

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2850.**

**KONTSEK ENDRE**

**Sejt-, extracelluláris mátrix, rostrendszer változások szív- és érrendszeri és egyes daganatos megbetegedésekben. Kísérletes és diagnosztikus pathomorfológiai vizsgálatok című program**

Programvezető: Dr. Kiss András, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Kiss András, egyetemi tanár

# Infravörös spektroszkópia alkalmazása sejtvonalak és tumorszövetek elkülönítésére

Doktori értekezés

**Kontsek Endre**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kiss András D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Pálfi Emese Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Tornai Dávid Ph.D., tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sápi Zoltán D.Sc., egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Juriga Dávid Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest  
2023

# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
1 Bevezetés.....	5
1.1 A daganatok malignitásának kritériumrendszere és ennek vizsgálati módszerei a kísérletes modellrendszerektől a klinikai alkalmazásig.....	5
1.2 Rezgési spektroszkópia.....	8
1.2.1 Az infravörös spektroszkópia.....	9
1.2.2 Az infravörös készülék működése.....	12
1.3 Képalkotás.....	16
1.4 Sokváltozós adatelemzés.....	18
1.5 Spektroszkópia alkalmazása az orvoslásban.....	22
1.6 Intraoperatív alkalmazások.....	24
2 Célkitűzések.....	26
3 Módszerek.....	27
3.1 Vizsgált anyagok.....	27
3.1.1 Sejtkultúrák.....	27
3.1.2 Tüdőrak minták.....	28
3.2 Műszerek, mintaelőkészítés.....	29
3.2.1 Infravörös mikroszkópos mérések.....	30
3.2.2 Alumíniummal bevont tárgylemezek.....	32
3.3 Eredmények kiértékeléséhez választott szoftverek.....	32
3.4 Adatfeldolgozás.....	32
3.4.1 Főkomponens-elemzés.....	33
3.4.2 Légköri korrekció és zajcsökkentés.....	33
3.4.3 Lineáris diszkriminancia-elemzés.....	34
3.4.4 Támogató vektor gép.....	34

3.4.5	Pontosság és Cohen-féle kappamódszer .....	34
4	Eredmények .....	36
4.1	Sejtes előkísérletek a mérések optimalásához .....	36
4.2	Sejtvonalak vizsgálata.....	38
4.3	Szövetek vizsgálatának előkísérlete.....	46
4.4	Tüdőtumorok szubtypusainak elválasztása.....	47
5	Megbeszélés.....	52
6	Következtetések.....	59
7	Összefoglalás .....	60
8	Summary.....	61
9	Irodalomjegyzék .....	62
10	Saját publikációk jegyzéke .....	73
10.1	Disszertációhoz kapcsolódó közlemények.....	73
10.2	Disszertációhoz közvetlenül nem kapcsolódó közlemények .....	73
11	Köszönetnyilvánítás .....	75

## Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Angol név	Magyar név
ANN	artificial neural networks	mesteréges neurális hálózat
ATCC	American Type Culture Collection	
ATR	attenuated total reflectance	csillapított teljes visszaverődés
CA	cluster analysis	fürtelemzés
CNN	convolutional neural network	Konvolúciós neurális hálózat
C-SVC	C-Support Vector Classifier	C-tartóvektor-gép osztályozó
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	
DNS	deoxyribonucleic acid	dezoxiribonukleinsav
EMSC	extended multiplicative signal correction	kiterjesztett multiplikatív szóródási korrekció
EtOH	ethanol	etanol
FFPE	formalin-fixed embedded tissue	paraffinba ágyazott formalinnal fixált, paraffinba ágyazott szövetminta
FIR	far-infrared	távoli infravörös
fMRI	functional magnetic resonance imaging	funkcionális rezonanciavizsgálat
fNIRS	functional near-infrared spectroscopy	funkcionális közeli infravörös spektroszkópia
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy	Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia
IHC	Immunohistochemistry	immunhisztokémia
IR	infrared	infravörös
LDA	linear discriminant analysis	lineáris diszkriminancia-analízis
MCT	mercury-cadmium-telluride	higany-kadmium-tellurid
MIR	mid-infrared	közép infravörös

MLP	multilayer perceptron	többrétegű perceptron
mRNS	messenger RNA	hírvivő RNS
MSC	multiplicative correction	signal multiplikatív szóródási korrekció
NGS	next-generation sequencing	új-generációs szekvenálás
NIR	near-infrared	közeli infravörös
NSCLC	non-small cell lung cancer	nem kissejtes tüdőrák
nu-SVC	nu-Support Vector Classifier	nu-tartóvektor-gép osztályozó
PBS	phosphate-buffered saline	foszfát-pufferelt sóoldat
PCA	principal component analysis	főkomponens-elemzés
PLS-DA	partial least squares- discriminant analysis	részleges legkisebb négyzetek diszkriminanciaanalízis
PSM	positive surgical margin	pozitív műtéti margó
QWIP	quantum well infrared photodetector	kvantum völgy infravörös fotodetektor
SCC	squamous cell carcinoma	laphámsejtes karcinóma
SCLC	small cell lung cancer	kissejtes tüdőrák
SNV	standard normal variate	standard normális eloszlású változó transzformáció
SVM	support vector machine	tartóvektor-gép
TIL	tumor-infiltrating lymphocyte	tumor infiltráló lymphocita
TLR	technology readiness level	technológiai fejlettségi szintek
UV	ultraviolet	ibolyántúli
VIS	visible light	látható fény

# 1 Bevezetés

Disszertációmban a jelölésmentes infravörös spektroszkópia patológiai mintákon történő alkalmazhatóságát vizsgáltam meg. A látható fény tartományán túl detektálható spektrumok kiszélesítik a morfológiai vizsgálatok horizontját. Legyen ez a kérdés klasszikus műtéttechnika, úgy mint a rezekciós, sebészi szél meghatározása vagy egy, a klasszikus patológiai preanalitika során bevezethető előszűrés a későbbi molekuláris vizsgálatokhoz. Disszertációmban rövid általános bevezetést fogok adni a daganatokról, bemutatom az infravörös mikroszkópiát és egyes gyakran alkalmazott sokváltozós adatelemzési módszereket.

## 1.1 A daganatok malignitásának kritériumrendszere és ennek vizsgálati módszerei a kísérletes modellrendszerektől a klinikai alkalmazásig

Annak eldöntéséhez, hogy egy daganat malignus-e, bizonyos kritériumoknak teljesülniük kell. A malignitás kritériumrendszerét két csoportba szokás osztani: relatív, illetve abszolút kritériumokra. Összefoglalóan: relatív kritériumok a citológiai és a strukturális atípia, míg abszolút kritériumok az invázió, illetve a metasztázis megléte. A patológiai kritériumrendszer magába foglalja a malignitás relatív (citológiai és strukturális atípia) és abszolút (invázió, metasztázis) kritériumait, valamint ehhez kapcsolódóan kell megemlíteni a grade és a stage fogalmát. Egy bizonyos daganat jellemzésénél összefoglalóan alkalmazva a daganat differenciáltsági foka (grade) és a daganat előrehaladottsága kerül jellemzésre (stage -TNM) (1).

A differenciáció mértéke (grade) alatt azt értjük, hogy mennyire hasonlítanak a daganatos sejtek a normál sejtekre. A betegség kiterjedtségére (stage) a primer tumor (Tumor) kiterjedése és mérete, a regionális nyirokcsomók (Nodes) érintettsége és a távoli áttétek (Metastases) alapján lehet pontosabb megállapítást tenni (TNM).

A rutin szövettan során festődési és immunhisztokémiai (IHC) mintázatokat (kémiai csoportok, fehérjék kifejeződése) vizsgálnak a patológusok (2). Az egyes patológias állapotokat jellemezhetjük a génexpressziós mintázatuk alapján is (mRNS és fehérje szinten). A XXI. században szélesedett tovább a rutin molekuláris patológiai eszköztár a DNS chip és az újgenerációs szekvenálás (NGS) technikákkal (3). Ezen módszerekkel egyszerre több ezer gén expresszióját, mutációit térképezhetjük fel. Fentiek alapján állítanak fel diagnosztikai kritériumrendszereket, így a Sørlie és munkatársai által leírt emlőrák molekuláris altípusokat (4, 5), majd ezek átültetését a rutin klinikai

diagnosztikába. Ezeket a kritériumokat rendszeresen felülvizsgálják és módosítják, amint az újszerű diagnosztikus vagy terápiás lehetőségek ezt indokolják.

A patológiás, de szűkebben véve a malignus állapotokra jellemző mintázatokat más analitikai megközelítésekkel is vizsgálják. Ilyen a tömegspektrometria vagy a rezgési spektroszkópia. Ezen alternatív megközelítések elsődleges alkalmazási területe az intraoperatív döntéstámogatás vagy valamilyen gyors előszűrés (pl: fagyasztásos vizsgálatok).

A kutatási megközelítésben a valóságot egyszerűsített formában érdemes leképezni, ennek folyamata a modellezés. Mielőtt az intraoperatív környezetbe kerülne be egy eszköz, a technológiai fejlettségi szintek (Technology Readiness Level, TLR) során jól meghatározott körülmények között szokás vizsgálni. Az immortalizált, illetve primer tumorból származó sejt kultúrák nem mutatják a stróma tulajdonságait, de jól vizsgálható rajtuk a tumorsejtek fehérjeexpressziós mintázatának tetemes hányada, azonban csak példaként felhozva nem vizsgálhatóak jól a sejt-sejt interakciókban résztvevő makromolekulák, ahogyan a normál sejtek mellett az immunrendszer komponensei sem. Sejt kultúrák esetén a keringés, a nyomásviszonyok (pl.: szöveti CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> tenzió) hatásai sem felelnek meg teljesen az élő szervezethez. A szöveti minták már nagyobb rendezettséget és hasonlatosságot mutatnak a funkcionáló szerveket viszonyítási pontként kezelve. Itt már jelen van egyszerre a tumor, a stróma és esetleg nekrozison túl a tumor infiltráló lymphociták (TIL-ek). A tumort infiltráló limfociták az immunsejtek egy olyan csoportja, amely a tumor szövetét átjárja. Ezek jellemzően olyan fehérvérsejtek (T-sejtek, B-sejtek és NK-sejtek), amelyek kulcsszerepet játszhatnak a tumor elleni immunválaszban. A TIL-ek jelenléte a mikroszatellita, illetve genomiális instabilitás által életre hívott neoantigének immunrendszerünk általi felismerésére utal, mely számos malignus daganatban, többek között emlőrákban, melanomában és tüdőrákban jobb prognózissal és terápiára adott válasszal jár együtt (6, 7). A humán kísérletek előtt megszokott lépcső az állatmodellek vizsgálata, melyek speciális megoldása a xenograft (immunszuprimált állatba ültetett humán tumor) (8). A modern számítási kapacitások megléte elérhetővé teszi még az *in silico* modellek alkalmazását is a rákos sejtek viselkedését illetően (9).

A rosszindulatú daganatos betegségek hatalmas terhet jelentenek a társadalom számára, és az új onkológiai terápiák költségei egyre nőnek (10). Ráadásul a megfelelő terápia



megkezdéséhez pontos, személyre szabott és gyors multidiszciplináris team-döntésre van szükség (11).

A daganatok olyan új növekmények (neoplasiák), melyet a sejtek autonóm, kontrollálatlan növekedése okoz. Három jellemző típust szokás megkülönböztetni a tumor lokalizációja és a tumor okozta patológiás folyamat tekintetében. A jóindulatú, azaz benignus daganatok nem invazívak, ezért nem képeznek áttéteket (metasztázis) és teljes műtéti kimetszést (rezekció) követően nem újulnak ki (recidíva). Szövetteni megjelenésük nem tér el jelentősen a normál szövevtől. A rosszindulatú, azaz malignus daganatokra az agresszív növekedés jellemző, miközben a szövetteni határokat nem tartják tiszteletben. A környező szövetekbe benyomulva jelentős morfológia változásokat okoznak, továbbá áttéteket adhatnak a vér-, illetve nyirokkeringésen keresztül szóródva. A sebészi rezekciót követően is számolni kell sajnos a recidíva kialakulásnak lehetőségével. Az intermedier malignus kategóriát szokás a harmadik típusba sorolni, mely leginkább annyiban tér el a malignustól, hogy jellemzően nem invazív és képez távoli áttéteket (12).

Dolgozatomban tüdőtumorer szövetteni altípusait vizsgálom, ezért alább kitérek a szövetteni osztályzásukra és etiológiájukra. 2018-ban a tüdőrák volt a leggyakrabban diagnosztizált daganat és a vezető halálozási ok mindkét nemnél világszerte (13) és Magyarországon is (14). A tüdőráknak több altípusa létezik, mindegyikük eltérő jellemzőkkel és terápiás kimenetekkel asszociálható. A leggyakoribb altípusok az alábbi felsorolásban találhatóak (15):

1. Nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) - A leggyakoribb típus, az összes eset mintegy 85%-át teszi ki. Három altípusra osztható: adenokarcinóma, laphámrák és nagysejtes karcinóma. Az NSCLC prognózisa általában véve jobb, mint a kissejtes karcinómáé.
  - a. Adenokarcinóma - Ez az NSCLC leggyakoribb altípusa, az esetek mintegy 40%-át teszi ki. Jellemzően a tüdő perifériás részein jelenik meg, és ez az altípus gyakrabban fordul elő a soha nem dohányzók vagy a könnyű, esetlegesen a passzív dohányosok körében. Korai stádiumban jobb a prognózisa, mint a tüdőrák más altípusainak. Nem invazív, az alveolusok határait tiszteletben tartó terjedésű, *in situ* adenocarcinómának van a

legjobb prognózisa, ezt korábban bronchioloalveoláris carcinómának nevezték. (15)

b. Laphámsejtes karcinóma - Az NSCLC ezen altípusa az esetek mintegy 25%-át teszi ki. Jellemzően a tüdő centrumában alakul ki, és gyakrabban fordul elő erős dohányosoknál (15).

c. Nagysejtes karcinóma - Az NSCLC ezen altípusa az esetek körülbelül 15%-át teszi ki. Nagy, nem differenciált sejtek jelennek meg, a tüdő egészében bárhol azonos eséllyel alakul ki. Prognózisa a laphámsejtes karcinómához hasonló az esetek többségében (15).

2. Kissejtes tüdőrák (SCLC) - Ez a tüdőrák ritkább, de igen rossz klinikai prognózisú típusa, az esetek mintegy 15%-át teszi ki (15). Differenciálatlan, apró sejtek jellemzik. A kinetikájára a gyors növekedés jellemző. Az SCLC rosszabb prognózissal rendelkezik, mint az NSCLC.

Az etiológia tekintetében a kutatásomban megjelenő altípusokra az alábbiakban térek ki. Az összes tüdőrák altípus kialakulása erősen kötődik a dohányzáshoz. Egyedül a mirigyrák altípusban van jelentősebb része a nem dohányzóknak. A kialakulás kockázata a naponta elszívott cigaretták számával és a dohányzással töltött évek számával egyaránt nő. Környezeti toxinok közül a radont és az azbesztet érdemes megemlítenünk. Familiáris rizikót is számon tartanak, mint hajlamosító tényezőt. A tüdőrák laphámsejtes karcinóma (SCC) etiológiája hasonló a tüdőrák más típusaihoz. A laphámrákok kifejlődésében fontos megelőző patológiás elváltozás a bronchiális hám krónikus gyulladása (bronchitis chronica) talaján létrejövő laphám metaplázia.

## **1.2 Rezgési spektroszkópia**

A rezgési spektroszkópia a vegyületek rezgéseinek energiaváltozásaival foglalkozik. Egy molekulában az atomok folytonos mozgásban vannak. A rotáció és a transláció a legkisebb energiát igénylő mozgások, melyek során a kötésben résztvevő atomok távolsága és a kötésszögek nem változnak meg érdemleges léptékben. Normál rezgések során nem változik meg a molekulák helyzete, orientációja, ezen rezgés során az összes atom azonos frekvenciával rezeg, de a rezgés iránya azonos, illetve ellentétes is lehet. A molekulák geometriai változásait két csoportba szokás sorolni: vegyértékrezgésre más néven kötésnyúlásra, illetve deformációs rezgésre. Egy molekula rezgési spektrumát a normálfrekvenciák és a hozzájuk adódó felhangok, illetve a

kombinációs és differenciasávok határozzák meg együttesen. Amennyiben egy atomok közötti kötés rezgési frekvenciájával azonos frekvenciájú elektromágneses sugárzást közlünk, akkor a folyadék vagy szilárd fázisú halmazállapotú anyag a kötések gerjesztése révén elnyeli a sugárzott energia egy részét. Ez a jelenség az abszorpció. A visszavert sugárzást nevezzük reflexiónak, míg az anyagon áteresztett sugárzás jelensége a transzmisszió (16).

Fentiek alapján a mérési módszereket és színeképeket is így sorolhatjuk három osztályba. A rezgési spektrum a kötések alkotó atomok milyenségétől a kötéserősségtől függ (16). A rezgési spektroszkópia két elkülönült doménje a Raman, illetve az infravörös spektroszkópia.

Az infravörös és a Raman-képalkotás egyaránt a kémiai analízis technikája. A mintával való kölcsönhatás során a fényszórás típusa különbözteti meg a kettőt.

Az infravörös esetén infravörös fény gerjeszti a molekula kötéseit magasabb rezgési energiára. Az infravörös fényt a molekula elnyeli és adott frekvencián történő rezgést okoz, amely a molekula kémiai összetételének azonosítására használható. Az IR-képalkotást általában a mintában lévő funkcionális csoportok azonosítására használják, például alkoholok, karbonsavak vagy aminok jelenlétének kimutatására. A Raman mérés során fentiekkel szemben Raman-szórás segítségével azonosítjuk a minta kémiai összetételét. A Raman-szórás akkor következik be, amikor a fényt egy molekula úgy szórja, hogy a foton energiája megváltozik. A szórt fény energiája felhasználható a molekula kémiai összetételének azonosítására. A Raman-képalkotást általában a molekula kémiai szerkezetének, például az aromás vagy alifás csoportok jelenlétének azonosítására használják. Összefoglalva, az IR-képalkotás a kémiai kötések rezgéseire, míg a Raman-képalkotás a kémiai kötések rezgéseire és a kémiai csoportok forgására érzékeny. Bár mindkét technikát használják kémiai képalkotásra, az IR-képalkotás általában jobb a mintában lévő funkcionális csoportok azonosítására, míg a Raman-képalkotás általában jobb a molekula kémiai szerkezetének azonosítására (17, 18).

### **1.2.1 Az infravörös spektroszkópia**

A molekulákat felépítő atomok folyamatos mozgásokat végeznek (transzláció, rotáció). A rezgések következtében megváltozik a távolság az atomok között, míg a molekula orientációja állandó.  $3N-6$  független rezgéssel rendelkezik egy  $N$  atomból álló

molekula. Lineáris szerkezet esetén ez az érték  $3N-5$ . Ezek a rezgések a normál-, avagy alaprezgések. Egy normálrezgés során a molekula összes atomja ugyanazzal, az úgynevezett normálfrekvenciával rezeg, melynek fázisa lehet azonos, vagy ellentétes.

A gyakorlatban három jelentős IR tartományt szokás megkülönböztetni:

- közeli IR (*near infrared*, NIR): 0,78-2,5  $\mu\text{m}$ ,
- közép vagy más néven analitikai IR tartomány (*mid infrared*, MIR, de leggyakrabban IR-ként jelölik): 2,5-50  $\mu\text{m}$ ,
- távoli IR tartomány (*far infrared*, FIR): 50-1000  $\mu\text{m}$ .

A legkisebb energiájú közülük a FIR, mely leginkább a forgási spektroszkópiához kapcsolható, a NIR és a (M)IR tartományokban jellemzően a rezgési spektroszkópia a meghatározó. Minél nagyobb a hullámszám, annál nagyobb a fény energiája. A NIR és MIR fotonok magasabb energiaszintre emelik a kémiai kötések, deformációs mozgásokat (pl. szögváltozásokat) okozva.

A gyógyszeriparban jut leginkább szerephez a (M)IR technika. Legfőképp kinetikai folyamatok nyomon követésére, vizsgálatára alkalmazzák. A gyengített teljes reflexió (*attenuated total reflectance*, ATR) technika kiválóan használható félig szilárd halmazállapotban lévő gyógyszerkészítmények felszívódásának követésére, akár *in vivo* mérésekre is alkalmas. A szervezetbe történő felszívódás (pl.: transzdermális gélek) (19), illetve a bejutást módosító tényezők vizsgálatára használatos.

Folyamatok nyomon követésénél meg kell említeni a NIR technikát is, hiszen biológiai minták, folyadékok és szilárd anyagok roncsolásmentes analízisére használatos. Kvantitatív analitikai felhasználása széles körben terjedt el például tabletták összetételének, szemcseméretének, bevonatának, keménység/sűrűség arányának vizsgálatára, oldószer-összetételek, keveréshomogenitások ellenőrzésére. Az élelmiszeriparban is széleskörűen használják: mezőgazdaság, malomipar, húsipar, tejipar, szeszipar területén.

A MIR spektroszkópia egyik legkorábbi alkalmazása a lipidek cisz/transz konformációjának meghatározása volt (20). A MIR-technikákat a tej (21, 22) és a bor (23, 24) összetevőinek elemzésére fejlesztették ki. Mind a NIR-, mind a MIR-technikák széles körben elterjedtek a biológiai mátrixok elemzésének területén. A NIR minőségi és mennyiségi alkalmazása az agrár és élelmiszeriparban az 1960-as években kezdődött. A növények, állati termékek és az ezekből készült feldolgozott élelmiszerek komplex

biológiai eredetű minták, amelyek különböző víz-, fehérje-, lipid- és szénhidrát-tartalmúak. A gabonafélék és gabonaalapú termékek infravörös analitikája széles körben elterjedt technológiává vált, elsősorban a fehérjetartalom (25) és a minőségérés közbeni változására (26), valamint a malomipari folyamatok nyomon követésére (27) összpontosítva. Emellett a farmakológia területén a gyógyszervegyületek (28) és a polimerek, például a hidrogélek (29) kémiai szerkezetét is MIR-spektroszkópiával validálják.

A közép-infravörös tartomány ( $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ ) magában foglalja az úgynevezett ujjlenyomat tartományt ( $1800\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ ), ahol a lipidekre, fehérjékre, amid I/II-re és nukleinsavakra jellemző csúcsok találhatók (30). Ezt a tartományt azért nevezik így, mert az ebben a tartományban megjelenő abszorpciós sávok gyakran egyediek egy adott vegyületre karakterisztikusak, ahogyan az embereknél az ujjlenyomat. Az ujjlenyomat tartomány különösen hasznos az ismeretlen vegyületek azonosításában és az anyagkeverékek jellemzésében.

Az ujjlenyomat tartomány jelentősége az infravörös spektroszkópiában abban rejlik, hogy nagyszámú abszorpciós sávot tartalmaz, amelyek a molekula alapvető rezgési módusainak köszönhetőek. Ezek a rezgési módusok érzékenyek a molekula kémiai szerkezetére, és részletes információt szolgáltathatnak a mintában jelen lévő funkciós csoportokról. Például a C-H nyújtási sáv az ujjlenyomat tartományban jó indikátor a szénhidrogének jelenlétére, míg a C=O nyújtási sáv jó indikátor a karbonil funkciós csoportok jelenlétére.

Az ujjlenyomat tartomány az összetett keverékek elemzésében is hasznos. Például a biofolyadékok elemzése során az ujjlenyomat régió információt szolgáltat a különböző biomolekulák: fehérjék, lipidek és szénhidrátok jelenlétéről. Hasonlóképpen, a környezeti minták elemzése során az ujjlenyomat régió információt szolgáltat a különböző szennyező anyagok és egyéb szennyeződések jelenlétéről.

Számos technika használható az ujjlenyomat régió elemzésére, többek között a Fourier-transzformációs infravörös (FTIR) spektroszkópia, a csillapított teljes reflexiós spektroszkópia és a diffúz reflexiós spektroszkópia. Mindegyik technikának megvannak a maga előnyei és korlátai, és a technika kiválasztása az adott alkalmazástól és a minta típusától függ.

A fehérjesávok a fehérjék infravörös spektrumában – jellemzően az ujjlenyomat régióban - az abszorpciós vagy emissziós csúcsoakat, tartományokat jelentik. Ez a régió azért fontos, mert számos olyan jelet tartalmaz, amelyek érzékenyek a fehérje atomjainak környezetére, például a peptidkötés rezgéseit, az amid I. és II. rezgéseket és a C-H hajlító rezgéseket. Ezek információt szolgáltathatnak a fehérje másodlagos és harmadlagos szerkezetéről, valamint más molekulákkal való kölcsönhatásairól. E csúcsok intenzitása, helyzete és alakja arra is felhasználható, hogy a fehérjék különböző hatásokra, például hőmérsékletre, pH-ra vagy ligandumok jelenlétére adott konformációs változásait nyomon kövessük (31).

### **1.2.2 Az infravörös készülék működése**

Az alábbi fejezet jelentős részben „Gabonák nyersanyag minősítése: közeli infravörös spektroszkópia” című tananyagra támaszkodik (32).

Az infravörös hullámhossz-tartományban működő készülékek több szempont (optikai konfiguráció, fényforrás, detektor, optikai elrendezés stb.) szerint is csoportosíthatóak. Az IR spektrométerek két fő típusa az optikai konfiguráció alapján a diszperziós, valamint a Fourier-transzformációs spektrométerek.

A diszperziós készülékek működése alapvetően megegyezik a látható (*visible*, VIS) és ibolyántúli (*ultraviolet*, UV) fényben használt spektrofotométerek működési elvével (33). A készülékek fő részei a fényforrás, a detektor és a monokromátor (prizma, optikai rács). A forrás lehet közönséges izzólámpa, vagy halogén lámpa. A detektor típusát a vizsgált hullámhossz-tartomány határozza meg. Rövidebb hullámhosszaknál szilícium alapú detektorokat használnak, míg hosszabb hullámhossz-tartományok mérésénél indium-gallium-arszenid (InGaAS), vagy ólom-szulfid (PbS) detektorokat alkalmaznak.

A higany-kadmium-tellurid (MCT) detektor egy olyan detektortípus, amelyet spektroszkópiai és képalkotó alkalmazásokban használnak a közép-infravörös sugárzás értékelésére. A detektor egy vékony réteg higany-kadmium-tellurid (MCT) anyagból áll, amely érzékeny az infravörös sugárzásra. Az MCT detektornak számos előnye van más típusú detektorokkal szemben, például nagy érzékenység, nagy sebesség, alacsony zajszint és jó linearitás. Használatukkor azonban néhány korlátozást is figyelembe kell venni, egyik fő korlátja a viszonylag alacsony kriogén hőmérsékleten való működőképességük. A detektorokat 77 K körüli hőmérsékletre kell hűteni, ami bonyolíthatja a kísérleti elrendezést. Ezenkívül viszonylag törékenyek, és könnyen

károsodhatnak nagy teljesítményű sugárzás vagy mechanikai igénybevétel hatására. Az MCT-detektorok másik korlátja a gyártási folyamathoz kapcsolódó magas költségek és a speciális berendezések szükségessége.

Az FT-IR spektrométerekben egy interferométer van a minta előtt, amely az IR sugárforrásból érkező fényt két sugárra bontja. Az egyik egy álló, a másik egy mozgó tükörről verődik vissza. A mérés során az interferogramot mérjük, amely Fourier-transzformációval alakítható át spektrummá. Ez napjainkban a fejlett számítástechnikai háttér miatt könnyen megoldható, így a diszperziós készülékek lassan kiszorulnak a gyakorlati alkalmazásból.

A csoportosítás történhet még az alkalmazott fényforrás, detektor és a mérési elrendezés szerint is. Ezek közül az utolsó képezi a megkülönböztetés alapját és gyakorlati jelentősége is kiemelt.

Transzmissziós mérési elrendezés során a fény áthatol a mintán, ezáltal csökkentve az esetleges heterogenitásából adódó mérési hiba mértékét. A nagyobb szemcsemérettel informatívabb spektrumok társulnak, míg a túl kicsi szemcseméret a sugárzás jelentősebb hányadát visszaveri, ami a detektorba jutó fény mennyiségének csökkenéséhez, és a jel/zaj arány romlásához vezet. Ezen elrendezésnél az alkalmazott elektromágneses sugárzás frekvenciája – ennél fogva energiája is – nagyobb, ami a megfelelő áthatolóképeséget biztosítja. A minta rétegvastagságát optimálni szükséges a mérés kivitelezése előtt (33). Amennyiben a mintával kölcsönhatásba lépő sugárzás intenzitása  $I_0$  és a mintán áthatolóé pedig  $I_T$ , akkor a transzmittancia ( $T$ ) az (1) egyenlet szerint definiálható:

$$T = \frac{I_T}{I_0} \quad (1)$$

A fentek értelmében tehát a transzmittancia az a hányados, melynek nevezőjében a mintára eső, számlálójában az az azon áthaladó fény intenzitása van. Miután a transzmittancia a vizsgált analit koncentrációjával ( $c$ ) nem lineárisan, hanem logaritmikusan változik, ezért sort kell keríteni egy származtatott mennyiség, az abszorbancia ( $A$ ) bevezetésére, ami alább a (2) egyenlet szerint a transzmittancia negatív tízes alapú logaritmus, s így már lineáris kapcsolatba hozható a koncentrációval.

$$A = -\lg T = a \cdot l \cdot c = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (2)$$

Az abszorbancia az úgynevezett abszorpciós koefficienssel és a vizsgált minta  $l$  rétegvastagságával is arányosan változik, utóbbi pontos elnevezése és mértékegysége az alkalmazott koncentrációegységhez illeszkedik ( $[a] = \text{dm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  – abszorpciós koefficiens, illetve  $[\varepsilon] = \text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  – moláris abszorpciós koefficiens). A (2) *egyenlet* a molekulaszpektroszkópiában Lambert–Beer-törvényként ismert széles körben (16).

Zavaros, átlátszatlan vagy túlságosan magas abszorpciójú minták vizsgálata esetén célszerűbb lehet a transzmissziós mérési elrendezést felváltani egy másik, diffúz reflektanciának nevezett konstrukcióval. Az imént említett elrendezésnél merőleges éri a fénysugár a minta felszínét, majd onnan minden irányba történik visszaverődés. A reflexiós készülékek geometriai felépítésének fejlesztése során arra a következtetésre jutottak, hogy a beeső fénysugárral  $45^\circ$ -os szöget bezáró irányba kell elhelyezni a detektort, hogy a visszavert fény a legnagyobb arányban kerüljön regisztrálásra. Kiemelendő továbbá, hogy a reflexiós mérési elrendezés során a mintát érő fény penetrációja néhány (tized) milliméter. Éppen ezért a kapott spektroszkópiai információ is a felszíni rétegre vonatkozik. A reflektancia ( $R$ ) a transzmisszióhoz hasonlóan definiálható a (3) *egyenlet* szerint, mely adódik a beeső fény mintáról visszavert hányadának intenzitásának ( $I_R$ ), és egy nem elnyelő felületről (például fehér kerámia,  $\text{BaSO}_4$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{MgO}$ ) visszavert hányadának intenzitásának ( $I_{Sf}$ ) hányadosa.

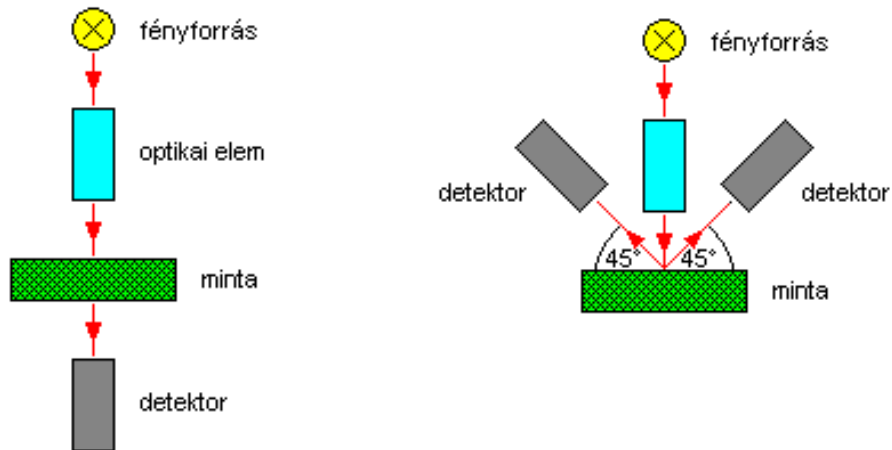
$$R = \frac{I_R}{I_{Sf}} \quad (3)$$

Reflexiós mérések során ugyanúgy bevezethető az abszorbancia fogalma, mely a (4) *egyenlet* szerint a következőképp származtatható:

$$A = -\lg R \quad (4)$$

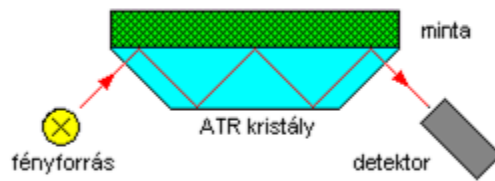
Az (1)-(4) *egyenletekben* definiált mennyiségek mind monokromatikus sugárzásra vonatkoznak (33). A transzmissziós és reflexiós mérési elrendezés sematikus képe alább (1. ábra) látható.





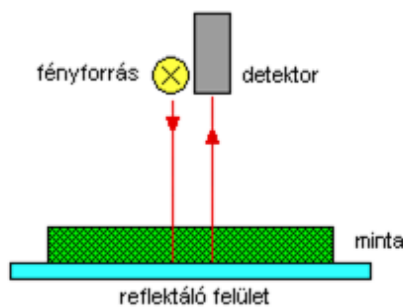
1. ábra Transzmissziós (balra) és reflexiós (jobbra) mérési elrendezés (32, 34)

A fény rövid úthossza okozta problémára kínál megoldást a gyengített teljes reflexió, azaz ATR technika, melynek alkalmazásával a belső reflexió megsokszorozódik, ezzel növelve az abszorpció mértékét. Ezen eljárással viszkózus anyagok esetében érték el különösen jó eredményeket. Leghatékonyabban a MIR régióban alkalmazható, mert az abszorpció itt erősebb. Az in-line alkalmazást hátráltatja számos esetben, hogy az érzékenység az ATR kristály felületére lerakódó szennyeződések és a kopás (felületi erózió) függvénye is. A mérés során a minta szorosan illeszkedik az ATR kristályhoz. Ez folyadékok esetében könnyen megoldható, azonban szilárd fázisú minták esetén figyelni kell a szoros érintkezés létrejöttére. A kristály törésmutatója nagyobb, mint a mintáé és értéke általában nagyobb, mint kettő. Az infravörös fény olyan szögben hatol be a minta és a kristály felületé közé, hogy ott teljesen visszaverődik a minta és a kristály között. Egy mérés során legalább egy, de jellemzően több reflexiót követően a fénysugarak elhagyják az ATR kristályt a detektor irányába (35). Az ATR-rel végzett mérés elrendezés sémája alább (2. ábra) látható.



2. ábra Az ATR kristállyal történő mérés elrendezése (36)

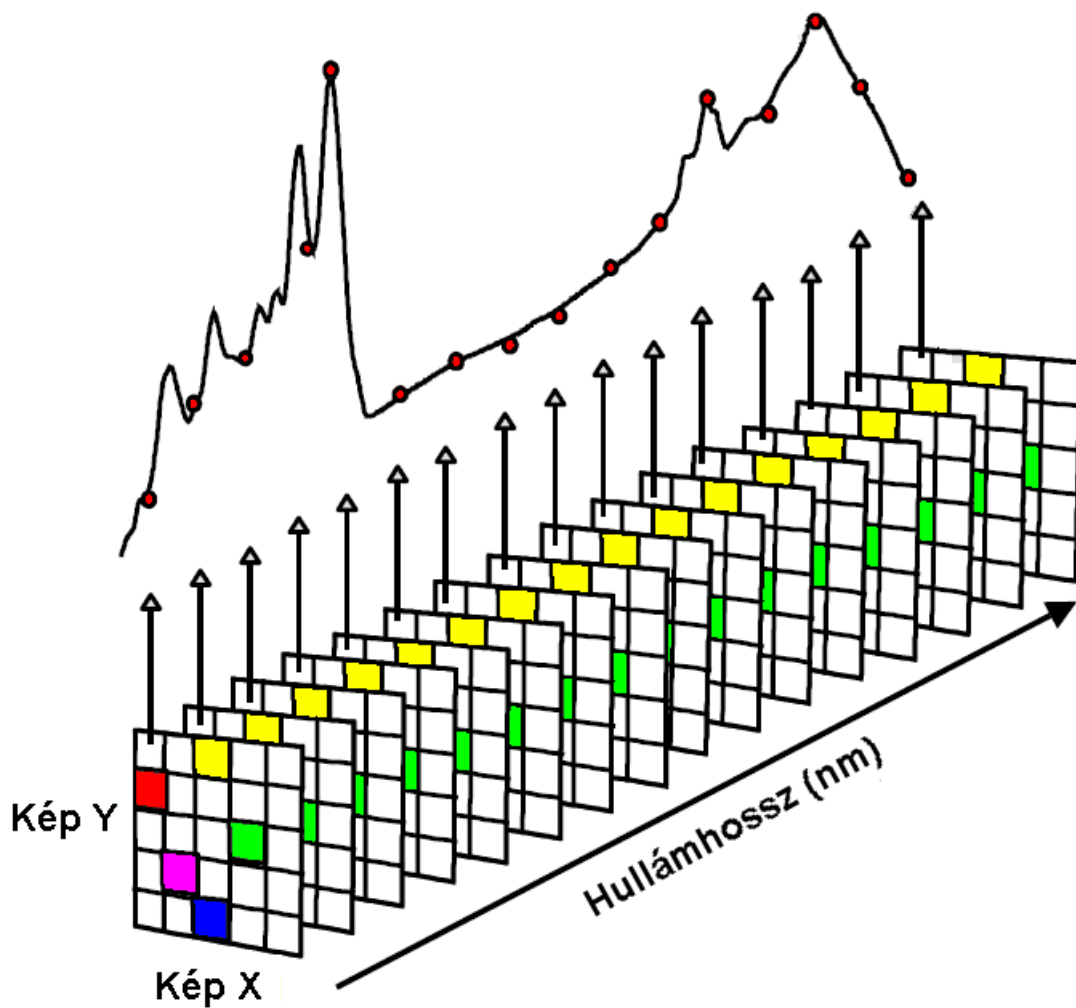
A transzflektanciás mérésnél a fénysugár nem egy kristályon keresztül verődik a mintára, hanem tulajdonképpen transzmisszióban halad a fénysugár, mely egy reflektáló felületről visszaverődik, újra transzmisszióban áthalad a mintán, majd a fénysugár a detektorba jut (3. ábra).



3. ábra Transzflektanciás minta elrendezés (36)

### 1.3 Képképzés

Az angol eredetű, de elterjedt kifejezés az „*imaging*”, ami olyan eljárást takar, ahol kiválasztott területről egy feltérképezéses adatrögzítés történik. A módszer lényege, hogy az  $x$ - $y$  koordinátákkal leírható felület minden  $P$  pontjához egy onnan mért spektrum kerül hozzárendelésre. Ezt az adathalmazt nevezzük spektrális hiperkockának (4. ábra). A gyakorlatban a mérések során kiterjedt adatkészletek elemzésére van szükség, melyek feldolgozására különleges célszoftverek, és az átlagosnál nagyobb teljesítményű számítási kapacitás szükséges (37).



4. ábra A „spektrális hiperkocka” elvi elrendezése (34, 38)

A közép-infravörös optikai szálak képesek fényt továbbítani a közép-infravörös hullámhossztartományban, jellemzően 2 és 20  $\mu\text{m}$  között. Tipikusan szilícium-dioxidból vagy kalkogenid üvegből készülnek (39), és eltérő törésmutatójú belső és burkoló köpennyel rendelkeznek, melyek lehetővé teszik a fény teljes belső visszaverődését és irányítását.

A MIR optikai szálakat számos alkalmazásban használják, például a spektroszkópiában, vagy a távközlésben. A spektroszkópiában a fénynek a mintából a spektrométerbe történő továbbítására. A MIR optikai szálak gyártása kihívást jelent a szilícium-dioxid és a kalkogenid üvegek átlátszósági ablaka miatt, amely a közeli infravörös tartományra korlátozódik. A gyártástechnológia legújabb fejlesztései azonban lehetővé tették, hogy alacsony csillapítású és nagy átviteli hatékonyságú optikai szálak kerüljenek a piacra (40, 41).

## 1.4 Sokváltozós adatelemzés

A spektrumokat gyakran érdemes előkezelni. A vizualizáláshoz elterjedt művelet a spektrum átlagát kiszámolni és ezt hőtérképként bemutatni, jellegzetesen ilyenek az abszorbanciaterképek, illetve a hőkamerák képei. Az esetleges műtermékek, zajok szűrésének széles irodalma van. Amennyiben a karakterisztikus csúcsokat kívánjuk vizsgálni, segítségünkre van a standard normális eloszlású változó transzformáció (SNV), a multiplikatív szóródási korrekció (MSC) vagy kézenfekvő módszerként a deriválás (42, 43). A kiterjesztett multiplikatív szóródási korrekciót (EMSC) szokás vízgőz, szén-dioxid hatásának vagy akár a minták vastagságának különbözőségeinek kiküszöbölésére használni (44).

A nyers adatok elkészítése még csak a munka egyik fele, az adatelemzés hasonló fontossággal bíró művelet. Az alapszintű statisztikai műveleteken túl széles eszköztár fejlődött ki a spektrális adatok előkezelésére és feldolgozására.

A legkézenfekvőbb csoportosítás, hogy az adott modell igényel-e felügyelt tanítást vagy az elkészült csoportokat utólag feleltetjük-e meg a minták csoportjainak.

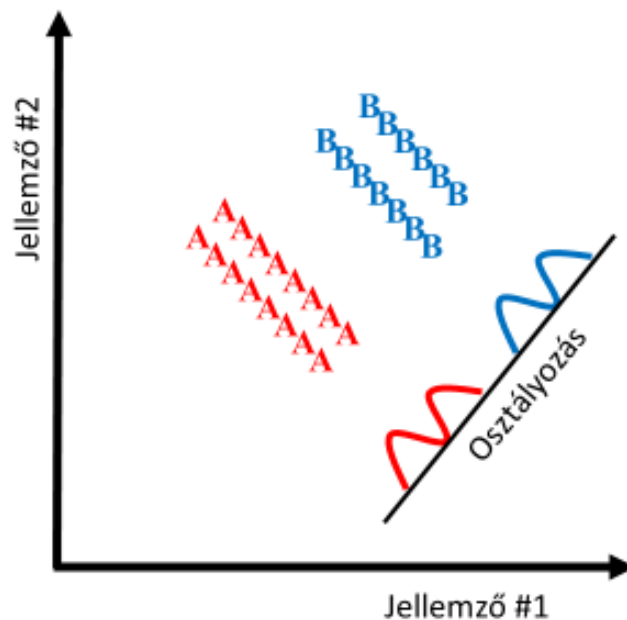
Nem felügyelt tanítási módszer például a cluster elemzés – ami magyarul még fürtelemzésként is ismert lehet – vagy a főkomponens elemzés (PCA).

A cluster elemzés (CA) során az egyes elemek hasonlósága alapján kerülnek egymáshoz közelebb vagy távolabb. A hasonlóságokra hatással van a kiválasztott távolságmérték, melyek közül csupán néhányat említve: euklideszi-, Manhattan- vagy Pearson-távolság egyaránt alkalmazható. Maga az algoritmus lehet hierarchikus vagy nem hierarchikus (45, 46).

A főkomponens elemzés egy dimenzióredukciós módszer, mely az adatok változékonyságát közel teljes mértékben megtartja, de kevesebb dimenzióba transzformálja. A gyakorlatban azt jelenti, hogy a több száz hullámszámot tartalmazó spektrum 2-3 kiválasztott főkomponense szerint ábrázolhatóak a minták egy-egy pontként egy koordinátarendszerben. Az egyes pontfelhők közötti távolságok kiszámolhatóak, új minták esetén ezek projekciója is könnyen ábrázolható.

A lineáris diszkriminancia analízis (LDA) egy olyan felügyelt módszer, amely két vagy több osztály elkülönítésére szolgál több kvantitatív változó figyelembevételével. Alkalmazásának előfeltétele, hogy az objektumok más osztályokba legyenek sorolva, ezért ismernünk kell az osztályozó változónak megadott csoportokat.

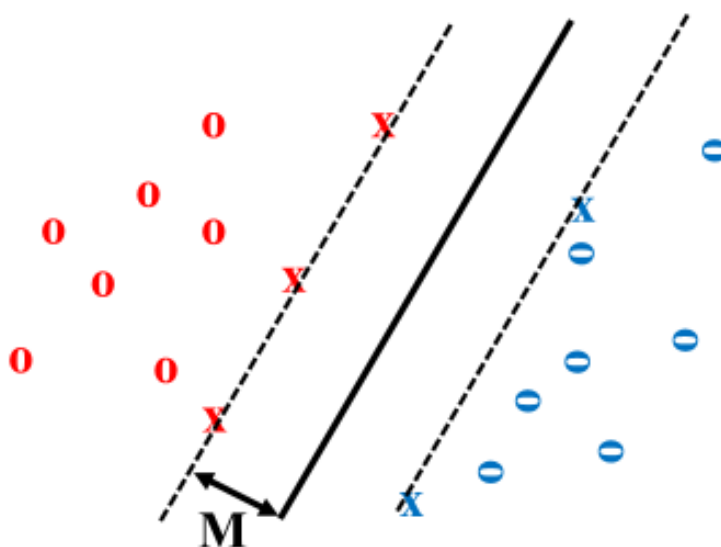
Az LDA egy olyan osztályozási módszer (5. ábra), amelyben az  $n$  dimenziós mintákat lineáris transzformációval egy  $m$  dimenziós térbe ( $m < n$ ) transzformáljuk, ebben hasonlít a korábban leírt PCA-hoz. Ennek következtében az azonos osztályba tartozó minták közel helyezkednek el egymáshoz, míg a különböző osztályokba tartozó minták távol helyezkednek el a térben. A módszer célja a minták csoportosításához legjobban illeszkedő paraméterek meghatározása a felépített modellben. A már felépített modell felhasználható ismeretlen minták projekciójára is. Az LDA olyan módszer, mely a Bayes-formulával közelíthető (47). A projektált adatokat tévesztési mátrixba helyezve már leíró metrikák (pontosság,  $2 \times 2$  táblázat esetén szenzitivitás és specificitás is megadható).



5. ábra Az LDA osztályozásának sémája. Valamilyen ortogonális jellemzők síkjába vetítve egy osztályozási irányt meghatározva az adatok elkülöníthetőek. (48)

Tartóvektor-gép (SVM) egy olyan kernel gép, mely alapváltozatát tekintve lineáris szeparációra képes, azonban kiterjesztése nemlineáris feladatokra is megoldást adhat. Lineáris szeparálható adathalmazok esetén végtelen számú hipersík képezhető, ezek közül kell az ideálisat kiválasztani, mely az úgynevezett legnagyobb margóval rendelkezik (6. ábra). Lineárisan nem szeparálható adathalmazok esetén bevezethető a puha margó módszere, mely enged némi hibát. Nem lineáris problémák megoldására (például egy belső körben található az egyik csoport, míg egy külsőbb gyűrűben a másik csoport) a koordináta-rendszert úgy transzformáljuk egy új térbe, hogy a lineáris döntési

határt lehessen alkalmazni. A C-SVC a klasszikus SVC algoritmus, amely az adatokat osztályokba sorolja azáltal, hogy megtalálja a legjobb hipersíkot (azaz az adatokat maximálisan elválasztó határt), amely maximalizálja a margót. Így az a hipersík és az egyes osztályokhoz legközelebbi adatpontok közötti távolságot jelenti. A C-SVC azon a megközelítésen alapszik, mely szerint a hipersíkhöz legközelebbi adatpontok, az úgynevezett támogatóvektorok a leginformatívabbak és az osztályozás szempontjából a legfontosabbak. A C-SVC-ben a C paraméter szabályozza a kompromisszumot a margó maximalizálása és az osztályozási hiba minimalizálása között. A nu-SVC a C-SVC egy olyan változata, amely egy másik paramétert, nu-t használ a margó maximalizálása és az osztályozási hiba minimalizálása közötti kompromisszum szabályozására. A nu a képzési hibák hányadának felső korlátját és a támogató vektorok hányadának alsó korlátját jelenti. Ez az SVC algoritmus robusztusabb változata, és kevésbé érzékeny a C paraméter megválasztására. Mind a C-SVC, mind a nu-SVC SVM algoritmusok alkalmasak osztályozási feladatokra, azonban különböző paramétereket használnak a margó maximalizálása és az osztályozási hiba minimalizálása közötti kompromisszum szabályozására. (49, 50)



6. ábra Az SVM módszernél a margó (M) bemutatása (48)

A mesterséges neurális hálózatok (ANN) a gépi tanulási algoritmusok egy olyan típusa, amelyet az emberi agy felépítése és működése alapján modelleztek. Nagy mennyiségű

adat feldolgozására és elemzésére használatos, és napjainkban kiterjedten alkalmazzák őket, pl.: képfelismerésre, nyelvi modellekben és egyéb predikciókra. A mesterséges neurális hálózat fogalmát először Warren McCulloch és Walter Pitts vetette fel 1943-ban (51). A kutatók azonban csak az 1950-es évek végén és az 1960-as évek elején kezdték el kidolgozni az első működő neurális hálózati modelleket.

A mesterséges neurális hálózatok ötletét az agy neuronjainak kapcsolata ihlette. Legegyszerűbb manifestációja a perceptron, Frank Rosenblatthoz kötődik (52). Az említett struktúra több bemeneti csomópontot, de csak egyetlen kimenetít foglal magába. A bemenetek meghatározott súlyozással kapcsolódnak a kimeneti ponthoz. A bemenetek súlyozott összege egy aktivációs függvénybe kerül (pl.: lineáris, szigmoid, előjel stb.). Kezdetben véletlen súlyokkal szokás futtatni a függvényt, aztán a jóság mérésével iteratív módon addig módosítani azokat, amíg nem sikerül a kívánatos precizitást elérni. Mesterséges neurális hálók esetén egyaránt alkalmazható felügyelt és nem felügyelt tanítás is, valamint a fenti példa továbbfejlesztésével többrétegű perceptronokkal lineáris nem szeparálható esetekre is megoldást adnak. A perceptronokat kezdetben ígéretes megoldásnak tekintették olyan problémákra, mint a képfelismerés és a nyelvi modellek alkotása, azonban kiderült, hogy képességeik korlátozottak, és nem képesek összetettebb problémák megoldására. Ez vezetett a neurális hálózatok fejlettebb típusainak, például a többrétegű perceptronoknak (MLP) és a konvolúciós neurális hálózatoknak (CNN) a kifejlesztéséhez, amelyek az elmúlt évtized során rohamosan kezdtek terjedni (53, 54). Tévesztési mátrix egy olyan táblázat, amelyet egy osztályozási modell teljesítményének meghatározására használnak egy olyan adathalmazon, melynek valódi értékei ismertek (55). Ez az algoritmus teljesítményének összegzésére szolgáló módszer, mely gyakran kerül elő mind a sokváltozós adatelemzések mind pedig a gépi tanulás területén. A mátrix mérete általában  $N \times N$ , ahol  $N$  az osztályok száma. A mátrixot gyakran bináris osztályozó teljesítményének értékelésére használják, azonban kiterjeszhető többsztályossá is. Ebben az esetben nem minden metrika számítható könnyedén. Az átló a helyesen osztályozott eseteket tartalmazza, míg az átlón kívül eső értékek a helytelen eseteket jelölik. A bináris tévesztési mátrix egészére számos teljesítménymutató kiszámítható (pl.: szenzitivitás, specificitás, pontosság, stb.). Kiterjesztett tévesztési mátrixok esetén alkalmazható a modell viselkedésének osztályonkénti vizsgálatára. Ezt

úgy lehet megtenni, hogy minden egyes osztályra kiszámítjuk a pontosságot és a visszahívást, amit osztályonkénti teljesítménynek nevezünk.

## 1.5 Spektroszkópia alkalmazása az orvoslásban

A legelterjedtebb és legismertebb alkalmazás a közeli-infravörös spektroszkópián alapuló pulzoximéter. 1977-ben Jöbsis közölt cikket a hemoglobin-oxihemoglobin arány infravörös méréséről (56). Újszülöttek agyi keringésének nyomonkövetésére is klinikai gyakorlatban van több eszköz (57). A legújabb alkalmazási terület az fMRI-hez hasonló koncepciót követő fNIRS (58, 59).

Az analitikai infravörös tartományban a fontosabb funkciós csoportokra ismertek a karakterisztikus elnyelési sávok, melyeket az 1. táblázat mutat be (60).

1. táblázat Funkciós csoportok és jellemző elnyelési hullámszámtartományaik (60)

Funkciós csoport	Vegyértékrezgés hullámszáma [cm <sup>-1</sup> ]
Hidroxilcsoport O-H	3500
Fehérjék N-H	3200
C = C	3060 - 3000
Zsírsavak -CH <sub>3</sub> -csoportjának C-H aszimmetrikus	2955
-CH <sub>2</sub> -csoport C-H aszimmetrikus	2930
Zsírsavakban C-H aszimmetrikus vegyértékrezgés	2918
Metilcsoportok szimmetrikus	2898
Alkilcsoportok -CH <sub>3</sub> szimmetrikus	2870
Zsírsavak -CH <sub>2</sub> -csoportjának C-H szimmetrikus	2850
Észterek -C =O	1740
Karbonsavak -C =O	1715
nukleinsavak -C=O	1710 -1680
Amid I	1695 - 1635
COO- aszimmetrikus	1575
Amid II	1550 - 1520
„Tirozin” sáv	1515
COO- C-H deformációs rezgése	1468
COO- C =O szimmetrikus	1400
Amid III	1310 - 1240
PO <sub>2</sub> - foszfodiészter P =O aszimmetrikus	1250 - 1220
Szénhidrátok C-O; C-C; C-O-H; C-O-C deformációs rezgése	1200 - 900
PO <sub>2</sub> - P =O szimmetrikus	1090 - 1085
-CH <sub>2</sub> C-H kaszó deformációs rezgése	720



A következőkben néhány jellemző orvosi alkalmazhatóságot és alkalmazásokat fogok bemutatni.

Az elmúlt évtizedben a tumorokat egyre gyakrabban vizsgálták infravörös spektroszkópián alapuló képalkotással (61-63). A leggyakrabban használt alkalmazás még mindig a NIR, amely a MIR-nél nagyobb besugárzott energiával érkezik, és így mélyebben hatol a szövetekbe (64). Alkalmaznak jelöléses és jelölésmentes megközelítéseket. Régóta ismert, biokompatibilis NIR-aktív festékmolekulák állnak rendelkezésre. Az indocianin-zöld a leggyakrabban használt állatmodellekben (65), humán alkalmazását pedig májkarcinómákon, illetve a tumormentes májszövet mennyiségének meghatározása céljából tesztelték (66, 67). A jövőbeni gyakorlati alkalmazás szempontjából azonban ígéretesebb a jelölésmentes MIR. A MIR spektroszkópia jobban illeszkedik a hagyományos képi patológiai információkhoz, mivel a MIR fotonok kevesebb energiát tartalmaznak, következésképpen mélységi behatolásuk kisebb, továbbá a MIR spektrumok jel-zaj aránya mintegy két nagyságrenddel nagyobb, mint a NIR esetében.

A MIR optikai szálak 2016 óta kaphatók kereskedelmi forgalomban, míg korábban csak laboratóriumi eszközök léteztek (68-70). Egy tanulmányban 15 beteg emlőrákjának képalkotását végezték el közép- és hosszuhullámú infravörös kamerák segítségével. A tumoros régiókat egy kvantum völgy infravörös fotodetektoros (QWIP) kamerarendszerrel azonosították (71). Egy másik tanulmányban egészséges nők, valamint rosszindulatú nőgyógyászati daganatos betegek egy kis kohorszából származó vizeletmintákat vizsgáltak. Ez a MIR módszer magas pontosságot eredményezett a főkomponens-elemzés, a támogató vektorgép és a genetikai algoritmus lineáris diszkriminancia-analízis algoritmusokkal együtt (72). A patológiai vizsgálatra érkező minták alapvető szövetfeldolgozásának (víztelenítés, formalinos fixálás, etanolos dehidratálás) hatását a MIR spektrumokra Zahdi és munkatársai vizsgálták, ennek eredményei alapján egy képalkotási protokollt javasoltak (73). További vizsgálatok világítottak rá az FT-IR spektroszkópiai elemzéshez szükséges szövetelőkészítési módszerek más buktatóira és legjobb gyakorlataira (74).

Gaydou és munkatársai a közép-infravörös képalkotást eszközként használták a sejtvonalak infravörös elnyelési karakterisztikájának vizsgálatára (75). A sejteket formalinban fixálták és centrifugálás után paraffinba ágyazták, majd 8 µm vastagságú

metszeteket hoztak létre és ezt követően készítettek infravörös képeket. Mintánként két infravörös kép készült, egy a sejt kultúráról, egy pedig a paraffinba ágyazást követően. Az adatok előfeldolgozásához kiterjesztett multiplikatív szorzáskorrekciót használtak.

## **1.6 Intraoperatív alkalmazások**

A pozitív műtéti margó (PSM) azt jelenti, hogy a sebészi reszekciós szél nem tumormentes. Ezt az információt a patológiai lelet szolgáltatja, és befolyásolja a terápiás döntést (76). A műtőkben a rutin patológiai háttér nem áll rendelkezésre a helyszínen, azonban időnként intraoperatív klinikai igény mutatkozik arra, hogy a reszekált szövetekről azonnal információt kapjunk. Ilyen esetekben a patológusnak kell választ adnia, aki tipikusan egy másik helyen vagy épületben tartózkodik. Ide kell a friss szövetmintákat haladéktalanul eljuttatni szövettani vizsgálatra. Ez történhet csőpostán vagy futár útján. A gyorsfagyasztott szövetekből a metszeteket a patológiai osztályon metszik, majd festik meg, amely eljárás körülbelül 15-30 percet vesz igénybe, miközben a sebész a további műtéti megoldások eldöntéséhez szükséges patológiai információra vár. Ez az eljárás meghosszabbítja a műtéti időt, és a fagyasztott metszetek a megfelelő dehidráció hiányából adódóan kevésbé pontos morfológiát mutatnak, ami növeli a diagnózis bizonytalanságát.

A fagyasztásos vizsgálatok kiváltására több megközelítés is elterjedhet a műtőkben. A legmodernebb új technológiák közé tartozik a tömegspektrometria, a rezgémikroszkópia, a multifoton-mikroszkópia és a konfokális technológiák különböző alkalmazásai. Számos, az intraoperatív képalkotást és a szövettípusok azonosítását célzó eszköz és alkalmazásuk elérte a közepes TLR fejlettségi szintet, ami lehetővé teszi a technológiákban rejlő lehetőségek tesztelését a műtőkben. A szövetek vaporizációjával nyert molekulák tömegspektrometriai elemzése destruktív analitikai módszer (77).

Természetesen több minőségi analitikai módszer irányából indultak meg kutatások, melyek során a cél az eszköz bevitele a műtőbe vagy annak közvetlen közelébe. A sebészi elektrokautes vágás közben elpárolgó szövet gőzeit tömegspektrométerbe vezetve a spektrális ujjlenyomat szolgálhat a tumor és az ép szövetrészek megkülönböztetésére.

A fent említett megoldást hazánkban, mi több, kezdetben az intézetünkben fejlesztette ki Takáts Zoltán onkokémikus néven (78, 79).

A rezgési spektroszkópia hasonló elvet követ, csak itt nincs szükség a minta roncsolására. Jelenleg a legelterjedtebb a Raman spektroszkópia és a közeli infravörös spektroszkópia.

Több biokompatibilis festéket, például indocianin zöldet használó megoldás terjedt el a sebészi gyakorlatban, melynek során a tumor fluoreszcens képalkotással válik láthatóvá. Témámhoz, az analitikai infravörös spektroszkópiához kapcsolódó számos publikáció közül az alábbiakat emelném ki.

A közép-infravörös képalkotás felhasználható a sejtvonalak megkülönböztetésére, és ígéretes technika lehet a tumorok *in vivo* képelemzésére állatmodellekben. Ez kulcsfontosságú lépés lenne annak a végső célnak az eléréséhez, hogy ez a festékmentes technika alkalmazható legyen az intraoperatív sebészeti eljárásokban (80, 81).

A legelterjedtebb módszer a fluoreszcens festékek használata, azonban létezik egy másik megközelítés is, amely a markermentes FT-IR képalkotást választja eszközként, és ígéretes eredményeket mutat a tüdőtumrok altípusmeghatározásában (82). Großerueschkamp és munkatársai friss fagyasztott mintákat elemeztek random forest algoritmusok segítségével. Egy 3 szintű döntési sémát állítottak fel, és még részletesebb szinten is sikeresen felismerték az adenokarcinóma altípusokat (82). Gayoud és munkatársai 34 minta laphámsejtes FFPE-mintán végzett preneoplasztikus és neoplasztikus elkülönítésre összpontosítottak PCA és PLS-DA eszközökkel (83). Akalin és munkatársai első lépésként a spektrális előkezelést választják Mie-szórás és kiterjesztett multiplikatív szórás-korrekciós algoritmusok alkalmazásával. Megszabadulnak a szöveti mikroblokk technikával nyert alacsony jelminőségű spektrumoktól, majd hierarchikus klaszterezéssel és SVM-mel dolgozzák fel őket (84). A mutálódott génekből és fehérjékből is eredő molekuláris expressziós mintázatok olyan komplexitást képviselnek, amelyről nem várható el, hogy a MIR-spektrumok pontosan tükrözzék. A MIR inkább a tumor fent említett molekuláris komplexitását reprezentáló ujjlenyomatot detektál. A tömegspektrometria vagy a molekuláris összetétel specifikus molekuláris változásaira összpontosíthat, vagy hasonlóan komplex mintázatot detektálhat.

## 2 Célkitűzések

Munkacsoportunk célként tűzte ki az infravörös spektroszkópia patológiai alkalmazásának vizsgálatát. A kutatási erőfeszítések hosszútávú célja az intraoperatív diagnosztikába való bevezetés, azonban jelen doktori munka keretében legfőképp a megalapozó vizsgálatok kérdéseit helyeztük górcső alá. A bevezetésben áttekintett rezgési spektroszkópai módszerek és a sokváltozós adatelemzési módszerek mellett a jelenleg fejlesztés alatt álló intraoperatív alkalmazásokra is áttekintést kívántunk biztosítani.

Az alábbi specifikus célkitűzésekkel indultunk neki a munkának:

1. Jelölésmentes infravörös spektroszkópia alkalmazhatóságának vizsgálata normál és transzformált sejtvonalak elkülönítésére
2. Sejtes rendszerek ideális mérési paramétereinek meghatározása és az elérhető adatfeldolgozási megoldások optimalása, továbbfejlesztése
3. FFPE mintákon való alkalmazhatóság vizsgálata, tekintettel a mintaelőkészítés lehetőségeire
4. Tüdőrákok szövettani altípusainak meghatározása biopsziás minták és sebészi rezekciók patológiai FFPE (formalin fixált, paraffinba ágyazott) szövetmintáiról készített jelölésmentes közép-infravörös karakterisztikájuk alapján
5. Minta- és pixelszintű adatkiértékelési megközelítések összevetése a jobb szeparáció eléréséhez

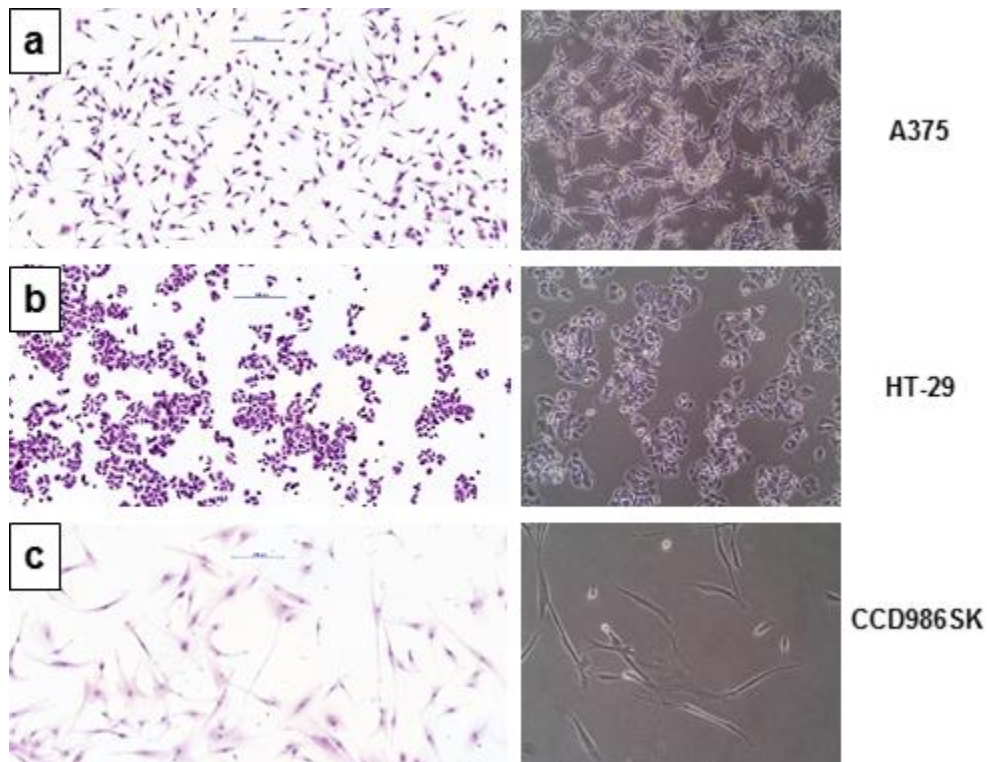
## **3 Módszerek**

### **3.1 Vizsgált anyagok**

Disszertációm a két megjelent publikációra épül, melyben először sejtvonalakat vizsgáltam, majd különböző szövettani mintázatú FFPE tüdőrákos mintákat. A műtéti helyszíni intraoperatív döntéstámogatás előfutáraként egy kevésbé komplex (sejtvonalak) és egy komplexebb (FFPE tüdő szubtípusok) környezetben kívántuk bemutatni a patológiai kérdésekre történő válaszadási képességet. Az előkísérletekhez HT-1080 (ATCC, Manassas, Virginia, USA) fibroszarkóma sejtvonalat használtunk.

#### **3.1.1 Sejtkultúrák**

Az A-375 melanoma (7. ábra a.) és a HT-29 humán vastagbélrák sejteket (7. ábra b.) az ATCC-től (Manassas, Virginia, USA) származnak. A CCD986SK fibroblasztokat (7. ábra c.) nem neoplastikus sejtvonalként választottuk ki az összehasonlításhoz (szintén az ATCC-től). A sejtek fenntartásához DMEM (Lonza Group Ltd, Basel, Svájc) mellé 10%-os FBS (Euroclone Ltd, Pero, Olaszország) puffert adtunk. A sejteket 37 °C-on és 5% CO<sub>2</sub>-on inkubáltuk. Az infravörös képalkotás értékeléséhez a sejteket tripszináltuk, és a sejtszuspenziót UV-sterilizált, alumíniummal bevont tárgylemezekre cseppentettük. A tárgylemezeket Petri-csészékbe helyeztük és foszfát-pufferelt sóoldatba (PBS) mártottuk, Whatman papírral fedtük, és a sejtek kitapadására egy éjszakát hagyunk az inkubátorban. Másnap a sejteket 95%-os etanol (EtOH) segítségével fixáltuk, majd PBS-vel mostuk és hagytuk megszáradni.



7. ábra A sejtvonalak H&E festett (10x objektívvel) és videómikroszkópos felvételei (85)

### 3.1.2 Tüdőrák minták

Összesen 30 FFPE tüdőrák eset blokkjaiból (2. táblázat) választottunk ki a Semmelweis Egyetem II. Sz. Patológiai Intézet (később Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézet) és a Pécsi Tudományegyetem Patológiai Intézet archívumaiból, minden altípusból 10-10 darabot. A paraffinba ágyazott blokkokból 2  $\mu$ m-es metszeteket készítettünk, és kétszer 10 percig xilolban deparaffináltuk. A humán FFPE minták felhasználását a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (61303-2/2018/EKU) engedélyezte. A rutin munkafolyamatban a paraffinba ágyazott blokk elkészítése a patológiai indítást követően 1 munkanapot vesz igénybe. Az alábbi három szövettani altípust választottuk ki: laphámrák (SQ), adenokarcinóma (LUAD) és kissejtes karcinóma (SCLC).

2. táblázat A vizsgált kohort főbb klinikopatológiai paramétereit (86)

Minta	Szubttípus	Kor	Nem	Minta típusa	Stádium
1	SQ	54	férfi	rezekció	T2bNxMx
2	LUAD	48	férfi	rezekció	T2aNxMx
3	SQ	59	férfi	biopszia	nem ismert
4	SQ	67	férfi	biopszia	nem ismert
5	LUAD	57	férfi	rezekció	nem ismert
6	LUAD	48	férfi	rezekció	T3NxMx
7	SCLC	59	férfi	biopszia	T2N2M1
8	SQ	66	nő	biopszia	T3N1M0
9	SCLC	51	férfi	rezekció	T2aN0Mx
10	SCLC	65	férfi	biopszia	T4N1M1
11	SQ	68	férfi	rezekció	T2aN0M0
12	SCLC	71	férfi	biopszia	T4N2M1
13	SQ	75	férfi	rezekció	T2bN0M0
14	SCLC	59	nő	biopszia	T4N2M1b
15	LUAD	65	nő	biopszia	T4N3Mx
16	SCLC	72	nő	biopszia	T3N1Mx
17	LUAD	79	nő	rezekció	T1aNxMx
18	SQ	65	férfi	biopszia	T3N0M0
19	SQ	60	férfi	rezekció	T1bNxMx
20	LUAD	78	nő	rezekció	T2aNxMx
21	LUAD	63	férfi	rezekció	T1cN0Mx
22	LUAD	63	nő	rezekció	T2aN2Mx
23	SCLC	57	nő	rezekció	T2aN0Mx
24	LUAD	65	nő	biopszia	TaN3M1c
25	SCLC	52	férfi	biopszia	T4N3M0
26	SCLC	64	nő	biopszia	nem ismert
27	SCLC	69	nő	biopszia	nem ismert
28	SQ	67	férfi	rezekció	T2bN0Mx
29	SQ	71	férfi	rezekció	T2aN0Mx
30	LUAD	58	férfi	rezekció	T2aNxMx

### 3.2 Műszerek, minta-előkészítés

A spektrumok gyűjtésére Fourier-transzformációs közép-infravörös képalkotást használtunk transzfleksziós optikai elrendezéssel. A Spotlight 400 mikroszkópot (Perkin Elmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA) a Spectrum 400 spektrofotométerhez

csatlakoztatva készítettük a képeket. A MCT detektor  $4000\text{-}648\text{ cm}^{-1}$  hullámhossz-tartományban  $4\text{ cm}^{-1}$  lépésközzel,  $8\text{ cm}^{-1}$  felbontással gyűjtött spektrumokat. A  $300\text{ }\mu\text{m} \times 550\text{ }\mu\text{m}$  méretű képeket  $6,25\text{ }\mu\text{m} \times 6,25\text{ }\mu\text{m}$  méretű pixelekkel és pixelenként 32 beolvasással pásztáztuk. Egyetlen kép  $48 \times 88$  pixelt tartalmazott, mely így 4224 spektrumot eredményezett. Ugyanolyan méretű területeket választottunk ki a három külön tárgylemezre rögzített három sejtvonal felvételéhez.

A sejtes mérések után egy rövid optimalizálást végeztünk, így módosított beállításokat választottunk a tüdőtumorkok vizsgálatára, ennek oka a mérési idő csökkentése volt.

A tüdőtumorkok vizsgálata esetén a fent ismertettekhez képest az alábbi változások történtek a beállításokban:  $16\text{ cm}^{-1}$  felbontás és  $8\text{ cm}^{-1}$  lépésköz mellé  $250\text{ }\mu\text{m} \times 600\text{ }\mu\text{m}$  nagyságú területeket vizsgáltunk. Így egy kép  $40 \times 96$  pixelt tartalmazott, mely 3840 spektrumot eredményezett a  $0,15\text{ mm}^2$ -es területről. A kiválasztott területek felvételi ideje egyenként 46 perc volt.

### 3.2.1 Infravörös mikroszkópos mérések



8. ábra PerkinElmer Spotlight 400 FT-IR/FT-NIR mikroszkóp (a szerző fényképe)

A 8. ábra mutatja a mikroszkópot (Spotlight 400) a spektrofotométerhez (Spectrum 400) kapcsoltn. A jellemző mérési paramétereket összefoglalóan a 3. táblázat tartalmazza.



### 3. táblázat Jellemző mérési paraméterek

<b>A készülék jellemző alapértelmezett paraméterei</b>	Sejtvonalak mérése esetén	Tüdőrák minták esetén
Üzem mód	MIR	MIR
Tárgyasztal mérete	160 mm × 60 mm	160 mm × 60 mm
Működési mód	reflexiós	reflexiós
Optikai elrendezés	Fourier- transzformációs (FT)	Fourier- transzformációs (FT)
Hullámhosszválasztó elem	Michelson-interferométer	Michelson-interferométer
Referencia	arany	arany
Mérési hullámhossz-tartomány	4000-648 $\text{cm}^{-1}$	4000-648 $\text{cm}^{-1}$
Detektor	HgCdTe (MCT)	HgCdTe (MCT)
Lépésköz	4 $\text{cm}^{-1}$	8 $\text{cm}^{-1}$
Felbontás	8 $\text{cm}^{-1}$	16 $\text{cm}^{-1}$
Spektrumok száma képenként	4224	3840
Numerikus apertúra	0,6	0,6
Kép pixel méret	6,25 $\mu\text{m}$ × 6,25 $\mu\text{m}$	6,25 $\mu\text{m}$ × 6,25 $\mu\text{m}$
Kép mérete	48 px × 88 px	40 px × 96 px
Kép mérete	300 $\mu\text{m}$ × 550 $\mu\text{m}$	250 $\mu\text{m}$ × 600 $\mu\text{m}$
Képpontonkénti letapogatások száma	32	32

### **3.2.2 Alumíniummal bevont tárgylemezek**

Az optikai vékonyréteget adó alumínium fémréteget vákuumos párologtatással vittük fel üveglemezekre, hogy közép-infravörös fényvisszaverő felületet kapjunk. Elektronnyalábos párologtató forrást alkalmaztunk egy nagy vákuumkamrában, amelyben az üveglemezeket a forgó mintatartóra rögzítettük. Az alumíniumot  $10^{-4}$  Pa nyomáson 20 percig párologtattuk 7 kV gyorsítófeszültség és 200 mA sugáráram mellett, ami kb. 150 nm-es rétegvastagságot eredményezett. A vékonyréteget a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Elektronikai Technológia Tanszékén készítettük.

### **3.3 Eredmények kiértékeléséhez választott szoftverek**

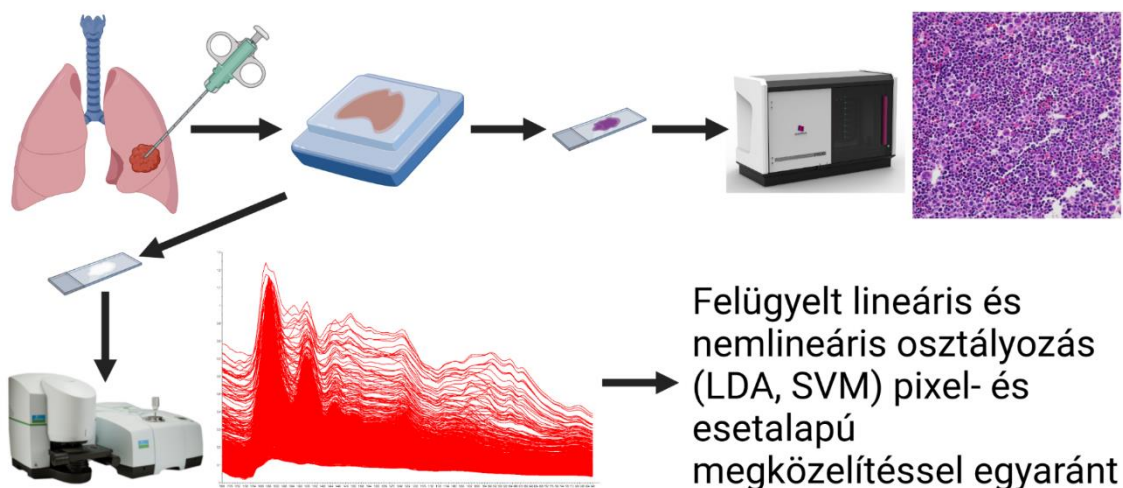
Az eredmények értékeléséhez a következő szoftvereket használtam:

- Microsoft® Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA),
- Statistica 11 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA),
- Unscrambler 10.4 (CAMO Software AS, Oslo, Norvégia),
- Spectrum 10.03.02.0077 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA),
- SpectrumIMAGE R1.6.5.0396 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)
- Matlab 9.1 (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) .

### **3.4 Adatfeldolgozás**

A sejtes minták esetén a teljes és az ujjlenyomat régiót is elemeztük, míg a tüdőtumороk esetén csak az ujjlenyomat régióra koncentráltunk. Az alábbi adatfeldolgozási eszközöket használtuk.

A tüdőtumороk esetén alkalmazott technológia sémáját egy munkafolyamat szemlélteti (9. ábra). A felvett spektrumokat összegyűjtöttük és atmoszférikus korrekció után és zajcsökkentéssel kezeltük. A sokváltozós adatelemzésekbe az ujjlenyomat régió adatait adtuk be.



9. ábra A kísérlet folyamatábrája (86)

A infravörös képek spektrumai egy adatbázisba kerültek, amelyből minden második spektrumot kiválasztottunk és tanítóhalmazként használtunk.

### 3.4.1 Főkomponens-elemzés

A főkomponens-elemzés egy nem felügyelt dimenzióredukciós (változócsoökkentő) technika. A változók különböző hatásai a töltéseken keresztül szemléltethetők, a pontszámok pedig a mintákat reprezentálják. A kapott spektrumokat egy táblázatba gyűjthetjük, ahol a sorokat mintáknak, az oszlopokat pedig változóknak nevezhetjük. A mért IR-spektrumok teljes tartománya esetén 838 hullámszámot ( $4000-648 \text{ cm}^{-1}$ ) tekintünk változóknak. Egy infravörös kép nagy mennyiségű adatot tartalmaz: az  $x$  és  $y$  a pixel helyét határozza meg, és minden optikai frekvenciasávot egy változó ír le. Ezt a többdimenziós adathalmazt adat/dimenziócsökkentéssel lehet feldolgozni, hogy a változékonyság megmaradjon. Minden spektrumot főkomponens-pontszámok reprezentálnak, és ábrák segítségével vizualizálhatók. A pontok színezése megkönnyíti az emberi megértést.

### 3.4.2 Légköri korrekció és zajcsökkentés

A  $\text{H}_2\text{O}$  és a  $\text{CO}_2$  jelenléte közép-infravörös elnyelő molekulák, amelyek akadályozzák egyes analitok azonosítását (87). A felvett képeket a SpectrumIMAGE R1.6.5.0396 szoftver (Perkin Elmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA) két beépített algoritmusával kezeltük légköri korrekció és zajcsökkentés céljából. A spektrumok légköri korrekcióját a légköri  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$  esetében az algoritmus a legkisebb négyzetek módszerével végezte (88). A zajcsökkentés 20 faktoros PCA alapján történt. Mivel a zajnak kisebb súlyai

vannak, a 20 faktoron alapuló rekonstruált spektrum zajcsökkentett. Ez a módszer nem vezet a spektrumcsúcsok kiszélesedéséhez, ellentétben a simítással.

### **3.4.3 Lineáris diszkriminancia-elemzés**

A lineáris diszkriminancia-analízis egy felügyelt osztályozási módszer. Az LDA a legegyszerűbb a lehetséges osztályozási módszerek közül, amelyek a Bayes-formulán alapulnak (89). Alapja a normális eloszlás feltételezése, valamint az a feltételezés, hogy a két (vagy több) csoport kovarianciamátrixa azonos. A lineáris módszert akkor alkalmazzuk, ha a két csoport közötti különbség lineáris függvénnyel ábrázolható. A zavamátrix a felügyelt módszerek, például a lineáris diszkriminancia-analízis szerinti osztályozás eredményeinek megjelenítésére használt mátrix. A minták megjósolt és tényleges osztályozására vonatkozó információkat hordoz, minden sor a megjósolt osztályba tartozó példányokat, minden oszlop pedig a tényleges osztályba tartozó példányokat mutatja. A vetített spektrumok kétdimenziós terek segítségével vizualizálhatók. Az egy osztályhoz tartozó nullához közel eső pontok az osztályhoz tartoznak.

### **3.4.4 Támogató vektor gép**

Az SVM segítségével történő osztályozás egy statisztikai tanuláson alapuló módszer. Az SVM lényege, hogy lineárisan szeparálható adatok esetén meghatározza a maximális margóval rendelkező hipersíkot. A maximális margó oka, hogy a nagy margóval rendelkező döntési határok általában jobb általánosítási hibával rendelkeznek, mint a kis margóval rendelkezők. A módszer széleskörűen alkalmazható a statisztikai elemzésben szinte minden tudományágban. A módszer fő előnye, hogy kernelfüggvények segítségével nemlineáris adathalmazokra is kiterjeszhető. Az elemzés elvégzéséhez az algoritmust az adathalmaz egy kategóriaváltozót tartalmazó részén kell betanítani, majd az adatok másik részén validálni. Miután ezeket a műveleteket elvégeztük, az eredményekből következtetni lehet a módszer pontosságára. A támogató vektorgép másik előnye, hogy jó általánosítási képességgel rendelkezik, és könnyen alkalmazható többdimenziós adatokra. A tévesztési mátrix összefoglalja az osztályozási problémára vonatkozó előrejelzési eredményeket.

### **3.4.5 Pontosság és Cohen-féle kappa-módszer**

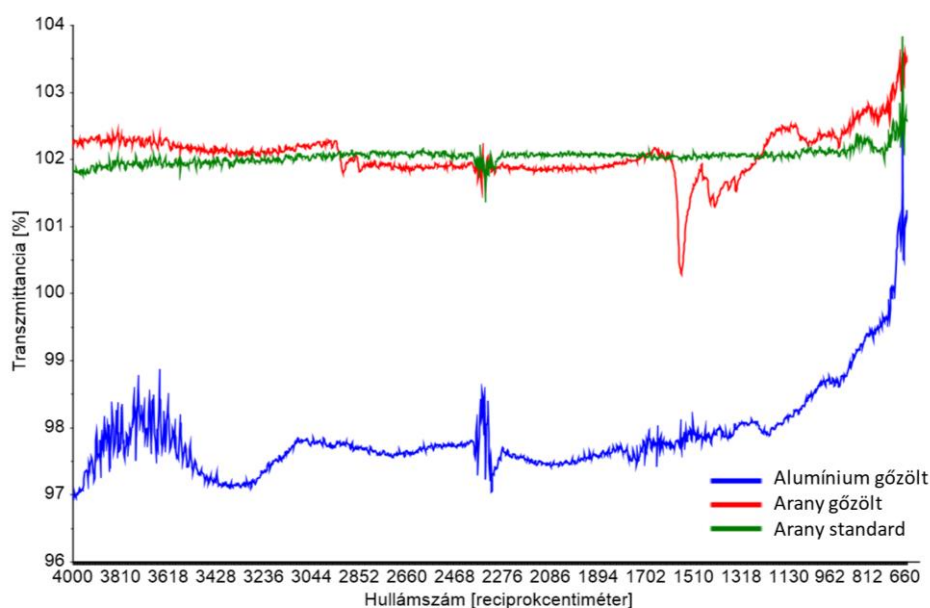
Az osztályozási modellek teljesítményét leggyakrabban a zavamátrixukkal - más néven hibamátrixukkal - írják le. A szenzitivitás és a specificitás egy 2x2-es táblával

értelmezhető (bináris osztályozó). A mi modellünkben három adatosztály, három sejtvonala van. Az átlós elemek a helyesen osztályozott, az off-diagonális elemek a rosszul osztályozott spektrumok számát jelentik. A modellek teljesítményének összehasonlításához a Cohen-féle kappát és a pontosságot a két mutató. A pontosság és a Cohen-féle kappát között az a kapcsolat, hogy mindkettő használható egy osztályozó vagy modell teljesítményének értékelésére. A pontosság azonban egy egyszerűbb mérőszám, amely csak a helyes előrejelzések számát veszi figyelembe, míg a Cohen-féle kappát a véletlen egyezés lehetőségét is figyelembe veszi. Ezeket a mérőszámokat számos területen, de az orvosi kutatásban (90) általában a diagnosztikai tesztek teljesítményének értékelésére, a diagnosztikában a különböző megfigyelők közötti egyetértés értékelésére, valamint a felügyelt gépi tanulásban az osztályozók teljesítményének értékelésére használják. Minél magasabb az érték, annál jobb a modell teljesítménye. Az általános pontosság arra a kérdésre ad választ, hogy az osztályozó milyen gyakran jár el helyesen? A Cohen-féle kappát egy olyan mérőszám, amely a megfigyelt és a várt pontosság közötti kapcsolatot írja le. Az osztályozás teljesítményét mutatja be. Landis és Koch a 0-0,20-as értéket csekélynek, a 0,21-0,40-es értéket közepesnek, a 0,41-0,60-as értéket közepesnek, a 0,61-0,80-as értéket jelentősnek, a 0,81-1-es értéket pedig szinte tökéletesnek tekintik (91).

## 4 Eredmények

### 4.1 Sejtes előkísérletek a mérések optimalizálásához

A reflexiós optikai elrendezésű infravörös képalkotás során első lépésben egy háttérrel kell felvenni. Alapvető kérdés, hogy milyen felület optimális ehhez? Az inframikroszkóphoz gyárilag egy aranystandardot adnak. A transzflektanciás mérési elrendezésnél kívánalom, hogy a fény minimális veszteséggel verődjön vissza a detektorba, ha a fényútban nincs minta. A fémgőzölés lehetőségét átgondolva egy aranygőzölt és egy alumíniumgőzölt tárgylemezt választottam ki a fenti kérdés tisztázására. A gyári aranystandard és a BME Atomfizika Tanszékről kölcsönként aranygőzölt rétegek gyártási paramétereiről sajnos nem állt rendelkezésre információ. A klasszikus, gyári aranystandardot használva háttérként mindhárom reflektív felületről felvettem egy spektrumot (10. ábra).



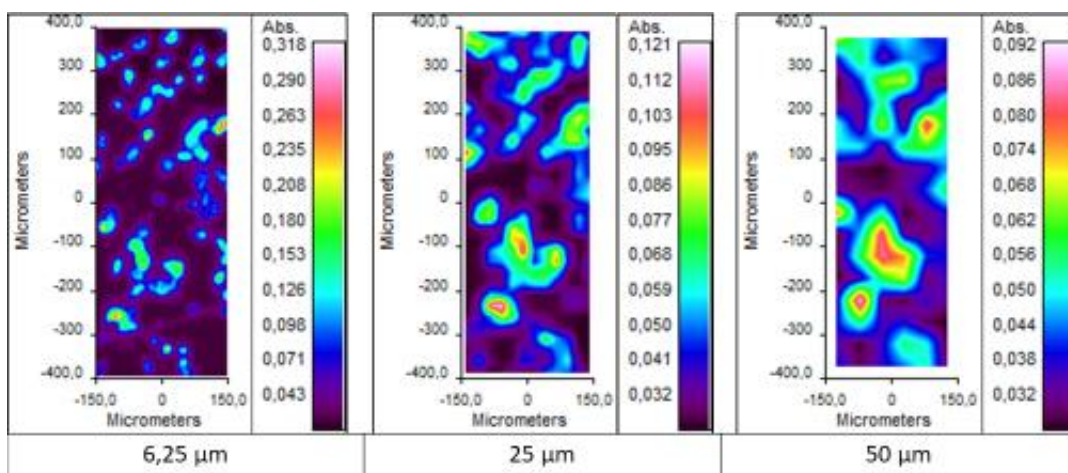
10. ábra Gyári arany és fémgőzöléssel készült arany és alumínium hátterek spektrumai (48)

A fenti ábrán  $2300\text{ cm}^{-1}$ -nél a csúcsokat a széndioxid adja, esetünkben ezzel nem érdemes most foglalkozni, mert sem légköri korrekciót, sem zajszűrést nem használtam. Az ábrán a standard skálán a 100% körüli részt kinagyítottam, melyen így látható, hogy minimális eltéréseket (akár 100 feletti értékeket is) adhatnak egyes mérési pontok. Ennek oka, hogy a standardhoz képest a vizsgált felületek helyenként jobban verték vissza a fényt. Általában véve a teljes spektrum megfelelő, nagyon magas reflexiót adott a teljes tartományon. A három felületet így egyaránt megfelelőnek ítélt meg a reflexió

tekintetében. A későbbi vizsgálatokhoz az alumíniumgőzölt technika mellett döntöttem, mert ez kellően olcsó a nagyszámú standard tárgylemez bevonatolására, miközben visszaverése nem számottevően gyengébb az aranystandardhoz képest.

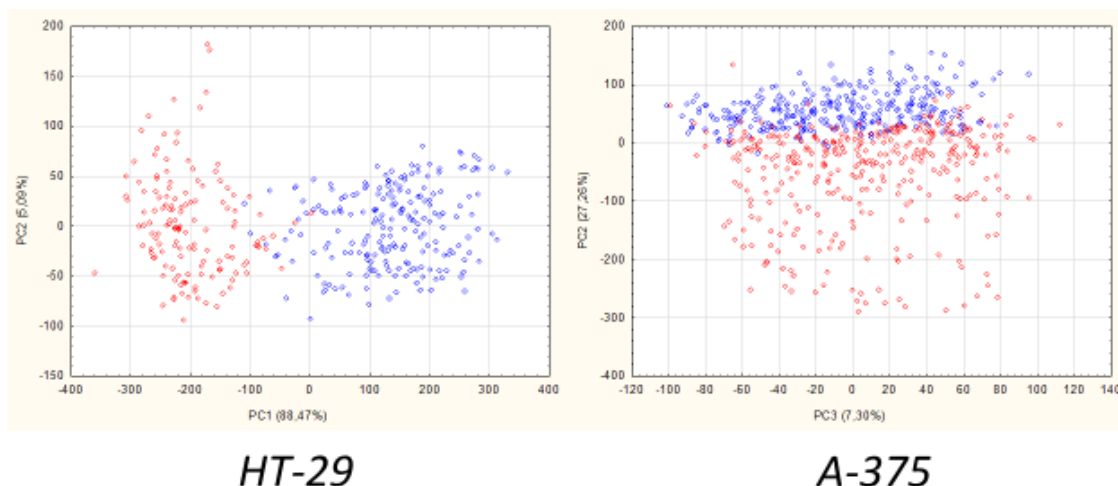
A sejtes kísérletek során korai kérdésként merült fel az ideális sejtszám az alumínium gőzölt lemezre való kitapadásához. Másfelől kérdés volt, hogy a sejtek letapadását követően milyen fixálást érdemes alkalmazni?

Kezdetben a közép-infravörös képalkotáshoz választható pixelméreteket vizsgáltuk meg egy  $300 \mu\text{m} \times 800 \mu\text{m}$  nagyságú területen, melyet egyaránt  $6,25$ ,  $25$  és  $50 \mu\text{m}$  élhosszúságú pixelekkel képeztünk le.



11. ábra HT-1080 sejtvonal csupán PBS-ben kezelt képei különböző pixelméretekkel ( $6,25$ ,  $25$  és  $50 \mu\text{m}$ ) (48)

A mérési időket is figyelembe véve az aprólékosabb pixelméret ( $6,25 \mu\text{m}$ ) mellett döntöttünk (11. ábra), mert így lesz a legrészletgazdagabb a kép, illetve, így nagyobb számú spektrum nyerhető ki.



**PFA | EtOH**

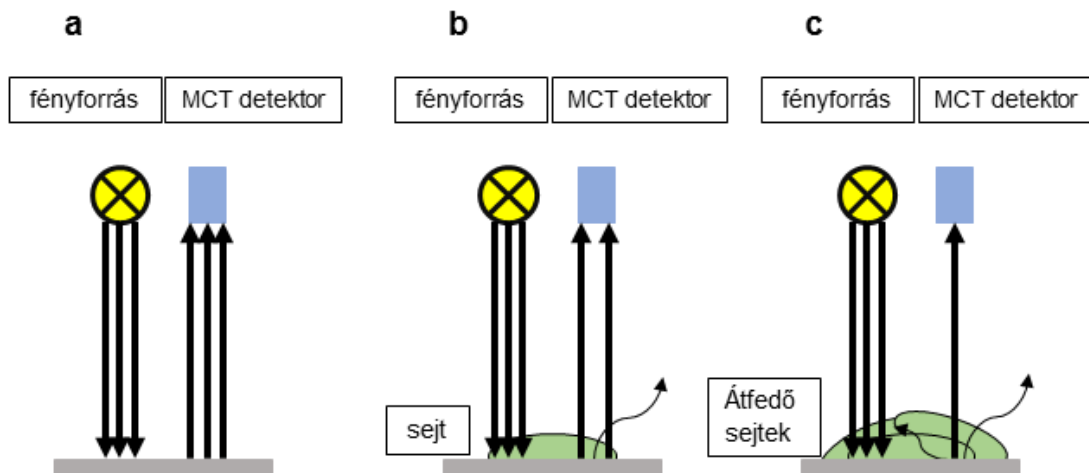
12. ábra A HT-29 és az A-375 sejtvonalak spektrumainak főkomponens elemzése a fixálás szerint színezve (kék- paraformaldehid (PFA), piros-ethanol (EtOH) (92))

A klasszikus fixálások közül a paraformaldehid és az etanol került kiválasztásra. A HT-29 és az A-375 sejtvonalakról készült 2-2 metszetet mindkét módszerrel fixáltuk. A fixálásokat egy főkomponens elemzéssel vizuálisan is szeparáltuk, úgy, hogy a spektrumok értékeit kiszíneztük (12. ábra).

## 4.2 Sejtvonalak vizsgálata

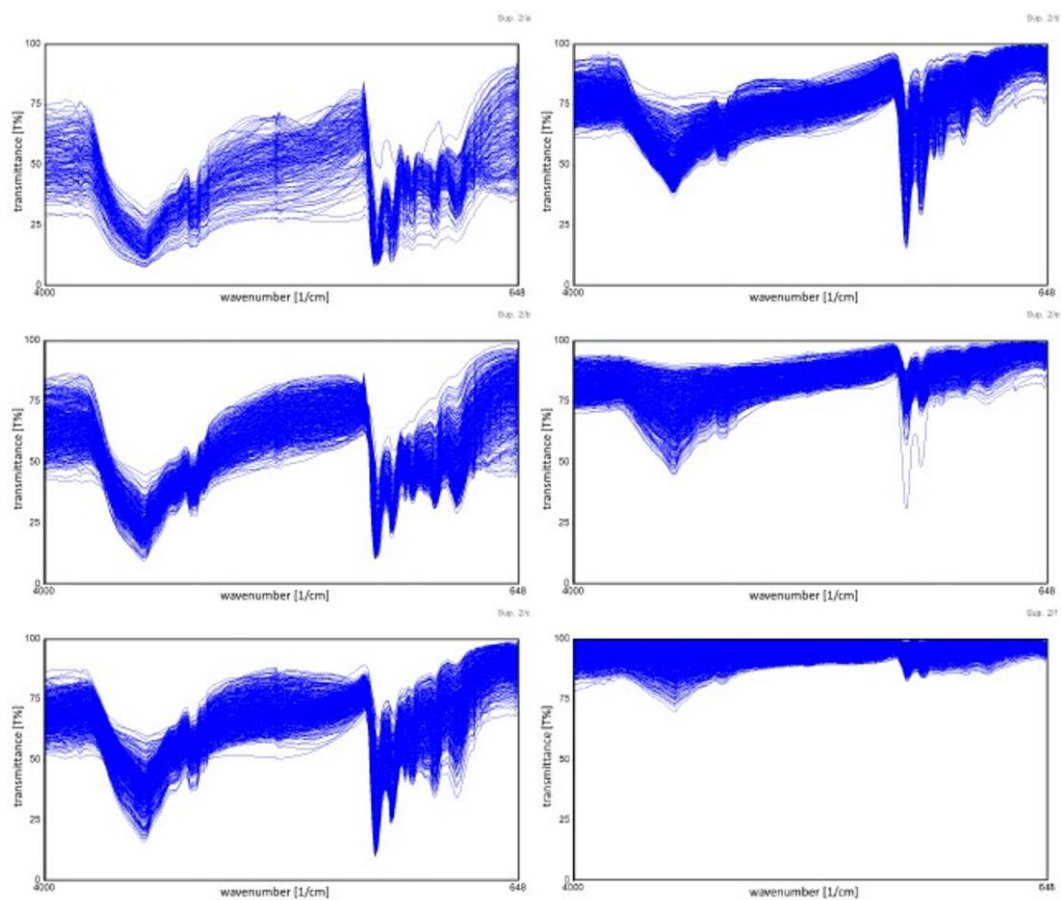
Új megközelítésünkben tumoros sejtvonalak MIR spektrumait használtuk fel, melyeken előzetesen légköri korrekciót és zajcsökkentést eszközöltünk. Mivel a sejtek kitapadása az alumínium gőzölt felületre nem egy szorosan kontrollált folyamat, ezért előfordulnak egyaránt sejtmentes és igen sejtűs területek is, ennek egyszerűsített rajzát az alább láthatjuk (13. ábra).





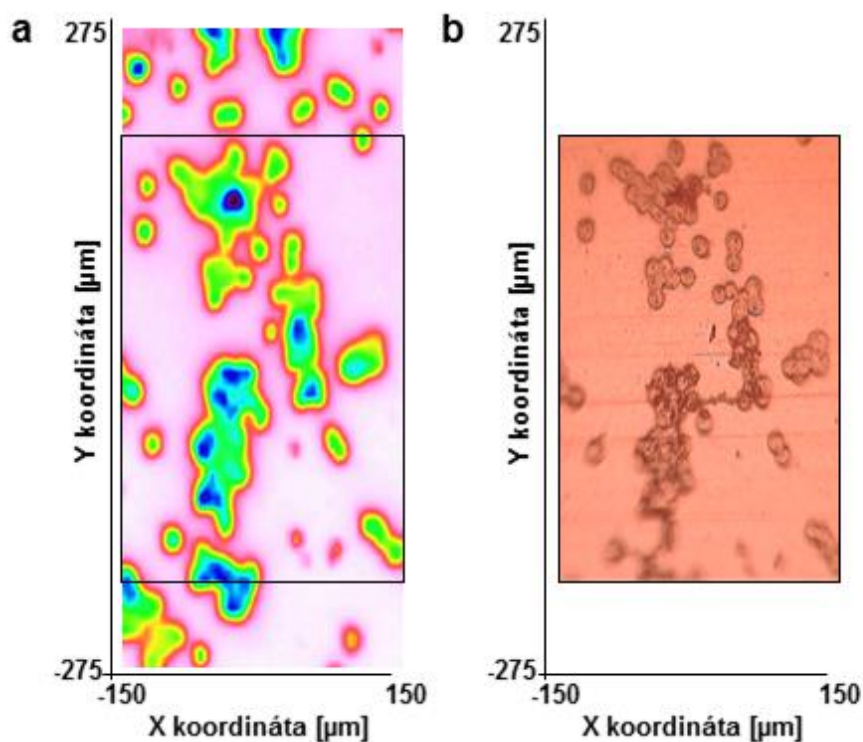
13. ábra Sejtekkel borított lemezről visszaverődő fény intenzitása. a: transzflektancia optikai elrendezése b: egyetlen sejtréteg transzflektanciája c: több sejtréteg átfedése gyenge jelet eredményez (alacsony átlag transzmittancia). Az „a” és „c” fényútból származó spektrumokat eltávolítottuk, és a végső elemzéseket a „b” mintaseregen végeztük. (85)

Hat csoportra osztottuk a spektrumokat a teljes tartományra ( $4000-648\text{ cm}^{-1}$ ) számított átlag transzmittancia ( $T\%$ ) értékük szerint (14. ábra). Első lépésben a nagy számú spektrumok előszűrése szükséges, hogy eltávolítsuk a túl magas átlagos  $T\%$ -ot mutató, sejtmentes területekről származó spektrumokat, majd ezt követte a vastag sejtrétegeket (azaz átfedő sejteket) reprezentáló pixelek spektrumainak eltávolítása, melyek túl alacsony átlagos  $T\%$ -ot eredményeztek.



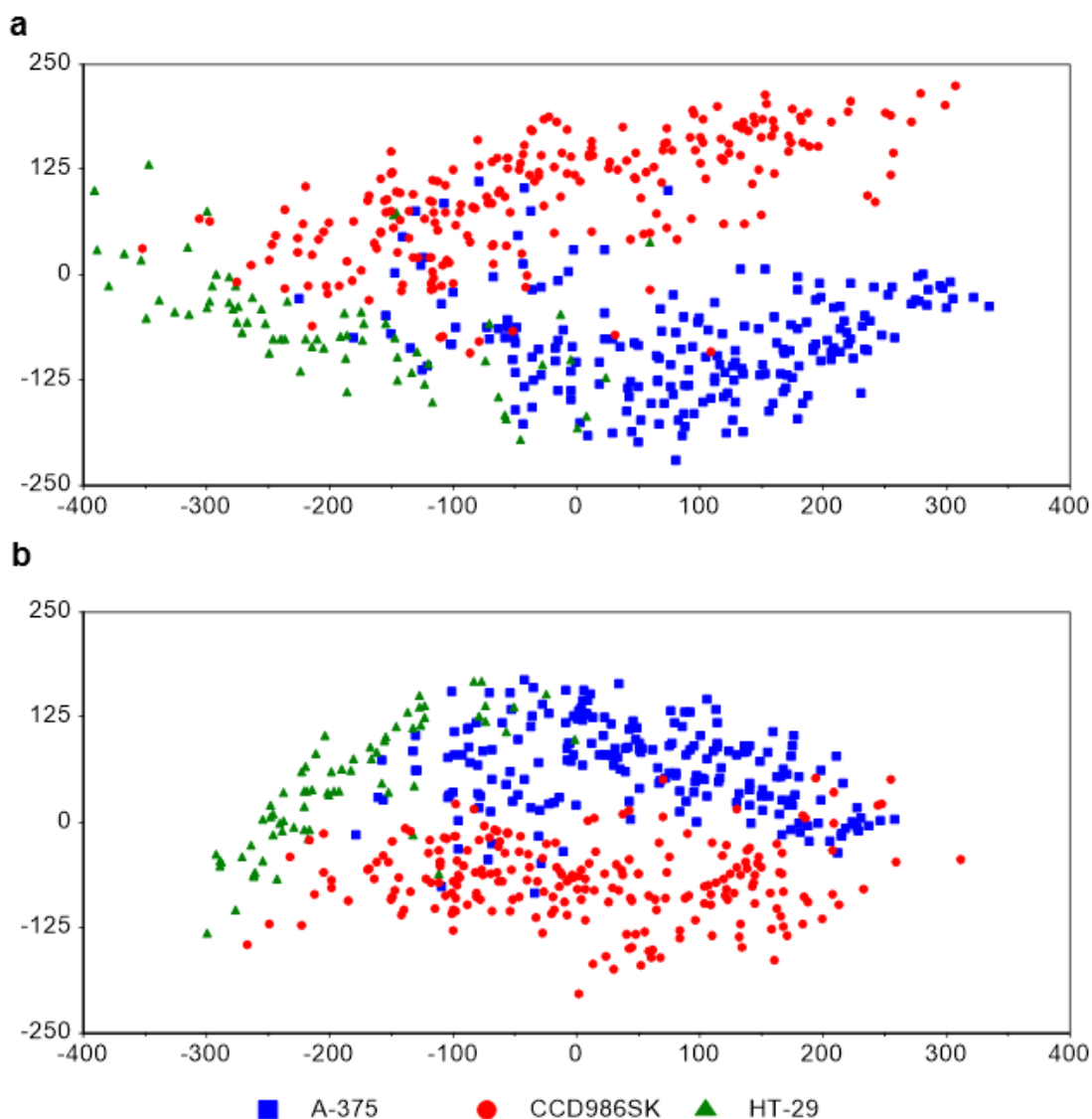
14. ábra A teljes közép-IR tartományon (4000-648  $\text{cm}^{-1}$ ) az etanol fixált A-375 sejteket tartalmazó mintáról készített kép spektrumait 6 osztályba soroltuk be az átlagtranszmittanciájuk szerint. a: <50 T% deformált csúcsok b: 50-60 T% - vizsgálandó csúcsokat tartalmaz; c: 60-70 T% - vizsgálandó csúcsokat tartalmaz; d: 70-80 T% - vizsgálandó csúcsokat tartalmaz; e: 80-90 T% sejtmentes területek; f: 90 T% < - sejtmentes területek. (85)

A HT-29 sejtek esetében jól megfigyelhető, hogy egyes régiók sejtmentesek voltak (15. ábra, a rózsaszín területek), mások túl sok fényt nyeltek el (15. ábra, a kék területek). A sokváltozós elemzésekbe kerülő adathalmaz a fenti szisztematikus adatredukción esett át.



15. ábra Etanollal fixált HT-29 sejtekről készült képek. a: Az infravörös kép, melyen rózsaszínnel a sejtmentes területek, zölddel a sejtek, kékkel pedig a vastag, nagy elnyelésű régiók láthatók. b: A látható fény tartományában készített mikroszkópos kép az „a” panelen jelölt területről. (85)

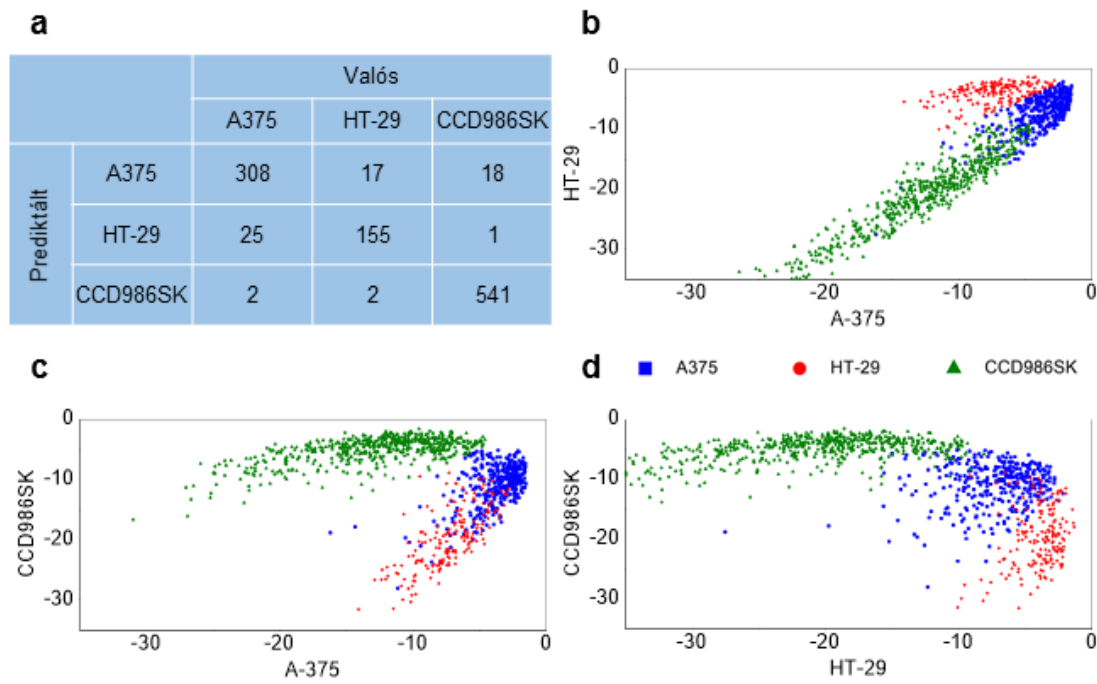
Az alábbi felosztást alkalmaztuk: a 0-50%-os átlagos T% tartományt foglalta magába, amelyet növekvő 10%-os lépések követtek egészen 100%-ig (14. ábra). Az 50 %-os átlag transzmittanciánál alacsonyabb spektrumok nem voltak használhatóak, mivel a csúcsok deformálódtak (pl. az NH-kötés "U" alakja látható a tipikus "V" alak helyett a 3500-3300  $\text{cm}^{-1}$  tartományban). A fényvisszaverő sejtmentes felület magas transzmissziót mutatott (>80 %). A megmaradt 50-80%-os tartományt 6 darab 5 T%-os keskeny sávra osztottuk (azaz 50-55%, ..., 75-80%). Minden csoport esetében PCA-t és LDA-t végeztünk a spektrális tartomány összes kombinációján.



16. ábra Főkomponens elemzés eredményei a PC1-PC2 tengelyek mentén a sejtvonalak szerint színeve a spektrumokat (A-375- kék, CCD986SK- piros, HT-29 zöld). Teljes spektrum (a) és az ujjlenyomat régió (b). (85)

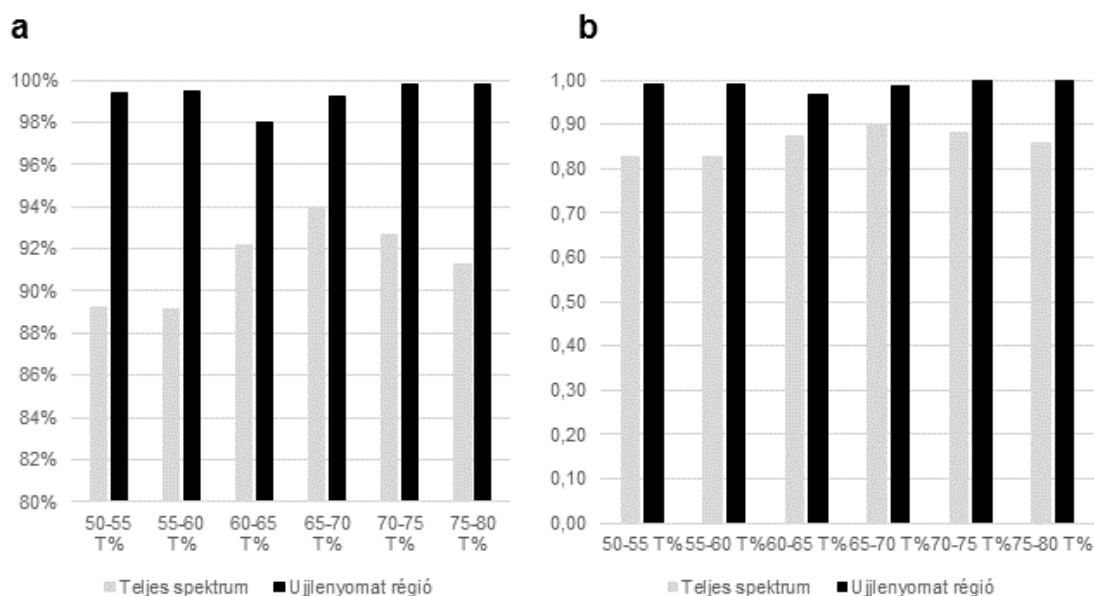
Összesen 12 PCA-modellt készítettünk el. A daganatos és normál sejtek infravörös spektrumainak 5 %-os tartományait PCA-val elemezve az 50-55 T%-os tartomány (a 6 szisztematikusan vizsgált 5 %-os spektrumtartományból) eredményezte a legjobb elválasztást (16. ábra). Az 1800-648  $\text{cm}^{-1}$  tartomány jobban teljesített, mint a teljes spektrumtartomány. Az ujjlenyomat régió elnyelési sávjai kifejezettebb módon reprezentálták a minták biológiai komplexitását, és jobb elválasztást tettek lehetővé. A téves osztályozások számát a tényleges osztályokkal együtt kell értelmezni. Emiatt az LDA a kiválasztott felügyelt módszer a sejtek osztályozására. A 17. ábra a. panelje a 65-70 T%-os tartomány teljes régiójának tévesztési mátrixát mutatja be. Mindössze 19 nem-

transzformált sejtes spektrumot sorolt be helytelenül. A 17. ábra b., c. és d. paneljei a spektrumokat reprezentáló pontokat két dimenzióban ábrázolják.



17. ábra A 65-70 átlagtranszmittanciás spektrumokra végzett LDA eredményének tévesztési mátrixa a teljes analitikai infravörös tartományon. „b”, „c” és „d” a kétdimenzióban ábrázolt projekált spektrumpontokat ábrázolják a sejtvonalak szerint színezve (A-375 - kék, HT-29 - piros, CCD986SK - zöld). (85)

A tumoros sejtek esetén nagyobb keveredés volt, így alacsonyabb pontosságot ért el a modell, számszerűen 93,92%. Az ujljenyomat régió elemzése mindig nagyobb pontosságot eredményezett, mint a teljes tartomány esetében. A felügyelt LDA-modellek kielégítő eredményeket mutattak az összes adatkészleten, mind a pontosság, mind a Cohen-féle kappa értékek tekintetében.



18. ábra A teljes és az ujjlenyomat régió vizsgált átlag transzmittancia sávokon elvégzett LDA pontossága értékei (a) és Cohen-féle kappa értékei (b) (85)

4. táblázat Pontosság és Cohen-féle kappa értékek az egyes LDA modellekre. (85)

	50_55 T%	55_60 T%	60_65 T%	65_70 T%	70_75 T%	75_80 T%
<b>LDA pontosság(%)</b>						
Teljes spektrum 4000-650cm <sup>-1</sup>	89,220	89,160	92,150	93,920	92,650	91,260
Ujjlenyomat régió 1800-650cm <sup>-1</sup>	99,400	99,510	97,970	99,250	99,840	99,790
<b>Cohen-féle kappa</b>						
Teljes spektrum 4000-650cm <sup>-1</sup>	0,827	0,825	0,872	0,899	0,880	0,858
Ujjlenyomat régió 1800-650cm <sup>-1</sup>	0,990	0,992	0,967	0,988	0,997	0,997

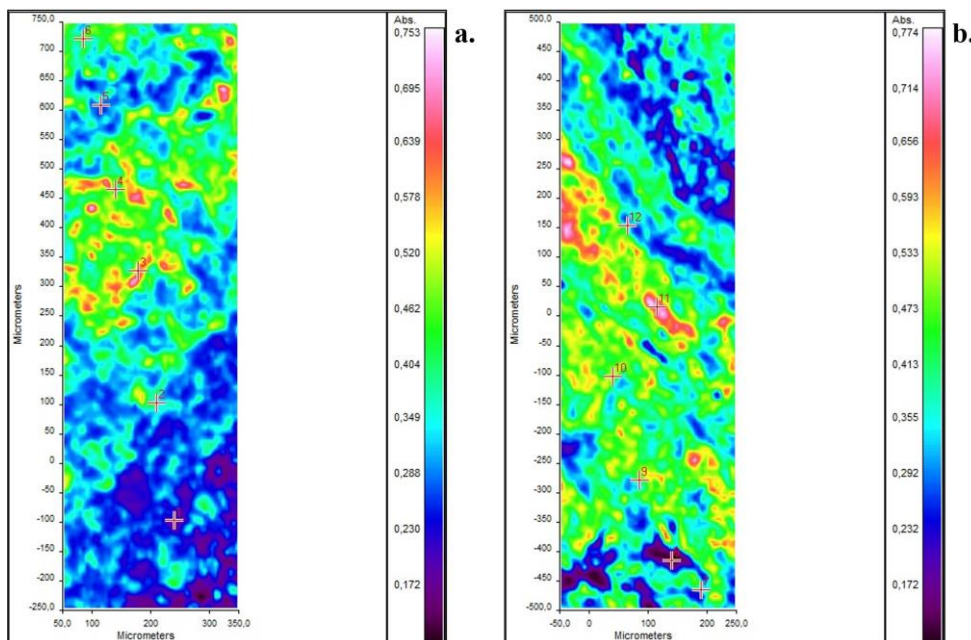
Az említett pontos értékeket az 4. táblázat tartalmazza, és a 18. ábra mutatja be vizuális demonstrációként. A legjobb elválasztást az ujjlenyomat tartományt vizsgálva a 70-75 T%-os tartományában értük el, mely szerint 99,84%-os pontosságot ért el a modell. Az összes LDA-modell tévesztési mátrixát a 5. táblázat jeleníti meg.

5. táblázat LDA modellek eredményei tévesztési mátrixokba rendezve (85)

Teljes spektrum 4000-650cm <sup>-1</sup>					Ujjlenyomat régió 1800-650cm <sup>-1</sup>		
		Valós			Valós		
		A-375	HT-29	CCD986SK	A-375	HT-29	CCD986SK
Prediktált	<b>50_55 T%</b>						
	A-375	169	2	4	204	0	0
	HT-29	25	63	7	1	68	0
	CCD986SK	12	4	215	1	1	226
Prediktált	<b>55_60 T%</b>						
	A-375	214	4	12	261	0	3
	HT-29	38	70	2	0	75	0
	CCD986SK	9	1	259	0	0	270
Prediktált	<b>60_65 T%</b>						
	A-375	246	12	12	273	0	11k
	HT-29	26	92	0	0	107	0
	CCD986SK	3	5	343	2	2	344
Prediktált	<b>65_70 T%</b>						
	A-375	308	17	18	334	0	5
	HT-29	25	155	1	0	172	0
	CCD986SK	2	2	541	1	2	555
Prediktált	<b>70_75 T%</b>						
	A-375	346	19	27	389	0	0
	HT-29	43	188	0	0	207	0
	CCD986SK	0	2	613	0	2	640
Prediktált	<b>75_80 T%</b>						
	A-375	287	15	3	353	1	0
	HT-29	60	127	0	1	141	0
	CCD986SK	7	0	474	0	0	477

### 4.3 Szövetek vizsgálatának előkísérlete

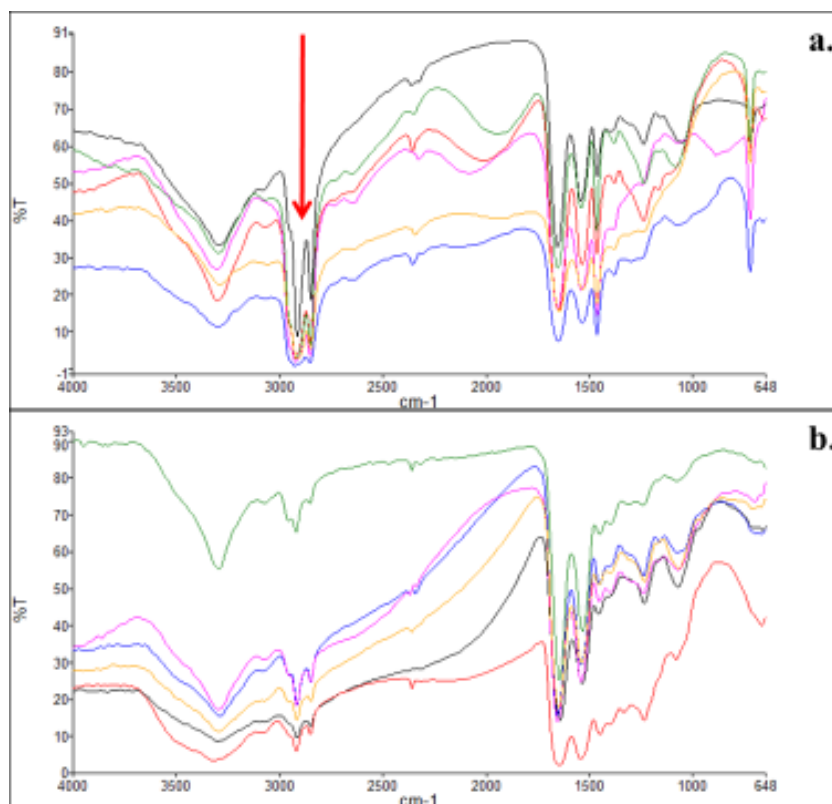
Nem triviális döntés, hogy a paraffinba ágyazott blokkból készült metszet feldolgozása során milyen állapotú mintát kívánunk infravörös képalkotásnak alávetni.



19. ábra FFPE blokkból készült metszet paraffinált (a.) és deparaffinált (b.) fázisában készült infravörös átlag abszorbancia képek (48)

Az előkísérlethez egy tüdőrákos blokkot választottunk ki, melyből két metszet készült. Az elsőt a paraffin eltávolítása nélkül, a másodikat kétszer 10 perc xilolos kezelést követően mértük le. A  $400\ \mu\text{m} \times 1000\ \mu\text{m}$  nagyságú terület átlag abszorbanciás képeit (19. ábra) szemrevételezve a bal felső sarokból indulva átlósan 6-6 spektrumot választottunk ki.



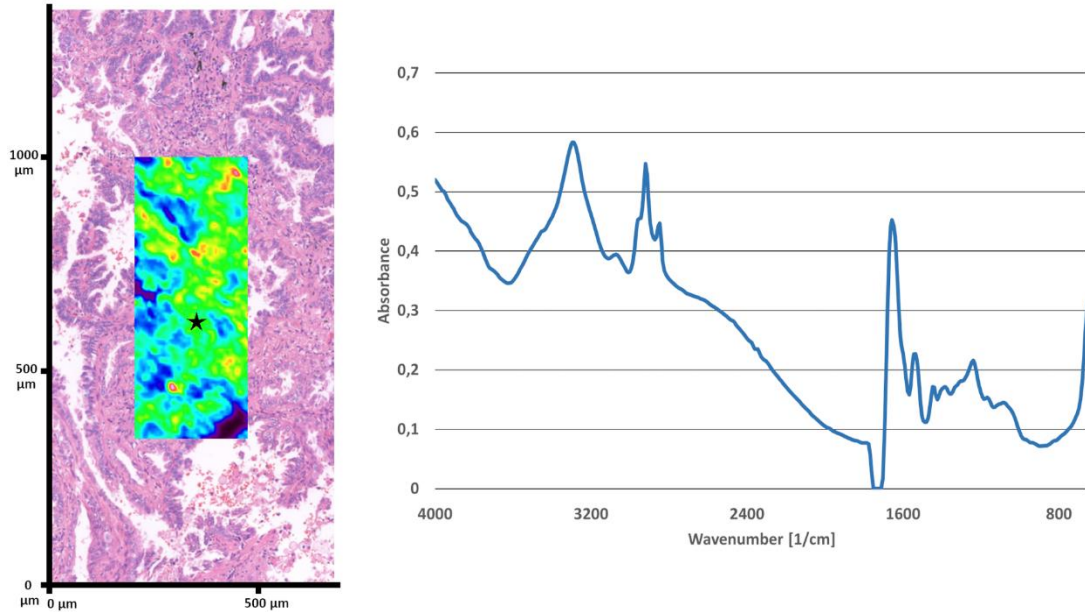


20. ábra 6-6 kézzel kiválasztott spektrum paraffinált (a.) és deparaffinált (b.) fázisú metszetről. (48)

A spektrumokat megvizsgálva látható (20. ábra), hogy a paraffinált minta esetén a lipidekre jellemző csúcsok (a. panel, piros nyíllal jelölve) pl.: a  $2900\text{ cm}^{-1}$  körüli értékek (1. táblázat) erősen letörnek, illetve a csúcsok több helyen kevésbé hegyesek. Választásunk a deparaffinálás alkalmazására esett, mert a paraffin elnyomja a szövetekben található lipidek alkotta esetleges különbségeket, a xilolos kezelést követően viszont azonban a fehérjékre és a szénhidrátokra jellemző csúcsok kifejezettebbé váltak.

#### 4.4 Tüdőtumorok szubtypusainak elválasztása

A tüdőrákokra jellemző mindhárom szövettani altípusból 10-10 mintát választottunk ki (2. táblázat). A 2. és 6. eset azonos betegről származó reszekált tumorok, amelyeket két különböző helyen, de eltérő időpontban operáltak. A tumoros régiókat a H&E festett tárgylemezeken történő azonosítása után az egymást követő tárgylemezek párhuzamos területét infravörös mikroszkóppal leképeztük az alumíniummal bevont tárgylemezeken (21. ábra).



21. ábra HE festett LUAD metszetről készült digitális képre illesztett infravörös mikroszkóppal készített átlagabszorbancia kép, melyen a csillaggal jelölt helyről származó spektrumot látható az ábra jobb felén (86).

Összesen 5 analízist végeztünk három LDA (lineáris, kvadratikus és Mahalanobis-távolságot használó) és két SVM (lineáris nu-SVC SVM és lineáris C-SVC SVM beállítású) modellel. Az említett adatbázis másik részét ezeken a modelleken futtattuk le, és prediktáltuk a szövettani altípust.

Az adatok vizsgálatához két megközelítést alkalmaztunk, az "esetalapú"-t és a "pixel alapú"-t egyaránt. Elsőként az 'esetalapú' osztályozások kerülnek bemutatásra. Ez a megközelítés az egyes besorolt spektrumokon alapul, ezért a legalacsonyabb ajánlott határérték 50 %. Minden spektrumot külön-külön osztályoztunk a fent említett öt matematikai modellel. Az eredményeket esetenként tévesztési mátrixokba rendeztük. Az egyes mintákból (mintánként 3840 spektrum) a helyesen osztályozott spektrumok arányát tekintettük a teljes eset osztályozás döntő tényezőjének. A különböző cut-off értékeket összehasonlítottuk a modellek pontosságának rangsorolása érdekében (6. táblázat).

6. táblázat A modellek pontossága különböző küszöbértékek használatának esetén (86)

Modellek küszöbértéke	Lineáris nu- SVC SVM	Lineáris C- SVC SVM	Lineáris LDA	Négyzetes LDA	Mahalanobis- féle LDA
<b>50%</b>					
SQ	90% (9/10)	100% (10/10)	70% (7/10)	100% (10/10)	0% (0/10)
SCLC	90% (9/10)	100% (10/10)	50% (5/10)	80% (8/10)	0% (0/10)
LUAD	10% (1/10)	100% (10/10)	20% (2/10)	20% (2/10)	100% (10/10)
<b>60%</b>					
SQ	80% (8/10)	80% (8/10)	60% (6/10)	100% (10/10)	0% (0/10)
SCLC	90% (9/10)	90% (9/10)	40% (4/10)	70% (7/10)	0% (0/10)
LUAD	0% (0/10)	80% (8/10)	20% (1/10)	20% (2/10)	100% (10/10)
<b>70%</b>					
SQ	50% (5/10)	80% (8/10)	50% (5/10)	90% (9/10)	0% (0/10)
SCLC	90% (9/10)	90% (9/10)	40% (4/10)	60% (6/10)	0% (0/10)
LUAD	0% (0/10)	70% (7/10)	20% (2/10)	20% (2/10)	100% (10/10)
<b>80%</b>					
SQ	20% (2/10)	70% (7/10)	50% (5/10)	90% (9/10)	0% (0/10)
SCLC	80% (8/10)	80% (8/10)	40% (4/10)	50% (5/10)	0% (0/10)
LUAD	0% (0/10)	60% (6/10)	20% (2/10)	20% (2/10)	100% (10/10)
<b>90%</b>					
SQ	10% (1/10)	20% (2/10)	40% (4/10)	70% (7/10)	0% (0/10)
SCLC	40% (4/10)	70% (7/10)	40% (4/10)	30% (3/10)	0% (0/10)
LUAD	0% (0/10)	60% (6/10)	20% (2/10)	20% (2/10)	100% (10/10)
<b>95%</b>					
SQ	0% (0/10)	20% (2/10)	40% (4/10)	30% (3/10)	0% (0/10)
SCLC	40% (4/10)	60% (6/10)	10% (1/10)	20% (2/10)	0% (0/10)
LUAD	0% (0/10)	40% (4/10)	20% (2/10)	20% (2/10)	100% (10/10)

A lineáris C-SVC SVM modell 50%-os cut-off értékkel volt a legsikeresebb a szövettani altípusok elkülönítésének tekintetében. A táblázatból egy példát bemutatva: 70%-os cut-off értéket és lineáris C-SVC SVM-et választva látható, hogy a 30 esetből csak 6 esetben nem adódott a cut-off-t meghaladó érték: 2 minta SQ, 1 SCLC és 3 minta LUAD esetében. Azonban ezeket az eseteket is helyesen jósoljuk meg, ha a mintákat az 50%-os cut-off érték alapján osztályozzuk. Természetesen a fent leírt módszer finomhangolása a többi modellt is javíthatná. Érdeemes lehet az 50%-nál alacsonyabb küszöbértékeket (cut-off) is tesztelni, azonban ez a megközelítés minden bizonnyal nagyobb vizsgálati csoportokat és további tesztelést igényelne a vegyes differenciáltságú, például adenokarcinóma és laphámrák szövetelemeket is tartalmazó adenosquamosus karcinóma esetében.

Az öt modell pixelenkénti vizsgálatával kumulatív adatokat kaphatunk az egyes altípusokra vonatkozóan az egyes spektrumok előrejelzése alapján. Az öt modell teljesítménye összehasonlítható a szenzitivitás, a specificitás, a pozitív prediktív érték (ppv) és a negatív prediktív érték (npv) jellemzői szempontjából.

7. táblázat Az öt modell teljesítményei az egyes szubtípusokra (86)

lineáris nu-SVC SVM	SQ	LUAD	SCLC
szenzitivitás	71.290%	8.261%	84.192%
specificitás	51.706%	92.294%	87.872%
ppv	42.465%	34.895%	77.633%
npv	78.270%	66.800%	91.747%
lineáris C-SVC SVM	SQ	LUAD	SCLC
szenzitivitás	81.645%	82.890%	88.885%
specificitás	90.484%	91.442%	94.784%
ppv	81.096%	82.885%	89.495%
npv	90.791%	91.445%	94.461%
lineáris LDA	SQ	LUAD	SCLC
szenzitivitás	70.900%	20.001%	50.878%
specificitás	50.469%	100.000%	70.420%
ppv	41.715%	100.000%	46.237%
npv	77.622%	71.429%	74.141%
négyzetes LDA	SQ	LUAD	SCLC
szenzitivitás	91.562%	23.387%	68.405%
specificitás	58.896%	99.398%	83.382%
ppv	52.692%	95.107%	67.300%
npv	93.315%	72.182%	84.072%
Mahalanobis-féle LDA	SQ	LUAD	SCLC
szenzitivitás	0.005%	100.000%	0.010%
specificitás	100.000%	0.008%	100.000%
ppv	100.000%	33.335%	100.000%
npv	66.668%	100.000%	66.669%

Összességében, összhangban a betegalapú megközelítéssel, a lineáris C-SVC SVM modell bizonyult ismét a legjobbnak, 81,645 % és 88,885 % közötti szenzitivitással és 90,484 % és 94,784 % közötti specificitással a szövettani altípusok tekintetében (7. táblázat). A kvadratikus LDA modell nagyobb szenzitivitást ért el az SQ előrejelzések meghatározása során, mint a lineáris C-SVC SVM, de alacsonyabb specificitással.

Hasonlóképpen, a LUAD minták spektrumai esetében a kvadratikus LDA 99%-os specificitást adott, de szenzitivitásban elmaradt az SVM-től. A kvadratikus LDA 95,107%-os ppv-vel rendelkezik LUAD esetében, ami jobb, mint a C-SVC SVM 82,885%-os teljesítménye.

A Mahalanobis LDA általi osztályozás teljesen téves volt. A modell gyakorlatilag minden spektrumot adenokarcinómának minősített. Ezért a LUAD minták spektrumaira 100%-os szenzitivitás adódott, de a specificitás 0,008%. Az SQ és az SCLC specificitása hiába adott 100%-os értéket, mivel az szenzitivitások közel állnak a nullához.

## 5 Megbeszélés

Az infravörös spektroszkópia egy roncsolásmentes analitikai módszer. A közép-infravörös tartományban, amennyiben a vizsgált anyagok spektrális mintázata eltérő, akkor sokváltozós adatelemzési módszerekkel elkülöníthetők a minták. Ismertek infraaktív jelölőfestékek, azonban a mi megközelítésünkben kerültük ezek használatát.

A modern műszeres analitikai módszerek bevezethetősége a patológiai gyakorlatba több kérdéskörben is hasznos lehet. Az *in vitro* minták esetén elsősorban az FFPE blokkok vizsgálata esetén a klasszikus módszerek előszűrési feladatait láthatják el. Az *in vivo* megközelítésben az intraoperatív fagyasztás kérdésének *on site, at line* vagy online megválaszolását célozza. Roncsolásos (például MS) és roncsolásmentes (például IR) felosztás mellett a jelölés (például fluoreszcens festék) valamint jelölésmentes csoportosítás is ismert.

Egyszerű modellrendszerként a sejtvonalakat választva, ezek elválaszthatóságát tekintve az első kísérletsorozatban jelölésmentes analitikai infravörös képalkotást alkalmaztunk három humán sejtvonal spektrumának felvételére etanolos fixálást követően. Két eltérő eredetű rákos és egy fibroblaszt sejtvonal került kiválasztásra. A jó jel-zaj aránnyal rendelkező informatív spektrumokat a teljes hullámszámtartomány ( $4000-648\text{ cm}^{-1}$ ) átlag transzmittanciás szűrése alapján választottuk ki.

Az infravörös spektroszkópia előnyei közé tartozik a gyors mérési idő, a relatív nagy áteresztőképesség, jó kalibrációk mellett nem csak minőségi, hanem mennyiségi adatokat is szolgáltat, illetve egyidejűleg több komponens vizsgálatára is képes. Hátránya a bonyolult sokváltozós adatelemzési módszerek készítése és kiértékelése, a víz jelenléte erősen befolyásolja a spektrumot.

Elsődleges célunk volt, hogy a jelölésmentes közép-infravörös tartományban felvett spektrumok alkalmasak-e adatelemzésre? Az előkísérleteket követően a kérdések megválaszolásához megfelelő adatokat nyertünk ki.

Általános érvényű megközelítést alkalmaztunk az értékelhető spektrumok kiválogatásának problémájára, melynek során egy értelmes információgazdag alcsoportha szűkíthető le a teljes adatmennyiség. Az átlag transzmittancián alapuló szelekció nem nevezhető elterjedtnek, mivel az irodalomban fellelhető publikációkban kezdetekben főleg kézzel kiválasztott spektrumokat elemeztek tovább a szerzők, későbbiekben valamilyen sokváltozós szűrést, például hierarchikus fürtelemzést használtak. A

szubjektív kézi kiválasztáshoz képest a szelektív módszerünk előnye az objektivitás és a reprodukálhatóság a szubjektív kézi kiválasztáshoz képest. Ez az egyszerű átlagszámításon alapuló módszer megoldást adott arra, hogy megszabaduljunk a kis elnyelésű, a reflektív felületről visszaverődő, háttértől, valamint az úgynevezett deformált spektrumoktól, például a sejtek átlapolása során mért jelek esetén. Az eredmény az, hogy a sejtek valóban informatív, értékelhető spektrumai kerülnek további elemzésre.

Az ujjlenyomat régiót tartalmazó spektrum specifikus lehet a különböző normális szövetekre (az egyes szerveket alkotó alapszövetek elkülöníthetőek), valamint a különböző patológiai elváltozásokra, beleértve a jó- és rosszindulatú daganatokat is. Ez az ujjlenyomat régió jellemzőitől függ, és azonosíthatja a szövet típusát vagy magát a léziót.

Gaydou és munkatársai adatelemzési gyakorlatával ellentétben áll a mi megközelítésünkkel, mivel a spektrumokat korrekció helyett szűrtük (75). Nálunk a szűrés miatt az elemzett spektrumok száma csökkent, azonban náluk a korrekció során a spektrumok száma változatlan maradt, míg néhány hullámhossznál a mért értéket az EMSC algoritmus módosított. A végeredményt tekintve az elemzéshez szükséges minőségi bemeneti spektrumokat akár szűréssel, akár korrekciós megközelítéssel el lehetett érni. Az újszerű ötletünk az volt, hogy minden spektrumból kiszámítottuk az átlagtranszmittancia értékét, és ezt az értéket vizsgáltuk a szűrés során.

A modellünk korlátja az alumíniumgőzölt üveglemezeket használó transzreflektanciás mérési beállítás volt. Egy lehetséges diagnosztikai eszköz endoszkópba építve a szövet összecsiszolásával a csillapított teljes visszaverődésen (ATR) (93) vagy egyszerű transzmisszió alapulva is szolgálhatna megfelelő jelekkel.

Főkomponens elemzéseket végeztünk az összes vizsgált alcsoporton mind a teljes (azaz  $4000-648\text{ cm}^{-1}$ ), mind az ujjlenyomat ( $1800-648\text{ cm}^{-1}$ ) tartományon. Vizuálisan értékelve az etanolban rögzített sejtekből nyert 50-55 átlag T%-os tartomány,  $1800-648\text{ cm}^{-1}$  spektrumai mutatták a legjobb csoportosítást. Sikeresen demonstráltuk, hogy a jelölésmentes képalkotáson alapuló módszerünk alkalmas a különböző humán sejttípusok elkülönítésére a szűrt közép-infravörös spektrumok alapján. A nem-lineáris, felügyelt tanítást igénylő modellek (például mesterséges neurális hálózatok) gyorsan terjednek, azonban az eredmények és az egyes változók hatásainak értelmezése nem könnyű. Ráadásul a modell túlillesztésének kockázata sokkal nagyobb, mint a PCA

alkalmazásakor (94). Összefoglalva, a mi ajánlásunk az 1800-648  $\text{cm}^{-1}$  közép-infravörös spektrumtartomány használata diagnosztikai alkalmazásokhoz. Eredményeink alapján az átlag T% alapú szűrést érdemes megfontolni, mint modellépítés előtti spektrum előkezelést.

Felügyelt osztályozási módszerként az LDA-t választottuk, amely minden vizsgált átlag transzmissziós tartományban kielégítően jól teljesített. Az ujjlenyomat régiót kiválasztva a pontossága és a Cohen-féle kappa értékek folyamatosan magasabbak voltak, mint a teljes régiót alkalmazó modell esetében.

A tumor mikrokörnyezetét és a normál sejtmentes mátrixot nem vizsgáltuk, mivel csak a tumorsejteket és a normál sejteket hasonlítottuk össze egymással. A kísérleti beállítást továbbgondolva számos különböző normál és transzformált sejttípus spektrumát kell összegyűjteni egy spektrumkönyvtárba. További kihívást jelentő kérdés a tumorba infiltráló immunsejtek azonosítása a tumor strómájában (95).

Ezen újszerű megközelítésünk megmutatta, hogy az általánosított spektrumszűrés alkalmazása után a felügyelt vagy nem felügyelt sokváltozós elemzés lehetővé teszi a normál és tumoros minták elkülönítését még részben átfedő spektrumok esetén is. Ez az újszerű, jelölésmentes megközelítés és az optikai üvegszálfejlesztés elősegíti a közép-infravörös spektrumon alapuló képalkotó eszközök új diagnosztikai *in vivo* alkalmazásainak elterjedését. *In vitro* eredményeink arra engednek következtetni, hogy ez az újszerű módszer továbbfejleszhető *in vivo* vizsgálati rendszerré, ez az út azonban további vizsgálatokat igényel a jövőre nézve.

Sebészeti beavatkozások közben annak vizsgálatára, hogy a kimetszés elérte-e az ép szövetet kulcsfontosságú, mert a nem teljesen rezekált tumor kiújul. Bár sok esetben az operatőr szabad szemmel meg tudja állapítani, hogy a kimetszés megfelelő, azonban számos olyan szöveti makroszkópos állapot is előfordul, ahol ezt lehetetlen vagy életfontosságú anatómiai struktúrák közelsége miatt fontos a kíméletes preparálás. Ilyen esetekben napjainkban a legelterjedtebb megoldás a friss szövet kimetszése a műtéti határon, melyet gyors, fagyasztásos patológiai vizsgálatra küldenek. A beható fixálást mellőző módszer során egy H&E festést követően értesíti a patológus a mütöt, hogy szükséges-e a rezekció folytatása. Ennek a folyamata jellemzően nem rövidebb 20 percnél és a mintavételek száma erősen limitált a műtéti idő és a válaszüth tekintetében. A



rezekciós szél *on site* meghatározás éppen ezért egy olyan feladat, melyre az újszerű megközelítések bevezethetőségét széles körben vizsgálják világszerte.

A szolid tumorok teljes rezekciója általában a daganatos betegek jobb jövőbeli életminőségével és hosszú távú túlélésével párosul. A daganat kiterjedésének és a sebészi rezekciós határvonalának a pontos megítélése nemcsak intraoperatív makroszkópos megfigyelést, hanem szövettani visszaigazolást is igényel. Rutinszerűen ezt a fagyasztott metszet kéréssel erősítik meg. Égető szükség lenne precíz és gyors, intraoperatív, helyszíni módszerre, mely képes a rezekciós szélekről visszajelzést adni. Azonban mindeddig egyetlen megbízható módszer sem nyert teret a sebészet mindennapi gyakorlatában. Ennek a problémának az egyik lehetséges megoldásaként a látható fény tartományában Jansen-Winkeln és munkatársai egy ígéretes, festékmentes hiperspektrális képkalkotáson alapuló pilot vizsgálatot tettek közzé 20 vastagbélműtéten átesett beteg bevonásával a rezekciós szélek meghatározására (96).

A preoperatív biopsziás anyagoknak különös jelentősége van, és a biopsziás anyag mennyisége korlátozott. A klinikai mintavétel meghatározza a megvalósítható patológiai módszereket is. Gyakran végeznek ecsetcitológiát, azonban a sejtekre vagy sejtcsoportokra vonatkozó diagnosztikai módszerek korlátozottabbak, mint a bronchoszkópos szövetmintavétellel gyűjtött FFPE minták szövettani elemzése. Szükség van kiegészítő diagnosztikára a szövettani altípusok meghatározásához, hogy anyagot takarítsunk meg a közelgő molekuláris diagnosztika számára. Az infravörös spektroszkópia lehet az egyik ilyen eszköz (97). Az optikai szálakon alapuló technikák a bronchoszkópokkal vagy transztorakális tűkkel kombinálva szintén megzavarhatják és javíthatják a jelenlegi diagnosztikai utakat (98).

Sokáig a kissejtes és a nem kissejtes tüdőrák közötti differenciáldiagnózis volt a legfontosabb klinikopatológiai szempont. A laphámrák (SQ) és az adenokarcinóma (LUAD) a két leggyakoribb szövettani altípus. A kissejtes karcinóma (SCLC) altípusnak a legrosszabb a prognózisa. Vannak ritka daganattípusok, így a mezotelióma vagy vegyes entitások, mint az adenosquamosus karcinóma. A célzott terápiák kifejlesztése és elterjedése a rutin onkológiai kezelésben szükségessé tette az altípus-specifikus differenciálást és a kiindulási szövet meghatározását még a dedifferenciált tumorok és citológiai minták esetében is. Ez immunhisztokémiai tipizálással érhető el (99, 100). A legtöbb célzott terápia az adenokarcinóma altípusra áll rendelkezésre.

A rutinszerű szövettani szubtypizálás a hematoxilin és eozin (H&E) festésen és 5-6 immunhisztokémiai reakción alapul. A vékony metszetek alacsony száma ellenére a szövetmag mérete és konzisztenciája miatt veszélyeztetett a jó minőségű nukleinsav-izolálás megvalósíthatósága.

A fent említett szempont magyarázza az olyan új módszerek szükségességét, amelyek immunhisztokémiai reakciók nélkül képesek meghatározni egyetlen sejt vagy sejtcsoport eredetét, így több anyag marad a DNS vagy RNS izolálására és az ebből következő molekuláris patológiai elemzésre. Az infravörös spektroszkópia erre alkalmas lehet, és célunk volt osztályozási modellek felállítása. Az FT-IR differenciáldiagnosztikai alkalmazására összpontosítottunk a leggyakoribb daganattípusoknál (101). A szövettani altípusok megkülönböztetésére léteznek molekuláris, immunhisztokémiai markerek (102), azonban ezeket az összességében kis különbségeket az FT-IR nem mutatná ki, mivel várhatóan inkább egy, az altípusokra jellemző spektrális ujjlenyomatot mutatna ki, mint a specifikus fehérjék (pl. p63, TTF1) szintjén eltérő mennyiségi összetételbeli változást.

Elértük a szövettanilag jelentős tüdőtumor altípusok osztályozását. Rávilágítottunk az öt multivariáns adatelemzési modell közötti különbségekre is.

E modellek pontosságát több cut-off paraméter segítségével számoltuk ki. Minél nagyobb a pontosság, annál alacsonyabb a cut-off általában. A Mahalanobis-moddellel kapcsolatban erős torzítást figyeltünk meg, mivel minden mintát egy osztályba jósoltunk. Eredményeink szerint a legjobb elkülönítést a lineáris C-SVC SVM modell érte el 50%-os cut-off értékkel kombinálva. A cut-off érték további optimalizálásához nagyobb kohorszra lenne szükség. A pixelalapú előrejelzések is sikeresnek bizonyultak. Összességében a C-SVC SVM jobban teljesített, mint a másik 4 modell.

A lineáris C-SVC SVM módszer diszkriminatív ereje felülmúlta a többi, azonban a többi módszer egyes egyedi statisztikai mérőszámai - mint például az szenzitivitás, specificitás, ppv, npv - jobbak voltak a szövettani altípusok tekintetében. A tapasztalt patológusok rutinszerű tevékenységük során több megközelítés előnyeit kombinálják, ezért a fent említett paraméterek kiválóak (103). A lineáris C-SVC SVM szenzitivitási és specificitási értékei hasonló tartományban vannak a patológiához kapcsolódó képelemző eszközökkel, mint például a PAPNET a méhnyakkenethez (104). Az infravörös spektrális elemzés ígéretes perspektívát jelent e módszer fejlesztésére, hogy a tömegspektrometriával

segített eszközökhöz hasonlóan segítse az intraoperatív döntéshozatalt. A tömegspektrometriával történő helyes szöveti osztályozást nagy pontosság jellemezte, 90,5%-os szenzitivitással és 89,7%-os specificitással, ami összehasonlítható a mi módszerünkkel (105).

Ezek a megközelítések reprodukálhatóságot, objektivitást és nagyobb pontosságot ígérnek a tüdőtumor-diagnosztika jelenlegi módszereihez képest. Az orvostudományban egyre nagyobb szükség van a személyre szabásra, ami a differenciáldiagnosztika gyors és pontos módját igényli. A megközelítést még nem validálták nagyobb léptékben.

Összességében a különböző modellekhez a spektrumok felét használva a teljes képzési idő 2-12 órát vett igénybe. Az előrejelzési idő azonban ezekkel a modellekkel rendkívül lerövidült: 5-10 perc alatt lehetséges elvégezni. A patológia jelenlegi rutinszerű munkafolyamatában a legnagyobb késedelmet a minta előkészítése jelenti, amely a bruttó időt követően 1 napot vesz igénybe. A H&E kép alapján a kiválasztott terület infravörös felvételének ideje mindössze 46 percet vesz igénybe. A natív sebészeti minták elemzése csökkentené a diagnosztikai időközöket és lehetővé tenné a helyszíni méréseket. Az intraoperatív megközelítés másfajta detektálással is kivitelezhető lenne, pl. a Raman-spektroszkópia jobban működik vizes közegben, mint a fixálatlan, helyszíni minták.

Ezek az *in vitro* megközelítések alapul szolgálhatnak egy festékmentes intraoperatív technika kifejlesztéséhez, amely megkönnyíti a sebészeti döntéshozatalt (81, 82). Összességében *in vitro* eredményeink előrevetítik az infravörös képalkotás megvalósíthatóságát a különböző rákos altípusok azonosítására. Választható egyéb kiegészítő módszer lenne a tumortípus-specifikus tumor-asszociált DNS kimutatása, azonban klinikailag megbízható markerek egyelőre nem állnak rendelkezésre.

Az infravörös technika előnye, hogy roncsolásmentes és akár a helyszínen is alkalmazható. Módszerünket szövettanilag igazolt szövetmetszeteken fejlesztettük ki. Régóta fennálló probléma a mintavétel megfelelősége a diagnosztikai igényekhez. Az onkoteam döntéshozatala folyamatosan növekvő szöveti diagnosztikai információt igényel. Bizonyos genetikai adatokhoz újgenerációs szekvenálásra van szükség, a többi szövettani, immunhisztokémiai vagy fluoreszcens *in situ* hibridizációs információra. Az infravörös spektroszkópia kevesebb vagy minimális mennyiségű szövetből is szolgáltat szükséges adatokat. Ez azt jelenti, hogy a biopsziás anyagot más szükséges

módszerekhez megspórolják, ezért kevesebb vagy minimális invazív mintavétel is elegendő lenne (106).

A megfelelő cut-off érték kiválasztása biztosítja az elemzés specificitását. Ezért a különböző szövettani altípusok területeit tartalmazó daganatokon, például a tüdő adenosquamosus karcinómákon lehetne tesztelni a módszerek esetleg alacsonyabb cut-off-értékeinek megvalósíthatóságát. Ez javíthatná az elválasztás erejét. A szövettani altípusok területeit tartalmazó daganatokon, például a tüdő adenosquamosus karcinómák a tüdő nem kissejtes karcinómájának ritka, vegyes differenciálódású altípusa, amely az esetek 0,4-4%-át teszi ki. A p63 IHC-reakció a laphámkomponens azonosításának eszköze. A legalacsonyabb cut-off értéket nagyszámú vegyes entitáson lehetett meghatározni.

Az infravörös képalkotás alkalmas lehet a tüdőrák altípusainak azonosítására, ezért kevesebb tárgylemezre lenne szükség az IHC vizsgálathoz, és több szövet maradna meg a molekuláris patológia számára a lehetséges új terápiák kiválasztásához. Nagyobb adathalmazokat kell elemezni eredményeink további alátámasztásához.

Vizsgálatunkban a közép-infravörös képalkotás címkézésmentes módszerét alkalmaztuk három tüdőrák altípus spektrumának felvételére. LDA-t és SVM-et végeztünk az összes vizsgált alcsoporton az ujjlenyomat közép-infravörös tartományban. Eredményeink alapján az SVM modellek jobban teljesítettek, bár a spektrális előkezelések tovább növelhetik a pontosságot, ezért ez egy további lehetőség lehet. Sikeresen bizonyítottuk infravörös módszerünk megvalósíthatóságát a malignus daganatszövet altípusok elkülönítésére a kiemelt tartományú, jelölésmentes közép-infravörös spektrumok alapján. Összefoglalva, adataink a transzflektív optikai készlet és az  $1800\text{-}648\text{ cm}^{-1}$  spektrumtartomány használatát javasolják a spektrumok kinyeréséhez.

## 6 Következtetések

**Az alábbi új megállapítások tesszük:**

1. Az infravörös spektroszkópia transzflektanciás mérési elrendezését különböző szervek, eltérő entitású daganatos sejtvonalai diagnosztikus vizsgálatára bevezetve, kifejlesztettük az átlag transzmittancia alapú szűrést. Ezáltal a zaj és háttérspektrumot sikerült minimalizálni.
2. A daganatos sejtvonalakon az átlagtranszmittancia sávokat 5 T%-os sávokon kiértékelve az optimális tartománynak az 55-60 T%-ot tartjuk.
3. Az eltérő entitású daganatos sejtvonalakon a teljes és ujjlenyomat régió összevetése, valamint a felügyelt és nem felügyelt sokváltozós adatelemzési módszerünk egyaránt kimutatta, hogy az ujjlenyomat régió a daganatos sejtvonalak jobb elkülönítését eredményezi.
4. Infravörös spektroszkópiai elemzéssel a tüdőrák különböző szövettani altípusainak szétválasztását sikerült deparaffinált mintákon megvalósítani, mellyel a jövőben több biopsziás szövetminta maradhat molekuláris tipizálásra.
5. FFPE mintákon a tüdőrák különböző szövettani altípusainak elkülönítésére jelölésmentes módszert fejlesztettünk ki a kiértékelhető spektrumok alapján.

## 7 Összefoglalás

A rosszindulatú daganatok halálozása a terápiás modalitások fejlődése ellenére még mindig magas. A sebészi reszekciós margók makroszkópos megítélése bizonytalan, ezért a probléma megoldására az utóbbi évtizedben megjelentek a nagy adatmennyiségen alapuló képkalkotó megközelítések (tömegspektrometria, kétfoton-mikroszkópia, infravörös- és Raman-spektroszkópia). Az élettudományokhoz kapcsolódó közép- és közeli infravörös alapú mikroszkópos technikák exponenciálisan fejlődtek, különösen az elmúlt évtizedben. A rezgésspektroszkópia egy potenciális, roncsolásmentes megközelítés a rosszindulatú daganatok vizsgálatára. Célunk a különböző transzformált (A-375, HT-29) és nem transzformált (CCD986SK) sejtvonalak azonosítása és elkülönítése, illetve a tüdőrák szövettani altípusainak a megkülönböztetése a jelölésmentes közép-infravörös spektrumok alapján, felügyelt és nem felügyelt többváltozós elemzések segítségével. Jelölésmentes, transzflektanciás optikai mérést alkalmaztunk a közép-infravörös tartományban. Mind a teljes ( $4000-648\text{ cm}^{-1}$ ), mind az „ujjlenyomat” tartományokat ( $1800-648\text{ cm}^{-1}$ ) teszteltük az etanolban rögzített sejtvonalakon, illetve a deparaffinált tüdőrák minták metszeteit tartalmazó területeken. A nem-sejtes spektrumokat ki lehetett zárni a 90% feletti átlagtranszmittancia alapján. A sejtvonalak elkülönítésére sikerült kifejleszteni az átlagtranszmittancia alapú spektrumszűrési módszert, mind a főkomponens elemzéssel, mind pedig a lineáris diszkriminancia analízissel. A legjobb elkülönítést az ujjlenyomat régió eredményezte 99,84%-os pontossággal a 70-75% átlag transzmittancia tartományban. Összességében a különböző eredetű szöveteket modellező egyedi sejtvonalak elkülönítésére a kidolgozott *in vitro* megközelítésünk képes volt. Az eltérő tüdőrák szövettani típusok vizsgálata során a 3 LDA modell és 2 SVM modellek esetében minél magasabb volt a küszöbérték (cut off), annál kisebb volt a pontosság. A lineáris C-SVC SVM a legjobb (100%-os) pontosságot eredményezte mindhárom tüdőrák altípus esetében, 50%-os küszöbértéket használva. A megfelelő adatkezelés és spektrumfeldolgozás kulcsfontosságú lépések a jelölésmentes technika intraoperatív sebészeti alkalmazására. A közép-infravörös képkalkotás felhasználható az FFPE tüdőrák altípusainak megkülönböztetésére. A felügyelt többváltozós eszközök ígéretesek a tüdőtumor altípusok pontos elkülönítésére. A hosszú távú perspektíva egy spektroszkópia-alapú diagnosztikai eszköz kifejlesztése.

## 8 Summary

Mortality of malignant tumours is still high despite the presence of advanced therapeutic modalities. The macroscopic assessment of surgical resection margins is uncertain, and imaging approaches based on big data (mass spectrometry, two-photon microscopy, infrared and Raman spectroscopy) have emerged to solve this problem. Life science related mid- and near-infrared microscopy techniques have evolved exponentially, especially in the last decade. Vibrational spectroscopy is a potential non-destructive approach for the investigation of malignant tumours. Our aim is to identify and separate different transformed (A-375, HT-29) and non-transformed (CCD986SK) cell lines and to distinguish histological subtypes of lung cancer based on label-free mid-infrared spectra using supervised and unsupervised multivariate analyses. Label-free transreflectance optical setup was used. Both the full (4000-648  $\text{cm}^{-1}$ ) and "fingerprint" ranges (1800-648  $\text{cm}^{-1}$ ) were tested on cell lines fixed in ethanol and on deparaffinized lung cancer samples. Cell-free spectra could be excluded based on their average transmittance above 90%. The spectra filtering method based on mean transmittance was developed for the separation of cell lines, both by principal component analysis and linear discriminant analysis. The best separation was obtained for the fingerprint region with accuracy of 99.84% in the mean transmittance range of 70-75%. Overall, our *in vitro* approach was able to separate individual cell lines modeling tissues of different origins. When examining different lung cancer histological subtypes, the higher the cut-off for the 3 LDA models and 2 SVM models, the lower the accuracy. The linear C-SVC SVM resulted in the best (100%) accuracy for all three lung cancer subtypes using 50% cut-off. Proper data management and spectral processing are key steps for intraoperative surgical application of this label-free technique. Mid-infrared imaging can be used to differentiate between FFPE lung cancer subtypes. Supervised multivariate tools hold promise for accurate differentiation of lung tumor subtypes. The long-term perspective is to develop a spectroscopy-based diagnostic tool.

## 9 Irodalomjegyzék

1. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins basic pathology. Elsevier Health Sciences 2017.
2. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. (2019) An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*, 1897: 289-298.
3. Buermans HP, den Dunnen JT. (2014) Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta*, 1842: 1932-1941.
4. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale AL. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 10869-10874.
5. Lesurf R, Aure MR, Mork HH, Vitelli V, Oslo Breast Cancer Research C, Lundgren S, Borresen-Dale AL, Kristensen V, Warnberg F, Hallett M, Sorlie T. (2016) Molecular Features of Subtype-Specific Progression from Ductal Carcinoma In Situ to Invasive Breast Cancer. *Cell Rep*, 16: 1166-1179.
6. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, Budczies J, Darb-Esfahani S, Kronenwett R, Hanusch C, Törne Cv, Weichert W, Engels K, Solbach C, Schrader I, Dietel M, Minckwitz Gv. (2010) Tumor-Associated Lymphocytes As an Independent Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28: 105-113.
7. Maibach F, Sadozai H, Seyed Jafari SM, Hunger RE, Schenk M. (2020) Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Prognostic Value in Cutaneous Melanoma. *Frontiers in Immunology*, 11.
8. Tóvári J. (2015) [Potential role of patient-derived tumor xenografts (PDXs) in the selection of optimal therapeutic strategy]. *Magy Onkol*, 59: 324-328.
9. Cortesi M, Liverani C, Mercatali L, Ibrahim T, Giordano E. (2020) An in-silico study of cancer cell survival and spatial distribution within a 3D microenvironment. *Scientific Reports*, 10: 12976.
10. Dolgin E. (2018) Bringing down the cost of cancer treatment. *Nature*, 555: S26-S29.



11. Prades J, Remue E, van Hoof E, Borrás JM. (2015) Is it worth reorganising cancer services on the basis of multidisciplinary teams (MDTs)? A systematic review of the objectives and organisation of MDTs and their impact on patient outcomes. *Health Policy*, 119: 464-474.
12. Szende B. *Pathologia. Medicina Könyvkiadó Rt.* 1999: 640.
13. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68: 394-424.
14. Wéber A, Szatmári I, Dobozi M, Hilbert L, Branyiczkiné Géczy G, Nagy P, Kásler M, Polgár C, Kenessey I. (2022) A Központi Statisztikai Hivatal halálozási adatainak összevetése a Nemzeti Rákregiszter adatbázisával.: Egy adat-összekapcsolás tanulságai. *Orvosi Hetilap*, 163: 1481-1489.
15. Schabath MB, Cote ML. (2019) Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 28: 1563-1579.
16. Pokol G, J. S. *Analitikai kémia I. Műegyetemi kiadó, Budapest, 2003.*
17. Krafft C, Codrich D, Pelizzo G, Sergio V. (2008) Raman and FTIR imaging of lung tissue: Methodology for control samples. *Vibrational Spectroscopy*, 46: 141-149.
18. Krafft C, Sergio V. (2006) Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues. *Spectroscopy*, 20: 738186.
19. Szabo E, Gergely S, Spaits T, Simon T, Salgo A. (2019) Near-infrared spectroscopy-based methods for quantitative determination of active pharmaceutical ingredient in transdermal gel formulations. *Spectroscopy Letters*, doi:10.1080/00387010.2019.1681459.
20. Baumann WJ, Madson TH, Weseman BJ. (1972) "Plasmalogen-type" cyclic acetals: formation and conformation of the 1,3-dioxanes and 1,3-dioxolanes from 1-0-cis-alk-1'-enyl-sn-glycerols. *J Lipid Res*, 13: 640-650.
21. O'Sullivan A, O'Connor B, Kelly A, McGrath MJ. (1999) The use of chemical and infrared methods for analysis of milk and dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 52: 139-148.
22. Goulden JDS. (1964) Analysis of milk by infra-red absorption. *Journal of Dairy Research*, 31: 273.

23. GarciaJares CM, Medina B. (1997) Application of multivariate calibration to the simultaneous routine determination of ethanol, glycerol, fructose, glucose and total residual sugars in botrytized-grape sweet wines by means of near-infrared reflectance spectroscopy. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 357: 86-91.
24. Nieuwoudt HH, Prior BA, Pretorius IS, Manley M, Bauer FF. (2004) Principal component analysis applied to Fourier transform infrared spectroscopy for the design of calibration sets for glycerol prediction models in wine and for the detection and classification of outlier samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 3726-3735.
25. Kays SE, Barton FE, Windham WR. (2000) Predicting Protein Content by near Infrared Reflectance Spectroscopy in Diverse Cereal Food Products. 8: 35-43.
26. Gergely S, Salgo A. (2005) Changes in carbohydrate content during wheat maturation - what is measured by near infrared spectroscopy? *Journal of near Infrared Spectroscopy*, 13: 9-17.
27. Huang H, Yu H, Xu H, Ying Y. (2008) Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. *Journal of Food Engineering*, 87: 303-313.
28. Juriga D, Laszlo I, Ludanyi K, Klebovich I, Chae CH, Zrinyi M. (2018) Kinetics of dopamine release from poly(aspartamide)-based prodrugs. *Acta Biomater*, 76: 225-238.
29. Juriga D, Kalman EE, Toth K, Barczikai D, Szollosi D, Foldes A, Varga G, Zrinyi M, Jedlovszky-Hajdu A, Nagy KS. (2022) Analysis of Three-Dimensional Cell Migration in Dopamine-Modified Poly(aspartic acid)-Based Hydrogels. *Gels*, 8.
30. Balan V, Mihai CT, Cojocaru FD, Uritu CM, Dodi G, Botezat D, Gardikiotis I. (2019) Vibrational Spectroscopy Fingerprinting in Medicine: from Molecular to Clinical Practice. *Materials*, 12.
31. Barth A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767: 1073-1101.
32. Gergely S. Gabonák nyeranyag minősítése: közeli infravörös spektroszkópia. (Economics BUoTa szerk.), 2005.
33. Gergely S. Gabonák nyeranyag minősítése: Közeli infravörös spektroszkópia. BME, Budapest, 2005.

34. Balázs G, Bugyi Z, Gergely S, Hegyi A, Hevér A, Salgó A, Tömösközi S. Élelmiszeranalitika gyors és automatizált módszerei. Nemzeti Tankönyvkiadó2011.
35. Barth A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1767: 1073-1101.
36. Gergely S. Personal communication of the optical setups. 2012.
37. Lu G, Halig L, Wang D, Qin X, Chen ZG, Fei B. (2014) Spectral-spatial classification for noninvasive cancer detection using hyperspectral imaging. *J Biomed Opt*, 19: 106004.
38. Lyon RC, Lester DS, Lewis EN, Lee E, Yu LX, Jefferson EH, Hussain AS. (2002) Near-infrared spectral imaging for quality assurance of pharmaceutical products: analysis of tablets to assess powder blend homogeneity. *AAPS PharmSciTech*, 3: E17.
39. Nazabal V, Adam J-L. (2022) (INVITED)Infrared luminescence of chalcogenide glasses doped with rare earth ions and their potential applications. *Optical Materials: X*, 15: 100168.
40. Wu Y, Meneghetti M, Troles J, Adam J-L. (2018) Chalcogenide Microstructured Optical Fibers for Mid-Infrared Supercontinuum Generation: Interest, Fabrication, and Applications. *Applied Sciences*, 8: 1637.
41. Jackson S. Mid-Infrared Fiber Sources: Challenges and Opportunities. In: *Frontiers in Optics 2014*, doi:10.1364/FIO.2014.FW1D.1. Optica Publishing Group, Tucson, Arizona, 2014: FW1D.1.
42. Dhanoa MS, Lister SJ, Sanderson R, Barnes RJ. (1994) The Link between Multiplicative Scatter Correction (MSC) and Standard Normal Variate (SNV) Transformations of NIR Spectra. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 2: 43-47.
43. Fearn T, Riccioli C, Garrido-Varo A, Guerrero-Ginel JE. (2009) On the geometry of SNV and MSC. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 96: 22-26.
44. Afseth NK, Kohler A. (2012) Extended multiplicative signal correction in vibrational spectroscopy, a tutorial. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 117: 92-99.
45. Tryon RC. (1939) *Cluster Analysis*. Edwards Brothers: 122.

46. Greene D, Cunningham P, Mayer R. (2008) Unsupervised Learning and Clustering. *Machine Learning Techniques for Multimedia: Case Studies on Organization and Retrieval*, doi:Doi 10.1007/978-3-540-75171-7\_3: 51-90.
47. James G, Witten D, Hastie T, Tibshirani R. Classification. In: *An Introduction to Statistical Learning: with Applications in R*, doi:10.1007/978-1-0716-1418-1\_4. Springer US, New York, NY, 2021: 129-195.
48. Kontsek E. Személyes közlés. 2023.
49. Widjaja E, Zheng W, Huang Z. (2008) Classification of colonic tissues using near-infrared Raman spectroscopy and support vector machines. *Int J Oncol*, 32: 653-662.
50. Chang C-C, Lin C-J. (2001) Training v-Support Vector Classifiers: Theory and Algorithms. *Neural Computation*, 13: 2119-2147.
51. McCulloch WS, Pitts W. (1943) A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *The bulletin of mathematical biophysics*, 5: 115-133.
52. Rosenblatt F. (1958) The perceptron: a probabilistic model for information storage and organization in the brain. *Psychol Rev*, 65: 386-408.
53. Rumelhart DE, Hinton GE, Williams RJ. (1986) Learning representations by back-propagating errors. *Nature*, 323: 533-536.
54. LeCun Y, Bengio Y, Hinton G. (2015) Deep learning. *Nature*, 521: 436-444.
55. Sokolova M, Lapalme G. (2009) A systematic analysis of performance measures for classification tasks. *Information Processing & Management*, 45: 427-437.
56. Jobsis FF. (1977) Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science*, 198: 1264-1267.
57. Kleiser S, Hyttel-Sorensen S, Greisen G, Wolf M. (2016) Comparison of Near-Infrared Oximeters in a Liquid Optical Phantom with Varying Intralipid and Blood Content. *Adv Exp Med Biol*, 876: 413-418.
58. Herold F, Gronwald T, Scholkmann F, Zohdi H, Wyser D, Müller NG, Hamacher D. New Directions in Exercise Prescription: Is There a Role for Brain-Derived Parameters Obtained by Functional Near-Infrared Spectroscopy? In: *Brain Sciences Vol. 10*, 2020.
59. Dominik GW, Christoph MK, Lena S, Olivier L, Martin W, Felix S, Roger G. (2022) Characterizing reproducibility of cerebral hemodynamic responses when

- applying short-channel regression in functional near-infrared spectroscopy. *Neurophotonics*, 9: 015004.
60. Le Naour F, Bralet MP, Debois D, Sandt C, Guettier C, Dumas P, Brunelle A, Laprevote O. (2009) Chemical Imaging on Liver Steatosis Using Synchrotron Infrared and ToF-SIMS Microspectroscopies. *Plos One*, 4.
  61. Bunaciu AA, Hoang VD, Aboul-Enein HY. (2017) Vibrational Micro-Spectroscopy of Human Tissues Analysis: Review. *Crit Rev Anal Chem*, 47: 194-203.
  62. Haque A, Faizi MS, Rather JA, Khan MS. (2017) Next generation NIR fluorophores for tumor imaging and fluorescence-guided surgery: A review. *Bioorg Med Chem*, 25: 2017-2034.
  63. Wolthuis R, Travo A, Nicolet C, Neuville A, Gaub MP, Guenot D, Ly E, Manfait M, Jeannesson P, Piott O. (2008) IR Spectral Imaging for Histopathological Characterization of Xenografted Human Colon Carcinomas. *Analytical Chemistry*, 80: 8461-8469.
  64. Silva JSF, Silva JYR, de Sa GF, Araujo SS, Filho MAG, Ronconi CM, Santos TC, Junior SA. (2018) Multifunctional System Polyaniline-Decorated ZIF-8 Nanoparticles as a New Chemo-Photothermal Platform for Cancer Therapy. *ACS Omega*, 3: 12147-12157.
  65. Oh Y, Quan YH, Choi Y, Kim CK, Kim H, Kim HK, Kim BM. (2013) Intraoperative combined color and fluorescent images-based sentinel node mapping in the porcine lung: Comparison of indocyanine green with or without albumin premixing. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 146: 1509-1515.
  66. Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, Masuda K, Tamura S, Aoki T, Hasegawa K, Beck Y, Fukayama M, Kokudo N. (2009) Real-Time Identification of Liver Cancers by Using Indocyanine Green Fluorescent Imaging. *Cancer*, 115: 2491-2504.
  67. Köller A, Grzegorzewski J, Tautenhahn H-M, König M. (2021) Prediction of Survival After Partial Hepatectomy Using a Physiologically Based Pharmacokinetic Model of Indocyanine Green Liver Function Tests. *Frontiers in Physiology*, 12.

68. Bogomolov A, Belikova V, Zabarylo UJ, Bibikova O, Usenov I, Sakharova T, Krause H, Minet O, Feliksberger E, Artyushenko V. (2017) Synergy Effect of Combining Fluorescence and Mid Infrared Fiber Spectroscopy for Kidney Tumor Diagnostics. *Sensors (Basel)*, 17.
69. Sojka L, Tang Z, Furniss D, Sakr H, Fang Y, Beres-Pawlik E, Benson TM, Seddon AB, Sujecki S. (2017) Mid-infrared emission in Tb<sup>3+</sup>-doped selenide glass fiber. *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics*, 34: A70-A79.
70. Nallala J, Lloyd GR, Hermes M, Shepherd N, Stone N. (2017) Enhanced spectral histology in the colon using high-magnification benchtop FTIR imaging. *Vibrational Spectroscopy*, 91: 83-91.
71. Joro R, Laaperi AL, Dastidar P, Soimakallio S, Kuukasjarvi T, Toivonen T, Saaristo R, Jarvenpaa R. (2008) Imaging of breast cancer with mid- and long-wave infrared camera. *J Med Eng Technol*, 32: 189-197.
72. Paraskevaidi M, Morais CLM, Lima KMG, Ashton KM, Stringfellow HF, Martin-Hirsch PL, Martin FL. (2018) Potential of mid-infrared spectroscopy as a non-invasive diagnostic test in urine for endometrial or ovarian cancer. *Analyst*, 143: 3156-3163.
73. Zohdi V, Whelan DR, Wood BR, Pearson JT, Bambery KR, Black MJ. (2015) Importance of tissue preparation methods in FTIR micro-spectroscopical analysis of biological tissues: 'traps for new users'. *PLoS One*, 10: e0116491.
74. Sreedhar H, Varma VK, Nguyen PL, Davidson B, Akkina S, Guzman G, Setty S, Kajdacsy-Balla A, Walsh MJ. (2015) High-definition Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopic imaging of human tissue sections towards improving pathology. *J Vis Exp*, doi:10.3791/52332: 52332.
75. Gaydou V, Polette M, Gobinet C, Kileztky C, Angiboust JF, Manfait M, Birernbaut P, Piot O. (2016) Vibrational Analysis of Lung Tumor Cell Lines: Implementation of an Invasiveness Scale Based on the Cell Infrared Signatures. *Analytical Chemistry*, 88: 8459-8467.
76. Orosco RK, Tapia VJ, Califano JA, Clary B, Cohen EEW, Kane C, Lippman SM, Messer K, Molinolo A, Murphy JD, Pang J, Sacco A, Tringale KR, Wallace A, Nguyen QT. (2018) Positive Surgical Margins in the 10 Most Common Solid Cancers. *Scientific Reports*, 8.

77. Jones EA, Simon D, Karancsi T, Balog J, Pringle SD, Takats Z. (2019) Matrix Assisted Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem*, 91: 9784-9791.
78. Tzafetas M, Mitra A, Paraskevaidi M, Bodai Z, Kalliala I, Bowden S, Lathouras K, Rosini F, Szasz M, Savage A, Manoli E, Balog J, McKenzie J, Lyons D, Bennett P, MacIntyre D, Ghaem-Maghani S, Takats Z, Kyrgiou M. (2020) The intelligent knife (iKnife) and its intraoperative diagnostic advantage for the treatment of cervical disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117: 7338-7346.
79. Balog J, Sasi-Szabó L, Kinross J, Lewis MR, Muirhead LJ, Veselkov K, Mirnezami R, Dezsó B, Damjanovich L, Darzi A, Nicholson JK, Takáts Z. (2013) Intraoperative Tissue Identification Using Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry. *Science Translational Medicine*, 5: 194ra193-194ra193.
80. Grosserueschkamp F, Kallenbach-Thieltges A, Behrens T, Bruning T, Altmayer M, Stamatis G, Theegarten D, Gerwert K. (2015) Marker-free automated histopathological annotation of lung tumour subtypes by FTIR imaging. *Analyst*, 140: 2114-2120.
81. Petersen D, Mavarani L, Niedieker D, Freier E, Tannapfel A, Kotting C, Gerwert K, El-Mashtoly SF. (2017) Virtual staining of colon cancer tissue by label-free Raman micro-spectroscopy. *Analyst*, 142: 1207-1215.
82. Grosserueschkamp F, Kallenbach-Thieltges A, Behrens T, Bruning T, Altmayer M, Stamatis G, Theegarten D, Gerwert K. (2015) Marker-free automated histopathological annotation of lung tumour subtypes by FTIR imaging. *Analyst*, 140: 2114-2120.
83. Gaydou V, Polette M, Gobinet C, Kileztky C, Angiboust JF, Birembaut P, Vuiblet V, Piot O. (2019) New insights into spectral histopathology: infrared-based scoring of tumour aggressiveness of squamous cell lung carcinomas. *Chem Sci*, 10: 4246-4258.
84. Akalin A, Mu X, Kon MA, Ergin A, Remiszewski SH, Thompson CM, Raz DJ, Diem M, Bird B, Miljkovic M. (2015) Classification of malignant and benign tumors of the lung by infrared spectral histopathology (SHP). *Lab Invest*, 95: 406-421.

85. Kontsek E, Pesti A, Bjornstedt M, Uveges T, Szabo E, Garay T, Gordon P, Gergely S, Kiss A. (2020) Mid-Infrared Imaging Is Able to Characterize and Separate Cancer Cell Lines. *Pathol Oncol Res*, 26: 2401-2407.
86. Kontsek E, Pesti A, Slezsak J, Gordon P, Tornoczki T, Smuk G, Gergely S, Kiss A. (2022) Mid-Infrared Imaging Characterization to Differentiate Lung Cancer Subtypes. *Pathol Oncol Res*, 28: 1610439.
87. Perez-Guaita D, Kuligowski J, Quintas G, Garrigues S, de la Guardia M. (2013) Atmospheric compensation in Fourier transform infrared (FT-IR) spectra of clinical samples. *Appl Spectrosc*, 67: 1339-1342.
88. Hoult RA. Angle of rotation sensor having a rotating annular magnet and two ferritic stator halves. United States, 2003.
89. Hastie T, Tibshirani R, Friedman JH. The elements of statistical learning : data mining, inference, and prediction. Springer, New York, NY, 2009.
90. Ashby D. (1991) Practical statistics for medical research. *Statistics in Medicine*, 10: 1635-1636.
91. Landis JR, Koch GG. (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33: 159-174.
92. Üveges T. Tumoros sejtvonalak infravörös mikroszkópiai vizsgálata - BSC dolgozat. Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, 2015.
93. Chan KLA, Kazarian SG. (2016) Attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) imaging of tissues and live cells. *Chemical Society Reviews*, 45: 1850-1864.
94. Smialowski P, Frishman D, Kramer S. (2010) Pitfalls of supervised feature selection. *Bioinformatics*, 26: 440-443.
95. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, Christie M, van de Vijver K, Estrada MV, Gonzalez-Ericsson PI, Sanders M, Solomon B, Solinas C, Van den Eynden G, Allory Y, Preusser M, Hainfellner J, Pruneri G, Vingiani A, Demaria S, Symmans F, Nuciforo P, Comerma L, Thompson EA, Lakhani S, Kim SR, Schnitt S, Colpaert C, Sotiriou C, Scherer SJ, Ignatiadis M, Badve S, Pierce RH, Viale G, Sirtaine N, Penault-Llorca F, Sugie T, Fineberg S, Paik S, Srinivasan A, Richardson A, Wang Y, Chmielik E, Brock J, Johnson DB, Balko J, Wienert S, Bossuyt V, Michiels S, Ternes N, Burchardi N, Luen SJ, Savas P,



- Klauschen F, Watson PH, Nelson BH, Criscitiello C, O'Toole S, Larsimont D, de Wind R, Curigliano G, Andre F, Lacroix-Triki M, van de Vijver M, Rojo F, Floris G, Bedri S, Sparano J, Rimm D, Nielsen T, Kos Z, Hewitt S, Singh B, Farshid G, Loibl S, Allison KH, Tung N, Adams S, Willard-Gallo K, Horlings HM, Gandhi L, Moreira A, Hirsch F, Dieci MV, Urbanowicz M, Brcic I, Korski K, Gaire F, Koeppen H, Lo A, Giltnane J, Rebelatto MC, Steele KE, Zha J, Emancipator K, Juco JW, Denkert C, Reis-Filho J, Loi S, Fox SB. (2017) Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research. *Adv Anat Pathol*, 24: 235-251.
96. Jansen-Winkeln B, Holfert N, Kohler H, Moulla Y, Takoh JP, Rabe SM, Mehdorn M, Barberio M, Chalopin C, Neumuth T, Gockel I. (2019) Determination of the transection margin during colorectal resection with hyperspectral imaging (HSI). *Int J Colorectal Dis*, 34: 731-739.
97. Finlayson D, Rinaldi C, Baker MJ. (2019) Is Infrared Spectroscopy Ready for the Clinic? *Analytical Chemistry*, 91: 12117-12128.
98. Fernandes S, Williams G, Williams E, Ehrlich K, Stone J, Finlayson N, Bradley M, Thomson RR, Akram AR, Dhaliwal K. (2021) Solitary pulmonary nodule imaging approaches and the role of optical fibre-based technologies. *European Respiratory Journal*, 57.
99. Loo PS, Thomas SC, Nicolson MC, Fyfe MN, Kerr KM. (2010) Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol*, 5: 442-447.
100. Rossi G, Pelosi G, Graziano P, Barbareschi M, Papotti M. (2009) A reevaluation of the clinical significance of histological subtyping of non--small-cell lung carcinoma: diagnostic algorithms in the era of personalized treatments. *Int J Surg Pathol*, 17: 206-218.
101. Su KY, Lee WL. (2020) Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Cancer Screening and Diagnostic Tool: A Review and Prospects. *Cancers*, 12.

102. Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, Warth A, Russell PA, Lantuejoul S, Beasley MB, Thunnissen E, Pelosi G, Rekhtman N, Bubendorf L, Mino-Kenudson M, Yoshida A, Geisinger KR, Noguchi M, Chirieac LR, Bolting J, Chung JH, Chou TY, Chen G, Poleri C, Lopez-Rios F, Papotti M, Sholl LM, Roden AC, Travis WD, Hirsch FR, Kerr KM, Tsao MS, Nicholson AG, Wistuba I, Moreira AL. (2019) Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer. *J Thorac Oncol*, 14: 377-407.
103. Paech DC, Weston AR, Pavlakis N, Gill A, Rajan N, Barraclough H, Fitzgerald B, Van Kooten M. (2011) A systematic review of the interobserver variability for histology in the differentiation between squamous and nonsquamous non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 6: 55-63.
104. Irwig L, Macaskill P, Farnsworth A, Wright RG, McCool J, Barratt A, Simpson JM. (2004) A randomized crossover trial of PAPNET for primary cervical screening. *J Clin Epidemiol*, 57: 75-81.
105. Phelps DL, Balog J, Gildea LF, Bodai Z, Savage A, El-Bahrawy MA, Speller AV, Rosini F, Kudo H, McKenzie JS, Brown R, Takats Z, Ghaem-Maghami S. (2018) The surgical intelligent knife distinguishes normal, borderline and malignant gynaecological tissues using rapid evaporative ionisation mass spectrometry (REIMS). *Br J Cancer*, 118: 1349-1358.
106. Tian P, Wang Y, Li L, Zhou Y, Luo W, Li W. (2017) CT-guided transthoracic core needle biopsy for small pulmonary lesions: diagnostic performance and adequacy for molecular testing. *J Thorac Dis*, 9: 333-343.

## 10 Saját publikációk jegyzéke

### 10.1 Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

- **E. Kontsek**, A. Pesti, M. Bjornstedt, T. Uveges, E. Szabo, T. Garay, P. Gordon, S. Gergely, A. Kiss, Mid-Infrared Imaging Is Able to Characterize and Separate Cancer Cell Lines. *Pathol Oncol Res*, 2020. 26(4): p. 2401-2407. (2020) <https://doi.org/10.1007/s12253-020-00825-z> **IF=3,201**
- **E. Kontsek**, A. Pesti, J. Slezsak, P. Gordon, T. Tornoczki, G. Smuk, S. Gergely, A. Kiss, Mid-Infrared Imaging Characterization to Differentiate Lung Cancer Subtypes. *Pathol Oncol Res*, 2022. 28: p. 1610439. <https://doi.org/10.3389/pore.2022.1610439> **IF=2,874**

### 10.2 Disszertációhoz közvetlenül nem kapcsolódó közlemények

- Balogh, Judit ; Szócska, Miklós ; Palicz, Tamás ; Kontsek, Endre ; Pollner, Péter ; Varga, Gergely ; Ugrin, Irina ; Davidovics, Krisztina ; Joó, Tamás A mesterséges intelligencia alapú megoldások fejlesztése és bevezetése az egészségügyben – kézműves manufaktúrától a gyártósig? *IME: INTERDISZCIPLINÁRIS MAGYAR EGÉSZSÉGÜGY / INFORMATIKA ÉS MENEDZSMENT AZ EGÉSZSÉGÜGYBEN* 21 : 2 pp. 56-63. , 8 p. (2022) <https://doi.org/10.53020%2FIME-2022-206>
- Pataki, Bálint Ármin ; Olar, Alex ; Ribli, Dezső ; Pesti, Adrián ; Kontsek, Endre ; Gyöngyösi, Benedek ; Bilecz, Ágnes ; Kovács, Tekla ; Kovács, Kristóf Attila ; Kramer, Zsófia ; Kiss, András ; Szócska, Miklós ; Pollner, Péter ; Csabai, István HunCRC: annotated pathological slides to enhance deep learning applications in colorectal cancer screening *SCIENTIFIC DATA* 9 : 1 Paper: 370 , 7 p. (2022) <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01450-y> **IF: 8,501**
- Elek, Zsuzsanna ; Rónai, Zsolt ; Keszler, Gergely ; Harsányi, László ; Kontsek, Endre ; Herold, Zoltán ; Herold, Magdolna ; Somogyi, Anikó ; Bánlaki, Zsófia Correlation between Expression Profiles of Key Signaling Genes in Colorectal Cancer Samples from Type 2 Diabetic and Non-Diabetic Patients *LIFE-BASEL* 10 : 9 Paper: 216 (2020) <https://doi.org/10.3390/life10090216> **IF: 3,817**

- Lendvai, G. ; Szekerczés, T. ; Illyés, I. ; Dóra, R. ; Kontsek, E. ; Gógl, A. ; Kiss, A. ; Werling, K. ; Kovalszky, I. ; Schaff, Z. ; Borka, K Cholangiocarcinoma: Classification, Histopathology and Molecular Carcinogenesis PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 26 : 1 pp. 3-15. , 13 p. (2020) <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0491-8> **IF: 3,201**
- Lendvai, Gábor ; Szekerczés, Tímea ; Kontsek, Endre ; Selvam, Arun ; Szakos, Attila ; Schaff, Zsuzsa ; Björnstedt, Mikael ; Kiss, András The Effect of Methylselenocysteine and Sodium Selenite Treatment on microRNA Expression in Liver Cancer Cell Lines PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 26 : 4 pp. 2669-2681. , 13 p. (2020) <https://doi.org/10.1007/s12253-020-00870-8> **IF: 3,201**
- Lendvai, Gábor ; Szekerczés, Tímea ; Gyöngyösi, Benedek ; Schlachter, Krisztina ; Kontsek, Endre ; Pesti, Adrián ; Patonai, Attila ; Werling, Klára ; Kovalszky, Ilona ; Schaff, Zsuzsa ; Kiss, András MicroRNA Expression in Focal Nodular Hyperplasia in Comparison with Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 25 : 3 pp. 1103-1109. , 7 p. (2019) <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0528-z> **IF: 2,826**

## 11 Köszönetnyilvánítás

Elsőként, témavezetőmnak Prof. Kiss Andrásnak ezúton is szeretnék köszönetet mondani, hogy a hazai és nemzetközi kutatási együttműködések és projektek során is mindig támogatott.

Köszönettel tartozom Prof. Kiss Andrásnak és Prof. Tímár Józsefnek, hogy jelenlegi és korábbi igazgatóként az intézetben lehetőséget biztosítottak a kutatómunkámhoz.

Nagy köszönettel tartozom Prof. Schaff Zsuzsánának, aki nélkül nem indulhatott volna el a kutatómunkám, mely a műszaki és az élettudomány határterületét kötöti össze.

Hálával tartozom Kovács Erzsébetnek és Hegyesi Nikolettnek, akik a molekuláris laboratóriumban a minták előkészítésében nyújtottak precíz segítséget. Köszönettel tartozom Rigóné Káló Elvirának a cikkeim angol lektorálásáért.

Hálával tartozom Dr. Gergely Szilveszternek, aki megismertette velem az infravörös mikroszkópiát és már 10 éve nyújt segítséget mind a mérések, mind az adatelemzések terén. Köszönöm Dr. Gordon Péternek, aki nélkül nem tudtuk volna a transzflektanciás mérési elrendezéshez szükséges lemezeket elkészíteni. Köszönettel tartozom még Prof. Salgó Andrásnak, Prof. Koppa Pálnak, Dr. Szabó Évának és Slezsák Jánosnak.

Köszönöm Dr. Garai Tamásnak és Dr. Baranyi Marcellnek, akik a sejtes kísérleteimhez biztosították a mintákat. Hálás vagyok Dr. Csúcs Gábornak, aki lehetővé tette, hogy az ETH kurzusain részt vehessek, ahol kiváló szakemberektől tanulhattam – a mikroszkópiáról, képalgozásról, képelemzésről és az adatelemzésről – olyanoktól, mint Simon Nørrelykke és Szymon Stoma.

Köszönet Pesti Adriánnak, aki mint TDK hallgató, majd később intézeti kolléga a kutatással összefüggésben mindig és minden téren a legnagyobb buzgalommal és kitartással segítette a munkámat.

Köszönöm a TDK és diplomázó hallgatóimnak, akik sokat segítettek a mérésekben és minden egyéni feladat vagy diplomamunka az én tudományos munkámhoz is egy újabb építőkövet adott.

Kutatásmenedzsment csoportnak is köszönettel tartozom, hogy igénybe vehettem a segítségüket a disszertáció készítésének fázisában.

Végül pedig köszönöm a családomnak, a barátaimnak, akik türelmesen támogattak mindvégig.