šviesolaidyje, *ATR IR* sugerties spektruose spektrinėje srityje nuo  $4000\text{ cm}^{-1}$  iki  $2500\text{ cm}^{-1}$  stebimi triukšmai (palyginimui to paties paciento normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai užregistruoti spektrometru „ALPHA“ ir šviesolaidine spektrometrine sistema pateikiami 23 a pav.; spektrams atlikta bazinės linijos korekcija). Šioje spektrinėje srityje nėra stebima spektrinių juostų, kurios galėtų būti naudojamos audinio piktybiškumo nustatymui, todėl triukšmai nedaro įtakos audinio identifikavimo tikslumui. Pirštų antspaudo spektrinėje srityje ( $1800\text{ cm}^{-1}$  –  $950\text{ cm}^{-1}$ ), kurioje stebimi svarbiausi biologinių darinių spektriniai požymiai, spektrų, užregistruotų naudojant šviesolaidinę sistemą kokybė nenusileidžia spektrometru „ALPHA“ užregistruotiems *ATR IR* sugerties spektrams, todėl naudojama šviesolaidinė sistema yra tinkama biologinių darinių spektrų registravimui. 23 b pav. pateikiami to paties paciento normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai, užregistruoti minėtais

spektrometrais, abiem atvejais registravimas vyksta matuojant ir suvidurkinant 64 spektrus; spektrams atlikta bazinės linijos korekcija ir minimumo-maksimumo normavimas.

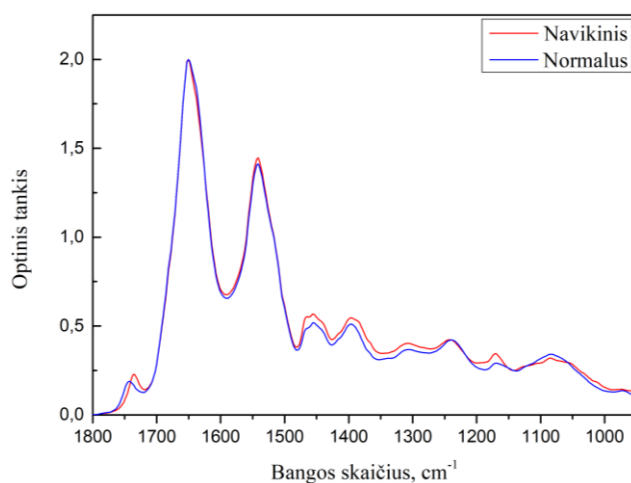


23 pav. To paties paciento normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos ATR IR sugerties spektrai, užregistruoti spektrometru „ALPHA“ ir šviesolaidine spektrometrine sistema (spektrai paveikslo legendoje pažymėti atitinkamai trumpiniu ATR ir šviesolaidinis ATR).

Siekiant nustatyti automatinės audinių atpažinimo sistemos tinkamumą inkstų navikinių audinių diagnostikai *in situ*, parašytos programos (žr. 2.2.2.4. skyrelį) veikimas išbandytas su šviesolaidine spektrometrine sistema. Programos testavimas atliktas su 8 pacientų normalaus ir navikinio inkstų audinio bandiniais. Matavimai atliekami laboratorijoje iškart po chirurginės operacijos, bandiniams dar nepradėjus irti.

Patikrinus audinių automatinio atpažinimo programos veikimą su 8 normalaus ir navikinio audinių bandiniais, nustatyta, jog normalus audinys identifikuojamas 100 % tikslumu, o navikinis audinys - 88 % tikslumu. Navikinio audinio atveju, klaidingai identifikuojamas 1 atvejis iš 8, tačiau atlikus vizualinę analizę, galima pastebėti, jog navikinio audinio spektras yra artimas normalaus audinio spektrui (normalaus ir klaidingai identifikuojamo navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos ATR IR sugerties spektrai pateikiami 24 pav., spektrams atlikta bazinės linijos korekcija ir minimumo - maksimumo normavimas).

Nagrinėjamu atveju audinys gali būti identifikuojamas kaip normalus dėl tos priežasties, jog šiuo atveju nėra pateiktos gydytojų histologų išvados ir nėra aiškus naviko tipas. 2.2.2.5. skyrelyje aptarta, jog tiksliausia analizės sistemą taikyti šviesių inksto ląstelių karcinomos atvejams dėl turimos didelės atvejų



24 pav. Normalaus ir klaidingai identifikuojamo navikinio inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos ATR IR sugerties spektrai.

imties ir sudarytos audinių spektrų bibliotekos. Esant kitiems navikų tipams, rezultatas gali būti netikslus, esant onkocitomos atvejams – navikas identifikuojamas kaip normalus audinys. Todėl tikslesnis audinių atpažinimo sistemos įvertinimo rezultatas būtų pasiekiamas analizuojant tik šviesiųjų inksto ląstelių karcinomos atvejus.

Pasiektas audinio atpažinimo tikslumas taikant šviesolaidinę spektrometrinę sistemą skiriasi nuo aptarto 2.2.2.4.1. skyrelyje dėl tos priežasties, jog taikant šviesolaidinę spektrometrinę sistemą atlikti tik pirminiai tyrimai su nedideliu bandinių skaičiumi. Tikslesniam įvertinimui reikalinga didesnė bandinių imtis ir bandinių klasifikavimas pagal naviko tipus, tačiau remiantis gautais rezultatais galima teigti, jog taikoma metodika yra tinkama sėkmingam audinių identifikvimui *in situ*, o ateityje gali būti pritaikoma ir klinikiniam tyrimams *in vivo*.

### 2.2.3. Skirtingų analizės metodų palyginimas ir rezultatų aptarimas

Šiame darbe analizuojami keli metodai, kurie gali būti pritaikomi normalių ir vėžinių inkstų audinių automatiniam atpažinimui. Sukūrus automatinę audinių atpažinimo sistemą, kurią taikant būtų registruojami ir iškart analizuojami *IR* sugerties spektrai bei identifikuojami normalūs ir navikiniai audiniai, tai būtų didelis žingsnis į priekį siekiant pritaikyti infraraudonosios spektrometrijos metodus klinicinei vėžio diagnostikai. Pasaulyje dar nėra sukurta automatinė audinių atpažinimo sistema, tačiau siekiant ją sukurti, taikomi statistiniai spektrų analizės metodai [4, 27, 57]. Šiame darbe nagrinėjamos galimybės pritaikyti savarankiškai parašytą automatinio audinių atpažinimo programą, kuri veikia analizuojamojo spektro palyginimu su sudarytos spektrų bibliotekos spektrais, kas yra nauja virpesinės spektrometrijos metodų taikymui vėžio diagnostikoje. Bandant pritaikyti integrinių intensyvumų, atitinkančių glikogeno ir baltymų Amidas I spektrines juostas, santykio verčių palyginimą normaliame ir vėžiniame audinyje, nustatyta, jog šio metodo pritaikymas nėra galimas dėl didelio netikslumo. Esant skirtingiems glikogeną atitinkančios spektrinės srities integravimo režiams, atliekant skirtingą spektrų apdorojimą bei rezultatus analizuojant esant skirtingiems naviko pašalinimo operacijos tipams, gautas didelis verčių sutapimas esant tiek normaliam, tiek piktybiniam audiniui. Verčių atitikimas siekia iki 64 %, kas reikštų, jog audinys klaidingai atpažįstamas dažniau nei teisingai. Naudojantis programiniame pakete „Opus“ esančia „Macro“ skiltimi ir parašius programą, kuri remiasi spektrinių juostų skaičiaus nustatymu glikogeną atitinkančioje spektrinėje srityje (apimančioje bangos skaičių intervalą nuo  $1200\text{ cm}^{-1}$  iki  $950\text{ cm}^{-1}$ ) ir patikrinus jos veikimą, nustatyta, jog vėžinis inkstų audinys įvertinamas 84 %, o normalus 98 % tikslumu. Šio audinių atpažinimo metodo atsisakyta dėl galimos triukšmų *ATR IR* sugerties spektruose įtakos spektrinių juostų skaičiaus nustatymui. Sudarius ryškiausius spektrinius požymius turinčių žmogaus inkstų normalaus ir piktybinio audinių tarpląstelinės medžiagos bei vandens ir etanolio *ATR IR* sugerties spektrų biblioteką ir

programiniame pakete „Opus“ parašyta programa, kurios veikimo metu palyginamas užregistruotas spektras su turimais bibliotekos spektrais. Tyrimo metu išbandyta keletas paieškos atlikimo spektrų bibliotekoje parametrų kombinacijų variantų. Geriausias rezultatas pasiekiamas, kuomet sukurtoji biblioteka sudaryta iš 30 normalaus, 30 piktybinio žmogaus inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos, vandens ir etanolio *ATR IR* sugerties spektrų, paieška atliekama  $1200\text{ cm}^{-1} - 950\text{ cm}^{-1}$  spektrinėje srityje taikant koreliacijos algoritmą kuomet atliekamas vektorinis spektrų normavimas bei skaičiuojama pirmos eilės išvestinė. Patikrinus programos veikimą su 85 piktybinio ir 82 normalaus žmogaus inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrais, nustatytas 94 % tikslumas atpažįstant normalų audinį ir 88 % tikslumas atpažįstant visų tipų inkstų piktybinius navikus. Atlikus skirtingų inkstų susirgimų audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų analizę, nutarta audinių atpažinimo metodą taikyti tik šviesiųjų inksto ląstelių karcinomos atvejams, nes šių navikų atvejai pasitaiko dažniausiai (šio tyrimo metu diagnozuoti 98 šviesiųjų inksto ląstelių karcinomos atvejai iš 115 inkstų susirgimų atvejų), o siekiant tikslaus kitų tipų navikų atpažinimo yra reikalinga didesnė susirgimų imtis. Analizuojant tik šviesiųjų inksto ląstelių karcinomos atvejus, nustatytas 90 % tikslumas atpažįstant piktybinį audinį. Apibendrinus šiuos rezultatus ir palyginus juos su publikacijose pateikiamais rezultatais, kuomet taikomi populiarūs statistiniai metodai *PCA* (principinė komponentų analizė) bei *HCA* (hierarchinė klasterių analizė), gautas audinių atpažinimo tikslumas yra artimas šiose publikacijose pateikiamam audinių atpažinimo tikslumui (publikacijose pateikiamas audinių atpažinimo tikslumo palyginimas pateikiamas 4 lentelėje).

4 lentelė. Publikacijose [4, 27, 57] pateikiamas *PCA* bei *HCA* metodų taikymas audinių atpažinimui bei pasiektas metodų tikslumas.

Metodas	Taikymas	Atpažinimo tikslumas
<i>PCA</i>	Skirtingų plaučių navikų ląstelių (SCLC – mažųjų plaučių ląstelių karcinomos, SqCC - suragėjusio audinio karcinomos, ADC - adenokarcinomos) atpažinimas [27].	Normalios ląstelės – 97,6 % Nekrotinės ląstelės - 81,4 % SCLC - 89,4 % SqCC - 84,6 % ADC - 83,1 %
	Viršutinių kvėpavimo takų bei virškinamojo trakto ląstelių atpažinimas [57].	Liežuvio ląstelės - 95,1 % Stemplės ir displastinės ląstelės - 90,0 % Suragėjęs ir displastinis audiniai - 92,1 %
<i>HCA</i>	Plaučių vėžinių audinių atskyrimas nuo nepiktybinių navikų ir uždegimo pažeistų audinių [27].	Kraujagyslės sienelės audinyje audiniai identifikuojami 90,3%, jungiamajame audinyje - 88,9 % tikslumu.
	Normalaus ir navikinio audinio atskyrimas odos suragėjusių ląstelių karcinomos atveju [4].	86,4 %

Todėl galima teigti, jog šiame darbe taikoma metodika, ją patobulinus ateityje, gali būti sėkmingai pritaikoma vėžinių audinių diagnostikoje. Šios metodikos privalumas palyginus su statistinės analizės metodais yra tai, jog ši metodika yra paprastesnis būdas audinių identifikavimui.

Remiantis medicininio diagnostinio metodo patikimumo įvertinimo kriterijais, apskaičiuoti šiame darbe taikomo testo patikimumo rodikliai: jautrumas (90 %), specifiškumas (94 %), teigiama prognostinė vertė (93 %) ir neigiama prognostinė vertė (92 %). Normalaus žmogaus inkstų audinio atpažinimo tikslumas galėtų būti pagerintas atsižvelgiant į audinio bandinio paėmimo iš organo sritį - įvertinus žmogaus ir kiaulės inkstų audinio galimą panašumą, iškelta hipotezė, jog dalis klaidingai identifikuojamų normalaus žmogaus inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų gali būti priskiriami inksto geldelės sričiai. Tai galime laikyti tik prielaida, negalime daryti konkretnių išvadų – siekiant patvirtinti tokias išvagas, reiktų atlikti detalesnius tyrimus su žmogaus inkstų audiniais. Tęsiant tyrimą toliau, būtų naudinga atlikti skirtingų žmogaus inksto dalių audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų registravimą bei analizę, tai galėtų pasitarnauti pagerinant normalaus inkstų audinio atpažinimo tikslumą.

Atlikus žmogaus pirštų odos *ATR IR* sugerties spektrų analizę bei papildžius jais programoje naudojamą spektrų biblioteką, nustatyta, jog šviesiųjų inksto ląstelių karcinomos audinys atpažįstamas 90 %, normalus inkstų audinys 94 %, o žmogaus oda 100 % tikslumu. Tai leistų daryti išvadą, jog taikoma metodika yra pajėgi ne tik nustatyti vieno organo audinio piktybiškumą, tačiau ir klasifikuoti audinius į skirtingas grupes.

Išbandžius audinių atpažinimo metodikos pritaikymo šviesolaidinei spektrometrinei sistemai tinkamumą navikinių audinių identifikavimui *in situ*, nustatyta, jog žmogaus inkstų navikinis audinys atpažįstamas 88 %, o normalus 100 % tikslumu. Geresniam audinių atpažinimo tikslumo įvertinimui reikalinga didesnė navikinių susirgimų imtis, tačiau apibendrinus gautus rezultatus galima teigti, jog taikoma metodika yra tinkama audinių identifikavimui *in situ*.

## Pagrindiniai rezultatai ir išvados

1. Užregistravus ir išanalizavus žmogaus inkstų normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrus, nustatyta, jog naviko identifikavimui tinkamiausia remtis spektrinėmis juostomis, susijusiomis su glikogeno sugertimi ( $1200 - 950 \text{ cm}^{-1}$ ).
2. Tyrimo metu ištirti 3 automatinio audinių atpažinimo metodai, paremti:
  - a) Glikogeną atitinkančios spektrinės srities ir baltymų Amidas I grupę atitinkančios spektrinės juostos integrinių intensyvumų santykio analize;
  - b) Spektrinių juostų skaičiaus nustatymu glikogeną atitinkančioje spektrinėje srityje;
  - c) Analizuojamojo ir sudarytos bibliotekos spektrų palyginimu.
3. Įvertinus taikytų metodų tikslumą identifikuojant navikinius audinius, nustatyta:
  - a) Integrinių intensyvumų santykio vertės palyginimas normaliam ir piktybiniam audiniui yra netinkamas metodas dėl mažo audinių atpažinimo tikslumo – nepatikimai identifikuojama iki 64 % atvejų.
  - b) Spektrinių juostų skaičiaus nustatymas yra tinkamas metodas (piktybinis audinys atpažįstamas 84 %, normalus – 98 % tikslumu), tačiau turi trūkumų.
  - c) Tinkamiausia remtis analizuojamojo ir bibliotekos spektrų palyginimu: piktybinis audinys atpažįstamas 90 %, normalus – 94 % tikslumu.
4. Analizuojamojo ir bibliotekos spektrų palyginimo metodą pritaikius šviesolaidinei spektrometrinei sistemai ir atlikus pirminius tyrimus su nedideliu bandinių skaičiumi nustatytas 88 % navikinio ir 100 % normalaus audinio atpažinimo tikslumas. Sukurta metodika gali būti sėkmingai taikoma audinių atpažinimui *in situ*.



## Literatūros šaltinių sąrašas

- [1] Global Burden of Disease Cancer Collaboration, *Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015 A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study*, JAMA Oncology 3(4), 524–548 (2017)
- [2] Lietuvos vėžio registro leidinys „Vėžys Lietuvoje 2012 metais“ (2015) <[http://www.nvi.lt/uploads/pdf/Vezio%20registras/Vezys\\_lietuvoje\\_2012.pdf](http://www.nvi.lt/uploads/pdf/Vezio%20registras/Vezys_lietuvoje_2012.pdf)> [žiūrėta 2018-04-02]
- [3] N. Wald, N. Bordry, P. G. Foukas, D. E. Speiser, E. Goormaghtigha, *Identification of melanoma cells and lymphocyte subpopulations in lymph node metastases by FTIR imaging histopathology*, Biochimica et Biophysica Acta, 1862, 202–212 (2016)
- [4] C. A. Lima, V. P. Goulart, L. Côrrea, T. M. Pereira, and Denise M. Zezell, *ATR-FTIR Spectroscopy for the Assessment of Biochemical Changes in Skin Due to Cutaneous Squamous Cell Carcinoma*, International Journal of Molecular Sciences, 16, 6621-6630 (2015)
- [5] G. Theophilou, K. M. G. Lima, P. L. Martin-Hirsch, H. F. Stringfellowb, and F. L. Martin, *ATR-FTIR spectroscopy coupled with chemometric analysis discriminates normal, borderline and malignant ovarian tissue: classifying subtypes of human cancer*, Analyst, 141, 585-594 (2016)
- [6] V. Urbonienė, M. Pučetaitė, F. Jankevičius, A. Želvys, V. Šablinskas, and G. Steiner, *Identification of kidney tumor tissue by infrared spectroscopy of extracellular matrix*, Journal of Biomedical Optics 19(8), 087005 (2014)
- [7] M. Velicka, V. Urboniene, J. Cepenkus, M. Pucetaite, F. Jankevicius, and V. Sablinskas, *Detection of cancerous biological tissue areas by means of infrared absorption and SERS spectroscopy of intercellular fluid*, Biosensing and Nanomedicine VIII, 95500A (2015)
- [8] V. Urboniene, M. Velicka, J. Cepenkus, M. Pucetaite, F. Jankevicius, V. Sablinskas, G. Steiner, *Intra-operative on-line discrimination of kidney cancer from normal tissue by IR ATR spectroscopy of extracellular fluid*, Biomedical Vibrational Spectroscopy 2016: Advances in Research and Industry, 97040E (2016)
- [9] M. Pucetaite, M. Velicka, V. Urboniene, J. Cepenkus, R. Bandzeviciute, F. Jankevicius, A. Zelvys, V. Sablinskas, G. Steiner, *Rapid intra-operative diagnosis of kidney cancer by attenuated total reflection infrared spectroscopy of tissue smears*, Journal of Biophotonics, e201700260 (2018)
- [10] M. C. S. Wong, W. B. Goggins, B. H. K. Yip, F. D. H. Fung1, C. Leung, Y.Fang, S. Y. S. Wong, C. F. Ng, *Incidence and mortality of kidney cancer: temporal patterns and global trends in 39 countries*, SCIENTIFIC REPORTS, 7 (15698) (2017)
- [11] Sergamumas inkstų vėžiu <<https://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/kidney-cancer-statistics>> [žiūrėta 2018-04-03]

- [12] J. Didžiapetrienė, *Vėžio biologija*, Vilnius (2013)
- [13] H. Moch, A. L. Cubilla, P. A. Humphrey, V. E. Reuter, T. M. Ulbright, *The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours*, *European Urology* 70, 93 – 105 (2016)
- [14] J. J. Hsieh, M. P. Purdue, S. Signoretti, C. Swanton, L. Albiges, M. Schmidinger, D. Y. Heng, J. Larkin, V. Ficarra, *Renal cell carcinoma*, *Nature Reviews Disease Primers*, 3(17009) (2017)
- [15] I. J. Frew and H. Moch, *A Clearer View of the Molecular Complexity of Clear Cell Renal Cell Carcinoma*, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 10, 263–89 (2015)
- [16] W. Stadler, J. Abraham, *Renal Cancer*, New York, US: Demos Medical, (2011)
- [17] W. L. Kemp, D. K. Burns, T. G. Brown, *Pathology: The Big Picture*, McGraw-Hill (2008)
- [18] P. Tian, W. Zhang, H. Zhao, Y. Lei, L. Cui, W. Wang, Q. Li, Q. Zhu, Y. Zhang, Z. Xu, *Intraoperative diagnosis of benign and malignant breast tissues by fourier transform infrared spectroscopy and support vector machine classification*, *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8(1), 972-981 (2015)
- [19] J. Gordetsky, M. A. Gorin, J. Canner, M. W. Ball, P. M. Pierorazio, M. E. Allaf, J. I. Epstein, *Frozen section during partial nephrectomy: does it predict positive margins?*, *BJU International* 116, 868–872 (2015)
- [20] G. D. Stewart, G. Oades, *Frozen section during partial nephrectomy: an unreliable test that changes nothing?*, *BJU International* 116, 836-837 (2015)
- [21] R. H. Thompson, B. R. Lane, C. M. Lohse, B. C. Leibovich, A. Fergany, I. Frank, I. S. Gill, M. L. Blute, S. C. Campbell, *Every Minute Counts When the Renal Hilum Is Clamped During Partial Nephrectomy*, *European Urology* 58, 340 – 345 (2010)
- [22] M. Baranska, *Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine*, Springer (2014)
- [23] R. K. Dukor, *Vibrational Spectroscopy in the Detection of Cancer. Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons (2006)
- [24] G. Bellisola, C. Sorio, *Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis*, *American Journal of Cancer Research* 2(1), 1–21 (2012)
- [25] R. K. Sahu, S. Mordechai, *Fourier transform infrared spectroscopy in cancer detection*, *Future Oncology* 1(5), 635 – 647 (2005)
- [26] S. Olsztyńska-Janus, K. Szyborska-Małek, M. Gąsior-Głogowska, T. Walski, M. Komorowska, W. Witkiewicz, C. Pezowicz, M. Kobielarz, and S. Szotek, *Spectroscopic techniques in the study of human tissues and their components. Part I: IR spectroscopy*, *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, 14(3), 101-115 (2012)

- [27] A. Akalin, X. Mu, M. A. Kon, A. Ergin, S. H. Remiszewski, C. M. Thompson, D. J. Raz, and M. Diem, *Classification of malignant and benign tumors of the lung by infrared spectral histopathology (SHP)*, *Laboratory Investigation* 95, 406–421(2015)
- [28] X. Sun, Y. Xu, J. Wu, Y. Zhang, and K. Sun, *Detection of lung cancer tissue by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: a pilot study of 60 samples*, *Journal of surgical research* 179, 33-38 (2013)
- [29] P. D. Lewis, K. E. Lewis, R. Ghosal, S. Bayliss, A. J. Lloyd, J. Wills, R. Godfrey, P. Kloer, L. A. J. Mur, *Evaluation of FTIR Spectroscopy as a diagnostic tool for lung cancer using sputum*, *BMC Cancer*, 10:640 (2010)
- [30] K. Gajjar, L. D. Heppenstall, W. Pang, K. M. Ashton, J. Trevisan, I. I. Patel, V. Llabjani, H. F. Stringfellow, P. L. Martin-Hirsch, T. Dawson, and F. L. Martin, *Diagnostic segregation of human brain tumours using Fourier-transform infrared and/or Raman spectroscopy coupled with discriminant analysis*, *Europe PMC Funders Author Manuscripts* 5, 89–102 (2012)
- [31] G. Steiner, S. K uchler, A. Hermann, E. Koch, R. Salzer, G. Schackert, M. Kirsch, *Rapid and Label-Free Classification of Human Glioma Cells by Infrared Spectroscopic Imaging*, *Cytometry Part A* 73A, 1158-1164 (2008)
- [32] G. Steiner, M. Kirsch, *Optical spectroscopic methods for intraoperative diagnosis*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 21-25 (2014)
- [33] Y. Gao, X. Huo, L. Dong, X. Sun, H. Sai, G. Wei, Y. Xu, Y. Zhang, and J. Wu, *Fourier transform infrared microspectroscopy monitoring of 5-fluorouracil-induced apoptosis in SW620 colon cancer cells*, *Molecular Medicine Reports* 11, 2585-2591 (2015)
- [34] J. V. Coea, Z. Chena, R. Lia, S. V. Nystroma, R. Butkeb, B. Millerb, C. L. Hitchcockb, H. C. Allena, S. P. Povoskic, and E. W. Martin, *Molecular constituents of colorectal cancer metastatic to the liver by imaging infrared spectroscopy*, *Proceedings of SPIE*, 9328 (2015)
- [35] A. Benard, C. Desmedt, M. Smolina, P. Szternfeld, M. Verdonck, G. Rouas, N. Kheddoumi, F. Roth e, D. Larsimont, C. Sotirioub and E. Goormaghtigh, *Infrared imaging in breast cancer: automated tissue component recognition and spectral characterization of breast cancer cells as well as the tumor microenvironment*, *Analyst*, 139, (2014)
- [36] Q. Li, X. Sun, Y. Xu, L. Yang, Y. Zhang, S. Weng, J. Shi, and J. Wu, *Diagnosis of Gastric Inflammation and Malignancy in Endoscopic Biopsies Based on Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, *Clinical Chemistry* 51(2), 346–350 (2005)
- [37] Q. Li, W. Wang, X. Ling, and J. G. Wu, *Detection of Gastric Cancer with Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Support Vector Machine Classification*, *BioMed Research International* (2013)

- [38] M. J. Baker, E. Gazi, M. D. Brown, J. H. Shanks, P. Gardner and N. W. Clarke, *FTIR-based spectroscopic analysis in the identification of clinically aggressive prostate cancer*, British Journal of Cancer 99, 1859 – 1866 (2008)
- [39] M. J. Baker, E. Gazi, M. D. Brown, J. H. Shanks, N. W. Clarke, and P. Gardner, *Investigating FTIR based histopathology for the diagnosis of prostate cancer*, Journal of Biophotonics, 1–2, 104–113 (2009)
- [40] M. J. Baker, E. Gazi, M. D. Brown, J. H. Shanks, P. Gardner, and N. W. Clarke, *FTIR-based spectroscopic analysis in the identification of clinically aggressive prostate cancer*, British Journal of Cancer 99, 1859 – 1866 (2008)
- [41] E. Gazi, M. Baker, J. Dwyer, N. P. Lockyer, P. Gardner, J. H. Shanks, R. S. Reeve, C. A. Hart, N. W. Clarke and M. D. Brown, *A Correlation of FTIR Derived from Prostate Cancer Biopsies with Gleason Grade and Tumour Stage*, European Urology 50, 750-761 (2006)
- [42] J. Anastassopoulou, M. Kyriakidou, S. Kyriazis, T. H. Kormas, A. F. Mavrogenis, V. Dritsa, P. Kolovou and T. Theophanides, *An FT-IR Spectroscopic Study of Metastatic Cancerous Bones*. In: *Infrared Spectroscopy - Anharmonicity of Biomolecules, Crosslinking of Biopolymers, Food Quality and Medical Applications*, T. Theophanides, eds., InTech (2015)
- [43] A. Barth, P. I. Haris, *Biological and Biomedical Infrared Spectroscopy*, IOS Press (2009)
- [44] R. Mayeux, *Biomarkers: Potential Uses and Limitations*, The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 1, 182–188, (2004)
- [45] U. Zelig, E. Barlev, O. Bar, I. Gross, F. Flomen, S. Mordechai, J. Kapelushnik, I. Nathan, H. Kashtan, N. Wasserberg, and O. Madhala-Givon, *Early detection of breast cancer using total biochemical analysis of peripheral blood components: a preliminary study*, BMC Cancer, 15:408 (2015)
- [46] R. Bandzevičiūtė, *Infraraudonosios spektrometrijos metodų taikymas inkstų vėžinių audinių diagnostikoje*, Pagrindinių studijų baigiamasis darbas (2016)
- [47] C. E. Zois, E. Favaro, A. L. Harris, *Glycogen metabolism in cancer*, Biochemical Pharmacology 92 3-11 (2014)
- [48] R. A. Gatenby, R. J. Gillies, *Why do cancers have high aerobic glycolysis?*, Nature Reviews 4, 891-899 (2004)
- [49] P. R. Griffiths and J. A. De Haseth, *Fourier Transform Infrared Spectrometry, Second Edition*, John Wiley & Sons (2007)
- [50] Spektrų bibliotekos <<http://www.stjapan-usa.com/Products/SpectraDatabases/tabid/165/Default.aspx>> [žiūrėta 2018-04-05]
- [51] Paieškos algoritmų taikymas atliekant paiešką spektrų bibliotekose <[http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/spectroscopy/global/english/literature/application\\_notes/94034-Bio-](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/spectroscopy/global/english/literature/application_notes/94034-Bio-)

Rad\_Search\_Strategies\_for\_IR\_Spectra\_Normalization\_Euclidean\_First\_Derivative\_Application\_Note.pdf> [žiūrėta 2018-04-05]

- [52] R. Kumar, *Evaluation of diagnostic tests*, Clinical epidemiology and global health 4, 76 – 79 (2016)
- [53] C. Petibois and G. Deleris, *Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology*, TRENDS in Biotechnology, 24(10), 455-462 (2006)
- [54] V. Sablinskas, M. Velicka, M. Pucetaite, V. Urboniene, J. Ceponkus, R. Bandzeviciute, F. Jankevicius, T. Sakharova, O. Bibikova, G. Steiner, *In situ detection of cancerous kidney tissue by means of fiber ATR FTIR Spectroscopy*, Proceedings of SPIE, 10497, 1049713
- [55] Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. Rehman, *Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues*, Applied Spectroscopy Reviews, 43, 134–179 (2008)
- [56] E. Kobayashi, S. Hishikawa, T. Teratani, and A. Lefor, *The pig as a model for translational research: overview of porcine animal models at Jichi Medical University*, Transplantation Research 1:8 (2012)
- [57] M. Diem, M. Miljkovic, B. Bird, I. Mazur, J. M. Schubert, D. Townsend, N. Laver, M. Almond and O. Old, *Cancer screening via infrared spectral cytopathology (SCP): results for the upper respiratory and digestive tracts*, Analyst, 141, 416-428 (2016)

## Summary

Rimantė Bandzevičiūtė

### AUTOMATED IDENTIFICATION OF CANCEROUS KIDNEY TISSUE BY APPLICATION OF ATTENUATED TOTAL REFLECTION INFRARED SPECTROSCOPY

It is possible to identify normal and cancerous tissues by applying the technique of an attenuated total reflection of infrared radiation (ATR IR) for the tissue analysis. It is possible to apply this technique immediately after surgery for the intercellular material of the removed tissues because this method does not require any special sample preparation. There is a need for methods that could automatically identify normal and cancerous tissues for the purpose to create the technique for the tissue recognition *in vivo*.

**The aim** of this work is to create the system for the recognition of the cancerous kidney tissues.

**The goals of this study:**

1. To register the ATR IR absorption spectra of intercellular material of the normal and tumorous human kidney tissue and to complement the database of the spectra.
2. To do the qualitative spectral analysis and identify the spectral markers and methods which could be used for the recognition system of the tissues.
3. To evaluate the accuracy of the different spectra recognition methods.
4. To evaluate the possibilities of the system for the tissue diagnostics *in situ*.

**Main results.** After analysis of the ratio of the integral intensities of the spectral bands corresponding to the glycogen ( $1200\text{ cm}^{-1}$  -  $950\text{ cm}^{-1}$ ) and Amide I of proteins ( $1717\text{ cm}^{-1}$  -  $1591\text{ cm}^{-1}$ ), it was found that comparison of this ratio in normal and cancerous tissues is not an appropriate method for the recognition system. Using the attribute of spectra that the spectra of the intercellular material of normal and cancerous tissues have the different number of peaks in the glycogen area ( $1200\text{ cm}^{-1}$  –  $950\text{ cm}^{-1}$ ) the program was written. It automatically identified the ATR IR absorption spectra of intercellular material of the normal and tumorous human kidney tissue. The program identified the cancerous tissue with 84 % accuracy, while the normal tissue was identified with 98 % accuracy. After creation of the spectra library containing ATR IR absorption spectra of 30 normal, 30 cancerous human kidney tissue samples, water and ethanol, there was written the program which operation algorithm is based on the comparison of the spectrum that is being analyzed with the spectra of the library. It was established that the latter method is the most appropriate for the tissue identification: the tissue of the clear cell renal cell carcinoma was identified with 90 % accuracy, while normal tissue was identified with 94 % accuracy. After evaluation of the validity of this method for the cancerous tissue diagnosis, it was established that the tissue type can be identified with 90 % sensitivity and 94 % specificity, while the positive and

negative predictive values reached 93 % and 92 % respectively. It is possible that the normal human kidney tissue could be recognized with better accuracy according to the probable differences between ATR IR absorption spectra of intercellular fluid of the different kidney tissue areas. There is a need for the more detailed spectral analysis of different kidney parts. The applied methodology is able to classify the different types of tissue into several groups whereas the application of the fiber spectroscopic tool enables *in situ* tissue identification. This method after some improvements could be applied for the cancerous tissue diagnostics in the future.

### **Conclusions:**

1. After registration and analysis of the ATR IR absorption spectra of intercellular material of normal and tumorous human kidney tissues, it was established that the spectral bands corresponding to the glycogen absorbance ( $1200\text{ cm}^{-1} - 950\text{ cm}^{-1}$ ) are the most appropriate for tumor identification.
2. During the research 3 investigated methods for the automated tissue identification were based on:
  - a) The analysis of the integral intensities of spectral bands corresponding to glycogen and Amide I of proteins;
  - b) The identification of spectral bands quantity in the spectral area corresponding to glycogen;
  - c) The comparison of the spectrum that is being analyzed with the spectra of the library.
3. After evaluation of the methods for tumorous kidney tissue identification it was established:
  - a) The comparison of integral intensities for normal and cancerous tissues is not suitable for tissue identification due to low tissue recognition accuracy - up to 64 % of the cases are identified uncertainly.
  - b) The identification of spectral bands quantity is an appropriate method (cancerous tissue identified with 84 %, normal tissue – with 98 % accuracy) but it has some imperfections.
  - c) It is the most appropriate to base method on the comparison of the spectrum that is being analyzed with the spectra of the library: cancerous tissue was identified with 90 % accuracy, normal tissue - with 94 % accuracy.
4. After customizing the method based on the spectra comparison and performing the primary investigation with small number of specimen, the 88 % identification accuracy for tumorous tissues and 100 % accuracy for normal tissues was established. The created methodology can be successfully applied for the cancerous tissue recognition *in situ*.

## Santrauka

Rimantė Bandzevičiūtė

### PAŽEISTOJO VISIŠKOJO VIDAUS ATSPINDŽIO INFRARAUDONOSIOS SPEKTROSKOPIJOS METODU PAGRĮSTA AUTOMATINĖ INKSTŲ NAVIKŲ ATPAŽINIMO SISTEMA

Audinių tyrimams taikant infraraudonosios spinduliuotės pažeistojo visiškojo vidaus atspindžio (angl. *Attenuated Total Reflection - ATR*) metodą, galima identifikuoti normalius ir piktybinius audinius. Šį metodą taikant chirurginės operacijos metu pašalinto audinio tarpląstelinei medžiagai, spektrinius duomenis galima gauti operacinėje iškart po chirurginės operacijos audiniams dar nepradėjus irti, kadangi bandiniams nereikalingas specialus paruošimas. Siekiant sukurti metodiką, leidžiančią atpažinti audinius *in vivo*, yra reikalingi metodai, galintys automatizuotai identifikuoti normalius ir piktybinius audinius. Šio darbo tikslas yra sukurti inkstų vėžinių audinių atpažinimo sistemą.

Siekiant įvykdyti šiame darbe suformuluotą tikslą, iškeliami šie uždaviniai:

1. Užregistruoti žmogaus inkstų normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrus ir tokiu būdu papildyti spektrų duomenų bazę.
2. Atlikti kokybinę spektrinę analizę ir nustatyti spektrinius požymius bei metodus, tinkamus audinių atpažinimo sistemai.
3. Įvertinti skirtingų spektrų atpažinimo metodų tikslumą.
4. Įvertinti sistemos pritaikymo galimybes *in situ* audinių diagnostikai.

Atlikus glikogeną atitinkančios spektrinės srities ( $1200\text{ cm}^{-1} - 950\text{ cm}^{-1}$ ) ir baltymų Amidas I grupės spektrinės juostos ( $1717\text{ cm}^{-1} - 1591\text{ cm}^{-1}$ ) integrinių intensyvumų santykių analizę, nustatyta, jog šio santykio vertės palyginimas normaliam ir piktybiniam audiniui yra netinkamas metodas kuriant audinių atpažinimo sistemą. Remiantis skirtingu normalaus ir piktybinio audinių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų juostų skaičiumi glikogeną atitinkančioje spektrinėje srityje ( $1200\text{ cm}^{-1} - 950\text{ cm}^{-1}$ ) parašyta programa, automatiškai atpažįstanti normalaus ir piktybinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrus. Programa piktybinį audinį identifikuoja 84 % tikslumu, o normalų – 98 % tikslumu. Sukūrus spektrų biblioteką iš 30 normalaus ir 30 piktybinio žmogaus inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos, vandens ir etanolio *ATR IR* sugerties spektrų, parašyta programa, kurios veikimas remiasi analizuojamojo ir sudarytos bibliotekos spektrų palyginimu. Nustatyta, jog šis metodas yra tinkamiausias audinių atpažinimui: šviesiųjų inksto ląstelių karcinomos audinys identifikuojamas 90 %, o normalus audinys - 94 % tikslumu. Įvertinus šio diagnostinio metodo patikimumą, nustatytas testo 90 % jautrumas, 94 % specifiškumas, 93 % teigiama ir 92 % neigiama prognostinės vertės. Yra galima ir tai, jog normalus inkstų audinys gali būti atpažintas didesniu tikslumu atsižvelgus į galimus skirtumus tarp skirtingų



inksto dalių tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų. Norint patvirtinti šias išvalgas, reiktų atlikti detalius skirtingų inksto dalių tyrimus. Taikoma metodika yra pajėgi klasifikuoti skirtingų tipų audinius į kelias grupes, o panaudojus šviesolaidinę spektrinę sistemą gali būti atliekamas audinių identifikavimas *in situ*. Ateityje patobulinus šį metodą, jis galėtų būti sėkmingai pritaikomas vėžinių audinių diagnostikoje.

Išvados:

1. Užregistravus ir išanalizavus žmogaus inkstų normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrus, nustatyta, jog naviko identifikavimui tinkamiausia remtis spektrinėmis juostomis, susijusiomis su glikogeno sugertimi ( $1200 - 950 \text{ cm}^{-1}$ ).
2. Tyrimo metu ištirti 3 automatinio audinių atpažinimo metodai, paremti:
  - a) Glikogeną atitinkančios spektrinės srities ir baltymų Amidas I grupę atitinkančios spektrinės juostos integrinių intensyvumų santykio analize;
  - b) Spektrinių juostų skaičiaus nustatymu glikogeną atitinkančioje spektrinėje srityje;
  - c) Analizuojamojo ir sudarytos bibliotekos spektrų palyginimu.
3. Įvertinus taikytų metodų tikslumą identifikuojant navikinius audinius, nustatyta:
  - a) Integrinių intensyvumų santykio vertės palyginimas normaliam ir piktybiniam audiniui yra netinkamas metodas dėl mažo audinių atpažinimo tikslumo – nepatikimai identifikuojama iki 64 % atvejų.
  - b) Spektrinių juostų skaičiaus nustatymas yra tinkamas metodas (piktybinis audinys atpažįstamas 84 %, normalus – 98 % tikslumu), tačiau turi trūkumų.
  - c) Tinkamiausia remtis analizuojamojo ir bibliotekos spektrų palyginimu: piktybinis audinys atpažįstamas 90 %, normalus – 94 % tikslumu.
4. Analizuojamojo ir bibliotekos spektrų palyginimo metodą pritaikius šviesolaidinei spektrometrinei sistemai ir atlikus pirminius tyrimus su nedideliu bandinių skaičiumi nustatytas 88 % navikinio ir 100 % normalaus audinio atpažinimo tikslumas. Sukurta metodika gali būti sėkmingai taikoma audinių atpažinimui *in situ*.

## **PRIEDAI**

**1 priedas** *Spektrinių juostų padėtys ir jas atitinkantys molekulių virpesiai*

1 priedo 1 lentelė. Spektrinių juostų padėtys ir jas atitinkantys molekulių virpesiai normalaus ir navikinio audinio *ATR IR* sugerties spektruose [46].

Bangos skaičius, $\text{cm}^{-1}$		Virpesiai
Normalus audinys	Navikinis audinys	
3292	3297	Baltymų ir nukleorūgščių Amidų A grupės $\nu$ (N-H), vandens $\nu$ (OH)
3074	3081	Baltymų ir nukleorūgščių Amidų B grupės $\nu$ (N-H)
2961	2960	Lipidų, baltymų, nukleorūgščių metilo grupės $\nu_{\text{as}}$ ( $\text{CH}_3$ )
2927	2926	Lipidinių jungčių $\nu_{\text{as}}$ ( $\text{CH}_2$ ), $\nu_{\text{as}}$ ( $\text{CH}_3$ ), $\nu_{\text{s}}$ ( $\text{CH}_2$ )
2865	2861	Lipidinių jungčių $\nu_{\text{as}}$ ( $\text{CH}_2$ ), $\nu_{\text{as}}$ ( $\text{CH}_3$ ), $\nu_{\text{s}}$ ( $\text{CH}_2$ )
1736	1738	Lipidų, polisacharidų bei riebiųjų rūgščių $\nu_{\text{as}}$ (C=O)
1647	1649	Peptidinių jungčių Amido I grupės $\nu$ (C=O), $\nu$ (C=C), $\delta$ (C-N), $\delta$ (N-H)
1540	1541	Peptidinių jungčių Amido II grupės $\nu$ (C=O), $\nu$ (C=C), $\delta$ (C-N), $\delta$ (N-H)
1454	1454	Lipidų ir baltymų jungčių, kolageno $\delta$ ( $\text{CH}_3$ )
1398	1399	Baltymų $\delta$ ( $\text{CH}_3$ ), riebiųjų ir amino rūgščių $\nu_{\text{s}}$ ( $\text{COO}^-$ )
1306	1308	Kolageno, baltymų Amidų III grupės $\delta$ (C-H), $\delta$ (C-O-H)
1241	1243	Nukleorūgščių, membranas sudarančių fosfolipidų ir kolageno fosfodiesterių grupių $\nu_{\text{as}}$ ( $\text{PO}_2^-$ )
1165	-	Baltymų ir angliavandenių $\nu$ (C-O)
-	1156	Baltymų ir angliavandenių $\nu$ (C-O), glikogeno $\nu$ (C-O), $\nu$ (C-C), $\delta$ (C-O-H)
1085	1085	Nukleorūgščių $\nu_{\text{as}}$ ( $\text{PO}_2^-$ ) ir glikogeno $\nu$ (C-O), $\nu$ (C-C), $\delta$ (C-O-H)
-	1035	Angliavandenių $\text{CH}_2\text{OH}$ grupės, glikogeno $\nu$ (C-O), $\nu$ (C-C), $\delta$ (C-O-H)

2 priedas Glikogeną ir baltymų Amidas I grupę atitinkančių sugerties juostų integrinių intensyvumų santykių skaičiavimo rezultatai

Šiame priede pateikiami glikogeną ir baltymų Amidas I grupę atitinkančių sugerties juostų integrinių intensyvumų santykių skaičiavimo rezultatai, rezultatus sugrupavus pagal naviko piktybiškumo laipsnius.

Lentelėse naudojamų trumpinių paaiškinimai:

- $a_1$  – baltymų Amidas I grupę atitinkančios sugerties juostos integrinis intensyvumas, esant integravimo režiams nuo 1717  $\text{cm}^{-1}$  iki 1591  $\text{cm}^{-1}$ .
- $g_1$  – glikogeną atitinkančios spektrinės srities integrinis intensyvumas, esant integravimo režiams nuo 1198  $\text{cm}^{-1}$  iki 960  $\text{cm}^{-1}$ .
- $g_2$  – glikogeną atitinkančios spektrinės srities integrinis intensyvumas, esant integravimo režiams nuo 1198  $\text{cm}^{-1}$  iki 892  $\text{cm}^{-1}$ .
- $g$  – glikogeną atitinkančios spektrinės srities integrinis intensyvumas, esant integravimo režiams nuo 1190  $\text{cm}^{-1}$  iki 950  $\text{cm}^{-1}$ .
- $g_1/a_1$ ,  $g_2/a_1$ ,  $g/a_1$  – glikogeną ir baltymų Amidas I grupę atitinkančių sugerties juostų integrinių intensyvumų santykiai, esant  $g_1$ ,  $g_2$ ,  $g$  integriniams intensyvumams.

2 priedo 1 lentelė. Integrinių intensyvumų skaičiavimo rezultatai esant G1 naviko piktybiškumo laipsniui.

G1 naviko piktybiškumo laipsnis																						
Audinio tipas	Spektrams atliktas 25 taškų glotninimas, bazinės linijos korekcija										Spektrams atlikta bazinės linijos korekcija				Spektrams atlikta bazinės linijos korekcija, min-max normavimas							
	Integriniai intensyvumai						Integrinių intensyvumų santykiai				Integriniai intensyvumai				Integrinių intensyvumų santykiai		Integriniai intensyvumai				Integ. intensyvumų santykiai	
Integ. Sritis	Navikinis			Normalus			$g_1/a_1$	$g_2/a_1$	$g_1/a_1$	$g_2/a_1$	Navikinis		Normalus		$g/a_1$	$g/a_1$	Navikinis		Normalus		$g/a_1$	$g/a_1$
	$a_1$	$g_1$	$g_2$	$a_1$	$g_1$	$g_2$					$a_1$	$g$	$a_1$	$g$			$a_1$	$g$	$a_1$	$g$		
Paciento nr.	1717 - 1591 $\text{cm}^{-1}$	1198 - 960 $\text{cm}^{-1}$	1198 - 892 $\text{cm}^{-1}$	1717 - 1591 $\text{cm}^{-1}$	1198 - 960 $\text{cm}^{-1}$	1198 - 892 $\text{cm}^{-1}$					1717 - 1591 $\text{cm}^{-1}$	1190 - 950 $\text{cm}^{-1}$	1717 - 1591 $\text{cm}^{-1}$	1190 - 950 $\text{cm}^{-1}$			1717 - 1591 $\text{cm}^{-1}$	1190 - 950 $\text{cm}^{-1}$	1717 - 1591 $\text{cm}^{-1}$	1190 - 950 $\text{cm}^{-1}$		
nr14	56.172	25.805	26.451	21.710	5.922	6.009	0.459	0.471	0.273	0.277	56.397	25.211	22.689	8.031	0.447	0.354	134.378	60.282	133.505	39.351	0.449	0.295
nr21	26.163	13.380	13.811	21.215	4.647	4.699	0.511	0.528	0.219	0.221	26.842	15.616	21.710	5.841	0.582	0.269	123.143	68.486	121.728	29.516	0.556	0.242
nr26	43.060	13.748	14.038	35.357	8.449	8.612	0.319	0.326	0.239	0.244	44.355	17.281	36.083	10.588	0.390	0.293	129.340	45.756	130.071	34.697	0.354	0.267
nr39	46.785	16.681	17.018	20.652	5.401	5.477	0.357	0.364	0.262	0.265	47.385	19.879	21.308	7.082	0.420	0.332	130.474	53.669	128.109	38.196	0.411	0.298
nr41	38.373	42.162	43.126	35.882	8.790	8.918	1.099	1.124	0.245	0.249	39.946	46.782	37.217	11.674	1.171	0.314	134.327	154.121	126.964	32.782	1.147	0.258
nr45	37.381	18.125	18.331	46.596	11.826	11.960	0.485	0.490	0.254	0.257	38.408	19.435	48.561	15.061	0.506	0.310	131.777	62.526	129.795	33.030	0.474	0.254
nr50	16.996	3.449	3.493	36.935	8.209	8.325	0.203	0.206	0.222	0.225	18.318	4.586	38.428	10.597	0.250	0.276	125.942	26.259	130.229	28.369	0.209	0.218
nr54	41.400	18.015	18.463	18.711	5.568	5.660	0.435	0.446	0.298	0.302	43.224	22.666	19.797	7.490	0.524	0.378	132.630	62.821	132.970	39.821	0.474	0.299
nr75	20.332	9.671	9.671	15.654	3.683	3.767	0.476	0.476	0.235	0.241	22.005	12.649	17.122	5.475	0.575	0.320	125.704	59.221	130.378	31.901	0.471	0.245
nr101	20.495	5.431	5.564	47.952	15.104	15.213	0.265	0.271	0.315	0.317	22.373	6.317	47.809	14.902	0.282	0.312	126.804	27.579	135.978	30.752	0.217	0.226

2 priedo 2 lentelė. Integrinių intensyvumų skaičiavimo rezultatai esant G2 naviko piktybiškumo laipsniui.

G2 naviko piktybiškumo laipsnis																						
Audinio tipas	Spektrams atliktas 25 taškų glotninimas, bazinės linijos korekcija										Spektrams atlikta bazinės linijos korekcija						Spektrams atlikta bazinės linijos korekcija, min-max normavimas					
	Integriniai intensyvumai						Integrinių intensyvumų santykiai				Integriniai intensyvumai				Integrinių intensyvumų santykiai		Integriniai intensyvumai				Integ. intensyvumų santykiai	
	Navikinis			Normalus			Navikinis		Normalus		Navikinis		Normalus		Navikinis	Normalus	Navikinis		Normalus		Navikinis	Normalus
Integ. Sritis	a <sub>1</sub>	g <sub>1</sub>	g <sub>2</sub>	a <sub>1</sub>	g <sub>1</sub>	g <sub>2</sub>	g <sub>1</sub> /a <sub>1</sub>	g <sub>2</sub> /a <sub>1</sub>	g <sub>1</sub> /a <sub>1</sub>	g <sub>2</sub> /a <sub>1</sub>	a <sub>1</sub>	g	a <sub>1</sub>	g	g/a <sub>1</sub>	g/a <sub>1</sub>	a <sub>1</sub>	g	a <sub>1</sub>	g	g/a <sub>1</sub>	g/a <sub>1</sub>
Paciento nr.	1717 - 1591 cm <sup>-1</sup>	1198 - 960 cm <sup>-1</sup>	1198 - 892 cm <sup>-1</sup>	1717 - 1591 cm <sup>-1</sup>	1198 - 960 cm <sup>-1</sup>	1198 - 892 cm <sup>-1</sup>					1717 - 1591 cm <sup>-1</sup>	1190 - 950 cm <sup>-1</sup>	1717 - 1591 cm <sup>-1</sup>	1190 - 950 cm <sup>-1</sup>			1717 - 1591 cm <sup>-1</sup>	1190 - 950 cm <sup>-1</sup>	1717 - 1591 cm <sup>-1</sup>	1190 - 950 cm <sup>-1</sup>		
nr3	6.952	3.658	3.713	8.220	1.346	1.355	0.526	0.534	0.164	0.165	7.431	4.436	8.642	1.977	0.597	0.229	123.341	63.679	117.968	18.838	0.516	0.160
nr4	6.416	6.865	6.989	25.319	6.885	6.997	1.070	1.089	0.272	0.276	7.046	8.074	25.915	8.639	1.146	0.333	131.409	141.557	96.692	29.625	1.077	0.306
nr5	28.992	7.787	7.923	2.735	0.498	0.503	0.269	0.273	0.182	0.184	29.613	9.768	3.132	0.922	0.330	0.294	101.353	30.880	124.430	25.122	0.305	0.202
nr9	40.596	21.706	22.264	47.813	12.959	13.106	0.535	0.548	0.271	0.274	41.580	25.338	49.614	16.876	0.609	0.340	129.764	76.228	131.190	38.602	0.587	0.294
nr12	24.583	5.225	5.279	15.082	3.496	3.527	0.213	0.215	0.232	0.234	16.357	6.302	16.112	4.794	0.385	0.298	125.199	40.996	125.332	28.712	0.327	0.229
nr13	11.516	4.170	4.243	30.041	6.686	6.782	0.362	0.368	0.223	0.226	12.198	5.451	30.878	8.589	0.447	0.278	133.488	51.370	122.492	29.738	0.385	0.243
nr15	51.411	33.653	34.359	38.760	11.304	11.481	0.655	0.668	0.292	0.296	52.242	36.961	39.836	14.304	0.707	0.359	136.582	94.791	129.487	42.608	0.694	0.329
nr16	24.402	17.949	18.364	49.756	16.368	16.749	0.736	0.753	0.329	0.337	27.027	22.791	51.689	21.454	0.843	0.415	134.943	99.445	130.433	49.000	0.737	0.376
nr22	8.294	5.652	5.761	7.698	1.752	1.780	0.681	0.695	0.228	0.231	9.382	7.342	8.239	2.570	0.783	0.312	135.365	90.458	131.199	30.818	0.668	0.235
nr23	28.439	23.661	24.124	56.304	17.919	18.255	0.832	0.848	0.318	0.324	29.944	26.880	57.606	21.912	0.898	0.380	128.648	109.669	133.463	46.956	0.852	0.352
nr24	49.703	28.386	29.064	54.534	18.151	18.487	0.571	0.585	0.333	0.339	50.178	29.113	55.764	21.914	0.580	0.393	135.005	76.539	134.370	49.047	0.567	0.365
nr25	13.550	5.332	5.443	15.126	4.787	4.913	0.394	0.402	0.316	0.325	15.723	8.129	17.347	7.784	0.517	0.449	128.304	51.054	124.481	40.199	0.398	0.323
nr27	12.580	3.370	3.472	31.253	8.040	8.184	0.268	0.276	0.257	0.262	13.701	4.781	32.769	10.742	0.349	0.328	134.185	36.811	131.249	34.025	0.274	0.259
nr30	25.799	14.348	14.601	31.153	8.949	9.142	0.556	0.566	0.287	0.293	29.213	14.626	32.238	11.382	0.501	0.353	128.509	56.115	131.007	39.979	0.437	0.305
nr31	34.937	29.831	30.588	20.562	4.228	4.330	0.854	0.876	0.206	0.211	36.726	35.134	21.625	5.721	0.957	0.265	139.637	128.661	123.070	24.991	0.921	0.203
nr32	18.408	5.099	5.207	15.943	2.878	2.927	0.277	0.283	0.181	0.184	19.423	6.382	17.031	4.339	0.329	0.255	120.884	33.087	123.934	22.915	0.274	0.185
nr35	25.710	27.429	28.210	36.312	13.491	13.777	1.067	1.097	0.372	0.379	27.668	31.781	37.263	16.769	1.149	0.450	134.356	147.792	136.755	57.783	1.100	0.423
nr38	34.260	9.044	9.186	22.576	4.834	4.913	0.264	0.268	0.214	0.218	35.841	11.926	23.418	6.413	0.333	0.274	127.109	33.116	128.785	27.863	0.261	0.216
nr44	19.421	4.863	4.962	10.805	2.219	2.253	0.250	0.255	0.205	0.209	20.266	6.354	11.839	3.557	0.314	0.300	129.389	31.772	130.635	27.658	0.246	0.212
nr46	36.016	21.862	22.098	10.683	1.956	1.995	0.607	0.614	0.183	0.187	36.882	21.767	12.093	3.635	0.590	0.301	142.174	83.909	128.055	26.647	0.590	0.208
nr48	40.544	17.625	17.723	48.585	14.457	14.547	0.435	0.437	0.298	0.299	41.007	17.477	49.984	16.929	0.426	0.339	137.561	58.656	135.884	40.908	0.426	0.301
nr51	8.437	2.685	2.739	34.771	10.057	10.169	0.318	0.325	0.289	0.292	9.378	4.030	36.337	13.036	0.430	0.359	130.607	41.221	127.037	37.312	0.316	0.294
nr52	43.172	37.973	38.975	45.054	13.141	13.308	0.880	0.903	0.292	0.295	45.609	41.800	46.656	16.367	0.916	0.351	135.360	117.401	129.235	39.193	0.867	0.303
nr56	23.133	19.585	19.995	25.031	7.824	8.015	0.847	0.864	0.313	0.320	29.401	13.689	21.107	4.978	0.466	0.236	128.959	50.667	127.914	21.920	0.393	0.171
nr58	56.371	26.744	27.314	51.673	19.656	20.054	0.474	0.485	0.380	0.388	57.366	29.294	52.882	24.382	0.511	0.461	135.277	66.030	135.833	59.740	0.488	0.440
nr59	22.766	14.442	14.711	13.611	2.887	2.955	0.634	0.646	0.212	0.217	24.292	17.708	14.715	4.443	0.729	0.302	131.152	86.131	126.337	27.081	0.657	0.214
nr60	48.399	34.698	35.697	51.409	20.445	20.882	0.717	0.738	0.398	0.406	51.932	38.787	54.209	24.644	0.747	0.455	136.601	95.937	137.192	52.951	0.702	0.386
nr61	19.412	9.423	9.666	25.353	6.016	6.099	0.485	0.498	0.237	0.241	20.995	12.124	26.417	8.037	0.577	0.304	133.489	63.880	128.423	30.966	0.479	0.241
nr62	25.399	16.892	17.212	49.000	18.155	18.406	0.665	0.678	0.371	0.376	28.610	21.579	51.504	23.239	0.754	0.451	132.005	86.001	137.870	53.562	0.651	0.388
nr65	45.827	20.768	21.335	23.793	6.239	6.347	0.453	0.466	0.262	0.267	46.671	24.013	24.763	7.981	0.515	0.322	127.246	62.801	130.871	34.771	0.494	0.266
nr66	24.600	19.239	19.672	7.153	1.507	1.551	0.782	0.800	0.211	0.217	26.742	22.756	8.733	3.223	0.851	0.369	131.999	101.304	129.468	31.936	0.767	0.247
nr67	51.142	25.223	25.858	23.297	4.597	4.678	0.493	0.506	0.197	0.201	52.416	27.733	24.558	6.496	0.529	0.265	131.391	65.409	124.989	24.125	0.498	0.193

2 priedo 2 lentelė. Integrinių intensyvumų skaičiavimo rezultatai esant G2 naviko piktybiškumo laipsniui (tęsinys).

G2 naviko piktybiškumo laipsnis																						
Spektrams atliktas 25 taškų glotninimas, bazinės linijos korekcija							Spektrams atlikta bazinės linijos korekcija							Spektrams atlikta bazinės linijos korekcija, min-max								
Integriniai intensyvumai							Integrinių intensyvumų				Integriniai intensyvumai				Integrinių		Integriniai intensyvumai				Integ. intensyvumų	
Audinio tipas	Navikinis			Normalus			Navikinis		Normalus		Navikinis		Normalus		Navikinis	Normalus	Navikinis		Normalus		Navikinis	Normalus
	a <sub>1</sub>	g <sub>1</sub>	g <sub>2</sub>	a <sub>1</sub>	g <sub>1</sub>	g <sub>2</sub>	g <sub>1</sub> /a <sub>1</sub>	g <sub>2</sub> /a <sub>1</sub>	g <sub>1</sub> /a <sub>1</sub>	g <sub>2</sub> /a <sub>1</sub>	a <sub>1</sub>	g	a <sub>1</sub>	g	g/a <sub>1</sub>	g/a <sub>1</sub>	a <sub>1</sub>	g	a <sub>1</sub>	g	g/a <sub>1</sub>	g/a <sub>1</sub>
Paciento nr.	1717 - 1591 cm <sup>-1</sup>	1198 - 960 cm <sup>-1</sup>	1198 - 892 cm <sup>-1</sup>	1717 - 1591 cm <sup>-1</sup>	1198 - 960 cm <sup>-1</sup>	1198 - 892 cm <sup>-1</sup>					1717 - 1591 cm <sup>-1</sup>	1190 - 950 cm <sup>-1</sup>	1717 - 1591 cm <sup>-1</sup>	1190 - 950 cm <sup>-1</sup>			1717 - 1591 cm <sup>-1</sup>	1190 - 950 cm <sup>-1</sup>	1717 - 1591 cm <sup>-1</sup>	1190 - 950 cm <sup>-1</sup>		
nr68	50.530	23.523	24.009	41.281	13.553	13.834	0.466	0.475	0.328	0.335	52.827	27.962	42.750	16.865	0.529	0.395	128.512	60.035	129.925	44.966	0.467	0.346
nr72	55.535	26.989	27.609	53.783	22.592	23.127	0.486	0.497	0.420	0.430	56.672	29.032	54.239	22.189	0.512	0.409	134.487	65.096	136.926	56.017	0.484	0.409
nr73	48.213	31.995	32.854	55.668	18.157	18.521	0.664	0.681	0.326	0.333	49.441	36.388	56.767	21.507	0.736	0.379	133.003	95.346	132.909	47.428	0.717	0.357
nr78	18.834	3.721	3.777	16.708	3.196	3.251	0.198	0.201	0.191	0.195	20.072	5.313	17.830	4.868	0.265	0.273	123.158	24.578	125.405	23.825	0.200	0.190
nr80	16.074	4.506	4.607	43.807	14.379	14.719	0.280	0.287	0.328	0.336	17.233	6.251	45.031	18.055	0.363	0.401	122.758	33.987	133.013	48.909	0.277	0.368
nr83	16.874	10.457	10.610	39.875	9.351	9.517	0.620	0.629	0.235	0.239	18.258	12.541	41.255	12.348	0.687	0.299	127.410	77.465	127.191	31.530	0.608	0.248
nr84	26.013	30.360	31.088	4.745	1.499	1.508	1.167	1.195	0.316	0.318	29.126	35.895	5.622	2.650	1.232	0.471	135.655	156.835	129.693	42.425	1.156	0.327
nr85	29.743	16.791	17.153	15.512	4.438	4.479	0.565	0.577	0.286	0.289	31.003	20.575	16.564	6.277	0.664	0.379	133.648	83.534	128.586	36.409	0.625	0.283
nr86	20.402	12.023	12.392	38.984	15.529	15.960	0.589	0.607	0.398	0.409	22.264	15.043	39.728	17.473	0.676	0.440	125.933	72.281	135.214	56.830	0.574	0.420
nr87	22.222	14.857	15.238	16.830	2.999	3.055	0.669	0.686	0.178	0.182	24.360	18.565	19.041	5.438	0.762	0.286	137.165	90.896	123.872	23.857	0.663	0.193
nr88	20.967	20.758	21.448	6.984	1.288	1.308	0.990	1.023	0.184	0.187	22.949	24.425	8.151	2.576	1.064	0.316	133.739	133.555	128.432	25.984	0.999	0.202
nr93	9.105	8.289	9.118	13.987	4.951	5.103	0.910	1.001	0.354	0.365	9.073	8.192	14.158	5.476	0.903	0.387	135.682	100.756	127.910	41.045	0.743	0.321
nr95	21.421	6.445	6.970	41.519	12.841	13.291	0.301	0.325	0.309	0.320	22.511	7.347	42.414	13.305	0.326	0.314	125.031	31.266	139.726	34.979	0.250	0.250
nr103	35.692	29.473	31.016	21.642	7.682	7.993	0.826	0.869	0.355	0.369	36.708	29.699	23.624	8.480	0.809	0.359	135.763	99.727	131.841	30.576	0.735	0.232

2 priedo 3 lentelė. Integriųjų intensyvumų skaičiavimo rezultatai esant G3 naviko piktybiškumo laipsniui.

G3 naviko piktybiškumo laipsnis																						
Audinio tipas	Spektrams atliktas 25 taškų glotninimas, bazinės linijos korekcija										Spektrams atlikta bazinės linijos korekcija				Spektrams atlikta bazinės linijos korekcija, min-max normavimas							
	Integriniai intensyvumai						Integrinių intensyvumų santykiai				Integriniai intensyvumai				Integrinių intensyvumų		Integriniai intensyvumai				Integ. intensyvumų santykiai	
	Navikinis			Normalus			Navikinis		Normalus		Navikinis		Normalus		Navikinis	Normalus	Navikinis		Normalus		Navikinis	Normalus
Integ. Sritis	a <sub>1</sub>	g <sub>1</sub>	g <sub>2</sub>	a <sub>1</sub>	g <sub>1</sub>	g <sub>2</sub>	g <sub>1</sub> /a <sub>1</sub>	g <sub>2</sub> /a <sub>1</sub>	g <sub>1</sub> /a <sub>1</sub>	g <sub>2</sub> /a <sub>1</sub>	a <sub>1</sub>	g	a <sub>1</sub>	g	g/a <sub>1</sub>	g/a <sub>1</sub>	a <sub>1</sub>	g	a <sub>1</sub>	g	g/a <sub>1</sub>	g/a <sub>1</sub>
Paciento nr.	1717 - 1591 cm <sup>-1</sup>	1198 - 960 cm <sup>-1</sup>	1198 - 892 cm <sup>-1</sup>	1717 - 1591 cm <sup>-1</sup>	1198 - 960 cm <sup>-1</sup>	1198 - 892 cm <sup>-1</sup>					1717 - 1591 cm <sup>-1</sup>	1190 - 950 cm <sup>-1</sup>	1717 - 1591 cm <sup>-1</sup>	1190 - 950 cm <sup>-1</sup>			1717 - 1591 cm <sup>-1</sup>	1190 - 950 cm <sup>-1</sup>	1717 - 1591 cm <sup>-1</sup>	1190 - 950 cm <sup>-1</sup>		
nr10	25.035	14.205	14.427	23.178	5.576	5.658	0.567	0.576	0.241	0.244	26.032	16.437	24.335	7.543	0.631	0.310	128.571	75.783	132.176	30.964	0.589	0.234
nr11	56.562	32.712	33.433	32.322	8.966	9.094	0.578	0.591	0.277	0.281	57.274	34.899	33.058	11.132	0.609	0.337	136.038	80.914	134.048	41.217	0.595	0.307
nr17	46.167	28.006	28.777	15.606	3.619	3.701	0.607	0.623	0.232	0.237	47.199	31.274	16.262	4.708	0.663	0.290	137.438	88.117	130.477	30.156	0.641	0.231
nr20	37.559	22.567	23.235	20.089	3.937	3.994	0.601	0.619	0.196	0.199	39.028	25.211	20.834	5.453	0.646	0.262	143.909	86.943	123.883	25.569	0.604	0.206
nr28	18.361	4.677	4.769	21.137	4.651	4.692	0.255	0.260	0.220	0.222	19.317	6.213	21.901	6.147	0.322	0.281	129.252	32.545	131.152	29.844	0.252	0.228
nr29	19.890	16.730	17.107	28.374	7.168	7.307	0.841	0.860	0.253	0.258	21.816	20.371	29.013	9.008	0.934	0.310	131.132	111.201	127.301	35.931	0.848	0.282
nr36	23.584	19.579	20.075	27.606	7.241	7.389	0.830	0.851	0.262	0.268	24.996	22.610	28.739	9.383	0.905	0.326	133.482	114.428	127.023	34.536	0.857	0.272
nr37	24.314	29.057	29.833	54.026	20.580	21.050	1.195	1.227	0.381	0.390	26.423	33.370	55.348	25.671	1.263	0.464	136.098	165.032	134.395	58.805	1.213	0.438
nr40	46.785	16.681	17.018	23.485	4.752	4.822	0.357	0.364	0.202	0.205	47.385	19.879	24.370	6.465	0.420	0.265	130.474	53.669	126.103	26.728	0.411	0.212
nr43	12.896	7.108	7.194	24.256	4.103	4.136	0.551	0.558	0.169	0.171	24.951	5.423	14.006	9.035	0.217	0.645	134.419	23.177	133.955	72.519	0.172	0.541
nr49	40.677	20.799	20.995	22.279	5.611	5.691	0.511	0.516	0.252	0.255	41.046	20.696	23.473	7.678	0.504	0.327	139.001	70.364	130.851	31.924	0.506	0.244
nr53	11.862	10.836	11.017	25.167	6.139	6.237	0.914	0.929	0.244	0.248	13.252	12.596	27.186	9.058	0.950	0.333	127.681	113.143	131.038	31.490	0.886	0.240
nr64	37.346	28.694	29.487	7.008	1.535	1.595	0.768	0.790	0.219	0.228	39.253	33.415	8.565	2.970	0.851	0.347	135.001	108.724	134.711	37.166	0.805	0.276
nr69	6.639	1.801	1.838	15.869	5.373	5.483	0.271	0.277	0.339	0.346	7.583	3.038	16.811	6.873	0.401	0.409	130.452	38.438	139.297	47.800	0.295	0.343
nr70	35.380	13.074	13.401	46.210	20.160	20.646	0.370	0.379	0.436	0.447	36.910	16.611	47.556	24.070	0.450	0.506	131.368	52.196	136.470	64.647	0.397	0.474
nr71	26.945	23.139	23.675	47.228	12.963	13.232	0.859	0.879	0.274	0.280	29.291	27.439	49.500	17.472	0.937	0.353	127.398	108.973	127.638	35.873	0.855	0.281
nr74	29.209	12.719	13.010	28.678	6.782	6.892	0.435	0.445	0.236	0.240	30.400	15.366	29.691	9.226	0.505	0.311	129.273	58.897	128.873	30.640	0.456	0.238
nr77_1	28.350	20.479	20.838	35.018	11.364	11.557	0.722	0.735	0.325	0.330	39.156	22.790	36.304	14.254	0.582	0.393	125.881	66.476	131.063	45.102	0.528	0.344
nr77_2	37.489	19.283	19.647	-	-	-	0.514	0.524	-	-	30.231	23.984	-	-	0.793	-	128.531	93.138	-	-	0.725	-
nr79	9.560	3.198	3.265	9.657	2.125	2.163	0.335	0.342	0.220	0.224	10.293	4.519	11.043	3.857	0.439	0.349	136.338	45.283	131.068	30.751	0.332	0.235
nr81	38.532	13.808	14.140	7.568	1.371	1.400	0.358	0.367	0.181	0.185	39.707	17.018	8.195	2.145	0.429	0.262	126.855	49.450	125.418	23.675	0.390	0.189
nr82	12.268	4.614	4.684	41.444	10.144	10.359	0.376	0.382	0.245	0.250	13.971	6.650	43.303	13.730	0.476	0.317	124.916	47.557	122.304	30.351	0.381	0.248
nr90	38.502	18.973	19.409	47.867	15.307	15.658	0.493	0.504	0.320	0.327	39.889	23.243	48.768	18.699	0.583	0.383	130.107	71.117	128.801	46.606	0.547	0.362
nr92	37.559	22.567	23.235	20.089	3.937	3.994	0.601	0.619	0.196	0.199	26.790	11.244	28.084	7.599	0.420	0.271	127.272	45.464	130.287	26.546	0.357	0.204
nr96	19.890	16.730	17.107	28.374	7.168	7.307	0.841	0.860	0.253	0.258	35.872	30.094	21.563	6.510	0.839	0.302	134.518	104.133	128.471	26.886	0.774	0.209
nr97	46.785	16.681	17.018	23.485	4.752	4.822	0.357	0.364	0.202	0.205	53.398	32.968	28.147	2.845	0.617	0.101	138.484	80.624	153.591	15.918	0.582	0.104
nr98	31.198	23.452	24.013	47.128	17.298	17.457	0.752	0.770	0.367	0.370	32.285	24.631	48.087	18.347	0.763	0.382	143.186	105.610	130.875	40.151	0.738	0.307
nr100	50.237	23.602	24.104	44.151	13.732	14.584	0.470	0.480	0.311	0.330	51.185	24.567	45.071	14.633	0.480	0.325	138.090	59.976	133.884	36.381	0.434	0.272
nr102_1	26.873	12.381	13.119	17.092	4.758	5.693	0.461	0.488	0.278	0.333	27.971	13.983	18.005	5.759	0.500	0.320	125.025	51.275	134.716	28.787	0.410	0.214
nr102_2	46.628	31.415	32.107	-	-	-	0.674	0.689	-	-	47.613	32.513	-	-	0.683	-	132.742	85.762	-	-	0.646	-
nr104	35.103	22.478	23.238	56.113	20.915	21.409	0.640	0.662	0.373	0.382	36.095	23.776	57.105	21.707	0.659	0.380	135.337	79.376	133.830	40.882	0.587	0.305

**3 priedas** Programos, kurios veikimas remiasi spektrinių juostų skaičiaus nustatymu  $1200\text{ cm}^{-1}$  -  $950\text{ cm}^{-1}$  intervale, kodas

VARIABLES SECTION

```
STRING <Path> = 'Nurodykite katalogą';
STRING <Name> = 'Nurodykite spektro pavadinimą';
FILE <ResultFile 1> = Spec, Spec/Peak;
NUMERIC <Count> = 0;
BUTTON <Taip> = Goto (start);
BUTTON <Ne> = Goto (end);
```

PROGRAM SECTION

```
REM Lentelė, kurioje nurodoma tikrinamo spektro katalogas ir pavadinimas.
Label (start);
UserDialog ('Spektro įkėlimas', STANDARD, EDIT:'<Path>', EDIT:'<Name>', BLANK, BLANK, BLANK,
BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK);
REM įkeliamas tikrinamas spektras.
<ResultFile 1> = Load (0, {DAP='<Path>', DAF='<Name>'});
REM Tikrinamajam failui atliekamas 25 taškų glotninimas, bazinės linijos korekcija, pateikiamas 1800 - 800
cm-1 spektrinėje srityje
Smooth ([<ResultFile 1>:Spec], {QSP=25});
Baseline ([<ResultFile 1>:Spec], {BME=2, BCO=1, BPO=256, BIO=10});
Cut ([<ResultFile 1>:Spec], {CFX=1800.000000, CLX=800.000000});
REM Pakoreguotame spektre ieškoma spektrinių juostų, kurių maksimumai yra srityje nuo 1200 iki 1000
cm-1.
PeakPick ([<ResultFile 1>:Spec], {NSP=9, PSM=1, WHR=0, LXP=1000.000000, FXP=1200.000000,
QP8='NO', QP9=0.200000, PTR=0.100000, QP4='NO', QP7=0.800000, QP6='NO', QP5=80.000000,
PPM=1, QPA='OVR', QP0='NO', QP3=4, QPC='NO', QPD=3, QMA=10.000000});
REM Rastų juostų skaičius nurodomas lentelėje.
<Count> = FromReportHeader ([<ResultFile 1>:Spec/Peak], 1, 0, 3, RIGHT);
Message ("Spektrinėje srityje nuo 1200 iki 1000 cm-1 yra <Count> juostos", ON_SCREEN,
NO_TIMEOUT);
REM Nustatytas juostų skaičius „IF“ sakiniu palyginamas su verte, būdinga spektrams. Parodoma lentelė,
kurioje parašoma, jog spektras yra priskiriamas sveikam arba piktybiniam audiniui.
If (<Count>, .LT., 2);
Message ('Tikrinamasis spektras negali būti priskirtas nei normaliam, nei piktybiniam audiniui, nes rastų
spektrinių juostų skaičius mažesnis nei 2.', ON_SCREEN, NO_TIMEOUT);
Endif ();
If (<Count>, .EQ., 2);
Message ('Tikrinamasis spektras priskiriamas normaliam audiniui', ON_SCREEN, NO_TIMEOUT);
Endif ();
If (<Count>, .EQ., 3);
Message ('Tikrinamasis spektras priskiriamas piktybiniam audiniui', ON_SCREEN, NO_TIMEOUT);
Endif ();
If (<Count>, .EQ., 4);
Message ('Tikrinamasis spektras priskiriamas piktybiniam audiniui', ON_SCREEN, NO_TIMEOUT);
Endif ();
```

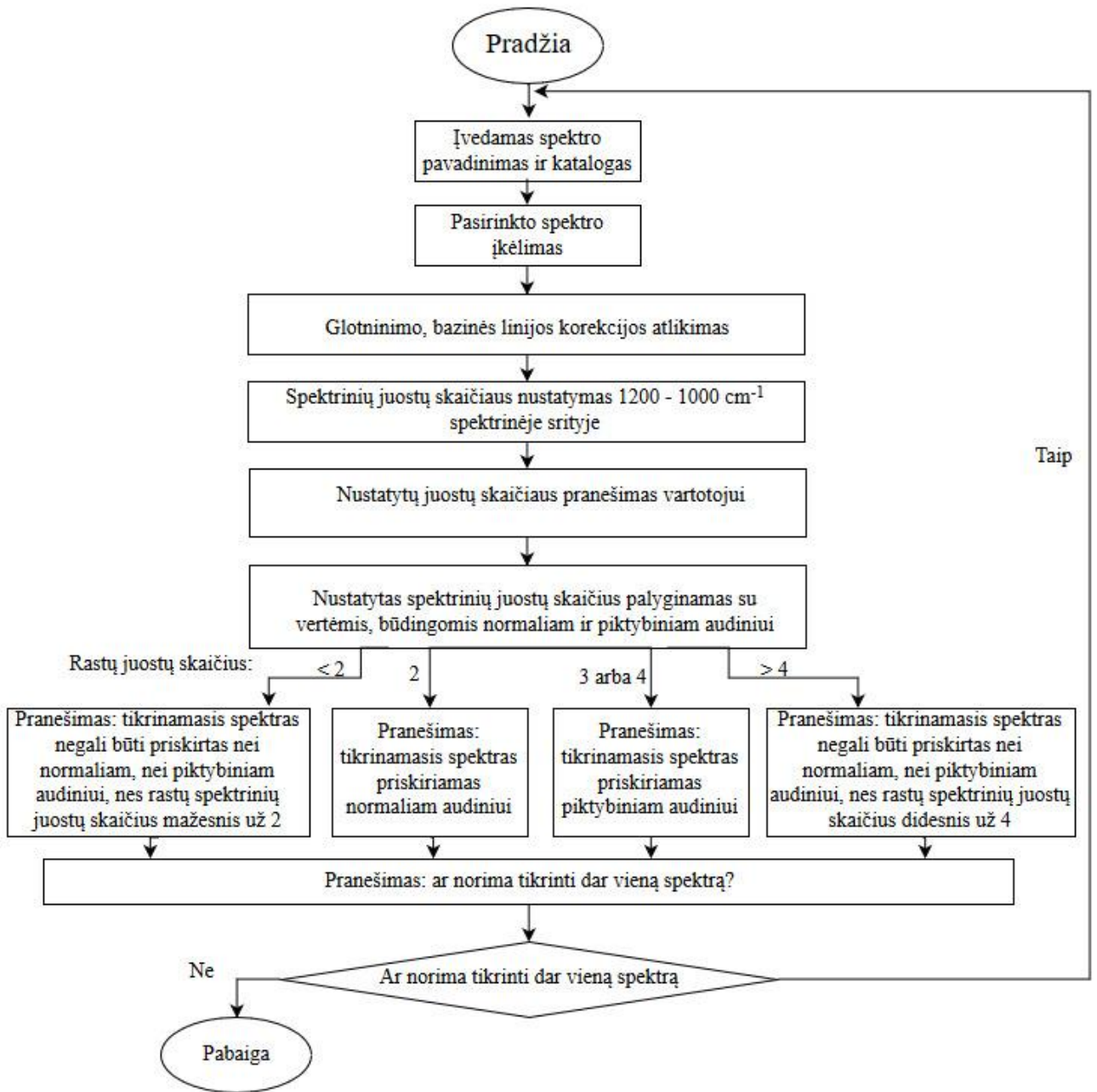


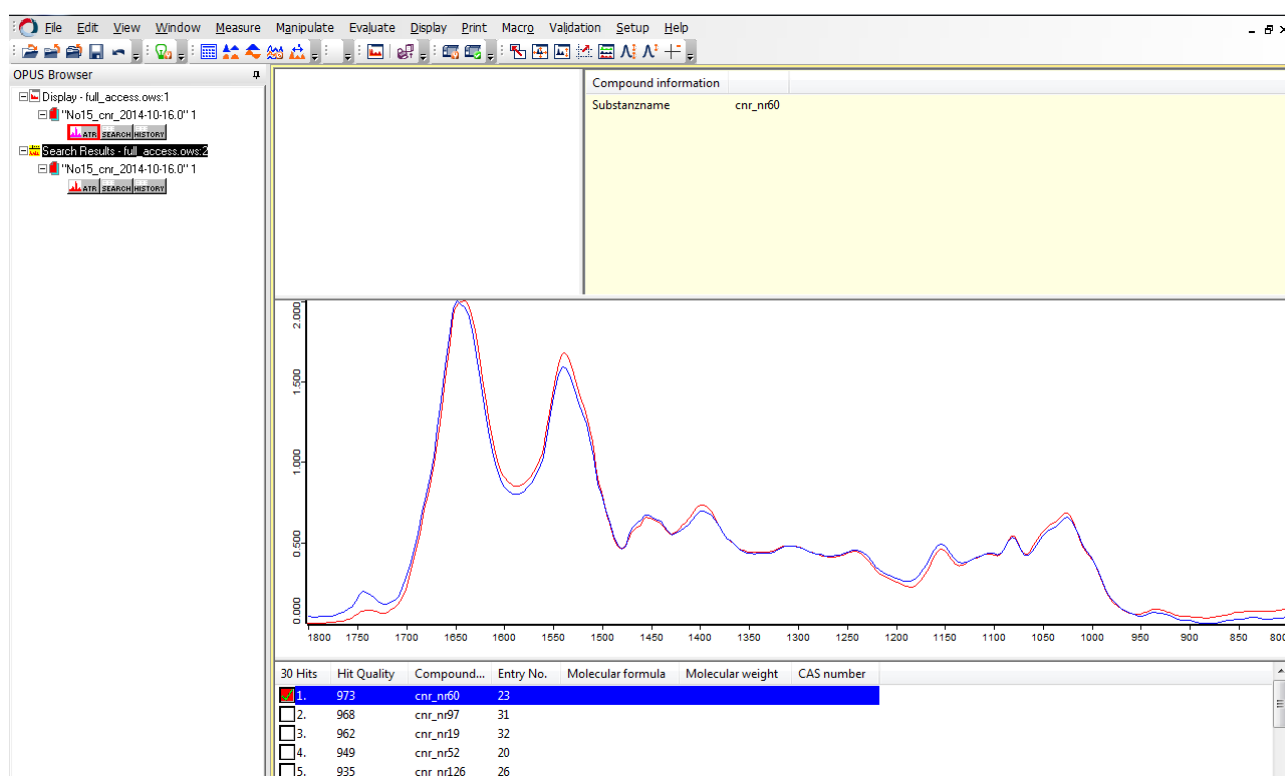
```
If (<Count>, .GT., 4);
Message ('Tikrinamasis spektras negali būti priskirtas nei normaliam, nei piktybiniam audiniui, nes rastų
spektrinių juostų skaičius yra didesnis nei 4', ON_SCREEN, NO_TIMEOUT);
Endif ();
REM Parodoma lentelė, klausianti ar norima tikrinti dar vieną spektrą. Pasirinkus „Taip“, nukreipiama į
programos pradžią, pasirinkus „Ne“ – programos langas uždaromas.
UserDialog ('Ar norėtumėte tikrinti dar vieną spektrą?', NODEFAULTBUTTONS,
BUTTON:'<Taip>+<Ne>', BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK,
BLANK, BLANK, BLANK, BLANK);
Label (end);
```

#### PARAMETER SECTION

```
IFN=DEFAULT;
INM=DEFAULT;
IFP=C:\OPUS_7.0.129\METHODS;
INP=C:\OPUS_7.0.129\METHODS;
```

4 priedas Programos, kurios veikimas remiasi spektrinių juostų skaičiaus nustatymu  $1200\text{ cm}^{-1}$  -  $950\text{ cm}^{-1}$  intervale, blokinė schema





1 pav. Paieškos normalaus ir navikinio audinio audinių tarpląstelinės medžiagos ATR IR sugerties spektrų bibliotekoje pavyzdys (raudona linija atitinka tikrinamąjį spektrą, mėlyna – geriausiai atitinkantį spektrų bibliotekos spektrą). Šiuo atveju atitikimo kokybės indeksas *HQI* yra lygus 973, kai maksimali šio indekso vertė gali siekti 1000.

Biblioteka sukuriama programiniame pakete „Opus“ skiltyje „Evaluate“ pasirenkant komandą „Initialize Library“. Atsidariusiame lange nurodomi duomenys apie kuriamą biblioteką: pavadinimas, vieta kompiuterio kietajame diske bei bibliotekos aprašymas. Spektrai į biblioteką keliami po vieną. Tuo tikslu programiniame pakete „Opus“ atidaromi reikalingi spektrai, pasirinkus norimą įkelti spektrą, pasirenkama komanda „Store Spectrum in Library“. Atsidariusiame lange nurodomas pavadinimas ir spektras išsaugomas bibliotekoje. Įtrauktiesiems spektrams nurodomi pavadinimai pagal tai, ar spektras yra priskiriamas normaliam ar navikiniam audiniui bei nurodant paciento eilės numerį.

Analizės metu, išbandyta atlikti paiešką taikant standartinį bei spektrų koreliacijos (sugerties spektrų be išvestinės, skaičiuojant pirmos ir antros eilės išvestines) metodus. Nustatyta, jog geriausi rezultatai pasiekiami taikant spektrų koreliacijos algoritmą, kuomet skaičiuojama pirmos eilės išvestinė, todėl pasirinkta taikyti būtent šį algoritmą. Spektrų koreliacijos algoritmas remiasi Euklidinių atstumų skaičiavimu. Pasirinkus šį metodą, paieškos algoritmas gali būti vykdomas sugerties spektrui neskaičiuojant išvestinės, skaičiuojant pirmos arba antros eilės išvestines. Kaip

minėta, pasirinkta taikyti pirmos išvestinės metodą. Apskaičiavus pirmos eilės išvestinę, yra išryškinami statesni juostų šlaitai ir smulkesnės struktūros.

Programiniame pakete „Opus“ pasirinkus komandą „Spectrum Search“, atsidariusiame lange pasirinktas spektrų koreliacijos algoritmas. Pasirinkus šį metodą, paieškos parametrų skiltyje „Normalization method“ būtina pasirinkti normalizavimo (vektorinį arba minimumo – maksimumo) metodą. Analizės atlikimui pasirinktas minimumo – maksimumo normavimas, kurio metu spektro ordinacių skalė padauginama iš tam tikro daugiklio taip, kad mažiausia spektro vertė būtų lygi 0, o didžiausia - lygi 2. Toliau skiltyje „Derivative“ pasirenkama pirmos eilės išvestinė. Kadangi paieškos rezultatai yra įvertinami spektrų atitikimo indeksu *HQI*, kuris nurodo kaip gerai bibliotekoje esantis spektras atitinka tiriamąjį spektrą ir yra įvertinamas vertėmis nuo 0 iki 1000, o atliekant paiešką rezultatai išdėstomi mažėjančia *HQI* indekso verčių tvarka, todėl skiltyje „Minimum hit quality“ reikia nurodyti mažiausią pageidaujamą atitikimo vertę. Kokybinės analizės metu ši vertė pasirinkta lygi 700. Atlikus paiešką, visi rezultatai, atitinkantys minimalios *HQI* vertės reikalavimą yra išdėstomi rezultatų lange. Siekiant išvengti duomenų pertekliaus, skiltyje „Maximum number of hits“ nurodomas didžiausias rezultatų lange rodomas spektrų skaičius, patenkinantis nustatytus reikalavimus. Analizės atlikimui šio parametro vertė nustatyta lygi 30. Nustačius pageidaujamus parametrus, skiltyje „Select Libraries“ pasirenkama sukurtoji spektrų biblioteka ir pradama spektrų paieška. Pradėjus paiešką, programiniame pakete „Opus“ atsidaro langas, kuriame pateikiama visa bibliotekos kūrimo metu nurodyta informacija apie bibliotekos spektrą, kuriam buvo priskirtas analizuojamas spektras. Parodomas geriausiai tiriamąjį spektrą atitinkančių bibliotekos spektrų sąrašas su *HQI* vertėmis bei pateikiami abu (analizuojamas bei didžiausią *HQI* vertę turintis) spektrai tam, kad būtų galima vizualiai palyginti spektrus bei įsitikinti jų panašumu.

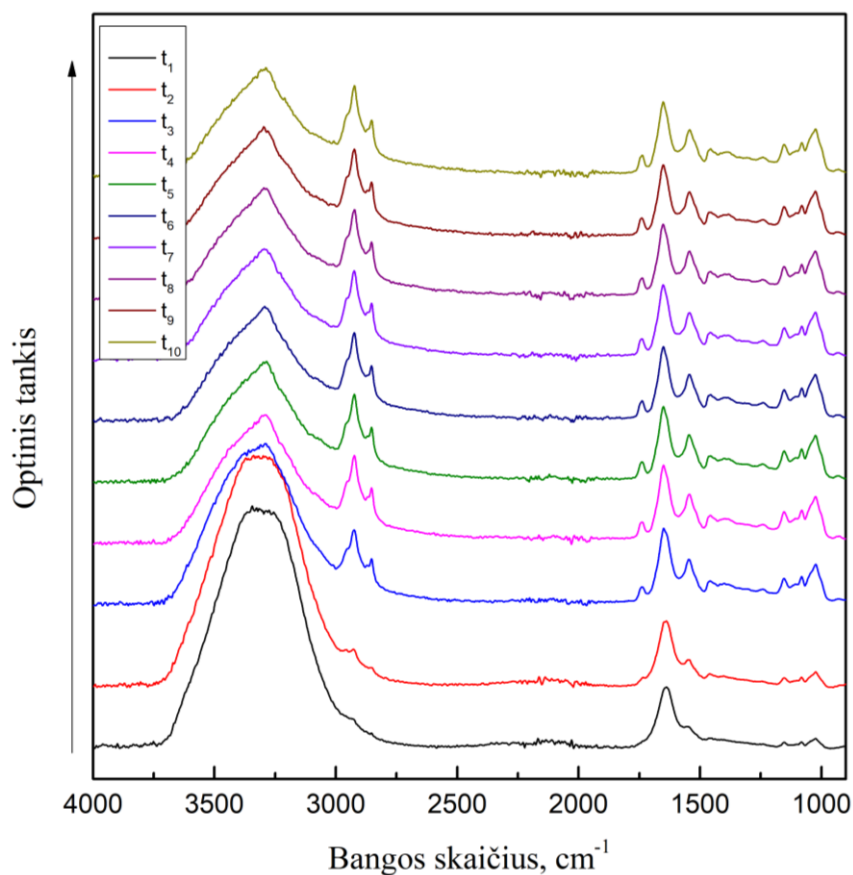
1 lentelė. Paieškos atlikimo spektrų bibliotekose rezultatai.

Eil. Nr.	Algoritmas	Normavimo metodas	Spektrinis intervalas, $\text{cm}^{-1}$	Patikrintų spektrų sk.		Klaidingai identifikuotų spektrų skaičius		Atpažinimo tikslumas, %	
				Pikt.	Norm.	Pikt.	Norm.	Pikt.	Norm.
1	Standartinis	-	1800-950	Pikt.	82	Pikt.	28	Pikt.	66
				Norm.	85	Norm.	6	Norm.	93
2	Koreliacijos, be išvestinės	min-max	1800-950	Pikt.	82	Pikt.	19	Pikt.	77
				Norm.	85	Norm.	6	Norm.	93
3	Koreliacijos, 1 eilės išvestinė	min-max	1800-950	Pikt.	82	Pikt.	17	Pikt.	79
				Norm.	85	Norm.	15	Norm.	82
4	Koreliacijos, 2 eilės išvestinė	min-max	1800-950	Pikt.	82	Pikt.	21	Pikt.	74
				Norm.	85	Norm.	20	Norm.	76
5	Koreliacijos, 1 eilės išvestinė	min-max	1200-950	Pikt.	82	Pikt.	9	Pikt.	89
				Norm.	85	Norm.	3	Norm.	96
6	Koreliacijos, 1 eilės išvestinė	min-max	1200-950	Pikt.	82	Pikt.	9	Pikt.	89
				Norm.	85	Norm.	3	Norm.	96
7	Koreliacijos, 2 eilės išvestinė	min-max	1200-950	Pikt.	82	Pikt.	11	Pikt.	87
				Norm.	85	Norm.	6	Norm.	93
8	Koreliacijos, 1 eilės išvestinė	vektorinis	1200-950	Pikt.	82	Pikt.	10	Pikt.	88
				Norm.	85	Norm.	5	Norm.	94
9	Koreliacijos, 1 eilės išvestinė	min-max	1200-950	Pikt.	82	Pikt.	12	Pikt.	85
				Norm.	85	Norm.	3	Norm.	96

1-5 eilutėse pateikiami rezultatai, atlikus paiešką bibliotekoje, sukurtoje iš normalaus, piktybinio žmogaus inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų (imant 1800 – 950  $\text{cm}^{-1}$  intervalą), 6-9 eilutėse – atlikus paiešką bibliotekoje, sukurtoje iš normalaus, piktybinio žmogaus inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos bei vandens ir etanolio *ATR IR* sugerties spektrų (imant 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$  intervalą). 1-8 eilutes atitinkančiose bibliotekose patalpinti tų pačių pacientų normalaus ir navikinio audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai, 9 eilutę atitinka pakeistos sudėties spektrų biblioteka.

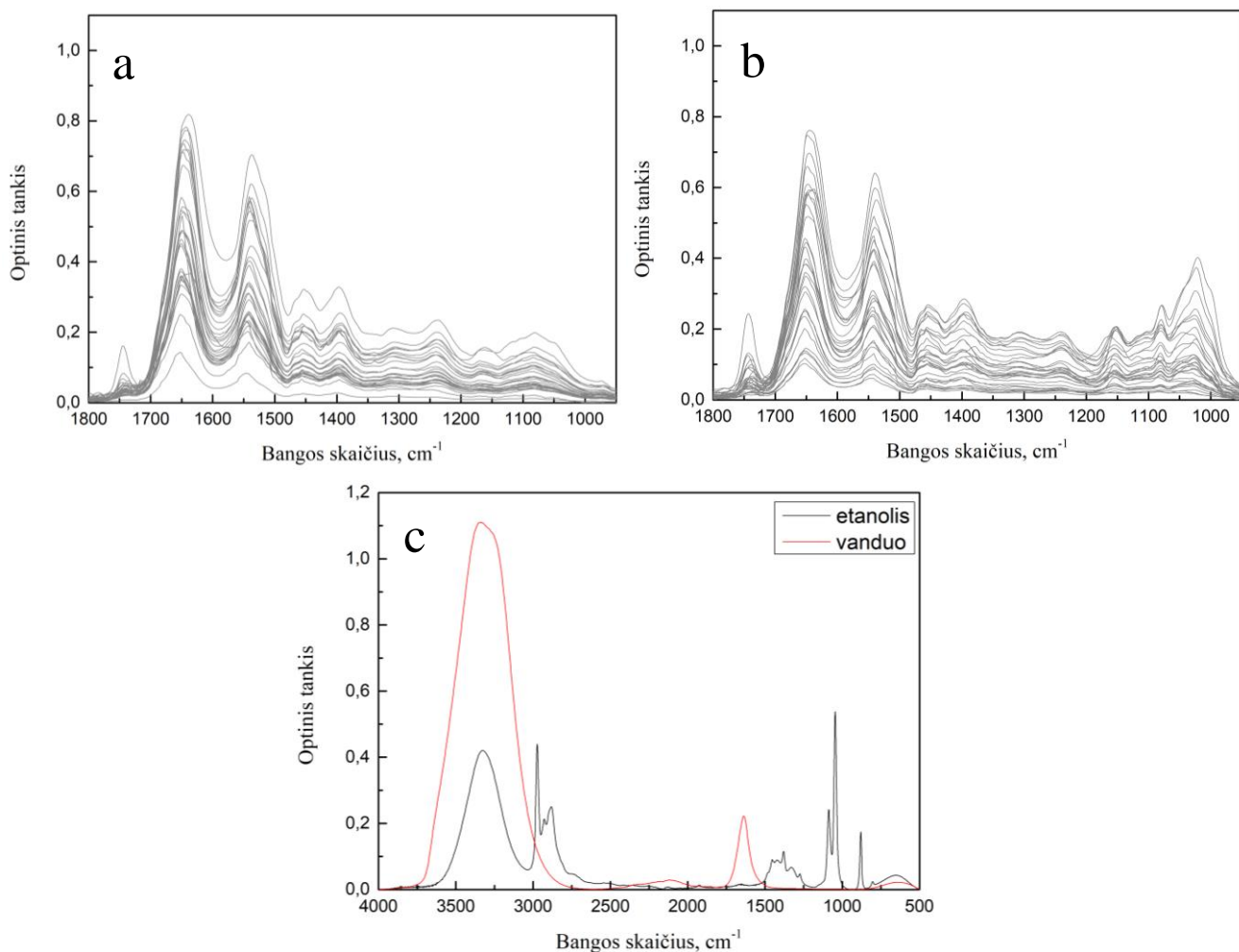
Trumpinys Pikt. Atitinka piktybinį, Norm. – normalų žmogaus inkstų audinį.

## 7 priedas Audinio tarpląstelinės medžiagos ATR IR sugerties spektrai kintant laikui



1 pav. Žmogaus piktybinio inkstų audinio to paties tarpląstelinės medžiagos bandinio ATR IR sugerties spektrai kintant laikui (spektrams atlikta bazinės linijos korekcija). t<sub>1</sub> atitinka spektrą, užregistruotą iškart po audinio pridėjimo ir atitraukimo nuo ATR kristalo, t<sub>10</sub> – praėjus 2 minutėms nuo bandinio uždėjimo.

## 8 priedas *ATR IR sugerties spektrai, patalpinti spektrų bibliotekoje*



1 pav. Spektrai, patalpinti spektrų bibliotekoje: a pav. – normalaus, b pav. – piktybinio inkstų audinio tarpląstelinės medžiagos, c pav. – vandens ir etanolio *ATR IR* sugerties spektrai. Spektrams atlikta bazinės linijos korekcija.

## 9 priedas Programos, kurios veikimas remiasi spektrų palyginimu bibliotekoje, kodas

### VARIABLES SECTION

```
STRING <Katalogas> = 'Nurodykite katalogą';
STRING <Spektro pavadinimas> = 'Nurodykite spektro pavadinimą';
FILE <${ResultFile 1}> = Spec, Spec/Peak, Spec/Search;
BUTTON <Taip> = Goto (start);
BUTTON <Ne> = Goto (end);
STRING <Pavadinimas> = ";
STRING <Pavadinimas_2> = ";
BUTTON <Registruoti spektrą> = Goto (spektro registravimas);
BUTTON <Tikrinti iš katalogo> = Goto (spektro įkėlimas);
FILE <${ResultFile 1}> = ATR;
BUTTON <Registruoti atraminį spektrą> = Goto (atraminis spektras);
BUTTON <Registruoti bandinio spektrą> = Goto (bandinio spektras);
BUTTON <Baigti> = Goto (end);
```

### PROGRAM SECTION

```
Label (start);
REM Lentelė, kurioje prašoma vartotojo pasirinkti norima registruoti spektrą ar tikrinti jau esamą iš katalogo.
UserDialog ('0', NODEFAULTBUTTONS, TEXT:'Norėtumėte užregistruoti ar tikrinti jau esamą spektrą iš katalogo? ', BUTTON:'<Registruoti spektrą>+<Tikrinti iš katalogo>', BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK);
Label (spektro registravimas);
REM spektro registravimas.
UserDialog ('0', NODEFAULTBUTTONS, TEXT:'Bus registruojamas atraminis spektras.', TEXT:'Prieš registruodami spektrą įsitikinkite, jog ATR kristalas švarus', BUTTON:'<Registruoti atraminį spektrą>+<Baigti>', BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK);
Label (atraminis spektras);
MeasureReference (0, 0, {EXP='ATR_DI_audiniams - programai.XPM', XPP='C:\DATA\Studentai\2016\Rimante\!programa'});
UserDialog ('0', NODEFAULTBUTTONS, TEXT:'Atraminis spektras užregistruotas.', TEXT:'Bus registruojamas bandinio spektras. Pridėkite bandinį prie ATR kristalo.', BUTTON:'<Registruoti bandinio
```



```

spektrą>+<Baigti>', BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK,
BLANK, BLANK);
Label (bandinio spektras);
<$ResultFile 1> = MeasureRepeated (0, 0, {EXP='ATR_DI_audiniams - programai.XPM',
XPP='C:\DATA\Studentai\2016\Rimante\!programa'});
Goto (spektro tipo nustatymas);
Label (spektro įkelimas);
REM Lentelė, kurioje nurodoma tikrinamo spektro katalogas ir pavadinimas.
UserDialog ('Spektro įkelimas', STANDARD, EDIT:'<Katalogas>', EDIT:'<Spektro pavadinimas>',
BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK,
BLANK);
REM įkeliamas tikrinamas spektras.
<$ResultFile 1> = Load (0, {DAP='<Katalogas>', DAF='<Spektro pavadinimas>'});
Label (spektro tipo nustatymas);
REM Tikrinamajam spektrui atliekama bazinės linijos korekcija, siekiant nustatyti spektro tipą (ar tai yra
audinio spektras) atliekama paieška sukurtoje spektrų bibliotekoje.
Baseline ([<$ResultFile 1>:Spec], {BME=2, BCO=1, BPO=256, BIO=10});
LibrarySearchSpectrum ([<$ResultFile 1>:Spec], 0, {LSS=6, SSQ=700, SSH=30, SS1=292,
LB1='C:\DATA\Studentai\2016\Rimante\!programa \bibliotekos\BIBLIOTEKA 13.S01@', MPP=0, LB6='|
|RunMacro 1| |Load 1 C:\ 'C:\DATA\Studentai\2016\Rimante\!programa\spektrai patikrinimui|
|LibrarySearchSpectrum 1| ', LBL='C:\ DATA\Studentai\2016\Rimante\!programa \bibliotekos', SSO=0,
DLI=0});
<Pavadinimas> = FromReportMatrix ([<$ResultFile 1>:Spec/Search], 1, 0, 1, 3);
REM parodoma lentelė, kurioje pranešama ar tikrinamasis spektras priklauso audiniui ar kitam tipui.
If ('<Pavadinimas>', .EQ., 'h');
Message ('Tikrinamasis spektras priskiriamas audiniui', ON_SCREEN, NO_TIMEOUT);
Endif ();
If ('<Pavadinimas>', .EQ., 'cnr');
Message ('Tikrinamasis spektras priskiriamas audiniui', ON_SCREEN, NO_TIMEOUT);
Endif ();
If ('<Pavadinimas>', .EQ., 'etanolis');
Message ('Spektras nėra priskiriamas audiniui, tiriamoje srityje gali būti didelis kiekis etanolio',
ON_SCREEN, NO_TIMEOUT);
Goto (identifikavimo pabaiga);
Endif ();
If ('<Pavadinimas>', .EQ., 'vanduo');
Message ('Spektras nėra priskiriamas audiniui, tiriamoje srityje gali būti didelis kiekis vandens',
ON_SCREEN, NO_TIMEOUT);

```

```

Goto (identifikavimo pabaiga);
Endif ();
REM spektras iškerpamas srityje nuo 1200 iki 950 cm-1, atliekama paieška audinių bibliotekoje ir nustatomas
audinio tipas (piktybinis ar normalus audinys).
Cut ([<$ResultFile 1>:Spec], {CFX=1200.000000, CLX=950.000000});
LibrarySearchSpectrum ([<$ResultFile 1>:Spec], 0, {LSS=6, SSQ=100, SSH=30, SS1=292, LB1='C:\
DATA\Studentai\2016\Rimante\!programa\bibliotekos\BIBLIOTEKA 13.S01@', MPP=38, LB6='|
|RunMacro 1| |Load 1 C:\ DATA\Studentai\2016\Rimante\!programa\inkstu spektrai - sutvarkyti\atrinkti ir
sutvarkyti\atrinkti 2| |LibrarySearchSpectrum 1|', LBL='C:\ DATA\Studentai\2016\Rimante\!programa
\bibliotekos', SSO=0, DLI=0});
<Pavadinimas_2> = FromReportMatrix ([<$ResultFile 1>:Spec/Search], 1, 0, 1, 3);
REM atliekamas audinio identifikavimas pagal geriausiai atitinkančio spektro pavadinimą.
If ('<Pavadinimas_2>', .EQ., 'h');
Message ('Tikrinamasis spektras priskiriamas sveikam audiniui', ON_SCREEN, NO_TIMEOUT);
Endif ();
If ('<Pavadinimas_2>', .EQ., 'cnr');
Message ('Tikrinamasis spektras priskiriamas piktybiniam audiniui', ON_SCREEN, NO_TIMEOUT);
Endif ();
Label (identifikavimo pabaiga);
REM Uždaromas tikrinamasis spektras.
Unload ([<$ResultFile 1>:Spec/Search], {});
REM Parodoma lentelė, klausianti ar norima tikrinti dar vieną spektrą.
UserDialog ('Ar norėtumėte tikrinti dar vieną spektrą?', NODEFAULTBUTTONS,
BUTTON:'< Taip>+< Ne>', BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK,
BLANK, BLANK, BLANK, BLANK, BLANK);
Label (end);

```

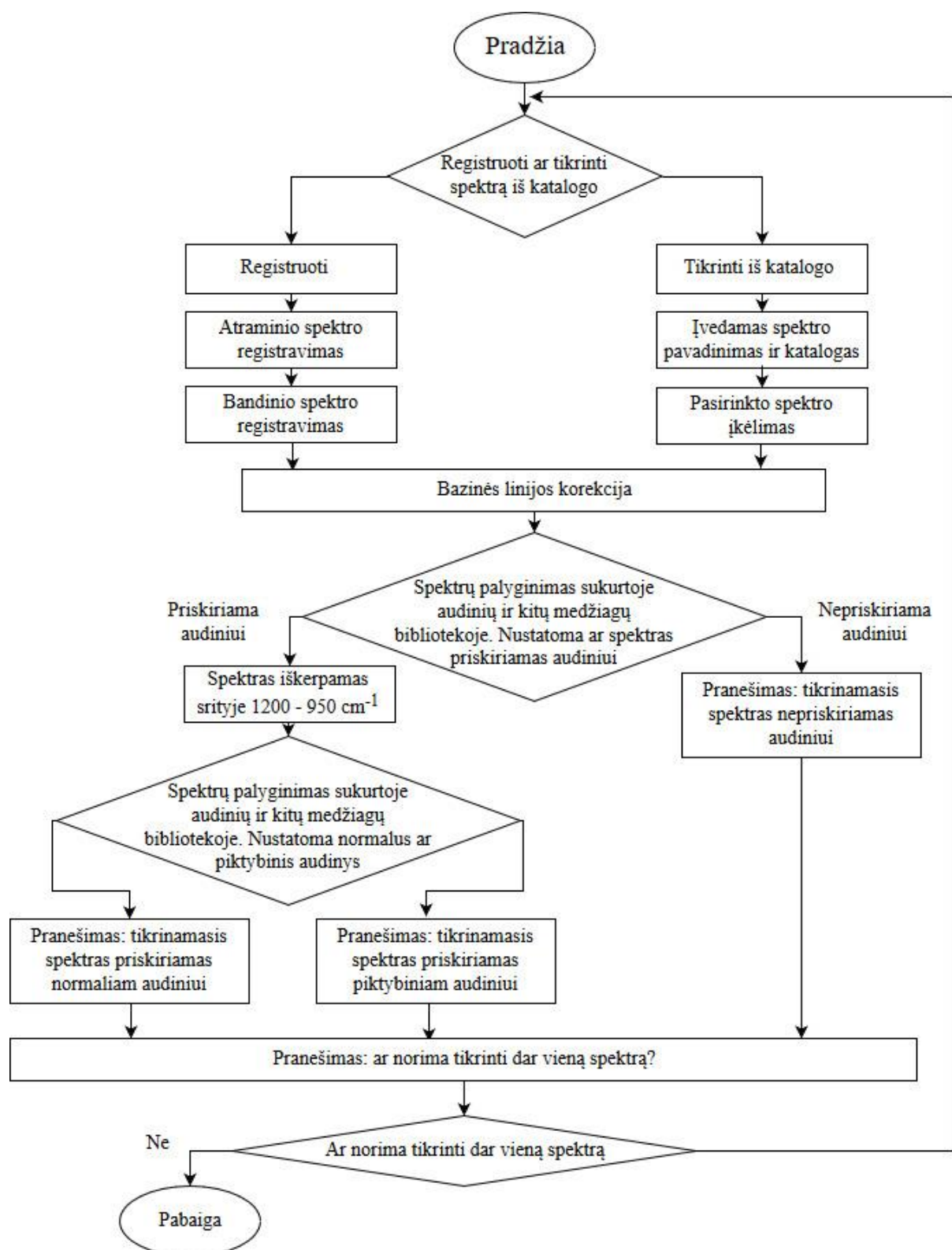
#### PARAMETER SECTION

```

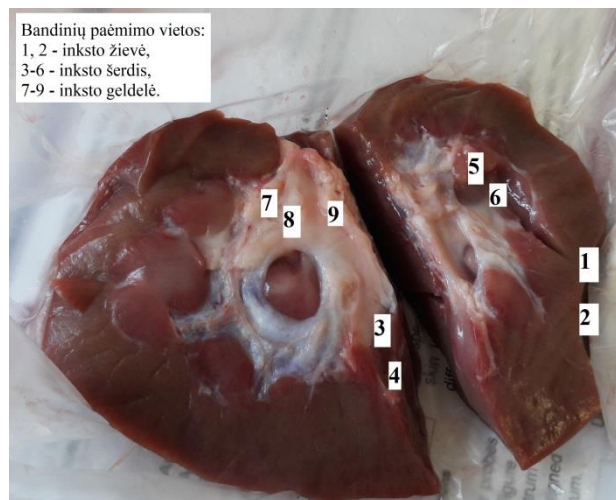
IFN=DEFAULT;
INM=DEFAULT;
IFP=C:\OPUS_7.0.129\METHODS;
INP=C:\OPUS_7.0.129\METHODS;

```

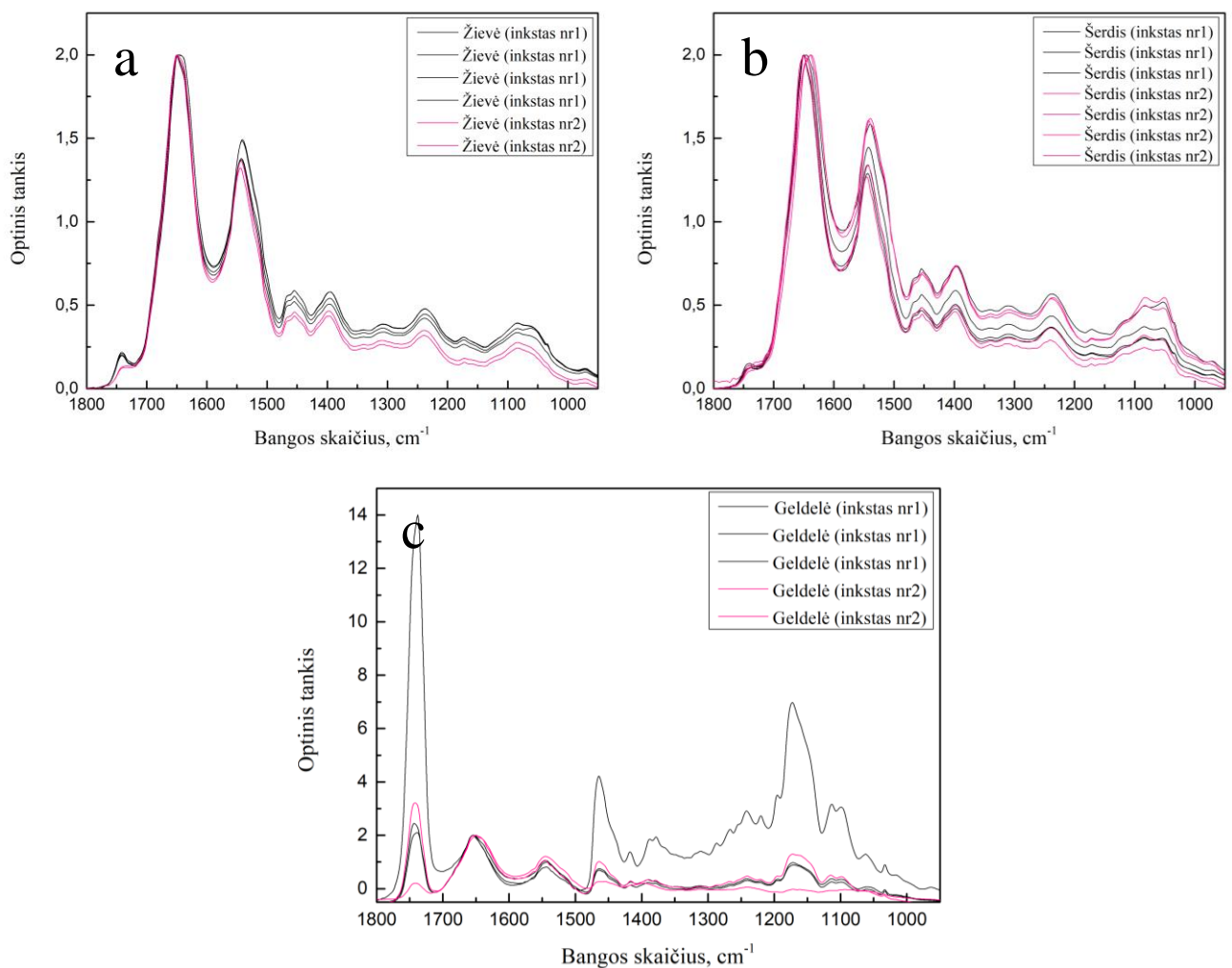
10 priedas Programos, kurios veikimas remiasi spektrų palyginimu bibliotekoje, blokinė schema



Taip



1 pav. Audinio bandinių paėmimo vietos iš kiaulės inksto. Atskiros organo dalys skiriasi vizualiai, stebimi skirtumai ir tarp skirtingų dalių audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrų.



2 pav. Skirtingų inksto dalių: a pav. – žievės, b pav. – šerdies, c pav. - geldelės audinio tarpląstelinės medžiagos *ATR IR* sugerties spektrai esant dviems individams. Spektrams atlikta bazinės linijos korekcija, minimumo-maksimumo normavimas (normavimas pagal Amidas I spektrinę juostą).

12 priedas Programos, galinčios klasifikuoti audinius į 3 grupes, blokinė schema

