



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Lovro Kavur

**ANALIZA FUNKCIJSKIH SKUPINA MOLEKULA
KARAKTERISTIČNIH ZA MALIGNI PLEURALNI
MEZOTELIOM PRIMJENOM VIBRACIJSKE
SPEKTROSKOPIJE**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

prof. dr. sc. Ozren Gamulin, prof. dr. sc. Sven Seiwert

Zagreb, 2025.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Lovro Kavur

**ANALYSIS OF FUNCTIONAL GROUPS OF
MOLECULES CHARACTERISTIC FOR MALIGNANT
PLEURAL MESOTHELIOMA USING VIBRATIONAL
SPECTROSCOPY**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:
Professor Ozren Gamulin, PhD, Professor Sven Seiwerth, PhD

Zagreb, 2025.

Prof .dr.sc. Ozren Gamulin rodio se 5. ožujka 1964. godine u Zagrebu. Fiziku inženjerskog smjera diplomirao je na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu 1989. godine, a doktorirao je 2004. godine. Dugogodišnji je zaposlenik na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Autor je brojnih znanstvenih radova te je sudjelovao i na velikom broju međunarodnih skupova. Koautor je jednog poglavlja u knjizi i dva laboratorijska priručnika za studente medicine. Jedno od glavnih područja znanstvenog interesa mu je fizika poluvodiča i vibracijska spektroskopija. Bavio se istraživanjima strukture amorfnih i staklastih poluvodiča. Osim navedenog, bavio se i istraživanjima poroznog silicija. Dio njegovih istraživanja posvećeno je primjeni vibracijske spektroskopije u istraživanju bioloških materijala i različitih vrsta bioloških sustava. Na 4. međunarodnoj izložbi inovacija, novih ideja, proizvoda i tehnologija ARCA 2006. dobio je posebnu nagradu za primjenu Ramanove spektroskopije u proučavanju promjene u embrija sisavaca.

Prof. dr. sc. Sven Seiwert redoviti redoviti je profesor patologije u trajnom zvanju. Bio je dugogodišnji pročelnik Katedre za patologiju i predstojnik Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te pročelnik Odsjeka za patologiju kosti i mekih tkiva te patologiju pluća Kliničkog zavoda za patologiju KBC-a Zagreb. Dugi niz godina bio je prodekan za nastavu, te predsjednik Povjerenstva za nastavu Medicinskog fakulteta. U četiri mandata glavni je tajnik Hrvatskoga društva patologa i sudskih medicinara sa zadatkom međunarodne suradnje, nacionalni predstavnik u UEMS/Board of Pathology, u kojem je i glavni tajnik. Bio je nacionalni koordinator za program specijalističkog usavršavanja za specijalizaciju iz područja patologije. Sudjelovao je u organizaciji brojnih znanstvenih skupova. Jedan je od glavnih organizatora European School of Pathology Zagreb Edition (tečaj trajne edukacije European Society of Pathology), jedan od inicijatora i glavnih organizatora Pannonia Congress of Pathology, te predsjednik organizacijskog odbora Memorijalnog sastanka Sergeja Saltykova.

--

ZAHVALE

Želim se zahvaliti svojim mentorima, prof. dr. sc. Ozrenu Gamulinu i prof dr. sc. Svenu Seiwerthu na izuzetno korisnim savjetima i potpori za vrijeme pisanja ove doktorske disertacije. Hvala zaposlenicima Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu na podršci i strpljivosti, pogotovo prof. dr.sc. Petri Korać na savjetima za poboljšanje teme doktorske disertacije i gospođi Jacqueline Vranić-Hrga koja je uvijek bila potpora u mojim najtežim trenucima i kojoj sam neizmjereno zahvalan. Zahvaljujem se dr. sc. Thomasu Klariću na pomoći u analizi glikana što je bilo od izuzetne važnosti za ovo istraživanje. Hvala prof. dr. sc. Gordanu Lauču na savjetima vezanima za analizu glikana. Hvala mojoj obitelji, a pogotovo mojoj ženi Marini Martinić Kavur na konstantnoj podršci, te što su uvijek vjerovali u mene. Hvala prof. dr. sc. Vinku Vidjaku koji mi je uvijek bio snažan oslonac za vrijeme pisanja ove disertacije.

Sadržaj

Sažetak.....	xi
Abstract.....	xiii
1. Uvod.....	1
2. Literaturni pregled.....	5
2.1 Plućna pleura.....	5
2.2 Upala pleure.....	7
2.3 Metastatski adenokarcinom u pleuri.....	10
2.4 Maligni pleuralni mezoteliom.....	11
2.4.1. Epidemiologija.....	13
2.4.2. Genetička osnova.....	15
2.4.3. Biomarkeri.....	17
2.5 FTIR-spektroskopija.....	24
2.5.1 Primjena FTIR-spektroskopije u biologiji i medicini.....	26
3. Metode i materijali.....	28
3.1 Uzorci.....	28
3.2 FTIR-spektroskopija.....	29
3.3 Analiza FTIR-podataka.....	29
3.4 Upotreba neuralnih mreža za generiranje modela za razlikovanje upala, metastaza, normalne pleure i mezotelioma.....	30
3.5 Izolacija glikana iz tkiva.....	32
3.6 UPLC-analiza glikana.....	33
3.7 Imunohistokemijsko bojenje.....	33
4. Rezultati.....	35
4.1 Apsorpcijski spektar uzoraka pleure s različitom histopatologijom.....	35
4.2 Rezultati analize PCA.....	38
4.3 Statistička analiza.....	40
4.4 Model za predviđanje tipa uzorka.....	42
4.5 Analiza N-glikoma plućne pleure i MPM-a.....	48
4.6 Rezultati imunohistokemijskog bojenja.....	51
5. Rasprava.....	53
6. Zaključak.....	60
7. Literatura.....	61
8. Prilozi.....	73
9. Životopis.....	99

POPIS RELEVANTNIH OZNAKA I KRATICA

MPM – maligni pleuralni mezoteliom

BAP1 - protein srodan protein BRCA1 (od eng. *BRCA 1 related protein*)

FTIR - infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (od eng. *Fourier transform infrared spectroscopy*)

PCA – analiza glavnih komponenti (od eng. *Principal component analysis*)

CNN – konvolucijske neuralne mreže (od eng. *Convolution neural networks*)

UPLC - tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (od eng. *Ultra-performance liquid cromatography*)

MCT – monokrotalin (od eng. *Monocrotaline*)

PAH – plućna arterijska hipertenzija

LDH – laktat-dehidrogenaza

CDKN2 - inhibitor kinaza 2 ovisan o ciklinu (od eng. *Cyclin-dependent kinase 2 inhibitor*)

NF2 - neurofibromatoza tipa 2

BDNF – moždani neurotrofni faktor (od eng. *Brain-derived neurotrophic factor*)

FAK – kinaza fokalne adhezije (od eng. *Focal adhesion kinase*)

PI3K - fosfatidilinozitol 3- kinaza (od eng. *Phosphatidylinositol 3-kinase*)

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta (od eng. *Vascular endothelial growth factor*)

SPARC - izlučeni kiseli protein bogat cisteinom (od eng. *Secreted protein acidic and rich in cysteine*)

HA – hijaluronska kiselina (od eng. *Hyaluronic acid*)

CLL – kronična limfocitna leukemija (od eng. *Chronic lymphocytic leukemia*)

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Doktorska disertacija

Sažetak

Analiza specifičnih markera u malignom pleuralnom mezoteliomu primjenom vibracijske spektroskopije

Lovro Kavur

Prirodoslovno Matematički fakultet Zagreb, Horvatovac 102a

Maligni pleuralni mezoteliom je agresivan tumor pleure čiju dijagnozu i pravodobno liječenje često otežava histološka sličnost s normalnom pleurom, upalnim lezijama pleure i metastatskim adenokarcinomom pluća u pleuri. Cilj ovog istraživanja bio je identificirati vibracijske biljege karakteristične za maligni pleuralni mezoteliom kako bi se omogućila diferencijacija od ostalih stanja pleure. U tu svrhu primijenjena je infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom u kombinaciji s analizom glavnih komponenata za analizu spektra uzoraka pleuralnog tkiva. Na temelju prikupljenih spektara, razvijen je model konvolucijske neuronske mreže za klasifikaciju uzoraka. Rezultati su pokazali da su razlike u infracrvenim spektrima između uzoraka malignog pleuralnog mezotelioma, normalne pleure i ostalih patoloških stanja pleure izražene u području apsorpcije glikana, što je potvrdila analiza N-vezanih glikana tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti. Također, imunohistokemijski profil proteina BAP1 pokazao je da do razlike u glikanskom profilu dolazi zbog smanjene ekspresije ovog proteina i posljedično poremećene sinteze glikana. Zaključno, infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom u kombinaciji s algoritmima strojnog učenja omogućuje brzu, neinvazivnu i pouzdanu diferencijaciju patoloških stanja pleure a u kombinaciji s komplementarnim metodama pruža dublji uvid u biološku osnovu uočenih razlika između zdravog i patološkog stanja pleure.

(99 stranica, 18 slika, 3 tablice, 155 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: maligni pleuralni mezoteliom /infracrvena spektroskopija sa Fourierovom transformacijom/vibracijski biomarkeri/ N-glikani/tekućinska kromatografija/BRCA – asocirani protein 1/analiza glavnih komponenata

Mentori: prof. dr. sc. Ozren Gamulin, prof. dr. sc. Sven Seiwert

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Petra Korać
2. izv. prof. dr. sc. Lovorka Batelja Vuletić, dr. med.
3. prof. dr. sc. Gordan Lauc

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of biology

Doctoral Thesis

Abstract

Analysis of functional groups of molecules characteristic for malignant pleural mesothelioma using vibration spectroscopy

Lovro Kavur

Prirodoslovno Matematički fakultet, Horvatovac 102a

Malignant pleural mesothelioma is an aggressive tumour of the pleura whose diagnosis and timely treatment are often hindered by its histological similarity to normal pleura, inflammatory pleural lesions, and pleural metastases of lung adenocarcinoma. The aim of this study was to identify vibrational markers characteristic of malignant pleural mesothelioma to enable differentiation from other pleural conditions. To this end, Fourier-transform infrared spectroscopy combined with principal component analysis was used to examine spectra from pleural tissue samples. Based on the acquired spectra, a convolutional neural network model was developed to classify the samples. The results showed that the infrared spectral differences between malignant pleural mesothelioma, normal pleura, and other pleural pathologies were pronounced in the glycan absorption region, a finding confirmed by ultra-high-performance liquid chromatography analysis of N-linked glycans. Moreover, the immunohistochemical profile of the BAP1 protein showed that the altered glycan profile arises from reduced BAP1 expression and the resulting disruption of glycan synthesis. In conclusion, Fourier-transform infrared spectroscopy combined with machine-learning algorithms allows rapid, non-invasive, and reliable differentiation of pleural pathologies, and—when paired with complementary methods—offers deeper insight into the biological basis of the observed differences between healthy and diseased pleura.

(99 pages, 18 figures, 3 tables, 155 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: Malignant pleural mesothelioma/Fourier-transform infrared spectroscopy/ Vibrational biomarkers/N-glycans/liquid chromatography/BRCA-associated protein 1/Principal component analysis

Supervisor: Professor Ozren Gamulin, PhD, Professor Sven Seiwerth, PhD

Reviewers:

1. Professor Petra Korać, PhD
2. Associate Professor Lovorka Batelja Vuletić, MD, PhD
3. Professor Gordan Lauc, Ph

1. Uvod

Tumori su biostrukturni poremećaji tj. nakupine stanica bez fiziološke funkcije, a dijelimo ih na benigne tumore koji ne napadaju okolna tkiva i maligne tumore koje karakterizira invazivni rast stanica u okolna tkiva te metastatska implantacija u druge dijelove tijela (također ih nazivamo rakom) (1). Maligni tumori su izuzetno važan javnozdravstveni problem jer predstavljaju jedan je od vodećih uzroka smrti u svijetu. Različiti maligni tumori zahvaćaju pacijente svih dobnih skupina a rizik za pojavu malignih tumora povećava se u kasnijoj životnoj dobi. U današnje vrijeme maligni tumori s najvećim stopama smrtnosti su karcinom pluća, karcinom debelog crijeva, karcinom dojke i karcinom prostate (1). Osim više životne dobi, rizik za razvoj malignog tumora u ljudi se povećava uslijed mnogobrojnih čimbenika među kojima su različiti okolišni čimbenici, npr. virusi ili životne navike kao što su konzumacija alkohola ili pušenje.

Zajedničke karakteristike svih malignih tumora nazivaju se „obilježja raka“ (od eng. *hallmarks of cancer*). Hanahan i Weinberg u prvoj publikaciji objavljenoj 2000. godine navode šest ključnih bioloških obilježja raka: izbjegavanje apoptoze (eng. *evading apoptosis*), samodostatnost u staničnoj signalizaciji (eng. *self-sufficiency in growth signaling*), nesenzitivnost na supresiju rasta (eng. *insensitivity to anti-growth signaling*), invaziju tkiva i metastaziranje (eng. *tissue invasion and metastasis*), neograničeni replikativni potencijal (eng. *limitless replicative potential*) te održanu angiogenezu (eng. *sustained angiogenesis*) (2). U istoj su publikaciji Hanahan i Weinberg predložili i integriranu mrežu staničnih puteva koji kontroliraju proces tumorigeneze: promjene u ekspresiji gena (poput mutacije u *RAS* regulatorima staničnog rasta i *RAF* proto-onkogenima koje utječu na aktivaciju mitogen aktivirane protein kinaze MAPK, *MYC* obitelji transkripcijskih faktora te E-kadherina tj. epitelnog kadherinskog proteina koji je uključen u staničnu adheziju), proliferaciju i stanični ciklus (poput ciklina E čija deregulacija dovodi do nekontrolirane diobe ali i nestabilnosti genoma), detekciju DNA oštećenja (poput mutacija u *TP53* tumor-supresorskom genu koje rezultiraju p53 proteinom s narušenom funkcijom transkripcijskog faktora), te staničnu smrt (npr. anti-apoptotski protein Bcl2) (2). U publikaciji objavljenoj 2011. godine Hanahan i Weinberg su uz ranije navedena obilježja dodali su još i: dereguliranu staničnu energiju (eng. *deregulating cellular energetics*), izbjegavanje uništenja od strane imunološkog sustava (eng.

avoiding immune destruction), nestabilnost i mutacije genoma (eng. *genome instability and mutation*) te upalu koja potiče rast tumora (eng. *tumor promoting inflammation*) (3).

Naknadno, Hanahan je 2022. godine objavio još jednu publikaciju u kojoj opisuje još četiri obilježja: Fenotipsku plastičnost (eng. *unlocking phenotypic plasticity*), nemutacijsko epigenetičko reprogramiranje (eng. *nonmutational epigenetic reprogramming*), senescentne stanice (eng. *senescent cells*) te polimorfne mikrobiome (eng. *polymorphic microbiomes*) (4). U dvadeset godina od objavljivanja prvotnog rada o obilježjima malignih tumora, autori su originalnu listu od šest obilježja proširili na čak četrnaest (2–4). Osim toga, postoje i obilježja koja se tek istražuju i nisu još široko prihvaćena, a prema dosadašnjim saznanjima neka od njih poput npr. promjena glikana imaju ulogu u regulaciji izvanstanične signalizacije, migracije tumorskih stanica i invazije u druga tkiva (metastaziranje), modulaciji rasta tumora i imunološkom odgovoru tijela na tumore (5).

Iako su opisana obilježja karakteristike malignih tumora, njihova biološka podloga u vidu signalnih puteva koji pokreću proces onkogeneze, ključnih molekula i njihovih interakcija se često razlikuje. Npr. Shuang et al. su 2021. opisali su da mutacije u onkogenu *KRAS* koji kontrolira stanični rast i diobu ima 25.5% svih karcinoma pluća, mutacije *EGFR* koje dovode do nekontroliranog rasta i preživljavanja tumora usprkos nepovoljnim uvjetima 16.1% karcinoma pluća, mutacije tumor-supressora *NFI* koji može utjecati na progresiju tumora kao i rezistenciju na različite terapije 8.1% karcinoma pluća, mutacije gena *BRAF* koji kontrolira rast i proliferaciju stanica, diferencijaciju i preživljavanje tumora ima 6.9% svih karcinoma pluća, itd. (6).

Maligni pleuralni mezoteliom (MPM) je vrlo agresivan maligni tumor pluća tj. plućne pleure koji primarno nastaje kao posljedica izlaganja azbestu s latencijskim vremenom 40 godina od izlaganja do pojave prvih simptoma bolesti (7–11). Očekuje se da će se učestalost MPM-a nastaviti povećavati tijekom sljedeća dva desetljeća diljem svijeta, posebno u industrijski razvijenim zemljama (12,13) te u zemljama u kojima i dalje ne postoji stroga zakonska regulacija korištenja azbesta poput Rusije, Brazila i Indije (14). Zbog toga je važna brza i rana dijagnostika MPM-a. Inicijalna evaluacija MPM-a je bazirana na korištenju kliničkih slikovnih metoda kao što su ultrazvuk, kompjuterizirana tomografija (CT, od eng. *Computed tomography*), i magnetska rezonancija (MR), no da bi se potvrdila dijagnoza, potrebna je citološka procjena pleuralne tekućine i biopsija pleure (15,16).

Veliki izazov je to što MPM histološki može oponašati drugu malignu ili upalnu patologiju pleure (17,18). Npr. histološki preparat MPM-a može sadržavati epitelioidne stanice

izgleda prstena pečatnjaka koje se pojavljuju i kod adenokarcinoma (18). Zbog ovog problema unazad nekoliko godina sve se više istražuju biološke razlike MPM-a u odnosu na druga stanja pleure (npr. metastaza adenokarcinoma u pleuru i upalnih stanja pleure) poput mutacija gena *BAP 1* koje dovode do gubitka proteina kojeg taj gena kodira (19). Osobe s ovom mutacijom imaju povećanu predispoziciju za razvoj MPM-a (20,21). Istražuje se i veliki broj biomolekula s potencijalom biomarkera, osobito proteina, no također i nukleinskih kiselina te polisaharida i glikana (22–31). No, bez obzira na napretke koji su na tom području postignuti u nekoliko zadnjih godina, još uvijek postoji izazov pronalaženja markera za MPM koji su osjetljivi, specifični, brzi i jeftini.

Nedavne studije ukazuju na mogućnost razlikovanja spektara dobivenih infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR, od eng. *Fourier transformation infrared spectroscopy*) za različite vrste karcinoma kao što su karcinom prostate (32), karcinom jajnika (33), ili karcinom štitnjače (34), budući da ova tehnika omogućuje razjašnjavanje promjena na staničnoj razini uzrokovanih bolešću pomoću analiza spektralnih vrpce (1). FTIR je metoda spektroskopije kojom možemo mjeriti apsorpciju ili emisiju krutina, tekućina i plinova. Za razliku od tradicionalne disperzijske spektroskopije koja koristi zraku monokromatske svjetlosti, FTIR koristi svjetlosni izvor frekvencija u širokom rasponu, no za dobivanje individualnog spektra uzorka potreban je dodatan matematički proces Fourierove transformacije. Recentna studija ukazuje na učinkovitost FTIR analize u određivanju podtipova tumora u difuznom malignom mezoteliomu (35).

Prethodne infracrvene (IR, od eng. *Infra-Red*) spektroskopske studije izvedene na uzorcima pleuralnog tkiva u pacijenata sa MPM-om, metastazama adenokarcinoma pluća u pleuru, upalom pleure (pleuritis) te uzoraka pleure u zdravih pacijenata ukazuju na potencijalno razlikovanje MPM-a od ostalih skupina (36). Ranije studije pokazale su da individualne stanice pokazuju specifične promjene mikro-spektra FTIR u ovisnosti o biokemijskim i morfološkim svojstvima vezanim uz sintezu DNA i pojavu regulacijskih proteina (ciklina) specifičnih za pojedine faze staničnog ciklusa (37).

Cilj ovog rada bio je pronaći vibracijske markere funkcijskih skupina specifične za MPM u FTIR-spekttru u vidu različitih staničnih komponenti kao što su lipidi, proteini, ugljikohidrati i nukleinske kiseline, te utvrditi potencijalnu biološku ulogu tih markera u MPM-u. Korištena je metoda analize glavnih komponenti (Principal Component Analysis, PCA) koja se primjenjuje u slučajevima opsežnog broja varijabli. PCA je statistički postupak kojem je cilj smanjenje dimenzionalnosti podatkovnog skupa, uz zadržavanje onih karakteristika podataka koje najviše doprinose varijanci, te njihova interpretacija. Redukcija dimenzionalnosti podataka

podrazumijeva smanjenje broja izvornih varijabli na mali broj indeksa koji su linearna kombinacija izvornih varijabli i koji se zovu glavne komponente. Kod ove statističke metode glavne komponente objašnjavaju varijabilnost i međuodnose podataka. Za odvajanje individualnih vrpce od ukupnog spektra korištena je metoda podešavanja krivulje (eng. *curve fitting*). Navedena metoda sastoji se od tri koraka koji uključuju izbor inicijalnog profila, izbor inicijalnih parametara te minimizaciju a omogućuje evaluaciju pojedinih vibracijskih vrpce unutar integriranog spektra. Nakon toga s naprednom statističkom i računalnom obradom podataka (Kruskal-Wallis test i konvolucijske neuralne mreže- CNN) utvrđene valne duljine koje su značajne za razlikovanje histopatoloških stanja pleure te verificirao tako dobivene podatke neovisnom metodom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UPLC od eng. *Ultra performance liquid chromatography* - UPLC).

Prethodna FTIR-spektroskopska istraživanja na pleuralnim izljevima pokazala su da MPM jedini ima povećanu količinu triglicerida i kolesterolskih estera u odnosu na benigni pleuralni izljev i izljev kod karcinoma pluća, dok su zasićeni lipidi, ukupni proteini, fosfolipidi, DNA i glukoza bili povišeni i kod karcinoma pluća i kod MPM-a (38).

CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Hipoteza ove studije je da molekularne promjene u stanici pleure nastale kao dio karcinogeneze dovode do razvoja vibracijskih biljega karakterističnih za MPM u vidu promjene koncentracije funkcijskih skupina ili sekundarnih struktura proteina mjerljivih vibracijskom spektroskopijom, te da je prisutnost vibracijskih biljega povezana s promijenjenom regulacijom ekspresije proteina ključnih za proces karcinogeneze.

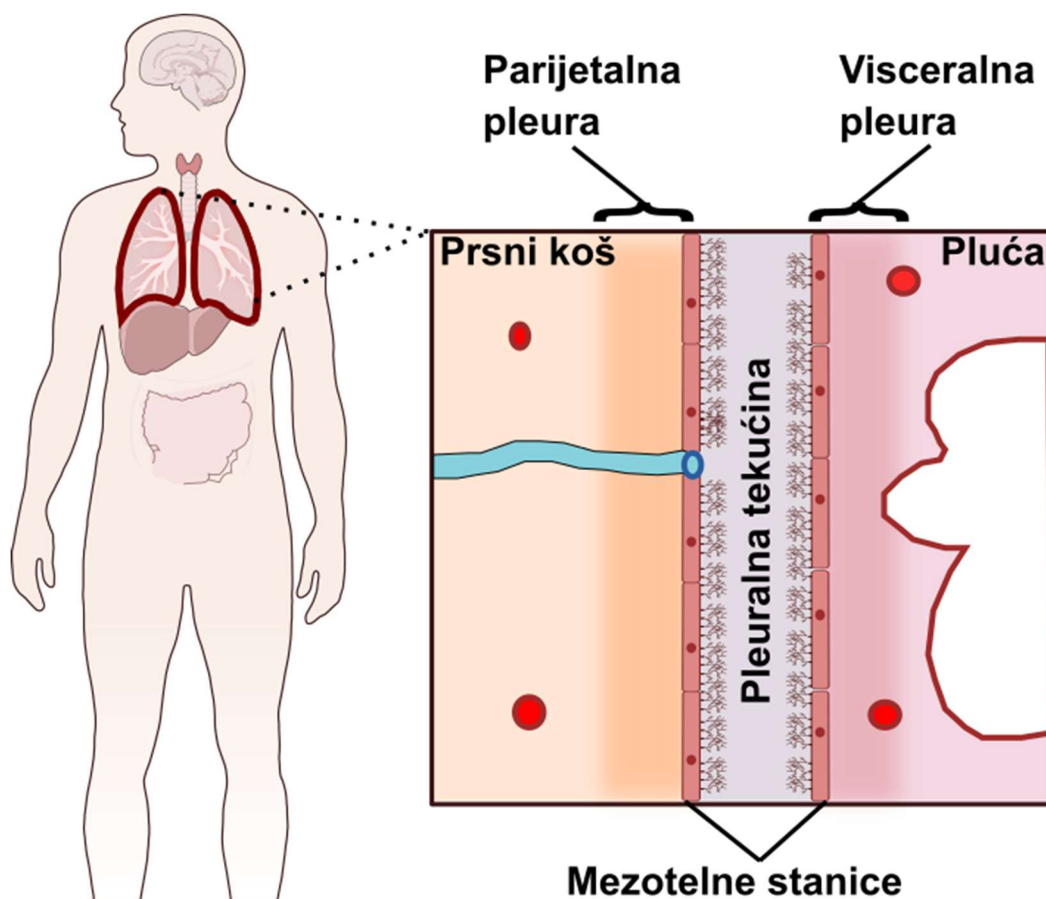
Cilj ove studije bio je identificirati vibracijske biljege u tkivu biopsija pleure za razlikovanje MPM-a od metastaza adenokarcinoma, upale pleure i normalne pleure primjenom vibracijske spektroskopije. Nakon identifikacije vibracijskih biljega karakterističnih za MPM, cilj je bio pokušati ustanoviti njihovu povezanost s promjenom ekspresije proteina ključnih za proces karcinogeneze u MPM-u, poput ubikvitinske karboksil-terminalne hidrolaze BAP1.

2. Literaturni pregled

2.1 Plućna pleura

Pleura je serozna opna koja obavlja pluća i sastoji se od dvije komponente. Prva komponenta je unutarnji list koji se zove visceralna pleura (poplućnica) i oblaže cijelu površinu pluća osim na području na kojemu u pluća ulazi plućni korijen (Slika 1). Drugi dio zove se parijetalna pleura (porebrica) koja je vanjski list pleure i koja oblaže stijenku šupljine prsnoga koša sa unutarnje strane (Slika 1). Visceralna i parijetalna pleura zajedno zatvaraju pleuralni prostor u kojem se nalazi minimalna količina pleuralne tekućine, prosječno 0,26 ml po kilogramu tjelesne težine (39) (Slika 1). Pleuralna tekućina omogućava klizanje dviju seroznih membrana uz minimalno trenje. Sama pleura sastoji se od pet slojeva: monosloja mezotelnih stanica na bazalnoj lamini; površinskog elastičnog sloja; sloja bogatog kolagenom koji sadrži krvne žile, živce i stanice imunosnog sustava; te dubokog fibroelastičnog sloja. Duboki sloj je čvrsto vezan uz okolne strukture, npr. mišiće, rebra ili plućni parenhim, a ukupna debljina svih pet slojeva pleure je svega oko 40 µm (40).

Kod raznih infektivnih, malignih, autoimunih i ostalih patoloških stanja dolazi do razvoja pleuralnog izljeva. Pleuralni izljev ima visoku incidenciju, procjenjuje se na preko 400 slučajeva na 100 000 stanovnika godišnje (41). Pleuralne izljeve dijelimo na eksudativne i transudativne pleuralne izljeve. Transudativni pleuralni izljevi su oni izljevi koji se pojavljuju kada dolazi do nakupljanja pleuralne tekućine koja se nakuplja kao posljedica disbalansa između hidrostatskih i onkotskih tlakova. Najčešći uzroci transudativnog pleuralnog izljeva su kongestivno srčano zatajenje, ciroza jetre te kao posljedica razvoja plućne embolije (42). Eksudativni pleuralni izljev se pojavljuje kada su promijenjeni lokalni faktori koji utječu na akumulaciju pleuralnog izljeva, kao što je to slučaj kod upalnih ili infektivnih stanja. Vodeći uzrok pojave eksudativnih pleuralnih izljeva su upala pluća, maligna oboljenja te plućna embolija (42). Maligni pleuralni izljev je pleuralni izljev koji je uzrokovan malignom bolesti. Najčešće je to posljedica širenja metastaza u pleuru, i to najčešće uzrokovanim primarnim karcinomima pluća i dojke dok je MPM u pozadini otprilike 12 % slučajeva malignog pleuralnog izljeva (43,44). Ipak, treba naglasiti da je pleuralni izljev najčešće posljedica benignih stanja.



Slika 1. Plućna pleura je serozna opna koja obavija pluća. Sastoji se od dvije serozne opne između kojih se nalazi minimalna količina pleuralne tekućine čija je funkcija smanjiti trenje pri disanju. Slika je napravljena u programu Inkscape korištenjem besplatnih grafika sa stranice <https://bioart.niaid.nih.gov/>

2.2 Upala pleure

Pleuralna upala (pleuritis) je klinička dijagnoza, a karakteristično za nju je upala pleuralnih ovojnica koje oblažu torakalnu šupljinu i pluća. Klinička slika uključuje oštru intratorakalnu bol na onoj strani prsišta gdje je prisutna upalna reakcija. Simptomi se tipično pogoršavaju pri disanju. Upala u pleuralnom prostoru počinje sa oštećenjem stanica mezotela koje inducira priljev neutrofila na mjesto oštećenja, povećanje vaskularne propusnosti (permeabilnosti) te u konačnici dolazi do koagulacijske kaskade (43,44). Koagulacijska kaskada je niz događaja koji dovode do zgrušavanja krvi. Uloga koagulacijske kaskade u sklopu upale pleure je zaustaviti gubitak krvi kao posljedicu oštećenja vaskularnih stijenki upalnom reakcijom.

Uslijed povećane vaskularne propusnosti često se posljedično vidi razvoj pleuralnog izljeva zbog eksudacije tekućine iz krvnih žila (45). Parapneumonički izljev je pleuralni izljev koji se istovremeno javlja uz upalu pluća (pneumoniju), a javlja se u oko 40% slučajeva upale pluća (46). Uslijed bakterijske infekcije može doći do akumulacije i gnojnog sadržaja unutar pleuralne šupljine, što se naziva empijem. Značajna akumulacija neutrofila prisutna je u kompliciranom pleuralnom izljevu i empijemu. Kao odgovor na bakterijske endotoksine i citokine, interleukin 8 (IL-8) smatra se glavnim kemotaktičkim faktorom koji privlači neutrofile u pleuralni prostor (47). Razvoj empijema započinje eksudativnom fazom gdje dolazi do transfera intersticijske tekućine u pleuralnu šupljinu što je posljedica upalne reakcije. Nakon eksudativne faze slijedi fibropurulentna faza s invazijom bakterija u pleuralni prostor te formiranjem lokulata i septacija. U konačnici slijedi organizacijska faza za koju je karakteristična proliferacija fibroblasta uz formiranje veziva i zadebljanja pleure (48). Bakterijske infekcije vrlo su česte, a najčešće su uzrokovane bakterijama *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* grupe viridans, te *Streptococcus pneumoniae*, no od važnijih još treba navesti i bakterije iz porodice Enterobacteriaceae te *Pseudomonas Aeruginosa* (48).

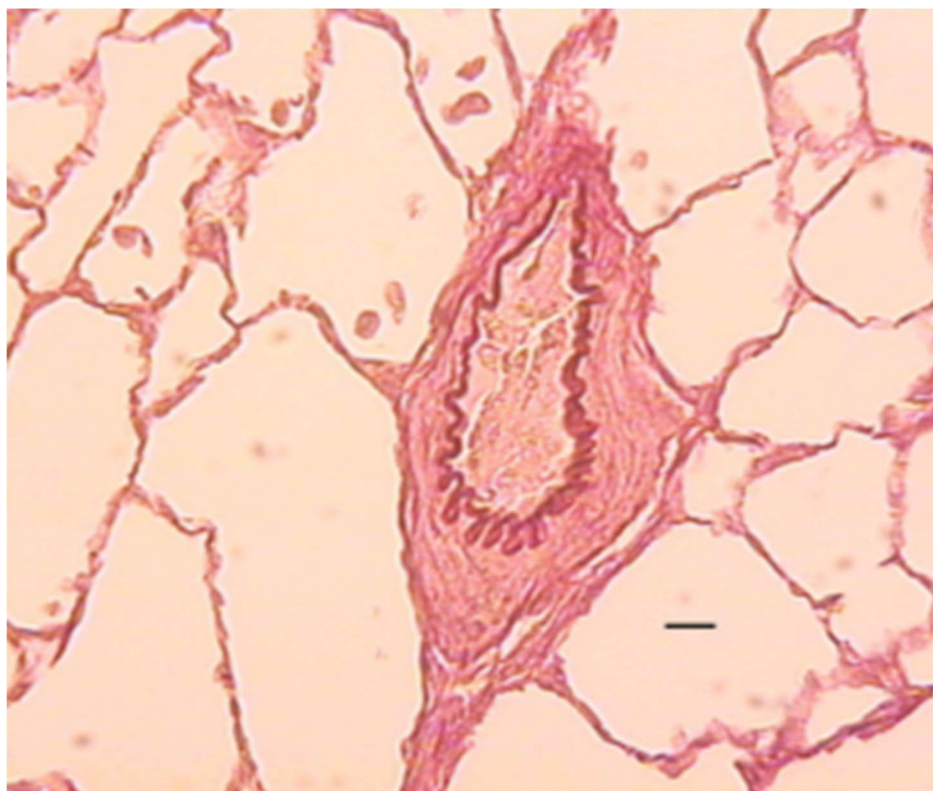
Značajan uzrok upale pleure u svijetu, prvenstveno u zemljama u razvoju je i tuberkulozni pleuritis koji predstavlja najčešći oblik tuberkuloze izvan plućnog u mnogim endemskim područjima (49). Upala plućnog parenhima i pleure nije uvijek vezana za infektivno stanje. Postoje i brojni drugi uzročnici koji mogu uzrokovati upalu pleure i parenhima. Jedan od takvih je primjera je kemijski spoj monokrotalin (MCT). Tang i suradnici u svojoj studiji istraživali su vremenski tijek upale i plućne arterijske hipertenzije (PAH) izazvane monokrotalinom u štakora (50). MCT je izazvao snažan upalni odgovor, kojeg su

kategorizirali u akutnu i kroničnu fazu. Nakon akutne upalne faza unutar prvih 6 dana nakon primjene MCT-a, uslijedila je kronična upalna faza. Na taj način su pokazali da pojedini kemijski spojevi mogu uzrokovati jaki upalni odgovor. Istraživanje objavljeno 2021. godine u *Biomedicines*, pokazalo je slične rezultate (51) (Slika 2).

Precizno određivanje uzroka upale pleure ključno je za pravilno liječenje, no dijagnostika pleuralnih izljeva zna biti izazovna. Standardna dijagnostička obrada uključuje anamnezu, fizikalni pregled i različite slikovne metode kao što su rentgensku (RTG), CT i ultrazvuk (UZV) toraksa. Kada navedeno nije dovoljno u nastavku se rade invazivne metode kao što su citološka analiza pleuralne tekućine putem torakocenteze (52).

Osnovna laboratorijska analiza pleuralne tekućine obuhvaća razlikovanje transudata (tekućine koja je prošla kroz membranu ili je izišla iz krvi procesom transudacije tj. djelovanjem hidrodinamičkih sila) od eksudata (izljevi iz oštećenih krvnih žila, kapilara i sl. i skuplja se u tkivima i tjelesnim šupljinama). Većina upalnih izljeva su eksudati. Daljnje pretrage uključuju biokemijsku analizu (glukoza, LDH, pH), citološki pregled, mikrobiološku obradu (mikroskopija i kultura na bakterije, mikobakterije) i određene biomarkere ovisno o sumnji na etiologiju (52–55). Međutim, unatoč opsežnim dijagnostičkim obradama uzrok značajnog postotka pleuralnih izljeva često ostaje nejasan nakon inicijalne obrade (53,54)

Istodobno, većina malignih pleuralnih izljeva potječe od metastatskih tumora u pleuri ($\approx 95\%$), ponajviše od karcinoma pluća i dojke. Primarni pleuralni tumori poput MPM-a čine tek 1–6% svih malignih pleuralnih izljeva premda upravo oni predstavljaju izazovnu dijagnozu (56). Stoga postoji jasna potreba za novim, jeftinim, brzim i osjetljivim metodama koje bi pomogle u analizi i razlikovanju pleuralnih upala uslijed nemalighnih i malignih uzroka. Jedna od takvih obećavajućih tehnika je FTIR-spektroskopija.



Slika 2 Presjek krvne žile s abnormalnom morfologijom stijenke uzrokovanom djelovanjem monokrotalina. Slika je preuzeta i prilagođena iz **(51)**.

2.3 Metastatski adenokarcinom u pleuri

Metastatsko širenje bolesti je odgovorno za otprilike 90 % smrti od malignih tumora (57). Do danas postoji relativno mali broj istraživanja koja pokazuju primjenjivost FTIR-spektroskopske slikovne metode u evaluaciji metastaza u pleuri(36,58) .

Augustynak i suradnici usmjerili su svoje istraživanje na razlikovanje metastatskih žarišta karcinoma dojke u pleuralnoj šupljini od stanica malignog tumora prisutnih u parenhimu pluća te upalnih stanica prisutnih u izvanstaničnom matriksu pluća uslijed rasta uznapredovalih metastaza. Pokazali su da je analiza FTIR-spektroskopijom u kombinaciji s drugim metodama prikladan i pouzdan alat za karakterizaciju metastatskih promjena karcinoma dojke u plućima. Primjenom FTIR-spektroskopijom visoke i ultravisoke rezolucije, istraživanje je identificiralo plućne metastaze u mišjem modelu raka dojke, pokazujući izvrsnu podudarnost s histopatološkim dijagnozama za metastaze manje od 1 mm te omogućujući razlikovanje tumorskih tipova stanica. Zaključili su je da je moguće karakterizirati ne samo stadije metastaza tumora, već i identificirati podrijetlo metastaza s obzirom na sadržaj i strukturu biomolekula (58).

Chrabaszcz i suradnici u svojem radu zaključili su da FTIR-spektroskopija predstavlja koristan alat u otkrivanju ranog mikrometastatskog širenja bolesti u plućima. Žarišta raka proučavana u mišjem modelu metastatskog raka dojke, daju specifičan IR-spektar te su precizno lokalizirana i odvojena od preostalog tkiva (59). Blat i suradnici koristili su FTIR-spektroskopiju za praćenje kemijskih promjena u krvnoj plazmi. Cilj im je bio pronaći spektroskopske markere metastatskog raka dojke tijekom napredovanja bolesti. Uzorci plazme prikupljeni su 1 do 5 tjedana nakon inokuliranja mišjih metastatskih stanica karcinoma dojke u miševe (60). Najranije promjene je bilo moguće detektirati upotrebom FTIR-spektroskopije kod analize plazme bile su povezane s fosfolipidima i sekundarnim strukturama proteina, koje su se pojavile 2., odnosno 3. tjedan nakon inokulacije metastatskih stanica. Značajne promjene u sadržaju i strukturi lipida i ugljikohidrata identificirane su u plazmi u kasnijim stadijima bolesti. Kada su se razvili veliki primarni tumori u dojci i makrometastaze u plućima u uznapredovalom stadiju bolesti, svi FTIR-spekttri značajno su se razlikovali od onih u ranijim fazama napredovanja tumora. Na taj su način pokazali da se svaka faza napredovanja tumora dojke i njegovih plućnih metastaza može karakterizirati specifičnim panelom spektroskopskih markera (60).

2.4 Maligni pleuralni mezoteliom

Maligni pleuralni mezoteliom (MPM) je maligni tumor koji nastaje iz mezotelnih stanica plućne pleure (Slika 1). Predominantno pobolijevaju muškarci, u otprilike 80% slučajeva, a pacijenti se najčešće prezentiraju s pleuralnim izljevom u kombinaciji s nedostatkom daha te boli u prsištu (61). Medijan preživljenja pacijenata s dijagnosticiranim MPM-om je vrlo kratak, u prosjeku samo 8 do 12 mjeseci (62). Međutim, mlađa životna dob u trenutku pojave ove bolesti povezana je sa značajno boljim preživljenjem, pri čemu pacijenti kojima je dijagnoza postavljena prije 50. godine imaju medijan preživljenja od 10 godina (63).

Karakteristično za MPM je da je izrazito otporan na današnje mogućnosti liječenja. Histološki, razlikujemo tri glavna podtipa MPM-a: epiteloidni, sarkomatoidni te bifazni podtip. Epiteloidni i bifazni podtipovi čine 75–95 % MPM-a, dok je sarkomatoidni podtip rijedak i nema specifične markere (64). Bifazični podtip MPM-a kombinira karakteristike preostala dva subtipa (65). Različiti subtipovi imaju različite kliničke i patološke karakteristike. Epiteloidni tip kao najčešći subtip MPM-a ima najbolju prognozu (66).

Stanice epiteloidnog mezotelioma često nalikuju benignim, reaktivnim mezotelnim stanicama koje se pojavljuju u obliku pločastih ili kuboidnih stanica s različitim stupnjevima promjena. Za razliku od epiteloidnog tipa sarkomatoidni mezoteliom sastoji se od vretenastih stanica, dok bifazni mezoteliom sadrži i epiteloidne i sarkomatoidne elemente (40). Sarkomatoidni maligni mezoteliom čini 15-20% malignih mezotelioma i pokazuje nekonzistentno bojenje za mezotelne markere što otežava njegovu dijagnostiku (17). Pleura je najčešće sjelo malignog mezotelioma. Drugo poznato sjelo malignog mezotelioma je peritoneum, no u puno manjem broju slučajeva s omjerom pleuralnih prema peritonealnim slučajevima u odnosu 9,2 : 1 (67).

Poznato je da postoji snažna epidemiološka povezanost MPM-a s ranijom izloženosti pacijenata azbestu. U slučaju azbesta, udahnuta mikroskopska vlakna migriraju kroz pluća u pleuralni prostor, gdje mogu ostati desetljećima, aktivirajući različite upalne puteve. Lokalno stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva izazvano azbestnim vlaknima posljedično uzrokuje oštećenje DNA, te na taj način pokreće malignu transformaciju (40). Postoji značajan broj diagnosticiranih mezotelioma u pacijenata koji nemaju povijest ekspozicije azbestu što je češći slučaj u žena nego u muškaraca, geografski vidljivo češće u Sjedinjenim Američkim

Državama nego u europskim zemljama, te također češće u peritonealnim mezoteliomima u odnosu na pleuralne mezoteliome (68).

Prosječni latentni period od ekspozicije vlakana azbesta do razvoja manifestne bolesti je 40 godina (7,8). Zbog navedene činjenice većina pacijenata kojima je dijagnosticiran MPM je starija od 60 godina. Iako postoji mali broj pacijenata s dugogodišnjim preživljenjem medijan preživljenja u neliječenih pacijenata je u rasponu od 6 do 10 mjeseci od dijagnoze, što prvenstveno ovisi o stadiju bolesti pri dijagnozi, histološkom subtipu i općem stanju pacijenta za vrijeme postavljanja dijagnoze (69). Manje od 10% pacijenata je u mogućnosti pristupiti radikalnom liječenju koje uključuje kirurški operativni zahvat s ili bez kemoterapije i/ili radioterapije (69).

S vremenom je razvijeno više prognostičkih sustava bodovanja za MPM kombiniranjem različitih prognostičkih varijabli, ali oni su prvenstveno izvedeni iz velikih serija pacijenata koji su sudjelovali u istraživanjima djelovanja različitih kemoterapija te ne odražavaju stvarnu situaciju kod drugih skupina pacijenata (62). Histološki nalaz može se kombinirati s dobi, spolom, brojem leukocita i drugim parametrima u sustavu bodovanja Europske organizacije za istraživanje i liječenje raka (eng. *European Organisation for Research and Treatment of Cancer* - EORTC) kako bi se na taj način bolje predvidjelo preživljenje.

Nespecifična klinička slika često je razlog kasne ispravne dijagnoze. Najčešći početni simptomi MPM-a su bol u prsima (69 % slučajeva) i nedostatak zraka (59 % slučajeva), dok se rjeđe javljaju simptomi poput povišene tjelesne temperature (33 % slučajeva) i gubitka tjelesne težine (24 % slučajeva) (70). Pacijenti se često prezentiraju i sa blagom, no perzistentnom nelagodom u prsnom košu, a čest je i intermitentan neproduktivan kašalj. Pacijenti u pravilu navode generalnu slabost i loše osjećanje. Uzevši u obzir opisane simptome MPM se često u inicijalnoj dijagnostici zna zamijeniti sa ostalim dobroćudnim pleuralnim stanjima ili drugim respiratornim bolestima kao što je upala pleure (pleuritis), upala pluća (pneumonija) te tuberkuloza. Najčešći klinički nalaz je pleuralni izljev, dok se uvećani limfni čvorovi (limfadenopatija) ili batičasti prsti (eng. *clubbing*) javljaju u manje od 10 % bolesnika (70).

2.4.1. Epidemiologija

Kada se doznala povezanost između razvoja MPM-a i izloženosti azbestu mnoge su zemlje, pogotovo zemlje Zapada, uvele izrazito strogu regulacije i zabrane u korištenju azbesta. Unatoč navedenoj činjenici zbog ranije opisanog latentnog perioda broj pacijenata s MPM-om i dalje raste. Tako su od 2001. do 2008. godine, dobno prilagođene stope smrtnosti porasle su na 5,3 na milijun stanovnika, u odnosu na 4,0 na milijun stanovnika zabilježenih u razdoblju od 1994. do 2000. godine. U navedenom vremenskom periodu godišnji porast dobno prilagođene smrtnosti iznosio je 5,37 %, pri čemu je zabilježen veći porast kod muškaraca (5,85 %) nego kod žena (3,48 %) (67).

Problematična je činjenica da je azbest inicijalno bio izuzetno cijenjen zbog svoje otpornosti na toplinu, te da se kao vrhunski materijal za toplinsku izolaciju široko koristio u industrijskom sektoru, uključujući brodogradnju, u automobilskoj industriji pri proizvodnji kočnica te generalno u izgradnji. Stoga i dalje postoji značajna incidencija MPM-a, dijelom iz razloga što ga se i nadalje koristi u pojedinim zemljama u razvoju te iz razloga što je azbest još uvijek prisutan u ranijim gradnjama u zemljama koje su ga već zabranile za korištenje u izgradnji. Upravo iz tog razloga izloženost cjelokupnog pučanstva azbestu u okolišu proširila je rizik izvan izravnog radnog kontakta, naglašavajući potrebu za snažnim javnozdravstvenim mjerama.

Otprilike 80% slučajeva MPM-a u zemljama Zapadnog svijeta su povezane s izloženosti azbestu no činjenica je da samo mala frakcija izloženih na kraju razvije bolest (71,72). Navedena činjenica sugerira da vjerojatno postoje drugi faktori u razvoju bolesti, uključujući izlaganje drugim faktorima kao što je potencijalno virus SV40. Istraživanja pokazuju da je SV40 detektiran u otprilike 40% do 50% pacijenata sa MPM-om u Sjedinjenim Američkim Državama (71,72) Rijetki su slučajevi mezotelioma povezani sa ranijom ekspozicijom ionizirajućem zračenju (71,72).

Studije pojedinih obiteljskih slučajeva mezotelioma izvijestile su o povećanom riziku za osobe koje imaju roditelje ili braću i sestre kojima je dijagnosticiran mezoteliom (73). Osim toga, jedna studija je pokazala da pojedinci čiji su brat ili sestra oboljeli od karcinoma bubrega ili mokraćnog mjehura također imaju povećan rizik za razvoj mezotelioma (74). Rizik od razvoja mezotelioma, karcinoma bubrega i mokraćnog mjehura nije bio povećan u slučajevima kada je supružnicima dijagnosticiran mezoteliom (74).

Zemlje visokog dohotka prijavile su 88 % svih smrtnih slučajeva od mezotelioma, pri čemu su Sjedinjene Američke Države, Ujedinjeno Kraljevstvo i Japan među vodećim državama (67). U Velikoj Britaniji, incidencija u muškaraca je 3.4/100 000, u Francuskoj 2,3/100 000 a u Nizozemskoj je 3.2/100 000. Zadnjih godina prati se blagi porast incidencije MPM-a, prvenstveno zbog latencije od 30 do 50 godina od ekspozicije azbestu te zabrane upotrebe istog krajem 20. Stoljeća (75). Svjetska Zdravstvena Organizacija procjenjuje da od bolesti prouzrokovanih azbestom godišnje umre 92500 pacijenata u svijetu (67). Značajni prediktori preživljenja su dob, pušački status, bol u prsima, gubitak tjelesne težine, broj trombocita, razina ureje i vrijednost kalcijau krvi (62).

2.4.2. Genetička osnova

Ranija istraživanja pokazuju kako mutacije gena *BAP1* pogoduju nastanku epiteloidnog MPM-a više nego bilo kojeg drugog podtipa, što ima važne vrlo implikacije za probir i prognozu pacijenata (19). Osim nasljednih *BAP1* mutacija genetske analize su pronašle korelaciju sa somatskim mutacijama kod gena za različite tumorske supresore, kao što su gen za kinazni inhibitor ovisan o ciklinu 2 (*CDKN2*), neurofibromatoza tipa 2 gen (*NF2*), te *BAP1* gen (76–78). Nađena je poveznica između zametne mutacije (od eng. *germline mutation*) u *BAP1* genu i predispoziciji u nastanku nekih slučajeva MPM-a u kombinaciji sa drugim tumorima. Tako su Testa et. al. opisali *BAP1*-sindrom kojeg karakterizira razvoj mezotelioma i uvealnih melanoma u pacijenata (79).

Pacijenti s MPM-om koji imaju germinativne mutacije gena *BAP1* imaju značajno bolju prognozu u usporedbi s pacijentima koji su bez navedene mutacije, iako mehanizam toga još nije poznat. (63). Upalni mikrokoliš ima ključnu ulogu u progresiji malignog pleuralnog mezotelioma, pri čemu su uključeni različiti citokini i čimbenici rasta (64). Fibroinformatorna stroma, karakteristična za MPM, može pridonijeti otpornosti tumora na kemoterapiju na način da potiče rast, invaziju i angiogenezu tumorskih stanica. Imunosupresivno mikrokruženje mezotelioma dodatno sudjeluje o u slabom odgovoru na nove imunoterapije u usporedbi s drugim solidnim tumorima (80).

Visoka ekspresija gena za neurotrofni faktor porijeklom iz mozga (*BDNF*, od eng. *brain-derived neurotrophic factor*) bila je prediktivna za kraće preživljenje pacijenata s MPM-om u kohorti od 79 tumorskih uzoraka MPM-a i 26 uzoraka normalne pleure. Otkriveno je da je aktivacija *BDNF*-a uključena u formiranju novih krvnih žila (angiogenezu) što olakšava proliferaciju tumora.. Kinaza fokalne adhezije (FAK od eng. *focal adhesion kinase*) je tirozin-kinaza koja je važna za reguliranje preživljenja, proliferacije, migracije i invazivnosti stanica karcinoma (81). c-MET, receptorska tirozin-kinaza važna za proliferaciju i pokretljivost stanica, također je prekomjerno izražena u mezoteliomu (82). Istraživanja *in vivo* i *in vitro* pokazala su da ciljana inhibicija c-MET pomoću eksperimentalnog antitumorskog lijeka tivantiniba zajedno s inhibicijom signalnog PI3K smanjuje pokretljivost stanica, njihov rast te razvoj tumora (81).

Genetske varijacije pojavljuju se u genima za putove TP53/popravka DNA i PI3K/AKT put, naglašavajući njihovu važnost u malignom pleuralnom mezoteliomu (78,83).

Uključenost gena *CDKN2A* u disregulaciju staničnog ciklusa kod MPMa, sugerira da bi inhibitori CDK4 i CDK6 mogli biti učinkoviti u liječenju malignog pleuralnog mezotelioma (78,83). Još jedan zahvaćeni put u MPM-u je signalni put MAPK. Ovaj put aktivira se kao odgovor na izvanstanične podražaje poput faktora rasta (MAPK/ERK put) i stresnih uvjeta (p38/MAPK14 stresom aktivirana MAPK kaskada) (78,83)

2.4.3. Biomarkeri

Biomarkeri su molekularne promjene u tjelesnim tekućinama i tkivima koje su vezane za različite bolesti (84). U zadnjem desetljeću značajno se povećao broj istraživanja biomarkera za različite tipove raka i drugih bolesti pri čemu je otkriveno više od 1000 biomarkera, no do sada je manje od 100 validirano za kliničku primjenu (84). Postoji nekoliko karakteristika koje govore o performansama biomarkera, a to su redom:

Imunohistokemijski biomarkeri tj. specifična antitijela koja se primjenju u imunohistokemijskoj analizi uzoraka biopsije mogu pomoći u razlikovanju epiteloidnog MPM-a od metastatskog adenokarcinoma, ali budući da niti jedan pojedinačni biomarker nije pouzdan u svim slučajevima, preporučuje se korištenje više njih istodobno (17). Za potvrdu mezotelijalnog podrijetla tumora i isključenje drugih malignih bolesti obično se koristi panel različitih imunohistokemijskih biomarkera (17,70,85–87). Razlikujemo tako pozitivne i negativne imunohistokemijske biomarkere za MPM. Standardni pozitivni imunohistokemijski biomarkeri za MPM uključuju antitijela specifična za kalretinin, trombomodulin, CK5/6, CAM5.2, EMA, vimentin, GLUT-1, HBME-1, WT-1 i p53, a njihova ukupna osjetljivost za MPM iznosi od 45 % do 100 % (70). Standardni negativni imunohistokemijski biomarkeri za MPM uključuju antitijela specifična za Ber-Ep4, MOC-31, CEA, Leu-1, CD15, TTF-1 i B72.3. Njihova ukupna specifičnost za MPM iznosi od 53 % do 100 % (70). Antitijelo za Citokeratin 5/6 boji više od 95% epiteloidnih MPM-a, dok antitijelo za kalretinin pokazuje osjetljivost pri raspoznavanju MPM-a u rasponu od 73% do 100% (17). Comin i suradnici pokušali su identificirati specifične biomarkere za razlikovanje epiteloidnog MPM-a od plućnog adenokarcinoma. Kalretinin i trombomodulin bili su najspecifičniji pozitivni mezotelni markeri, dok su CD44H i HBME-1 pokazali visoku osjetljivost, ali vrlo nisku specifičnost. Među negativnim markerima CEA i CD15 bili najspecifičniji u razlikovanju MPM-a od adenokarcinoma. (85). Cury i suradnici izvijestili su o pozitivnosti markera CD44H kod 39 (90,6%) od ukupno 43 epiteloidna MPM-a i kod 27 (45%) od 60 metastatskih adenokarcinoma, čime su postigli visoku osjetljivost od čast 91%, ali specifičnost od samo 55% što ograničava upotrebu u kliničkoj praksi (88). Pinheiro i suradnici identificirali su CD147 kao jedan od pouzdanih markera za razlikovanje MPM-a od reaktivnih mezotelnih stanica. Prema autorima CD147 može poslužiti kao potencijalna meta za specifične terapije MPM-a (89). Kitazume i suradnici pokazali su da je kombinirano imunohistokemijsko bojenje za E-kadherin i kalretinin korisno u razlikovanju reaktivnih mezotelnih stanica, MPM-a i

adenokarcinoma (86). Još jedan imunohistokemijski biomarker koji se pokazao visoko specifičan za diferencijalnu dijagnozu tj. razlikovanje MPM-a od drugih patoloških stanja je ranije navedeni BAP1 koji pokazuje specifičnost od 99% i senzitivnost od 70% za razlikovanje od karcinoma pluća i specifičnost od 100 % te senzitivnost od 70% za razlikovanje od karcinoma ovarija (90).

Osim same analize tkiva tumora, moguće je i detektirati biomarkere za MPM iz tjelesnih tekućina. Kad je riječ o biološkim tekućinama, krv i njezine sastavnice čine se najprikladnijima za detekciju biomarkera, jer sadrže više od 20 000 različitih proteina, što ju čini bogatim izvorom za dijagnostičke svrhe, uzevši u obzir lakoću prikupljanja i mogućnost ponavljanja testa koliko god je često potrebno u sklopu praćenja napredovanja bolesti ili odgovora na liječenje (91).

Predloženo je nekoliko krvnih biomarkera za incijalni MPM probir, dijagnozu, prognozu ili praćenje tijekom liječenja. Jedan od krvnih biomarkera koji se istražuje je mezotelin. Uloga mezotelina i drugih biomarkera za praćenje odgovora na antitumorsko liječenje trenutno se procjenjuje u nizu istraživačkih centara (7). Potencijalno korisni drugi krvni biomarkeri koji se istražuju uključuju CA 125, CA 15-3 i hijaluronsku kiselinu (92)..

Proteomika uključuje sveobuhvatna analizu cjelokupnog proteinskog profila uzorka. U posljednjim godinama proteomika je postala ključna metodologija za otkrivanje novih biomarkera u raznim stanjima i bolestima. Na primjer, primjenom masene spektrometrije na plazmi 12 bolesnika s MPM-om, identificiran je protein SPARC (od eng. *Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*) za kojeg su istraživači zaključili da bi mogao pomoći u procjeni prognoze progresije bolesti u pacijenata oboljelih sa MPM-om (93). Bolesnici s nižom razinom cirkulirajućeg SPARC-a imali su medijan preživljenja od 19 mjeseci, naspram 9 mjeseci kod bolesnika s visokom razinom cirkulirajućeg SPARC-a. Multivarijatna analiza potvrdila je da povišen SPARC u serumu neovisno predviđa lošiju prognozu. Ovaj protein, prisutan i u tumorskim stanicama i u fibroblastima strome mezotelioma, mogao bi stoga biti koristan prognostički biomarker MPM-a (Kao et al. 2016.). Neinvazivni serološki biljezi poput topljivih peptida povezanih s mezotelinom (SMRP od eng. *soluble mesothelin-related peptides*) i fibulina-3 također pokazuju obećavajuće rezultate za dijagnostiku MPM-a (64).

Druge biološke tekućine kao što su žuč, urin, sputum, sok gušterače te ascitesna, pleuralna i cerebrospinalna tekućina od velikog su interesa za otkrivanje biomarkera. Identifikacija biomarkera u tim biološkim tekućinama može biti olakšana manje složenim molekularnim sastavom bioloških tekućina u usporedbi sa krvlju. Iako neke biološke tekućine

dijele s uzorcima krvi jednostavnost prikupljanja i mogućnost laganog ponavljanja testa, analiza većine drugih bioloških tekućina u pravilu zahtijeva invazivni postupak, što otežava i ograničava njihovu ponovnu uporabu u kliničkoj praksi. Primjer biološke tekućine koja zahtijeva invazivnu metodu je cerebrospinalna tekućina, za čije je prikupljanje potrebna lumbalna punkcija (91).

Brojne proteomske studije usmjerile su se na identifikaciju proteina u pleuralnom izljevu u različitim stanjima. Ciljana su istraživanja tako rađena i za MPM na tkivu, serumu i pleuralnim izljevim (24,94–96) kao i komparativne analize malignih i benignih pleuralnih izljeva. Analiza proteoma pleuralnog izljeva posebno je interesantna jer pleuralna tekućina izravno odražava patofiziološke promjene koje se događaju u pleuralnom prostoru (97). Benigni pleuralni izljevi upalne etiologije (npr. tuberkulozni, parapneumonični ili pleuralni izljev kod reumatoidnih bolesti) mogu klinički i citološki imitirati maligne izljeve. Međutim, njihova pravovremena identifikacija izuzetno je bitna budući da liječenje osnovne upale (npr. antibiotici, antituberkulotici ili kortikosteroidi) često dovodi do potpunog izlječenja, za razliku od malignih bolesti. Klasični biomarkeri upale u pleuralnom izljevu uključuju visoku aktivnost adenzin-deaminaze (ADA) u tuberkuloznom pleuritisu, te povišen C-reaktivni protein (CRP) kod parapneumoničnih empijama (98,99). Stanice mezotelioma (posebno epiteloidnog podtipa) poznate su po lučenju visoke količine hijaluronske kiseline (HA) u pleuralni prostor – koncentracije HA u izljevu MPM višestruko su više nego kod benignih ili drugih malignih etiologija (100).

Liu i sur. analizirali su proteome šest različitih tipova pleuralnih izljeva (uključujući pleuralne izljeve uzrokovane karcinomom pluća, dojke i želuca, pleuralni izljev uz karcinom pluća bez tumorskih stanica, te benigne pleuralne izljeve kod tuberkuloze i pneumonije). U pleuralnim izljevim uzrokovanim nemikrocelularnim rakom pluća detektirali su 30 proteina čije su razine bile preko dva puta više nego u benignim pleuralnim izljevim (101). Nekoliko proteina su posebno zanimljivi kao potencijalni biomarkeri za diferencijaciju: MET (HGF receptor), DPP4 (dipeptidil-peptidaza 4, poznata i kao CD26) i PTPRF (protein-tirozin fosfataza receptorskog tipa F). Kvantifikacija metodom ELISA na 345 uzoraka pokazala je da su razine MET-a, DPP4 i PTPRF značajno više u malignim izljevim povezanim s rakom pluća nego u benignim ili paramaligim izljevim (pleuralni izljev uz tumor bez evidentnih tumorskih stanica). Razlike u razinama biomarkera bile su izraženije kod uzoraka sa pozitivnom citologijom, te su ovi proteini mogli pomoći u identificiranju citološki lažno

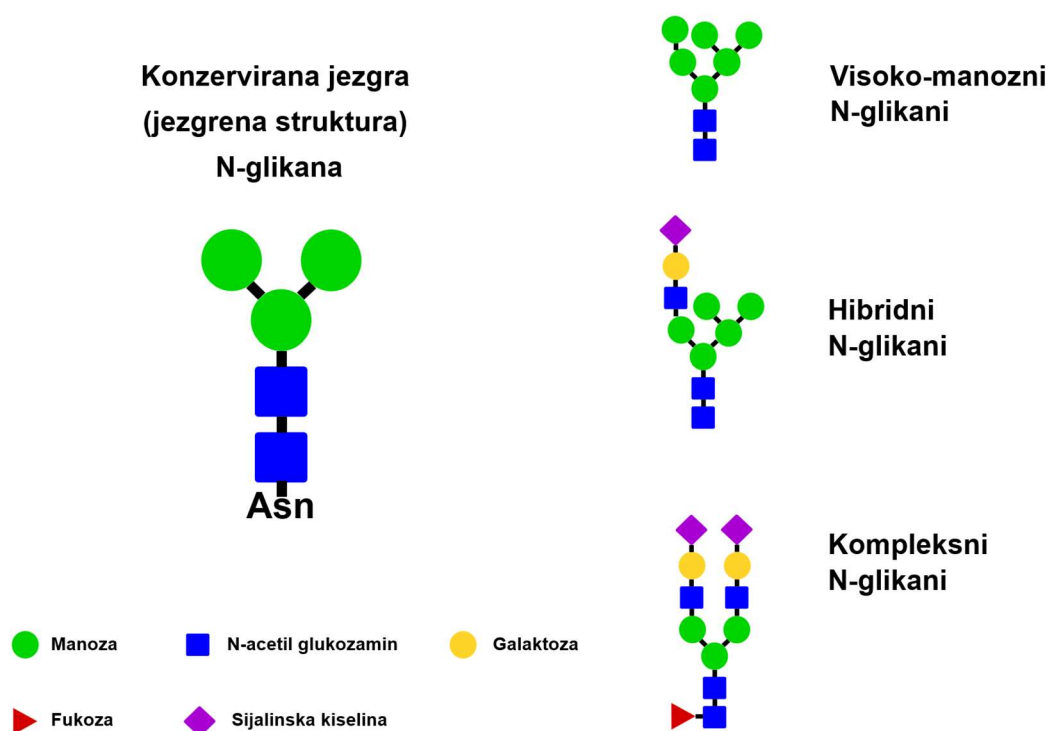
negativnih slučajeva. Ovi nalazi pokazuju važnost proteomike u otkrivanju markera tumorskog podrijetla u pleuralnoj tekućini (101).

Robak i sur. su ciljano evaluirali 53 proteina, uključujući većpoznate biomarkere raka, tuberkuloze i upale. Uočene su jasne skupine upalnih markera – primjerice, adenzin deaminaza 2 (ADA2) ili CXCL10 (poznat i kao IP-10 protein induciran interferonom- γ) su pronađeni kod tuberkuloznih pleuritisa (102). Multiklasna statistička analiza uspjela je ispravno svrstati izljeve u jednu od četiri kategorije: maligne, tuberkulozne, druge infektivne i benigne transudativne pleuralne izljeve. To pokazuje da kombinacija nekoliko proteina može poslužiti kao svojevrsni molekularni potpis određene etiologije pleuralnog izljeva. Maligni pleuralni izljevi karakterizirani su povišenjem niza različitih proteina povezanih s tumorom. Kao primjer može se navesti CDH1 (E-kadherin), koji ima vrlo važnu ulogu u stanično-staničnoj adheziji epitelnih tkiva. To je kandidat za serumski biomarker za dijagnozu uznapredovalog kolorektalnog karcinoma (Weiß et al., 2011).

Proteomski pristupi omogućili su identifikaciju mnoštva biomarkera - kandidata za MPM. Primjerice, Mundt i sur. su proteomskom analizom pleuralnih izljeva detektirali preko 1300 proteina, uključujući poznate markere i proteine uključene u invaziju tumora, angiogenezu i imunosnu evaziju. U njihovoj studiji sedam proteina kandidata identificirani su kao potencijalni biomarkeri za MPM, od kojih je najznačajniji galektin 1, za koji je utvrđeno da je prekomjerno izražen u adenokarcinomu pluća u odnosu na MPM. Ovi kandidati mogu poslužiti kao dijagnostički i prognostički pokazatelji bolesti (103). Ostroff i suradnici razvili su panel od 13 proteina koje su koristili kao biomarkere te su pokazali visoku točnost od 92 % u otkrivanju MPM-a u populacijama izloženim azbestu (104). White i suradnici su u proteomskom istraživanju pleuralnih izljeva pronašli više zanimljivih proteina. Zaključili su da su brojni proteini vezani uz VEGF signalni put izraženi u izljevima MPM-a, a posebno je zanimljivo da je koncentracija VEGF-A u pleuralnim izljevima korelirala sa kraćim preživljenjem bolesnika (94). Fibulin-3, matriksni protein, inicijalno je naveden kao obećavajući visoko specifičan biomarker, no druga ispitivanja na plazmi i pleuralnom izljevu nisu još potvrdila njegovu dijagnostičku vrijednost (23,105). Solubilni fragment mezotelina (SMRP) smatra se jednim od najspecifičnijih postojećih biomarkera za MPM, ali njegova osjetljivost je ograničena (106–108). Cirkulirajući fragmenti stanične slobodne mikroRNA (miRNA) također su istraživani kao biomarkeri kod nekoliko bolesti. Cirkulirajuće mikroRNA molekule, kao što je miR-625-3p, istražuju se i kao potencijalni dijagnostički biljezi i za MPM (109).

Osim proteina i nukleinskih kiselina, u posljednjem se desetljeću intenzivno istražuju i glikanski biomarkeri. Glikani je skupni naziv za kompleksne ili sekvencijalne polisaharide te polisaharidni dio glikokonjugata poput glikolipida, glikoproteina i proteoglikana. S obzirom na tip ugljikohidrata, konjugata na koji se veže ugljikohidrat te tipu veze razlikujemo nekoliko različitih tipova kao što su slobodni glikozaminoglikani koji se nalaze izvanstanično, glikozilirane nekodirajuće molekule RNA, glikosfingolipide u kojima je ugljikohidratna ekstenzija dodana na lipid, glikoproteine koji ovisno o tipu veze s proteinom mogu biti N-glikani ili O-glikani, itd. U slučaju O- glikana, ugljikohidrati se vežu za kisik iz aminokiseline serin ili treonin u aminokiselinskoj strukturi za vrijeme posttranslacijske modifikacije te imaju vrlo varijabilni sastav i izgled oligosaharidnog dijela. Za razliku od njih, N-glikani se vežu na aminokiselinu asparagin proteina u procesu sekvencijalne ko- i posttranslacijske modifikacije proteina te utječu nasmatanje proteina, stabilnost i funkciju proteina. Svi N-glikani prisutni u/na određenom tipu proteina, stanica, tkiva ili organizma kolektivno se zovu N-glikom. N-glikom se razlikuje ne samo ovisno o vrsti proteina/stanica/tkiva/organizma već i o starosti te zdravstvenom statusu zbog čega u zadnjih desetak godina raste interes za identifikaciju biomarkera među ovom skupinom molekula (110–113), uključujući i biomarkere za različite tipove raka (5,113–115).

U oligosaharidnoj strukturi N-glikana možemo razlikovati jezgru koja se u principu sastoji od pentasaharida tj. dva N-acetilglukozamina (GlcNac) produžena s tri manoze koje se granaju u dvije antene. Ova jezgra N-glikana često je dodatno modificirana, a ovisno o tipu i vrsti modifikacija antena razlikujemo visokomanozne, hibridne i kompleksne glikane (Slika 3). Osim manozu modificiran može biti i prvi N-acetilglukozamin i to fukozom koju tada zovemo jezgrena fukoza (od eng. *core fucose*).



Slika 3 N-glikani. Tipična jezgrena struktura N-glikana, monosaharidne jedinice od kojih su tipično izgrađeni N-glikani, te različite vrste N-glikanskih struktura.

Do sada je u MPM-u identificirano nekoliko glikanskih biomarkera. Nakashima et. al identificirali su monoklonsko antitijelo S1o koje prepoznaje glikane sa sulfatnom modifikacijom kao dijagnostički biomarker za MPM (116). Fujihira i suradnici otkrili su da mezotelin, jedan od glavnih biomarkera za MPM u epitelioidnom mezoteliomu ima bisektirajući GlcNAc na Asn388 koji nije identificiran na mezotelinu normalnih mezotelnih stanica te su čak predložili da bi se u svrhu terapije moglo razviti antitijelo specifično za ovaj glikoprotein (117). Hijaluronska kiselina koja je također identificirana kao potencijalni biomarker za MPM je polisaharid (29). Osim navedenih glikanskih biomarkera, i nekoliko proteina koji su identificirani kao biomarkeri za MPM su zapravo glikoproteini, poput MUC1 (118), Fibulin-3 (119) HEG1 (120), itd.

Lacerenza i sur. analizirali su sekretom stanica MPM-a metodom dvodimenzionalne elektroforeze u gelu i masene spektrometrije, usporedivši ga sa sekretom nemalignih mezotelnih stanica. Pronašli su dva potencijalna proteinska kandidata izrazito pojačane sekrecije: prosapozin i QSOX1 (od eng. *Quiescin sulfhydryl oxidase 1*). Oba su proteina uključena u biološke procese nastanka malignih tumora, a njihove razine u serumu bolesnika s MPM-om bile su značajno više nego u zdravih ispitanika. Kombinacija ovih dvaju markera pokazala je dobru dijagnostičku točnost u razlikovanju MPM bolesnika od kontrola. Ovi nalazi sugeriraju da bi panel od više biomarkera (npr. QSOX1 + prosapozin, uz postojeći mezotelin) mogao unaprijediti dijagnostiku mezotelioma (95). Prednost u dijagnostičkim postupcima bi u budućnosti mogle imati metode koje mogu istovremeno i bez dodatnih troškova identificirati nekoliko biomarkera istovremeno. Jedna od metoda koje daju veliku količinu informacija o ne samo jednoj već cijelom nizu biomolekula s potencijalom biomarkera je infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR).

2.5 FTIR-spektroskopija

Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR) je metoda kojom možemo mjeriti apsorpciju infracrvene svjetlosti u tekućinama, krutinama ili plinovima. FTIR-spektroskopija se temelji na činjenici da različite molekule apsorbiraju različite frekvencije infracrvenog zračenja, odnosno energija fotona koji se apsorbira odgovara energiji prijelaza između vibracijskih stanja molekule (121), zbog čega ju nazivamo i vibracijska spektroskopija. Vibracijska spektroskopija obuhvaća infracrvenu (IR) i Ramanovu spektroskopiju, koje analiziraju molekularne vibracije i rotacije (121,122). Apsorpcija infracrvenih fotona pobuđuje vibracije kemijskih veza unutar molekule te proizvodi karakterističan spektar – graf koji prikazuje koliki dio svjetla je apsorbiran pri pojedinim valnim brojevima (frekvencijama). Taj FTIR-spektar predstavlja svojevrsni molekularni otisak tj. „fingerprint“ uzorka, jer sadrži niz apsorpcijskih vrpca koje se mogu povezati s određenim funkcionalnim skupinama i strukturnim motivima molekula u uzorku (121). FTIR instrument mjeri ukupnu apsorpciju u širokom spektralnom području odjednom, a pomoću Fourierove transformacije dobiva se infracrveni spektar visoke rezolucije za svaki uzorak. Dobiveni se spektar potom koristi za kvalitativnu identifikaciju prisutnih molekula (prepoznavanjem karakterističnih vrpca) te kvantitativnu analizu njihovog udjela u uzorku (121).

Molekularne vibracije mogu se podijeliti u dvije skupine. Prva je vibracija istezanja, odnosno vibracija duž veze, pri čemu dolazi do kontinuirane promjene udaljenosti između atoma duž osi veze između dva atoma. Druga je vibracija savijanja, odnosno vibracija u ravnini, pri čemu dolazi do promjene kuta između dviju veza (123). Kada dolazi do ekspozicije uzorka infracrvenom (IR) svjetlu molekule unutar uzorka apsorbiraju fotone svjetlosti energije $E_{ph}=h\nu$ pri čemu je ν karakteristična frekvencija prijelaza a h Planckova konstanta. Zbog apsorpcije fotona raste vibracijska energija molekule. Različite veze, kao što su C-H, O-H, i N-H veze imaju različite distribucije vibracijskih stanja pa apsorbiraju različite frekvencije infracrvene svjetlosti. Zbog toga u spektru nastaju jedinstveni uzorci apsorpcije svjetla pri različitim valnim duljinama (121). Mjerenjem intenziteta apsorbiranog svjetla pri različitim valnim duljinama FTIR-spektrometar proizvodi karakteristični spektar za svaki uzorak. Navedeni spektar može se koristiti za pomoć u identifikaciji funkcionalnih skupina i različitih molekularnih struktura koje su prisutne u uzorku (121).

Unutar infracrvenog spektra znanstvenici često se koristi područje tzv. srednjeg infracrvenog spektra (mid-IR, $\sim 4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) u kojem pronalazimo vibracije većine relevantnih biomolekula unutar nekoliko različitih karakterističnih spektralnih područja (121). Prvo spekarsko područje od $3,000$ do $2,800\text{ cm}^{-1}$ je prvenstveno pod utjecajem specifičnih funkcionalnih grupa kao što su masne kiseline u staničnim membranama te vibracije određenih aminokiselina sporednih lanaca, koje su dominirane sa C-H rasteznim vibracijama CH_2 i CH_3 funkcionalnih skupina (121).

Lipidi doprinose spektru prvenstveno u području valentnih vibracija C-H veza: intenzivni pojasevi oko 2850 cm^{-1} (simetrično rastezanje CH_2 skupina) i $2920\text{--}2930\text{ cm}^{-1}$ (antisimetrično rastezanje $-\text{CH}_2$ skupina) dok oko 2959 cm^{-1} dolazi signal od antisimetričnog rastezanja CH_3 skupina iz lipida (38). Spektarsko područje koje se nalazi između $1,800$ and $1,500\text{ cm}^{-1}$ je vezano za funkcionalne skupine amida I i amida II u proteinima i peptidima, koje pokazuju informacije o proteinskoj strukturi uzorka, te vibracijske uzorke esterskih funkcionalnih skupina u lipidima, i u konačnici apsorpcijske uzorke nukleinskih kiselina (121). Proteini daju izražene vibracijske vrpce u amidskom području (Amid I oko $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$, Amid II oko $\sim 1540\text{ cm}^{-1}$, te slabiji Amid III oko $\sim 1300\text{--}1310\text{ cm}^{-1}$) koje potječu od vibracija peptidne veze ($\text{C}=\text{O}$ rastezanje i N-H savijanje) (38,124). Također, esterske skupine glicerolipida daju pojas oko $1735\text{--}1740\text{ cm}^{-1}$ (valentno rastezanje $\text{C}=\text{O}$ veze estera) što reflektira sadržaj triglicerida i kolesterol estera (38). Spektralno područje od $1,500$ do $1,200\text{ cm}^{-1}$ predstavlja raznoliku regiju koja je pod utjecajem proteina, masnih kiselina, spojeva sa fosfatnim grupama (121). Spektralno područje od $1,200$ to 900 cm^{-1} je karakterizirano simetričnim rasteznim vibracijama PO_2^- skupina u nukleinskim kiselinama, te vibracijama koje su vezane za ugljikohidrate, različite polisaharide ($\text{C}-\text{O}$, $\text{C}-\text{C}$ i $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ vibracije) (121). Zanimljivo je da u biološkim uzorcima proteini imaju relativno malu apsorbanciju u ovom spektralnom području te se mjerena apsorbancija u ovom dijelu spektra uglavnom pripisuje ugljikohidratnoj komponenti uzorka (ugljikohidrati, glikani) (125,126). Zadnji spektralni prozor koristan u evaluaciji je između 900 i 700 cm^{-1} koji pokazuje diskretne spektralne uzorke koji proizlaze i spektralnih uzoraka vibracija aromatskih prstena u specifičnim aminokiselinama i nukleotidima (121).

2.5.1 Primjena FTIR-spektroskopije u biologiji i medicini

Promjene u biokemijskom sastavu stanica i tjelesnih tekućina često prate razvoj bolesti. Vibracijska spektroskopija tj. FTIR može detektirati takve promjene u spektralnim podacima prije nego što postanu klinički vidljive (91,127). Zbog toga je ova tehnika sve više istraživana kao alat za istraživanje razvoja bolesti. Dok se klasične proteomske metode (poput masene spektrometrije) fokusiraju na identifikaciju pojedinačnih proteina i njihovih promjena, FTIR-spektroskopija nudi komplementaran pristup – ona ne razlučuje pojedine proteine, ali pruža ukupni molekularni profil uzorka iz kojeg se mogu iščitati ključne informacije o proteomu i drugim biomolekulama. FTIR-spektar uzorka sadrži značajke koje odražavaju sastav proteina, njihovu sekundarnu strukturu (udjeli α -heliksa, β -ploča, neuređenih struktura), kao i udio drugih važnih komponenti poput lipida i nukleinskih kiselina. Na taj način, FTIR omogućuje praćenje globalne promjene u molekularnom sastavu stanica ili tkiva i njihovo povezivanje s biološkim procesima u pozadini. Nadalje, FTIR-analiza je brza, jeftina, neinvazivna i ne zahtijeva bojanje ili obilježavanje uzoraka, što je velika prednost u usporedbi s tradicionalnim metodama. Moguće je direktno analizirati serum, plazmu, urin ili drugo bez složene pripreme, pri čemu se infracrvenim spektrom odmah dobivaju informacije o raznim komponentama (proteinima, lipidima, šećerima itd.) prisutnima u uzorku (91).

Abbas i suradnici koristili su FTIR-spektroskopiju uz kemometrijsku analizu za ispitivanje uzoraka pleuralne tekućine u 24 uzoraka MPM-a, 20 uzoraka karcinoma pluća i 25 uzoraka benignog pleuralnog izljeva. Njihova metoda postigla je visoku osjetljivost i specifičnost u razlikovanju pleuralnih tekućina MPM-a od tekućina karcinoma pluća i benignog pleuralnog izljeva (BPE), što su potvrdile analize hijerarhijske klusterske analize (HCA) i analize glavnih komponenata (PCA). U svojoj analizi postigli su čak 100 %-tnu osjetljivost i specifičnost u razlikovanju MPM-a od karcinoma pluća, te 100 %-tnu osjetljivost i 88 %-tnu specifičnost u razlikovanju od benignog pleuralnog izljeva (38). U skupinama MPM-a i karcinoma pluća dobili su značajno viši sadržaj lipida, proteina te nukleinskih kiselina i glukoze. Za razliku od navedenog značajne promjene u sadržaju triglicerida i kolesterol estera, strukturi proteina i nukleinskih kiselina, niža fluidnost membrane te veća uređenost membrane zabilježene su isključivo u skupini MPM-a (38).

Yonar i suradnici su u svojem istraživanju analizirali razlikovanje MPM-a od karcinoma pluća, benignih eksudativnih izljeva i zdravih ispitanika analizom uzoraka seruma. Korištena je ATR-FTIR-spektroskopija za analizu seruma, pri čemu su uočene značajne

spektralne razlike među skupinama (128,129). Amidni modovi proteina tj. vibracijske vrpce amidnih grupa (Amid A: N-H rastezanje, Amid I: C=O rastezanje, Amid II: N-H savijanje i C-N rastezanje te Amid III: C-N rastezanje i N-H savijanje) pokazale su blage razlike, dok su najizraženije promjene zabilježene u području od 1300 do 800 cm^{-1} , što ukazuje na razlike u biomolekularnom sastavu (128,129).

Sadiku-Zehri i sur. (2020) proveli su preliminarno istraživanje u kojem su spektrom FTIR promatrali uzorke bioptiranog pleuralnog tkiva kod različitih lezija: MPM-a, metastatskog adenokarcinoma u pleuri te upalne promjene pleure. Korištena je mikroskopska FTIR metoda na parafinskim presjecima pleure, uz PCA statistički model za klasifikaciju. Rezultati su pokazali da se spektri tkiva jasno grupiraju prema dijagnozi: mezoteliomi, metastaze i reaktivne upale pleure imali su međusobno odvojene klastere u PCA prostoru.

3. Metode i materijali

3.1 Uzorci

Zaštita identiteta i podataka pacijenata osigurana je tako što su originalni uzorci pohranjeni u Odsjeku za Patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kodirani, te se tablica s drugim relevantnim podacima pacijenata vodi odvojeno i sa zatvorenim pristupom. Uzorci su prema tome preuzeti i analizirani u svim koracima samo sa odgovarajućim jedinstvenim kodom pacijenta. Planirani eksperimenti i tijek studije opisani su i predani na uvid Etičkom povjerenstvu Medicinskog Fakulteta koje je dalo pozitivnu procjenu i odobrenje za izvođenje studije broj: 380-59-10106-19-111/222, klasa: 641-01/19-02/01, 18.09.2019.

Za analizu tkiva metodom FTIR-spektroskopije korišteni su uzorci tkiva pacijenta s različitim patologijama (20 po tipu). Uzorci zdrave plućne pleure, upale pleure, metastatskog adenokarcinoma pluća u pleuri te mezotelioma pleure izrezani bili su formalinom fiksirani u parafin uklopljena tkiva arhivirana u Zavodu za Patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od svakog tkiva napravljeno je 6 presjeka. Presjek debljine 5 µm korišten je za histopatološku analizu dok je 5 presjeka debljine 10 µm korišteno za FTIR-spektroskopiju.

Za analizu N-glikoma zdrave pleure i MPM-a korišteno je tkivo 30 pacijenata sa MPM-om te 30 pacijenata sa zdravom pleurom. Uzorci su bili formalinom fiksirani u parafin uklopljena tkiva arhivirana u Zavodu za Patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od svakog bloka tkiva napravljeno je 6 presjeka debljine 10-15 µm (Slika 4), koji su zatim u daljnjoj proceduri spojeni u jedan jedinstveni uzorak. Uzorci su primljeni s jedinstvenim kodom bez informacija o pacijentu, te su zatim jedinstveni kodovi promijenjeni u skraćene kodove s opisom histopatologije (MPM za uzorke mezotelioma i NP za normalne uzorke pleure).



Slika 4 Presjeci tkiva MPMa korišteni za analizu N-glikoma. 6 presjeka istog tkiva spojeno je u jedan uzorak za analizu N-glikoma. Uzorci su kodirani zbog zaštite identiteta pacijenata.

3.2 FTIR-spektroskopija

Uzorci za FTIR-spektroskopiju deparafinirani i rehidrirani su na predmetnici standardnim histološkim protokolom na stakalcu (ksilen, silazni niz etanola, voda) (36). Ukratko, nakon toga su smješteni na silicijske pločice, inkubirani su u termostatu jedan sat te zatim isprani tri puta u ksilenu (10 min po ispiranju) pa zatim smješteni 60 min u vakuum da bi se ekstrahirala preostala voda. Silicijske pločice su standardna podloga za transmisijsku IR spektroskopiju tkiva jer kristalni silicij ima malu apsorpciju u mid IR-u. FTIR-spektri snimljeni su na tako pripremljenim uzorcima korištenjem PERKIN-Elmer SPECTRUM GX spektrometra opremljenim s tekućim dušikom (N₂)- hlađenim MCT (Mercury Cadmium Telluride) detektorom. Za svako tkivo napravljeno je 100 snimki za prikupljanje vibracijskog spektra, u trajanju od 5 minuta po uzorku. FTIR-spektri snimljeni su na tako pripremljenim uzorcima u transmisijском modu (451-3994 cm⁻¹) s apsorpcijskim prozorom od 1 cm⁻¹. Pozadinski šum automatski je oduzet.

3.3 Analiza FTIR-podataka

Statistička analiza podataka prikupljenih FTIR-spektroskopijom učinjena je korištenjem programa MATLAB 2012a s PLS Toolbox 9.0. Prije same analize podaci su obrađeni koristeći program koji je izrađen za tu svrhu na Zavodu za fiziku i biofiziku Medicinskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u programskom paketu Matlab, ukratko, svi

snimljeni spektri su korigirani u odnosu na baznu liniju pomoću airPLS (od eng. *adaptive iteratively reweighted penalized last squares*) algoritma (130) i normalizirani pomoću SNV (*Standard Normal Variate*) algoritma (131).

Nadalje, da bi se testirala značajnost razlika u spektru između uzoraka različitih patologija primijenjena su dva statistička testa: Prvo je učinjena analiza-PCA (od eng. *Principal component analysis*). PCA je učinjena na isti način kao i u radu F. Sadiku Zehri 2020. Ukratko, Matlab i PLS Toolbox (Eigenvector Research) su korišteni za izradu kvantitativnog modela identičnog modelu u Sadiku Zehri et al. kako bi osigurali komparativnost rezultata (36). Zatim su u ovoj analizi dodani težinski faktori (umnožak 1-p vrijednosti za svaku kombinaciju tkiva) za unaprjeđenje PCA analize i lakše raspoznavanje tipa tkiva. Za validaciju modela korišteno je 150 nasumično odabranih mjerenja. Normalna pleura isključena je iz procesa validacije modela. Osim PCA analize napravljen je ikruskal-Wallis test. Da bi utvrdio odgovarajući statistički test, prvo sam testirao distribuciju uzoraka. Kako se radi o neparametrijskoj distribuciji, odabran je kruskal wallis test. Test je proveden na ukupno 3543 mjerenja na valnim duljinama od 451 cm⁻¹ do 3994 cm⁻¹ s rezolucijom od 1 cm⁻¹. Statistička analiza napravljena je u programu Matlab. Rezultati ove analize smatrani su značajnim ako je p vrijednost bila manja ili jednaka 0,05. Kruskal-Wallis testom prikazani su na slici 7 u kojoj su ucrtane valne duljine (izražene u cm⁻¹) te p-vrijednosti (Slika 7). i kao Tablica 3 Priloga.

3.4 Upotreba neuralnih mreža za generiranje modela za razlikovanje upala, metastaza, normalne pleure i mezotelioma

Apsorbancije sva 4 histopatološka tipa pleure na svim analiziranim valnim duljinama (451 cm⁻¹ do 3994 cm⁻¹) u CSV -ormatu korištene su kao početna datoteka za podatke koji su dalje računalno analizirani u Pythonu (Python ver. 3.10). Za analizu je korišten sustav tzv. konvolucijske neuralne mreže (CNN od eng. *convolution neural network*). Konvolucijska neuralna mreža je računalni model napravljen za prepoznavanje uzoraka i učenje iz podataka, a konstruiraju se kroz seriju tzv. nodula koji procesuiraju i transformiraju učitano (eng. *input*) informaciju (u ovom slučaju CSV datoteka s rezultatima FTIR-analize) u korisnu izlaznu informaciju (eng. *output*). Za generiranje rezultata (u ovom slučaju u obliku modela za razlikovanje upala, metastaza u pleuri, normalne pleure i MPM-a) potrebna je prvo tzv. faza treninga. Čvorovi su međusobno povezani (imitacija povezanosti neurona u mozgu). Na

početku sve veze imaju početnu „težinu“, no u procesu treninga ta „težina“ veze tj. značajnost veza između čvorova se prilagođava kao u svojevrsnoj simulaciji procesa učenja koje ojačava veze između neurona bitnih za procesuiranje naučene informacije u ljudskom mozgu.

Za razlikovanje histopatoloških tipova pleure u Pythonu su generirana dva računalna modela. Jedan sa apsorpcijskim prozorom od 50 cm⁻¹ a drugi sa apsorpcijskim prozorom 10 cm⁻¹. U oba slučaja korištena je tzv. konvolucijska neuralna mreža (CNN) bazirana na arhitekturi LeNet koju je razvila tvrtka Yann LeCun u AT&T Bell laboratories (132,133), no prilagođena je za prepoznavanje apsorpcijskih spektara. Ova prilagođena CNN arhitektura koristi: 1) dva konvolucijska sloja, prvi (conv1) sa 16 filtera i drugi (conv2) sa 32 filtera, 2) MaxPooling sloj za smanjenje dimenzionalnosti koji smanjuje količinu podataka uz očuvanje bitnih značajki, 3) Tri potpuno povezana (od eng. *fully connected*) sloja (fc1, fc2 i fc3) koji donose konačnu odluku o klasifikaciji. Ovisno o rezoluciji spektra, programska petlja zatim prolazi kroz cijelo mjereno spektralno područje u koracima 10cm⁻¹ ili 50cm⁻¹. Podatci se zatim alatom iz scikit-learn biblioteke alata koja olakšava brzu i efikasnu izradu modela za strojno učenje standardiziraju i normaliziraju uz pomoć tzv. StandardScaler alata(sklearn.preprocessing) koji se standardno koristi u tehnikama pred-procesuiranja podataka za strojno učenje a radi tako da određuje 0 kao srednju vrijednost i 1 kao standardnu devijaciju. Osim toga, generiran je i kod za nasumičan unos podataka (eng. DataLoader) koji prilagođava podatke za unos u CNN i olakšava unos podataka.

U oba slučaja za trening neuralne mreže korišteno je 70% dostupnih podataka i trening se odvijao u 50 iteracija za zadano spektralno područje, a 30% dostupnih podataka koristilo se kao set za testiranje. Potom se provela evaluacija modela odnosno, račun točnosti (eng. accuracy), matrica zbunjenosti (eng. confusion matrix), preciznost (eng. precision), senzitivnost (eng. sensitivity) i specifičnost (eng. specificity) i ispis podataka. Osnovni kod u Pythonu koji je zadužen za definiranje mreže nalazi se u prilogu (P2).

Upotrebom konvolucijskih neuralnih mreža (CNN) određeni su dijelovi spektra pomoću kojih je moguće razlikovati upalna stanja pleure, metastatski adenokarcinom u pleuri i normalnu pleuru od mezotelioma. U tu svrhu prvo je spektar podijeljen u spektralna područja širine 50 cm⁻¹ a u Tablici 1 navedeni su dijelovi spektra koji su imali veće od 0,75 rezultate: Točnosti (Accuracy); Preciznosti (eng. Precision ili Positive Predictive Value) tj. pozitivne prediktivne vrijednosti koja indicira proporciju pozitivnih predikcija koje su točne; Senzitivnosti (eng. Sensitivity, Recall ili True Positive Rate) tj. prave pozitivne mjere koja mjeri mogućnost modela da identificira sve pozitivne događaje, te Specifičnosti (eng.

Specificity, True Negative Rate) tj. prave negativne mjere koja mjeri mogućnost modela da točno identificira sve negativne događaje.

Nakon ove obrade, spektralni prozor smanjen je na 25 cm⁻¹ i zatim 10 cm⁻¹ s ciljem utvrđivanja signala tj. valnih duljina s većom kontribucijom prilikom razlikovanja histopatologije uzoraka. Dobiveni rezultate analize s rezolucijom 25 cm⁻¹ korišteni su za kreiranje računalnog modela za predviđanje histopatološke dijagnoze uzoraka tkiva. Rezultati su prikazani su u obliku tzv. matrice zbunjenosti (od eng. *confusion matrix*) (Slika 10). Matrica zbunjenosti je tablica koja na X osi prikazuje predviđene vrijednosti tj. predviđene pozitivne i predviđene negativne ishode testa (eng. *predicted label = predicted positive, predicted negative*), a na Y osi prave vrijednosti tj. prave pozitivne i prave negativne ishode (eng. *True label = true positive, true negative*). Sukladno tome, dijagonalni elementi matrice zbunjenosti govore nam o točnim predviđanjima (visok broj znači visok broj točnih predviđanja), dok su svi elementi izvan dijagonale uzorci koji su krivo identificirani uz pomoć modela tj. lažno pozitivni i lažno negativni uzorci.

3.5 Izolacija glikana iz tkiva

Za izolaciju N-glikana iz tkiva pluća korištena je metoda originalno razvijena za izolaciju glikana iz tkiva mozga ((134,135). Ukratko, prvo je proveden postupak deparafinizacije i rehidracije tako što je dva puta napravljeno ispiranje stakalca s tkivima ksilenom u trajanju od 10 minuta po ispiranju. Zatim su napravljena 2 ispiranja uzoraka u 100% etanolu u trajanju od 5 minuta po ispiranju, pa 2 ispiranja u 96% etanolu u trajanju od 5 minuta svako, zatim 2 ispiranja u 70% etanolu od 5 minuta svako te naposljetku 2 ispiranja u vodi u trajanju od 5 minuta po ispiranju. Uzorci su nakon toga skalpelom preneseni u epruvete za mikrocentrifugu s RIPA-puferom i inhibitorima proteaza. U ovom je koraku 6 presjeka tkiva istog pacijenta spojeno u jedinstveni uzorak. Sljedeći je korak bila denaturacija i deglikozilacija. Epruvete za mikrocentrifugu s uzorcima su vorteksirane i z njih je uzet alikvot za deglikozilaciju. Nakon dodatka β -merkaptoetanolu uzorci su vorteksirani, centrifugirani i denaturirani 10 minuta na temperaturi od 60°C. Nakon dodatka Igepala i PNGase F, uzorci su inkubirani na 37°C preko noći. Drugo jutro, uzorci su centrifugirani i u uzorak su dodani voda, metanol i kloroform u omjerima 1 (voda) : 4 (metanol) : 1 (kloroform). Nakon vorteksiranja i centrifugiranja 2 min na sobnoj temperaturi, vodena faza je prikupljena i preseljena u nove epruvete te su uzorci osušeni u vakuum centrifugi. Tako prikupljeni talog

glikana resuspendiran je u vodi i označen Prokainamidom (4-amino-N-(2-dietilaminoetil) benzemidom), spojem koji sadrži fluorescentnu grupu za detekciju na UPLC-u te 2-(dietilamino)etil grupu koja poboljšava efekt ionizacije prilikom spektrometrije masa (MS).

3.6 UPLC-analiza glikana

Glikani su označeni fluorescentnom bojom (Prokainamidom) te prije injektiranja u kolonu držani na 5°C. Tako označeni glikani zatim su provedeni kroz HILIC-kolone na instrumentu Acquity UPLC (od eng. *ultra high-pressure liquid chromatography*) (Waters, SAD). HILIC (od eng. *hydrophilic interaction liquid chromatography*) je vrsta tekućinske kromatografije koja funkcionira na principu polarnosti molekula. U HILIC kolonama molekule koje pokazuju jaču polarnost pokazuju jaču interakciju sa tzv. stacionarnom fazom. Za izolaciju označenih glikana koristi se posebna vrsta HILIC kolona zvana BEH (od eng. *Ethylene bridges hybrid*) s BEH-česticama veličine 1,7 µm kao stacionarnom fazom (u koloni veličine 150 mm x 2,1 mm). Kako bi se poboljšalo razdvajanje glikana korišten je linearni gradijent od 27 do 38,7% otopine 100 mM amonijevog formata pH vrijednosti 4.4, te acetonitrila kao druge otopine. Kolona je držana na sobnoj temperaturi (25°C). Prikupljeni kromatogrami integrirani su metodama procesuiranja podataka utemeljenim na standardnim algoritmima nakon čega je provedena i manualna kontrola i korekcija. Svaki je vrh numeriran u odnosu na retencijsko vrijeme.

3.7 Imunohistokemijsko bojenje

Za imunohistokemijsku analizu korišteni su 5 µm presjeci istih uzoraka koji su korišteni za UPLC-analizu glikana (MPM uzorci 1-30, NP uzorci 1-30). Imunohistokemijsko bojenje je učinjeno na Zavodu za Patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu standardnim protokolom. Ukratko, uzorci su deparafinirani ksilenom i kako je i ranije opisano rehidrirani u seriji graduiranih otopina alkohola (36). Demaskiranje antigena (eng. *Antigen retrieval*) učinjeno je dodatkom EDTA-pufera pH 9 (DakoCytomation) 3 x 5 min u mikrovalnoj pećnici. Prerezi su zatim inkubirani s primarnim antitijelima 30 min (monoklonsko antitijelo specifično za BAP1 klon C-4; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) razrijeđenom u omjeru 1:100 te zatim sa sekundarnim antitijelima (Dako REALTM EnVisionTM/Peroksidaza hrena, Zec/Miš) dodatnih 30 minuta, te naposljetku još 10 minuta

sa substratom (Dako REALTM Diaminobenzidin + Kromogen). Uzorci su isprani 3 x s puferom za ispiranje DakoCytomation. Kao pozitivna i negativna kontrola korišteni su uzorak mezotelioma s gubitkom ekspresije BAP-1 te normalna pleura. Uzorci su zatim obojani hematoksilinom i pregledani na mikroskopu BX53 Olympus. Obzirom na bojenje učinjeno je nekvantitativno bodovanje bojanja uzoraka sa sljedećim rezultatima: BAP1 - = negativno bojenje na BAP1 u staničnoj jezgri na više od 80% stanica uzorka, BAP1 + = pozitivno bojenje na BAP1 u staničnoj jezgri na više od 80% stanica uzorka.

4. Rezultati

4.1 Apsorpcijski spektar uzoraka pleure s različitom histopatologijom

Analizom spektra dobivenog FTIR-analizom uzoraka normalne plućne pleure, upale pleure, metastaza adenokarcinoma i MPM-a uočio sam da postoji nekoliko izraženih vibracijskih vrpce u biološki značajnim regijama. Na području 950 do 1200 cm^{-1} nalazi se regija u kojoj bilježimo apsorpciju ugljikohidrata i glikana, a istovremeno je u toj regiji vrlo mala pozadinska apsorpcija proteina. U toj regiji u rezultatima provedene FTIR-analize nalaze se kod svih tipova uzoraka (normalna pleura, inflamacija tj. upala pleure, metastaze adenokarcinoma u pleuri i MPM) dvije skupine slabijih vibracijskih vrpce koje apsorpcijom prelaze 0,2 AU (Slika 5). Iako svi mjereni uzorci konzistentno pokazuju ove dvije skupine vibracijskih vrpce, intenzitet i oblik vibracijskih vrpce koji nose informaciju o dominantno prisutnim funkcijskim skupinama molekula razlikuju se ovisno o histopatologiji. Područja u kojima se apsorbancija različitih histopatoloških uzoraka ne preklapa tj. u kojoj apsorbancija pojedinog tipa histopatologije odskače od ostalih tipova uzoraka dodatno su označena na slici 1 plavom bojom za inflamaciju pleure, zelenom bojom za metastaze adenokarcinoma, crveno za MPM te žuto za normalnu pleuru. U ovom pojasu vidljiva su tako odstupanja gotovo svih vrsta uzoraka.

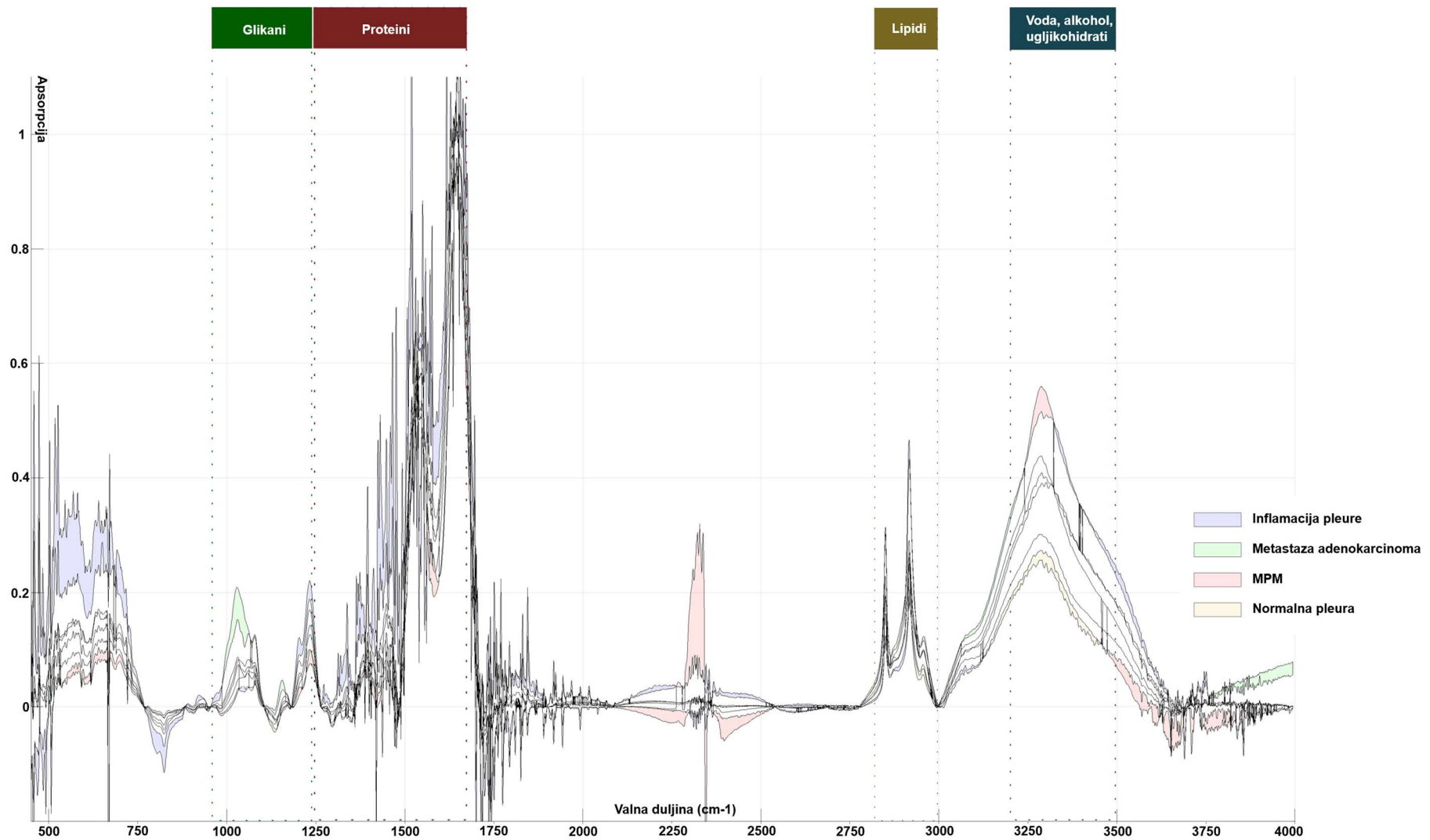
U pojasu između cca. 1240 cm^{-1} i 1700 cm^{-1} slijedi biološki značajno područje za proteine. Ovo je u rezultatima FTIR-analize uzoraka plućne pleure s različitom histopatologijom ujedno i najizraženija skupina vibracijskih vrpce koja po intenzitetu doseže 1 AU. Pri analizi razlika između pojedinačnih histopatologija plućne pleure uočio sam da u ovoj regiji predominantno odstupa apsorpcija inflamacija plućne pleure (Slika 5, plavo) potencijalno zbog infiltracije plućne pleure različitim stanicama i izlučivanja proteina koji sudjeluju u inflamaciji plućne pleure. Iako u ovoj regiji postoji i određeno odstupanje MPM-a, za druge dvije vrste histopatologija (metastaza adenokarcinoma, normalna pleura) razlike nisu toliko uočljive.

Između 2850 i 3000 cm^{-1} nalazimo još jednu skupinu vibracijskih vrpce. Na ovim valnim duljinama od biološki značajnih molekula predominantno apsorbiraju lipidi i masne kiseline (136). Vibracijske vrpce u ovoj u ovoj regiji su uske i najintenzivnije prelaze

vrijednost od 0,4 AU (Slika 5). Unatoč malim razlikama u položaju i intenzitetu vibracijskih vrpce, u ovoj regiji nalazimo odstupanja za sve 4 klase histopatoloških tipova uzoraka.

Na valnim duljinama iznad 3000 cm^{-1} smanjuje se udio i broj vibracija kemijskih veza koje nalazimo u biološkim molekulama, no ovdje nalazimo dio vibracijskog spektra ugljikohidrata, kao i vode i alkohola. U regiji između 3000 i 3600 cm^{-1} nalazimo još jednu izraženu skupinu širokih vibracijskih vrpce s vidljivim razlikama između svih histopatoloških tipova uzoraka, no najizraženijim promjenama između MPM-a (Slika 5, crveno) i normalne pleure (Slika 5, žuto).

Valne duljine povezane uz funkcijske skupine značajnih bioloških molekule predstavljaju samo simplifikaciju situacije u kompleksnim uzorcima gdje u gotovo svim dijelovima spektra dolazi do preklapanja, pa je tako npr. dijelove spektra u kojem apsorbiraju nukleinske kiseline teško obraditi na ovaj način jer se ili preklapaju s pojasom u kojem apsorbiraju druge biološki značajne molekule ili se radi o vrlo uskom pojasu.

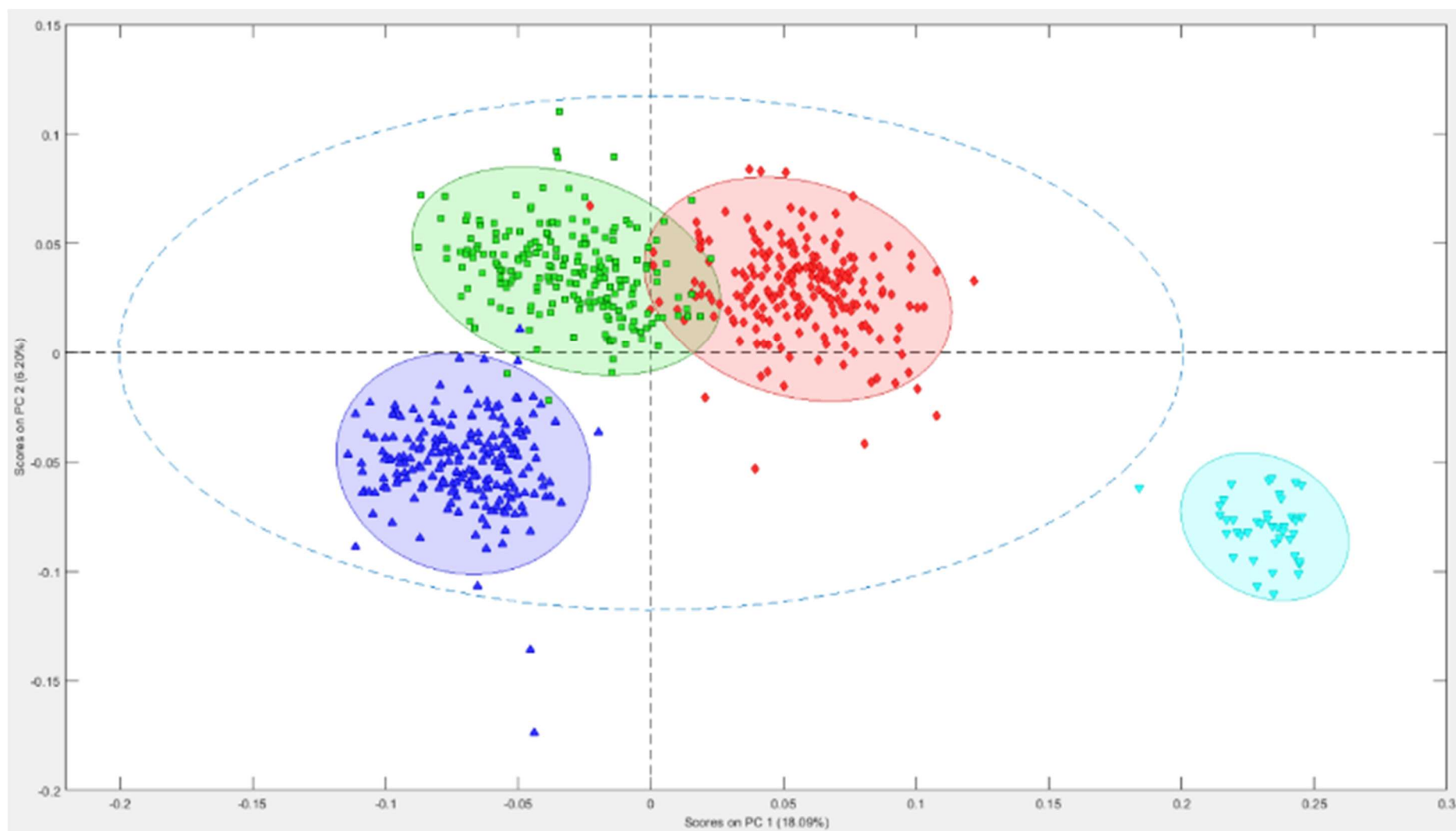


Slika 5 Apsorpcijski spektar normalne pleure, MPM-a, metastaza adenokarcinoma u pleuri i inflamacije (upale) pleure.

4.2 Rezultati analize PCA

U provedenoj PCA analizi s dvije principijelne komponente (PC1 = prva principijelna komponenta, komponenta koja korelira s najvećim brojem varijabli, PC2 = druga principijelna komponenta) vidljivo je da su normalna pleura (Slika 6, svijetlo plavo) i mezoteliom (Slika 6, tamno plavo) izdvojeni od metastaza adenokarcinoma (Slika 6, zeleno) i inflamacija pleure (Slika 6, crveno) među kojima postoje određena preklapanja (Slika 6).

Na temelju dobivenih rezultata moguće je jasno razlikovati maligni pleuralni mezoteliom (MPM) od upalnih stanja pleure i metastaza adenokarcinoma. Također, vidljivo je i da se rezultati FTIR-analize MPM-a grupiraju mnogo bliže upali pleure i metastazama adenokarcinoma u pleuri, u odnosu na normalnu pleuru što je potencijalno rezultat izraženih reaktivnih (inflamatornih, vaskularnih ili drugih) promjena u metastazama adenokarcinoma i MPM-u u odgovoru na maligne promjene. Veće preklapanje vidljivo je između upalnih stanja pleure i metastaza adenokarcinoma nego između upalnih stanja pleure i MPM-a.

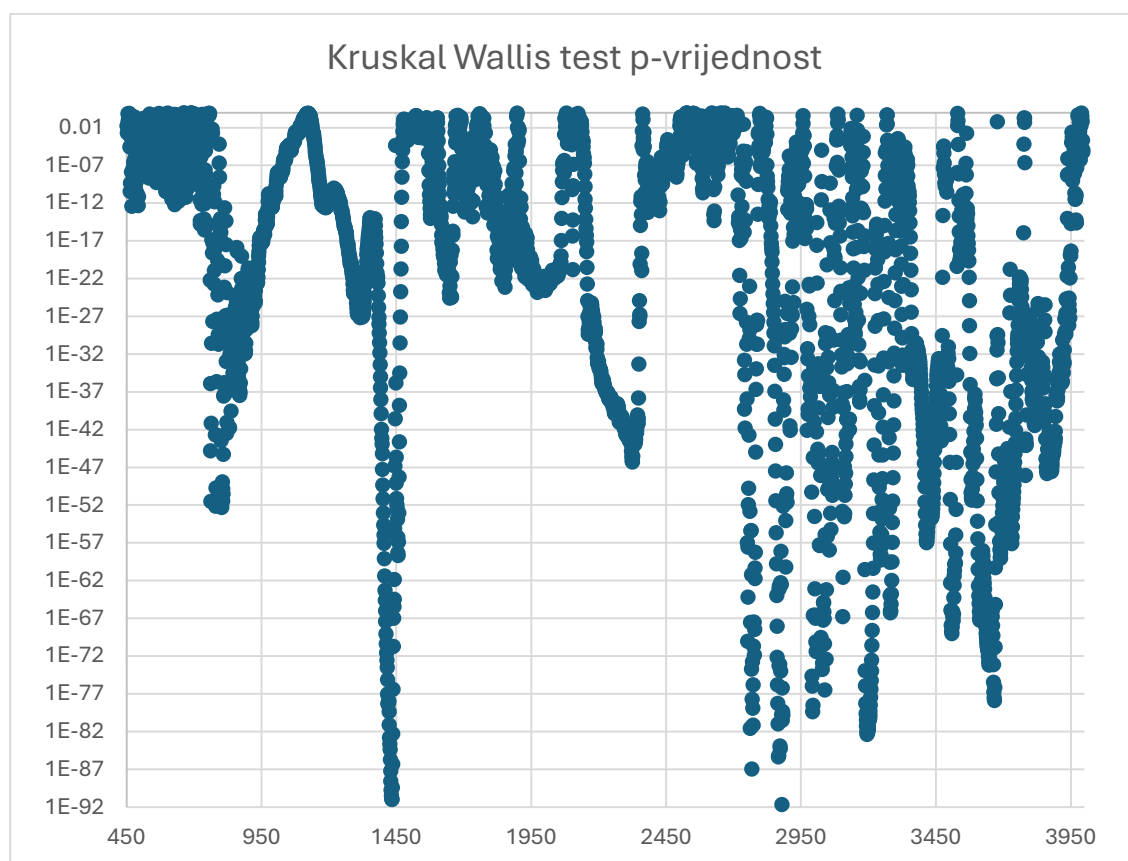


Slika 6 a Rezultati FTIR-analize MPMa (tamno plavo) u PCA analizi jasno su izdvojeni od normalne pleure (svijetlo plavo), adenokarcinoma (zeleno) i upale pleure (crveno).

4.3 Statistička analiza

Rezultati ove analize Kruskal-Wallis testom prikazani su na slici 7 u kojoj su ucrtane valne duljine (izražene u cm^{-1}) te p-vrijednosti (Slika 7). i kao Tablica P1 Priloga.

Od ukupno 3543 mjerenih valnih duljina u rasponu od 451 cm^{-1} do 3994 cm^{-1} s rezolucijom od 1 cm^{-1} u statističkoj analizi dobivenih FTIR rezultata značajan je izuzetno velik broj valnih duljina (Slika 7, tablica P1 u prilogu) što ukazuje na činjenicu da je gotovo cijeli spektar informativan. Specifično, kod uočenih značajnih valnih duljina za razlikovanje histopatoloških tipova uzoraka plućne pleure na prvi pogled nije jednostavno identificirati koje su biološki značajne regije više informativne (i.e. sastav nukleinskih kiselina, ugljikohidrata/glikana, proteina ili lipida), stoga je kako bi ekstrahirali biološki relevantne podatke za dublju analizu korištena napredna računalna metoda analize tj. generiranje prediktivnog modela putem neuralnih mreža.



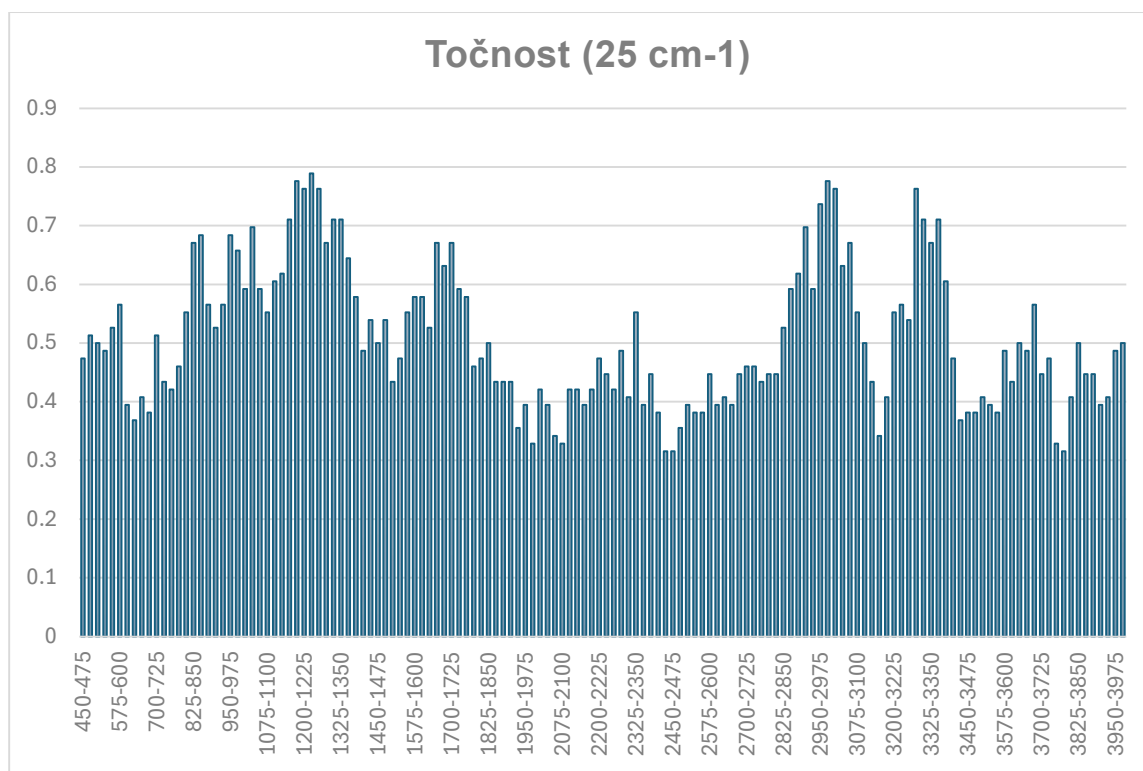
Slika 7. Rezultati Kruskal-Wallis testa. Na Y osi su p-vrijednosti za međusobno razlikovanje histopatoloških stanja a na X osi su valne duljine. Svi rezultati p-vrijednosti manji od 0,05 smatraju se statistički značajnima.

4.4 Model za predviđanje tipa uzorka

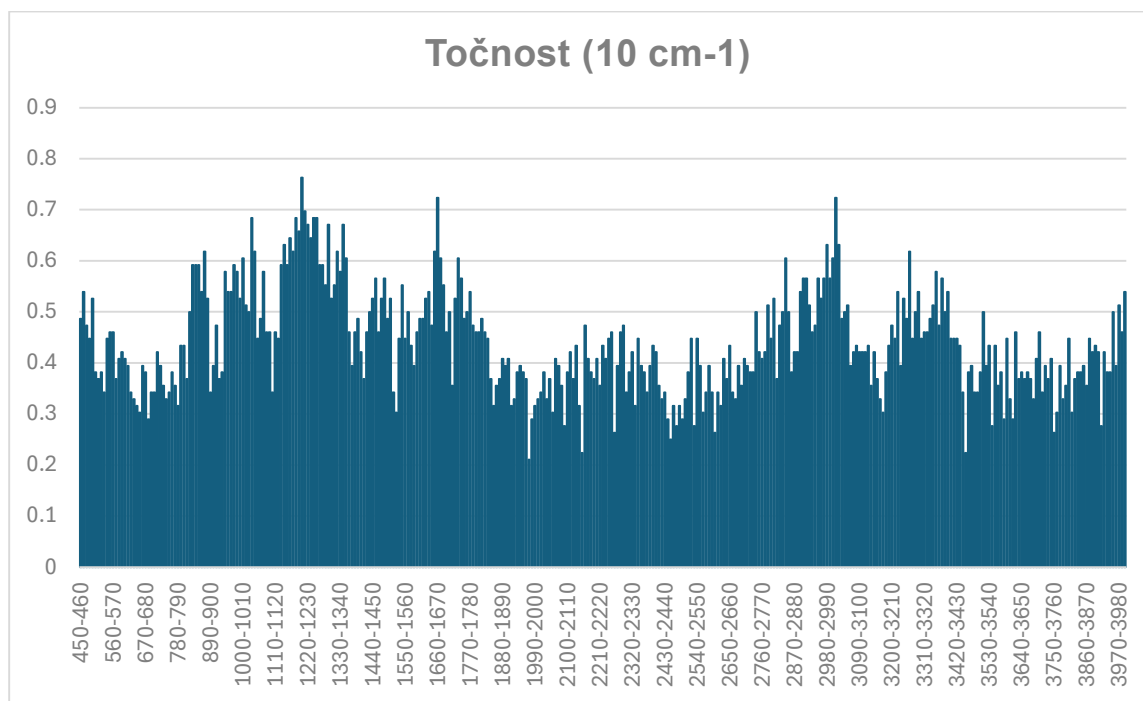
Koristeći 70% mjerenih uzoraka za trening CNN modela i 30% za test dobio sam slijedeće ukupne rezultate modela za predviđanje tipa uzorka: Točnost testa (Test Accuracy): 0,9342, Preciznost testa (Precision): 0,9361, Senzitivnost testa (Sensitivity, Recall): 0,9342, Specifičnost testa (Specificity): 0,9387. U Tablici 1 prikazani su dijelovi spektra (podijeljenog na 50 cm^{-1}) s rezultatom većim od 0,75. Slična je kontribucija modelu uočena i smanjenjem spektralnog prozora na 25 cm^{-1} (Slika 8) te 10 cm^{-1} (Slika 9). Iz priložene matrice (Slika 10) vidljivo je da je model treniran na 70% uzoraka predvidio tip uzorka uz pomoć FTIR-spektra na valnim duljina 1000-1500 cm^{-1} , 1650-1750 cm^{-1} i 2850 - 3100 cm^{-1} na preostalim 30% uzoraka imao vrlo visoku točnost, tj. točnost veću od 93%. ROC-krivulja također pokazuje izuzetno visoku točnost (Slika 11).

Tablica 1. Valne duljine u rasponu 50 cm⁻¹ s visokom točnošću (Accuracy) u predviđanju histopatološkog tipa uzorka.

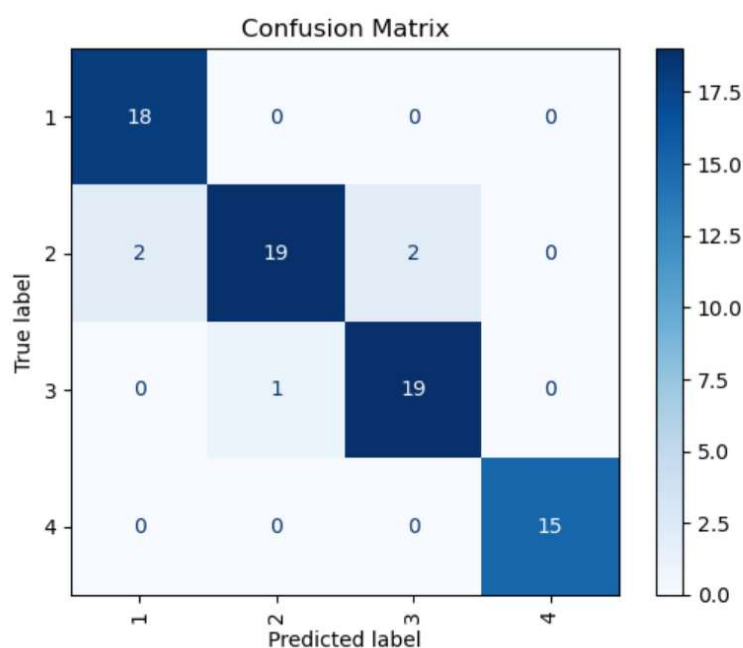
Tip biološke molekule koja pretežno apsorbira u navedenom spektru	Valna duljina (cm ⁻¹)	Točnost (accuracy)	Preciznost (precision)	Senzitivnost (sensitivity, recall)	Specifičnost (specificity)
Ugljikohidrati, glikani	1000-1050	0,7895	0,7907	0,7895	0,8006
	1050-1100	0,7368	0,7545	0,7368	0,7579
	1100-1150	0,8026	0,8129	0,8026	0,8184
	1150-1200	0,9737	0,9750	0,9737	0,9749
Nukleinske kiseline	1200-1250	0,8684	0,8687	0,8684	0,8738
	1250-1300	0,8816	0,8847	0,8816	0,8911
	1300-1350	0,7895	0,8226	0,7895	0,8269
Nukleinske kiseline i proteini	1350-1400	0,7895	0,7884	0,7895	0,7945
	1400-1450	0,7500	0,7553	0,7500	0,7666
Proteini	1450-1500	0,8684	0,8727	0,8684	0,8855
	1650-1700	0,8684	0,8745	0,8684	0,8826
	1700-1750	0,8026	0,8191	0,8026	0,8278
Lipidi	2850-2900	0,7763	0,7869	0,7763	0,7938
	2900-2950	0,7763	0,7792	0,7763	0,7894
	2950-3000	0,8289	0,8433	0,8289	0,8525
	3000-3050	0,8026	0,8060	0,8026	0,8059
	3050-3100	0,7368	0,7377	0,7368	0,7472



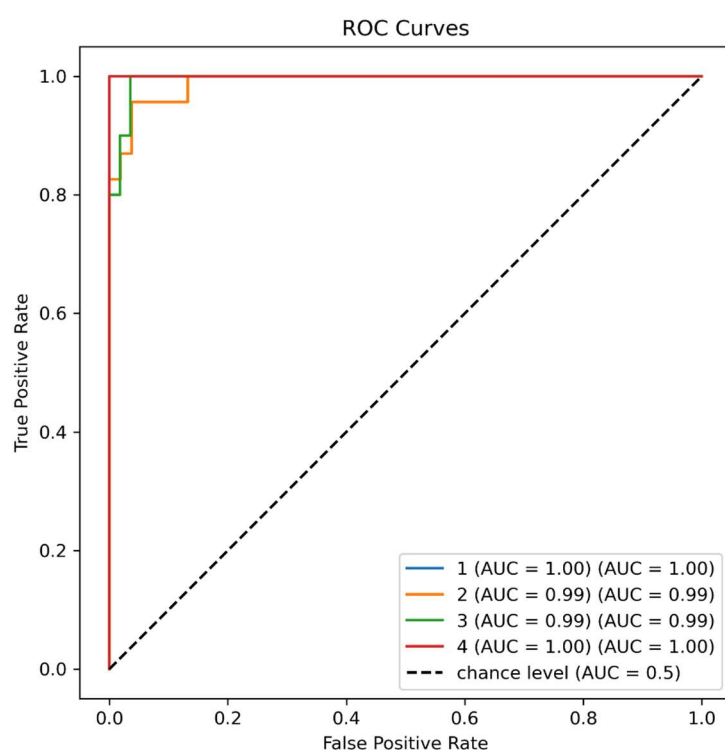
Slika 8 Točnost (25 cm⁻¹). Točnost modela za predviđanje tipa uzorka pri rezoluciji 25 cm⁻¹. Na Y osi je prikazana točnost a na X osi valne duljine.



Slika 9 Točnost (10 cm⁻¹). Točnost modela za predviđanje tipa uzorka pri rezoluciji 25 cm⁻¹. Na X osi je prikazana točnost a na Y osi valne duljine.



Slika 10 Matrica zbunjenosti (eng. *confusion matrix*). Tipovi uzorka pleure simplificirani su u brojeve 1-4 s obzirom na 4 moguće kategorije uzoraka. Na Y osi nalaze se stvarni tip uzorka pleure (eng. *true label*) dok se na X osi nalaze rezultati klasifikacije tipa tkiva uz pomoć CNN modela (eng. *predicted label*).

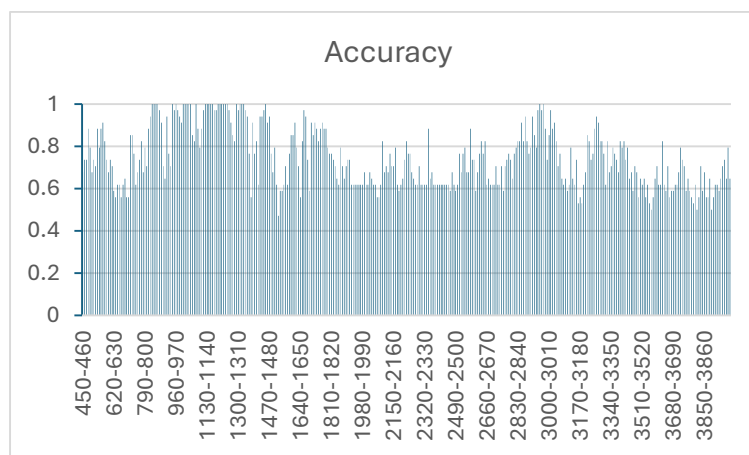


Slika 11 ROC-krivulja. ROC krivulja prikazuje točnost modela za sva četiri tipa uzorka. Na Y osi nalaze se uzorci koji su uspješno svrstani u točnu kategoriju (eng. *true positive rate*) dok ne na X osi nalaze uzorci koji su krivo svrstani u jedan od 4 tipa uzoraka (eng. *false positive rate*).

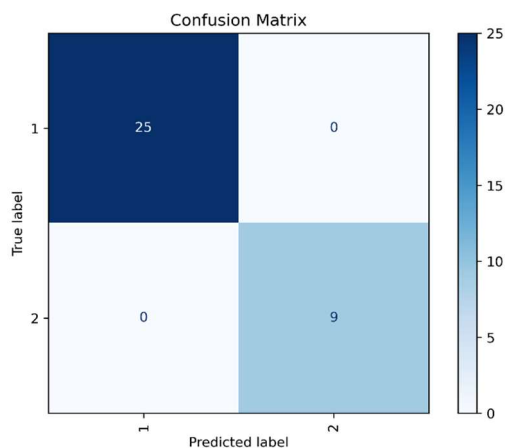
Iz priložene tablice (Tablica 1) vide se valne duljine koje su korištene za ovaj model, koje prikazuju dijelove spektra koji se pripisuju različitim vrstama bioloških molekula, tj. ugljikohidratima i glikanima, nukleinskim kiselinama, proteinima i lipidima. Ipak, dio spektra s najvećom prediktivnom vrijednošću koja s točnošću (Accuracy) od 0,9737, preciznošću (Precision) od 0,9750, senzitivnosti (Sensitivity) od 0,9737 i Specifičnosti (Specificity) od 0,9749 nadilazi performanse sveukupnog modela nalazio se na 1150-1200 cm^{-1} tj. u regiji koja se tipično pripisuje ugljikohidratima i glikanima jer glikani i glikanski dijelovi proteoglikanskih struktura pokazuju apsorbanciju između 950 i 1200 cm^{-1} dok je na istim valnim duljinama mjerena apsorbancija proteina vrlo mala (125,126).

S obzirom na to da su u ranijim istraživanjima identificirane određene promjene u O-glikanima i zabilježena je okupiranost sva tri N-glikozilacijska mjesta mezotelina, jednog od potencijalnih prognostičkih proteinskih biomarkera za MPM ovaj je rezultat biološki zanimljiv. Ipak, iako se ova regije pripisuju apsorpciji glikana u jednostavnim uzorcima, u tipovima uzoraka gdje nalazimo čitav spektar kompleksnih molekula (npr. proteo-glikani, glikolipidi, itd.) poput tkiva i tjelesnih tekućina situacija je mnogo složenija.

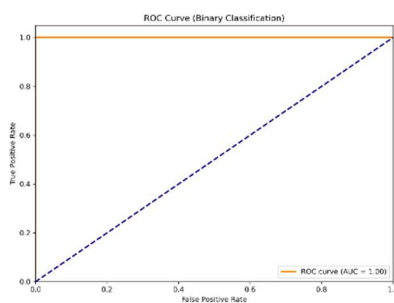
Učinjena je dublja analiza glikana dva tipa uzoraka: malignog pleuralnog mezotelioma (MPM) i normalne pleure. Osnovni CNN je prilagođen za ova dva tipa uzoraka i rezultati su prikazani na slikama 12, 13 i 14.



Slika 12 Točnost modela za razlikovanje MPM-a i normalne pleure. Na Y osi je točnost a na X osi valne duljine



Slika 13 Matrica zbunjenosti za razlikovanje MPMa od normalne pleure. Tipovi uzorka pleure simplificirani su u brojeve 1 i 2 s obzirom na 2 moguće kategorije uzoraka. Na Y osi nalaze se stvarni tip uzorka pleure (eng. *true label*) dok se na X osi nalaze rezultati klasifikacije tipa tkiva uz pomoć CNN modela (eng. *predicted label*).

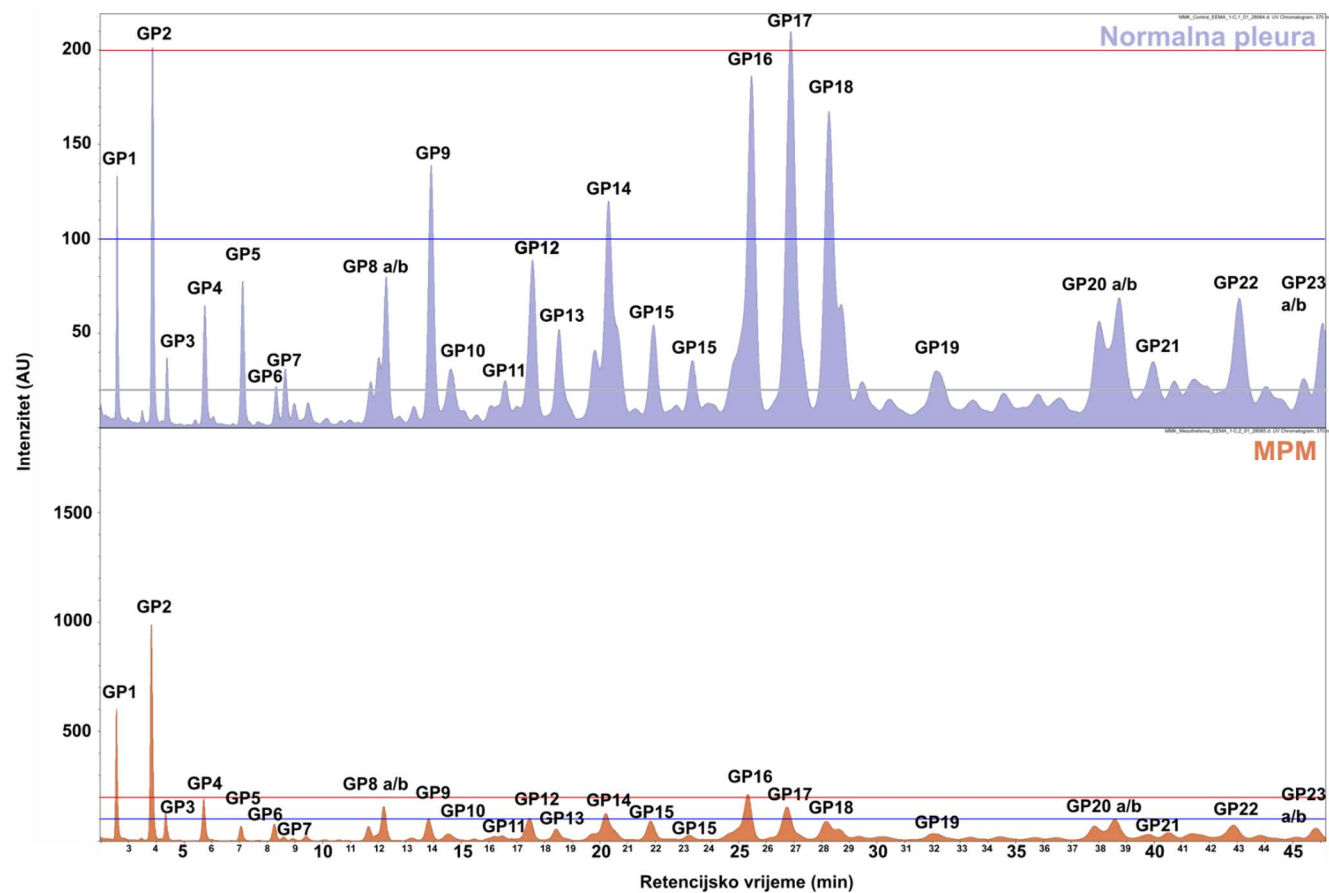


Slika 14 ROC krivulja za razlikovanje MPM-a i normalne pleure. ROC krivulja prikazuje točnost modela za sva četiri tipa uzorka. Na Y osi nalaze se uzorci koji su uspješno svrstani u točnu kategoriju (eng. *true positive rate*) dok ne na X osi nalaze uzorci koji su krivo svrstani (eng. *false positive rate*).

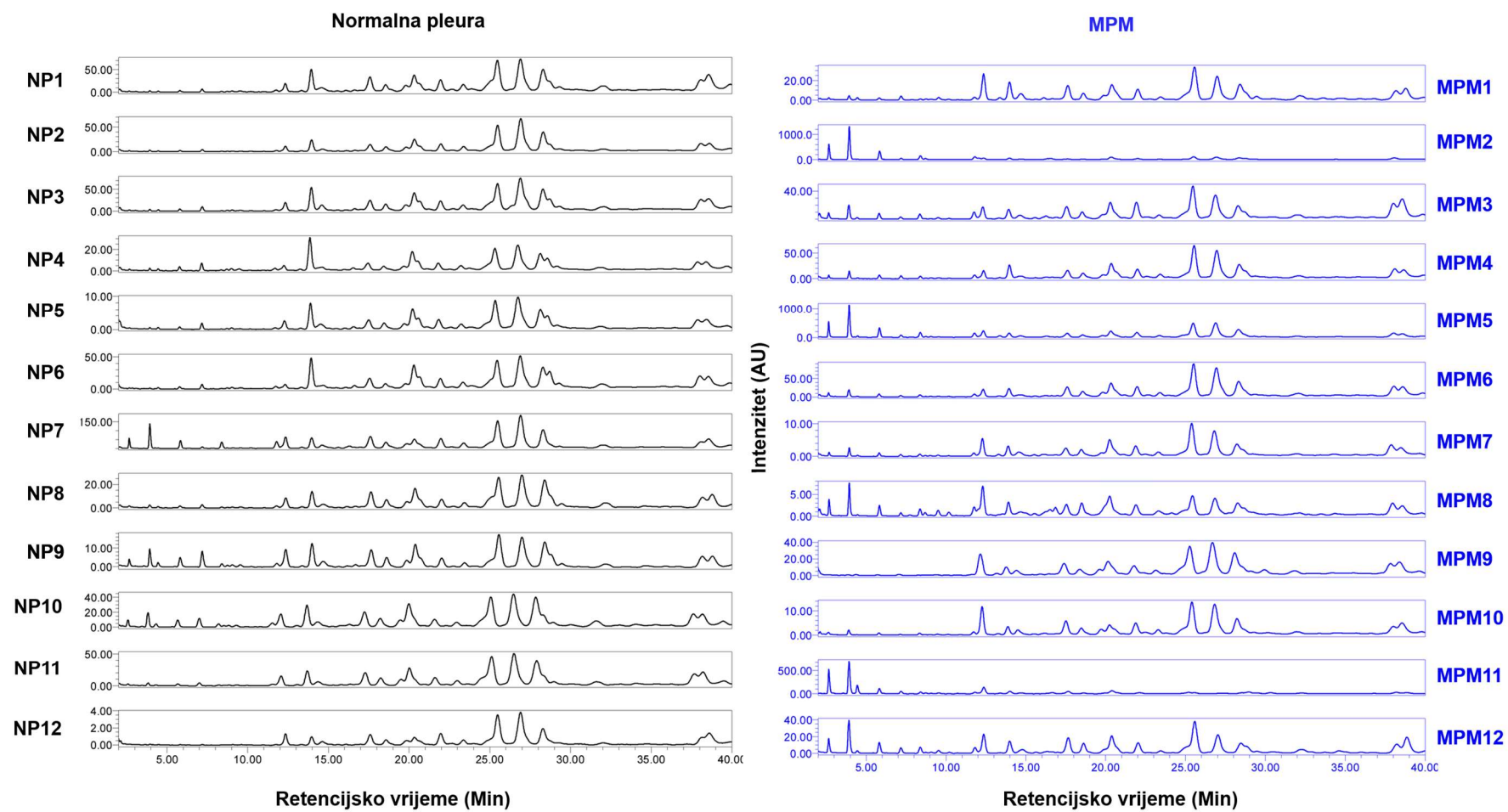
4.5 Analiza N-glikoma plućne pleure i MPM-a

Rezultati UPLC analize N-glikoma normalne plućne pleure pokazali su da ovo tkivo na kompozitnom kromatogramu svih uzoraka pokazuje 23 N-glikanska pika od kojih su neki kompozitni te stoga sastavljeni od nekoliko različitih struktura s nedovoljnom rezolucijom za razdvajanje te su takvi pikovi označeni simbolom a/b uz broj pika (Slika 15, plavo). Na kromatogramu MPM-a vidljivi su isti pikovi te nema značajnih odstupanja u odnosu na broj pikova između normalne pleure i MPM-a, no različita je relativna zastupljenost pojedinih pikova u uzorku (Slika 15, narančasto). Ovakav rezultat potencijalno govori da se u MPM-u ne pojavljuju neke značajne nove strukture N-glikana koje nisu prisutne u normalnoj pleuri već se uzorci razlikuju s obzirom na relativni udio pojedinih struktura u ukupnom N-glikomu tkiva. Iako na ovim uzorcima nije provedena masena spektrometrija te stoga nije moguće utvrditi točnu glikansku strukturu, moguće je iz UPLC-a procijeniti zastupljenost pojedinih tipova struktura. Naime, jezgrena struktura N-glikana i mali visokomanozni glikani imaju kraće retencijsko vrijeme u odnosu na kompleksnije glikane. Bi-antenarne (s dvije antene) kompleksne glikane i neke hibridne glikane očekujemo u lijevom i centralnom dijelu kromatograma UPLC-a s obzirom na retencijska vremena dok triantenarne, tetraantenarne i druge vrlo kompleksne, hibridne i visokomanozne glikane s velikim brojem antena očekujemo u desnom dijelu tj. pred kraj kromatograma.

Takvom analizom UPLC kromatograma primjećuje se značajan pomak u lijevo po pitanju najzastupljenih pikova u MPM-u. U normalnoj pleuri, 6 pikova s najvećim intenzitetom je $GP17 > GP2 > GP16 > GP18 > GP9 > GP14$, tj. četiri od šest najintenzivnijih pikova ima retencijsko vrijeme 20 minuta ili više dok je u MPM-u redoslijed slijedeći: $GP2 > GP1 > GP16 > GP4 > GP17 > GP8$ tj. četiri od šest najintenzivnijih pikova ima retencijsko vrijeme manje od 15 minuta. Uvidom u individualne kromatograme (12 primjera priloženo u slici 16) vidljivo je da iako situacija po pitanju individualnih pikova nije identična u svakom pojedinačnom uzorku, trend pomaka ulijevo je održan.



Slika 15 Ukupni rezultati UPLC analize N-glikana iz normalne pleure (plavo) i MPM-a (narančasto).



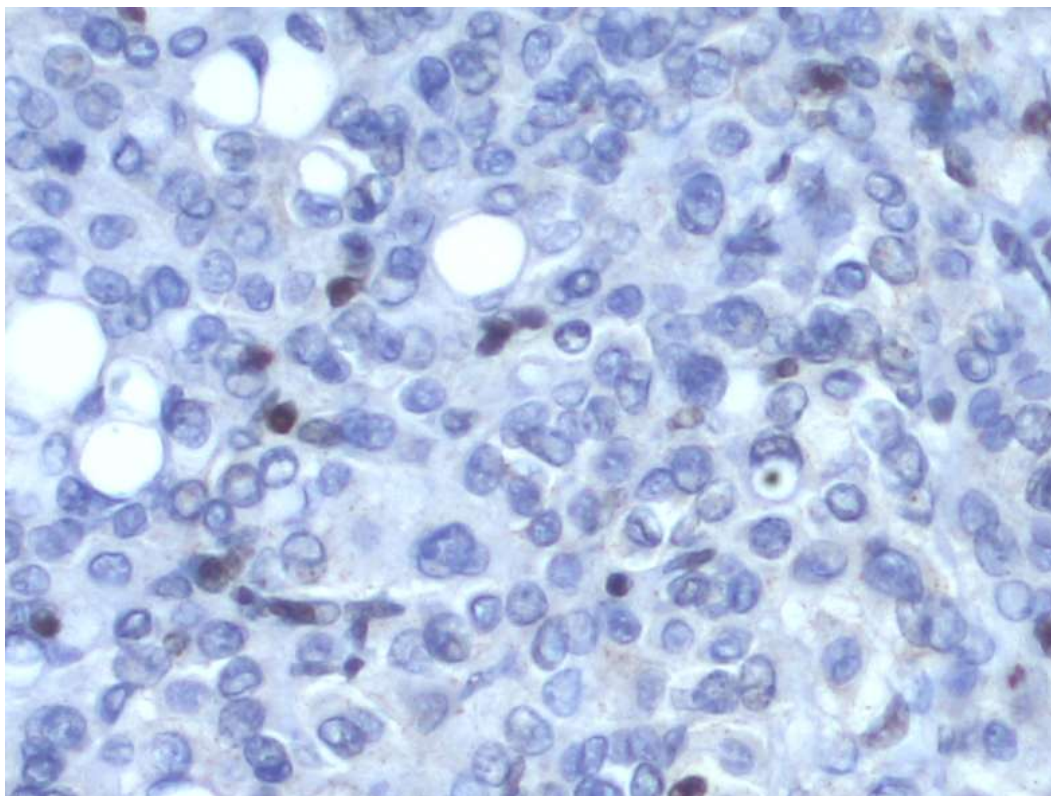
Slika 16 Individualni UPLC profili uzoraka normalne pleure i MPM-a

4.6 Rezultati imunohistokemijskog bojenja

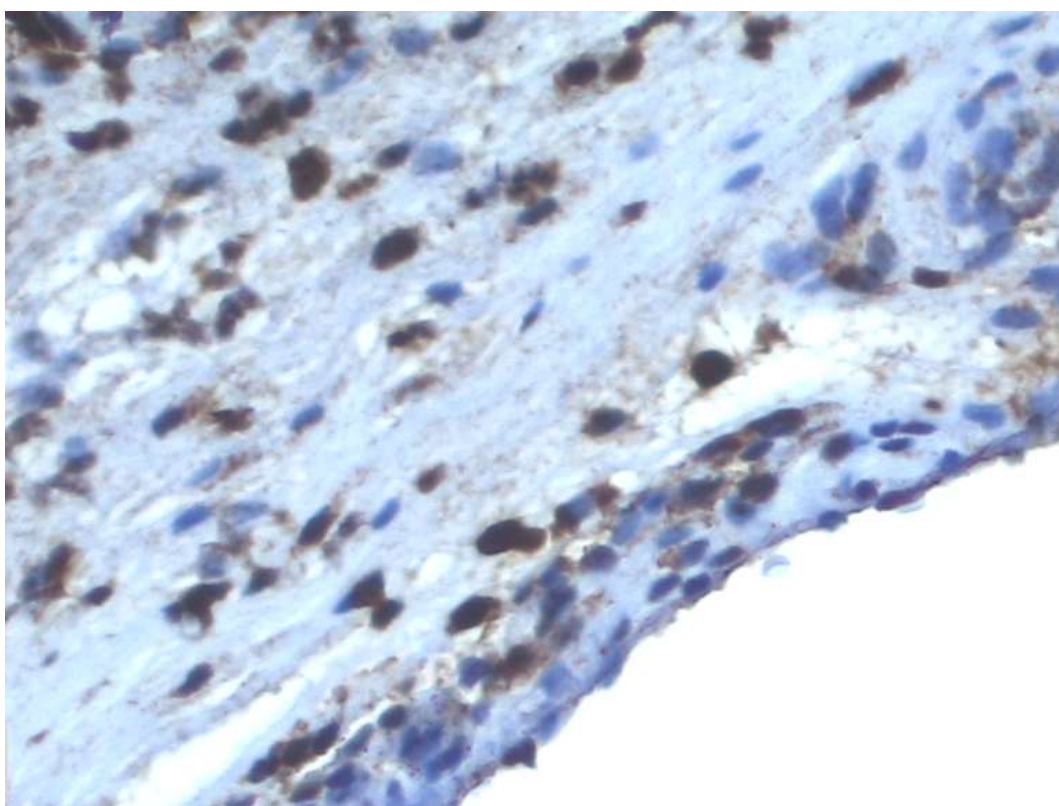
Imunohistokemijska analiza proteina BAP1 pokazala je prisutnost tog proteina u svim uzorcima normalne pleure (Tablica 2, slika 18), dok su 63.3% uzoraka MPM-a bili negativni (Tablica 2, slika 17).

Tablica 2. Rezultati klasifikacije uzoraka normalne pleure i MPM-a s obzirom na prisutnost BAP1 imunohistokemijskog bojenja u jezgri stanica. Uzorci su klasificirani u BAP1 pozitivne (BAP1+) te BAP1 negativne (BAP1-).

Tip uzorka	% uzoraka sa imunohistokemijskim bodovanjem	
	BAP1 +	BAP1 -
MPM	36.6	63.3
Normalna pleura	100	0



Slika 17 Imunohistokemijsko bojenja MPM-a bez BAP1 signala u jezgrama stanica MPM-a, povećanje 20X



Slika 18 Imunohistokemijsko bojenje normalne pleure pozitivne na BAP-1 signal u jezgrama stanica, povećanje 20x

5 Rasprava

Rezultati FTIR-analize tkiva pleure u ovom istraživanju potvrdili su ranija opažanja iz rada Sadiku-Zehri i sur. tj. pokazali su da postoje značajne razlike u spektrima između normalne pleure, upale pleure, metastaza adenokarcinoma u pleuri i MPM-a, pogotovo je bilo zanimljivo područje od 950-1200 cm^{-1} . Ovo područje obuhvaća rastezne vibracije C–O, C–C i C–O–C veza tipične za ugljikohidrate, uključujući složene glikanske strukture i glikoproteine. Statističkom analizom (PCA analiza, Kruskal-Wallis test, CNN) utvrđeno je da su razlike između patohistološki definiranih stanja pleure uočljive u različitim dijelovima spektra, a najveći je doprinos razdvajanju spektara dalo područje od 1200–1150 cm^{-1} .

U istom spektralnom rasponu, doprinos proteina je vrlo mali, štoviše, Derenne i sur. su istaknuli da FTIR nije osjetljiv samo na drastične razlike (poput prisutnosti ili odsutnosti više monosaharida), već i na suptilnije promjene poput malih modifikacija glikana (125,126). Ipak, važna je razlika da su Derenne i suradnici koristili pročišćeni glikoprotein dok je tkivo pleure sačinjeno od mješavina mnogih nukleinskih kiselina, lipida, proteina, glikoproteina, glikolipida, proteoglikana i sl. što ga čini mnogo kompleksnijim i težim za interpretaciju. Činjenica da su ključne razlike koncentrirane u ugljikohidratnom dijelu spektra sugerira da kumulativne promjene u glikanima potencijalno predstavljaju važnu razliku između MPM-a i drugih patoloških stanja. Primjenom tog i drugih visoko informativnih spektralnih područja, model baziran na neuralnoj mreži je s visokom točnošću klasificirao uzorke u MPM, metastaze adenokarcinoma u pleuri ili upalu pleure.

Kada se radi o kompleksnim uzorcima s velikim brojem komponenti kao što je slučaj prilikom analize uzoraka kako plazme tako i tkiva, vrlo često dolazi do preklapanja apsorbancija vrlo različitih komponenti u istim regijama. Npr. Eissa i suradnici vidjeli su da glikoprotein A1AG (eng. *Alpha-1-acid-glycoprotein*) pokazuje najveću apsorbanciju u regiji koja je tipična za proteine, a nalazio se i vrhunac apsorbancije za ATP (137).

Za provjeru pretpostavke da do uočenih razlika između patohistoloških stanja na 1200–1150 cm^{-1} dolazi zbog molekularnih razlika u glikozilaciji, te za detaljnije ispitivanje prirode uočenih promjena, napravljena je neovisna analiza N-glikanskih profila uzoraka MPM-a i normalne pleure (NP) metodom UPLC glikomike. Rezultati ove analize pokazali su jasnu razliku u zastupljenosti složenih N-glikana između MPM-a i normalne pleure. Naročito

je uočeno da je relativna zastupljenost kompleksnih N-glikana izoliranih iz tkiva MPM-a manja u usporedbi s onima iz zdrave pleure. Normalno pleuralno tkivo imalo je veći udio složenijih glikana (s duljim retencijskim vremenom) dok je u MPM-u relativno povećan udio pojednostavljenih glikanskih struktura (s kraćim retencijskim vremenom).

Opservacija da se različita stanja pleure razlikuju u sastavu glikana u skladu je sa prethodnim istraživanjima koja naglašavaju važnost glikozilacije u tumorogenezi. Prema dosadašnjim saznanjima, promjene glikana u tumorima imaju ulogu u izvanstaničnoj signalizaciji, migraciji tumorskih stanica, modulaciji rasta tumora, invaziji tumora u druga tkiva te u imunološkom odgovoru na tumore (5). Fujihira i sur. (2021) otkrili su da mezotelin u epitelnom MPM-u nosi specifičnu modifikaciju N-glikana – tzv. bisektirajući N-acetilglukozamin (GlcNAc) na jednom od svojih N-glikozilacijskih mjesta (Asn388) – koju mezotelin u normalnim stanicama ne sadrži (117), no do sada u literaturi nema podataka o ukupnom N-glikomu MPM-a.

Tipične promjene N-glikana u različitim vrstama malignoma saželi su Pinho et al. Njihova je opservacija bila da su najčešće promjene u malignomima pojačana sijalilacija, povećani udio i broj kompleksnih razgranatih glikana i jača prisutnost jezgrene fukozilacije (5). Nadalje, smatra se da pojačani udio razgranatih N-glikanskih struktura ometa staničnu adheziju te na taj način promovira odvajanje tumorskih stanica i omogućuje njihovu invaziju na druga tkiva (5). Jasno je kako rezultati ove studije ne odražavaju tipičan pronalazak kod tumorskih tkiva. Za razliku od opservacija u drugim vrstama malignih tumora, u analizi provedenoj na uzorcima MPM-a vidimo smanjeni relativni udio kompleksnih N-glikana te „pomak u lijevo“ tj. povećani udio jednostavnijih glikana (npr. potencijalno jezgrenih struktura i fragmenata jezgrenih struktura N-glikana).

Lattova i sur. također su u analizi N-glikana iz svježeg i zamrznutog tkiva adenokarcinoma pluća pronašli povećani udio jednostavnijih glikanskih struktura poput H3N2F1 i H2N2F1 (138), no najprominentniji su u njihovu profilu zdravog uzorka pluća i adenokarcinoma pluća ipak bili kompleksniji glikani poput H5N4, H5N4F1 i H6N5F1 dok su u UPLC profilu tkiva MPM-a najprominentniji pikovi sa retencijskim vremenom koje je prekratko da bi se radilo o tako složenim glikanskim strukturama. Ipak, za direktnu usporedbu struktura u budućim bi istraživanjima trebalo napraviti i masenu spektrometriju tkiva MPM-a.

Kako je biosinteza N-glikana sekvencijalni proces koji se odvija ko- i posttranslacijski u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu (139,140), moguće objašnjenje ovakvog rezultata je i da kod MPM-a dolazi do poremećaja sinteze glikana. U takvoj hipotetskoj situaciji, sinteza glikana bi bila zaustavljena/usporena što bi za posljedicu imalo smanjeni udio kompleksnih N-glikanskih struktura.

Odsutnost BAP1 proteina dovodi do poremećaja glikozilacije tj. smanjene količine i kompleksnosti glikana (141). Gomes da Silva Araujo i suradnici korištenjem CRISPR/Cas9 metode kojom su u gene zadužene za epigenetsku regulaciju unosili mutacije (tzv. skeniranje gubitka funkcije od eng. *loss-of-function screening*) utvrdili su da gubitak funkcije gena *BAP1* tj. posljedično gubitak tj. odsutnost proteina BAP1 dovodi do remodelinga kromatina i promjena u glikozilaciji kod stanica karcinoma dojke (141). Ovaj je podatak zanimljiv jer je prema prijašnjim publikacijama mutacija gena *BAP1* jedna od najčešćih mutacija u MPM-u (21,142–144) i osobe s BAP1 delecijom su genetski podložnije nastanku MPM-a, odnosno somatska mutacija gena *BAP1* prisutna je u većini MPM-a, (21) dok kod ostalih tumora pluća BAP1 delecija nije toliko učestala. Shuang et al. su 2021. opisali glavne vrste mutacija u karcinomima pluća te ustanovili da mutacije u genima *KRAS*, *EGFR*, *NF1* i *BRAF* zajedno čine više od 56% svih zabilježenih mutacija u karcinomima pluća dok manji postotak otpada na druge mutacije (6).

Nadalje, de Rienzo et al. analizirali su *BAP1* ekspresiju u MPM-u pomoću imunohistokemijskog bojenja BAP1 proteina te ju usporedili s rezultatima RNA-sekvenciranja i RT-qPCRa i tako utvrdili da se odsutnost imunohistokemijskog bojenja proteina BAP1 u jezgri stanica podudarala sa različitim mutacijama *BAP1* gena utvrđenim drugim metodama čiji je rezultat bio parcijalna ili potpuna delecija gena *BAP1* te nefunkcionalni ili smanjeno funkcionalni BAP1 protein kada je postojao drugačiji obrazac imunohistokemijskog bojenja BAP1 proteina, npr. u citoplazmi umjesto u jezgri stanice (143). Osim toga, imunohistokemijsko bojenje BAP1 proteina smatra se specifičnim i pouzdanim za diferencijalnu dijagnozu između MPM-a i drugih patologija pleure (90,145). Za provjeru prisutnosti delecije BAP1 u uzorcima MPM-a i normalne pleure korištenim u ovom radu napravljeno je imunohistokemijsko bojenje na BAP1. Rezultati su pokazali da je 100% uzoraka normalne pleure pozitivno na BAP1 dok je 63,3% uzoraka MPM-a bilo negativno na BAP1 (negativnim rezultatom smatralo se manje od 20% jezgri stanica pozitivnih na BAP1).

Ovo istraživanje stoga potvrđuje da FTIR-spektroskopija ima potencijal u diferencijalnoj dijagnostici pleuralne patologije. Kombiniranje FTIR-spektra sa analizom N-glikanskog profila uzoraka pruža dublji biološki uvid u molekularne karakteristike MPM-a u usporedbi sa normalnom pleurom. Glikani su se iskazali kao jedan od ključnih “molekularnih potpisa” koji razlikuju MPM od ostalih patoloških stanja pleure – u MPM-u prevladavaju jednostavniji, manje razgranati N-glikani nego u normalnom pleuralnom tkivu, što je odraz tumorskog fenotipa i što se odražava na infracrvenom spektru. Štoviše, rezultati analize N-glikana povezani su sa delecijom proteina BAP1 koji je već poznati i uvriježeni specifičan biomarker za diferencijalnu dijagnozu MPM-a.

Rezultati ove studije imaju dvostruku važnost: sa jedne strane produbljuju razumijevanje patobiologije mezotelioma (pokazujući da bi poremećaj glikozilacije potencijalno mogao biti bitna odlika ove bolesti), a s druge strane otvaraju put ka praktičnim primjenama – potencijalnom razvoju novih biomarkera i terapija temeljenih na glikanima. Svi rezultati provedenog istraživanja konzistentni su sa pretpostavkom da delecija BAP1 uzrokuje poremećaj u sintezi glikana čiji je rezultat visoka frekvencija jednostavnijih glikana te smanjena frekvencija kompleksnih glikanskih struktura koje se diferencijalno pojavljuju u MPM-u i očituju u specifičnom FTIR-spektralnom potpisu između 900 i 1200 cm^{-1} , a nisu prisutne u ostalim histopatološkim stanjima pleure potencijalno zbog prisutnosti funkcionalnog BAP1 proteina u jezgri stanica.

Biologija i biosinteza glikana kompleksan je proces koji zahtijeva dodatna istraživanja, no sudeći prema rezultatima ovog rada, promjene u glikozilaciji u MPM-u nisu nebitne, već bi mogle biti integralni dio patologije i tumorske progresije. No, dok je tehnologija u znanosti do danas omogućila mapiranje velikog broja gena i proteina koji su uključeni u tumorigenezu, uloga i povezanost glikana sa ovim procesima relativno je nepoznata. Jedan od razloga je i to što je glikozilacija stanica i tkiva regulirana složenim epigenetičkim mehanizmima koje je teže mapirati i interpretirati (146–148).

Jedan od ranije opisanih mehanizama koji povezuje poznate signalne putove uključene u tumorigenezu i glikane je uloga mucina i N-glikana u gubitku E-kadherina i regulaciji njihove funkcije (149–151). E-kadherini igraju važnu ulogu u regulaciji stanične adhezije a njihova je funkcija regulirana omjerom O-manozilacije i N-glikozilacije (151). U normalnim uvjetima E-kadherini su predominantno O-manozilirani, međutim u procesu tumorigeneze balans O-manozilacije i N-glikozilacije se mijenja (151). Osobito su bitni kompleksni razgranati N-glikani koji se dodaju na Asn-554 E-kadherina a čija prisutnost

zajedno sa reduciranim razinama O-manozilacije dovodi do gubitka supresorske funkcije E-kadherina te tumorske progresije i metastaziranja (151). Kako rezultat ove doktorske disertacije pokazuje da u MPM-u dolazi do gotovo obrnutog efekta nego što je zabilježeno u nekim drugim tipovima malignih tumora tj. relativno smanjene učestalosti kompleksnih glikana u odnosu na glikom normalne pleure, zanimljiv je i rad Kitazume i suradnika koji su ustanovili da samo antitijelo na E-kadherin bez drugih imunohistokemijskih markera nije dovoljno dobar biomarker za razlikovanje malignog mezotelioma od adenokarcinoma (86). U ovom kontekstu, ukoliko se uočena razlika u kompleksnosti N-glikoma odražava i na glikozilaciju E-kadherina, postavlja se pitanje da li bi specifičan glikotip E-kadherina bio više informativan za razlikovanje MPM-a i metastaza adenokarcinoma od same prisutnosti tj. imunohistokemijskog bojenja ovog regulatora stanične adhezije.

Do promjena u N-glikozilaciji E-kadherina dolazi prvenstveno izravno zbog pojačane ekspresije *MGAT5*, gena za protein N-acetilglukozamin transferazu (eng. *N-acetylglucosaminyltransferase V – GnT-V*) koji je izravno uključen u proces glikozilacije tj. dodavanje GlcNAc nastavaka na glikoproteine u Golgijevom aparatu (151), no BAP1 je histon deubikvitinaza koja uklanja monoubikvitin sa histona H2A na lizin 119 (H2AK119ub1) te na taj način mijenja ekspresiju brojnih gena uključenih u stanični razvoj, diferencijaciju, preživljavanje i imunološki odgovor organizma (19,152). Zbog te činjenice, mnogo je teže definirati točan mehanizam kojim BAP1 utječe na uočenu promjenu glikozilacije MPM-a.

Gomes da Silva Araujo i suradnici pokazali su da BAP1-KO (od eng. *Knock-Out* tj. nokautiran/izbrisan) stanična linija karcinoma dojke pokazuje povećanu prisutnost H2AK119ub1 i posljedično nižu ekspresiju nekoliko gena za glikoziltransferaze, uključujući gene *CIGALT1* (gena koji kodira enzim zadužena za sintezu O-glikanskih struktura), *GALNT3* (kodira popipeptidnu N-acetilgalaktozaminiltransferazu t. GalNAc) na serine i treonine proteina), *GCNT1* (kodira enzim odgovoran za dodavanje GlcNAc na O-glikane), *GCNT3* (također kodira enzim odgovoran za dodavanje GlcNAc na O-glikane), *MGAT4A* (kodira enzim odgovoran za dodavanje GlcNAc na alfa-1,3-vezane manoze N-glikana) i *ST6GALNAC1* (kodira enzim koji dodaje sialinsku kiselinu na GalNAc O-glikana) (141). Nadalje, kada su autori ove studije introducirali BAP1 protein u BAP1-KO stanice, i ekspresija gena za glikoziltransferaze se pojačala, čime su autori pokazali da je upravo BAP1 odgovoran za njihovu epigenetičku regulaciju iako nije u potpunosti jasno postoje li i drugi

neizravni čimbenici (npr. promjena ekspresije drugih gena na čiju ekspresiju koje utječe BAP1) (141) .

Iako su sve druge glikoziltransferaze čiju su promjenu ekspresije u odsutstvu BAP1 uočili Gomes da Silva Araujo i suradnici zaslužne za sintezu O-glikana, disregulacija *MGAT4A* mogla bi potencijalno biti djelomično ili u potpunosti odgovorna za smanjenu relativnu kompleksnost glikana uočenu u sklopu ove studije ovdje. Enzim alfa-1,3-manozil-glikoprotein beta-1,4-N-acetil-glukozamintransferaza A (GnT-Iva) koji je kodiran *MGAT4A* genom dodaje N-acetilglukozamin tj. GlcNAc izravno na jednu „ruku“ jezgre N-glikana i time predstavlja prvi korak u sintezi kompleksnih glikana bez kojeg se ne mogu nadograđivati dodatne jedinice galaktoze i sijalinske kiseline u kompleksnim glikanima niti stvarati tri- i tetra- antenarne strukture koje su tipično pojačano prisutne u drugim vrstama karcinoma poput adenokarcinoma pluća (5,138). S obzirom na to da je vrlo izgledno da bi se u slučaju zametne (eng. *germline*) mutacije *BAP1* efekt disregulirane ekspresije *MGAT4A* vrlo vjerojatno odrazio sistemski na cijeli organizam, bilo bi zanimljivo u budućim istraživanjima ispitati krije li se u tom mehanizmu možda i odgovor na pojačanu osjetljivost osoba s BAP1 zametnom mutacijom na nepovoljne okolišne uvjete, tj. konkretno izlaganje azbestu i povećanu incidenciju razvoja MPM-a, jer su kompleksni glikani odgovorni i za regulaciju kronične upale koja može dovesti do razvoja malignih tumora (68,79,113,153–155) .

Opisani rezultati i potencijalni molekularni mehanizmi u njihovoj pozadini vrlo su zanimljivi u kontekstu aktualne rasprave o rastućoj listi ključnih obilježja malignih tumora (eng. *hallmarks of cancer*). Iako je u posljednjih dvadeset godina lista obilježja malignih tumora te signalnih puteva i njihovih interakcija značajno proširena, promjene u glikomu malignih tumora (koje su osobito povezane s izbjegavanjem uništenja od strane imunološkog sustava, upalom koja potiče rast tumora, fenotiskom plastičnosti te invazijom i metastaziranjem tumora) i dalje ne nalazimo među univerzalno priznatim obilježjima raka (4,5). No, u znanstvenoj zajednici vodi se aktivna debata oko uključivanja glikana kao još jednog obilježja, a ova studija dodatno doprinosi aktualnom znanju o značaju glikana za razlikovanje različitih tipova malignih tumora (metastaze adenokarcinoma u pleuru, MPM) te njihovoj neizostavnoj prisutnosti u biologiji tumora (150). Ipak, jasno je da niti jedno od opisanih tumorskih obilježja ne postoji odvojeno već su usko povezana kompleksnim signalnim putevima i interakcijama koje dovode do tumorigeneze.

Ograničenje ovog istraživanja je relativno mali broj uzoraka MPM-a (desetci). Zbog malog broja uzoraka, važni parametri performansi biomarkera poput točnosti i preciznosti mogli bi u ovoj studiji biti precijenjeni. Postotak imunohistokemijski BAP1 negativnih uzoraka MPM-a u ovoj studiji je 63.3% i iako je to podatak koji odgovara 62% BAP1 negativnih MPM-a koji su zabilježili Righi et al. na 141 uzoraka MPM-a na kojima nisu uzimali u obzir citoplazmatski signal BAP1 (tj. citoplazmatski BAP1 je smatran BAP1 negativan) ((145), Rienzo i suradnici koji jesu u obzir uzimali citoplazmatsko bojenje BAP1 došli su do podataka o 12% MPM-a sa potpuno odsutnim BAP1, 25% sa citoplazmatskim BAP1, 27% sa kombiniranim uzorkom bojenja i 36% MPM-a sa prisutnim BAP1 bojenjem u jezgri na ukupnom broju od 483 uzorka (143). U budućim bi istraživanjima s većim brojem uzoraka stoga trebalo razdvojiti ove skupine i dublje istražiti specifične mutacije gena *BAP1* te njihovu korelaciju sa promjenama u lokalizaciji i funkcionalnosti proteina kao i utjecajem na glikozilaciju MPM-a.

6 Zaključak

U ovom istraživanju uspješno je validirana uočena razlika IR spektra MPM-a i drugih stanja pleure u cijelom spektru. Štoviše, MPM je pokazao jedinstveni FTIR-profil koji se značajno razlikovao od normalne pleure, upale pleure i od metastaza te je na temelju istih bilo moguće napraviti CNN model s visokom točnošću i preciznošću za predviđanje histopatološkog tipa uzorka pleure. Time je potvrđena hipoteza o postojanju jedinstvenih vibracijskih biljega za MPM.

Detaljnijom analizom identificiran je vibracijski biljeg između 950 i 1200 cm^{-1} , u dijelu spektra za koji su karakteristične vibracije koje su vezane za ugljikohidrate, različite polisaharide i glikane. Ovaj rezultat potvrđen je sa neovisnom UPLC metodom za analizu glikana koja je pokazala smanjen relativni udio kompleksnih N-glikana MPM-a u odnosu na normalnu pleuru. Specifičan profil MPM N-glikoma, točnije relativno smanjenje kompleksnosti N-glikana zatim je povezano sa odsutnošću proteina BAP1 (za koji je kroz literarni pregled utvrđeno da utječe na sintezu glikana) iz jezgre stanica MPM-a.

Ovo je prva studija koja je identificirala promjene u N-glikomu MPM-a i postavlja temelj za dublje razumijevanje i daljnje istraživanje potencijalnog molekularnog mehanizma kojim bi BAP1, poznati biomarker za MPM, mogao utjecati na tumorski fenotip i proces karcinogeneze u MPM-u.

7 Literatura

1. Bunaciu AA, Fleschin S, Abdoul-Enein HY. Cancer diagnosis by FT-IR spectrometry. *Rev Roum Chim.* 2015;5–6(60):415–26.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000;100(1):57–70.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
4. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31–46.
5. Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(9):540–55.
6. Yang S, Xia J, Yang Z, Xu M, Li S. Lung cancer molecular mutations and abnormal glycosylation as biomarkers for early diagnosis. *Cancer Treat Res Commun.* 2021;27:100311.
7. Scherpereel A, Opitz I, Berghmans T, Psallidas I, Glatzer M, Rigau D, et al. ERS/ESTS/EACTS/ESTRO guidelines for the management of malignant pleural mesothelioma. *Eur Respir J.* 2020;55(6):1900953.
8. Scherpereel A, Astoul P, Baas P, Berghmans T, Clayson H, Vuyst P de, et al. Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma. *Eur Respir J.* 2009;35(3):479–95.
9. McElvenny DM, Darnton AJ, Price MJ, Hodgson JT. Mesothelioma mortality in Great Britain from 1968 to 2001. *Occup Med.* 2005;55(2):79–87.
10. Hodgson JT, McElvenny DM, Darnton AJ, Price MJ, Peto J. The expected burden of mesothelioma mortality in Great Britain from 2002 to 2050. *Br J Cancer.* 2005;92(3):587–93.
11. Yates DH, Corrin B, Stidolph PN, Browne K. Malignant mesothelioma in south east England: clinicopathological experience of 272 cases. *Thorax.* 1997;52(6):507.
12. Mutti L, Broaddus VC. Malignant Mesothelioma as both a challenge and an opportunity. *Oncogene.* 2004;23(57):9155–61.
13. Napolitano A, Antoine DJ, Pellegrini L, Baumann F, Pagano I, Pastorino S, et al. HMGB1 and Its Hyperacetylated Isoform are Sensitive and Specific Serum Biomarkers to Detect Asbestos Exposure and to Identify Mesothelioma Patients. *Clin Cancer Res.* 2016;22(12):3087–96.
14. Bibby AC, Tsim S, Kanellakis N, Ball H, Talbot DC, Blyth KG, et al. Malignant pleural mesothelioma: an update on investigation, diagnosis and treatment. *Eur Respir Rev.* 2016;25(142):472–86.

15. Husain AN, Colby T, Ordonez N, Krausz T, Attanoos R, Beasley MB, et al. Guidelines for Pathologic Diagnosis of Malignant Mesothelioma: 2012 Update of the Consensus Statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol amp Lab Med*. 2013;137(5):647–67.
16. Husain AN, Colby TV, Ordóñez NG, Allen TC, Attanoos RL, Beasley MB, et al. Guidelines for Pathologic Diagnosis of Malignant Mesothelioma: 2017 Update of the Consensus Statement From the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;142(1):89–108.
17. Butnor KJ. My approach to the diagnosis of mesothelial lesions. *J Clin Pathol*. 2006;59(6):564.
18. Allen TC. Recognition of Histopathologic Patterns of Diffuse Malignant Mesothelioma in Differential Diagnosis of Pleural Biopsies. *Arch Pathol Lab Med*. 2005;129(11):1415–20.
19. Cheung M, Testa JR. BAP1 , a tumor suppressor gene driving malignant mesothelioma. *Transl Lung Cancer Res*. 2017;6(3):270–8.
20. Betti M, Aspesi A, Sculco M, Matullo G, Magnani C, Dianzani I. Genetic predisposition for malignant mesothelioma: A concise review. *Mutat ResRev Mutat Res*. 2019;781:1–10.
21. Congedo MT, West EC, Evangelista J, Mattingly AA, Calabrese G, Sassorossi C, et al. The genetic susceptibility in the development of malignant pleural mesothelioma: somatic and germline variants, clinicopathological features and implication in practical medical/surgical care: a narrative review. *J Thorac Dis*. 2024;16(1):671–87.
22. Akgun H, Metintas S, Ak G, Canlı SD, Isbilen M, Gure AO, et al. Prognostic value of midkine, syndecan-1, hyaluronan synthase-2, sestrin-1, laminin subunit alpha-4 and fibulin-3 for malignant pleural mesothelioma. *Arch Méd Sci : AMS*. 2021;19(2):355–64.
23. BATTOLLA E, CANESSA PA, FERRO P, FRANCESCHINI MC, FONTANA V, DESSANTI P, et al. Comparison of the Diagnostic Performance of Fibulin-3 and Mesothelin in Patients with Pleural Effusions from Malignant Mesothelioma. *Anticancer Res*. 2017;37(3):1387–91.
24. Cerciello F, Choi M, Sinicropi-Yao SL, Lomeo K, Amann JM, Felley-Bosco E, et al. Verification of a Blood-Based Targeted Proteomics Signature for Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer Epidemiology Prev Biomark*. 2020;29(10):1973–82.
25. Matboli M, Shafei AE, Azazy AE, Reda M, El-Khazragy N, Nagy AA, et al. Clinical evaluation of circulating miR-548a-3p and -20a expression in malignant pleural mesothelioma patients. 2018;12(2):129–39.
26. Santarelli L, Strafella E, Staffolani S, Amati M, Emanuelli M, Sartini D, et al. Association of MiR-126 with Soluble Mesothelin-Related Peptides, a Marker for Malignant Mesothelioma. *PLoS ONE*. 2011;6(4):e18232.
27. Tomasetti M, Amati M, Neuzil J, Santarelli L. Circulating epigenetic biomarkers in lung malignancies: From early diagnosis to therapy. *Lung Cancer*. 2017;107:65–72.

28. Cerciello F, Choi M, Nicastrì A, Bausch-Fluck D, Ziegler A, Vitek O, et al. Identification of a seven glycopeptide signature for malignant pleural mesothelioma in human serum by selected reaction monitoring. *Clin Proteom*. 2013;10(1):16.
29. Cortes-Dericks L, Schmid RA. CD44 and its ligand hyaluronan as potential biomarkers in malignant pleural mesothelioma: evidence and perspectives. *Respir Res*. 2017;18(1):58.
30. TSUJI S, IMAI K. Medical application of the monoclonal antibody SKM9-2 against sialylated HEG1, a new precision marker for malignant mesothelioma. *Proc Jpn Acad, Ser B*. 2023;99(2):39–47.
31. Matsuura R, Kaji H, Tomioka A, Sato T, Narimatsu H, Moriwaki Y, et al. Identification of mesothelioma-specific sialylated epitope recognized with monoclonal antibody SKM9-2 in a mucin-like membrane protein HEG1. *Sci Rep*. 2018;8(1):14251.
32. Baker MJ, Gazi E, Brown MD, Shanks JH, Gardner P, Clarke NW. FTIR-based spectroscopic analysis in the identification of clinically aggressive prostate cancer. *Br J Cancer*. 2008;99(11):1859–66.
33. Owens C, Hindocha S, Lee R, Millard T, Sharma B. The lung cancers: staging and response, CT, 18F-FDG PET/CT, MRI, DWI: review and new perspectives. *Br J Radiol*. 2023;96(1148):20220339.
34. Zhang X, Thiéfin G, Gobinet C, Untereiner V, Taleb I, Bernard-Chabert B, et al. Profiling serologic biomarkers in cirrhotic patients via high-throughput Fourier transform infrared spectroscopy: toward a new diagnostic tool of hepatocellular carcinoma. *Transl Res*. 2013;162(5):279–86.
35. Großerueschkamp F, Bracht T, Diehl HC, Kuepper C, Ahrens M, Kallenbach-Thieltges A, et al. Spatial and molecular resolution of diffuse malignant mesothelioma heterogeneity by integrating label-free FTIR imaging, laser capture microdissection and proteomics. *Sci Rep*. 2017;7(1):44829.
36. Sadiku-Zehri F, Gamulin O, Škrabić M, Qerimi-Krasniqi A, Sedlić F, Šepac A, et al. Differentiating Between Malignant Mesothelioma and Other Pleural Lesions Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Appl Spectrosc*. 2020;74(7):808–18.
37. Boydston-White S, Romeo M, Chernenko T, Regina A, Miljković M, Diem M. Cell-cycle-dependent variations in FTIR micro-spectra of single proliferating HeLa cells: Principal component and artificial neural network analysis. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Biomembr*. 2006;1758(7):908–14.
38. Abbas S, Ozek NS, Emri S, Koksall D, Severcan M, Severcan F. Diagnosis of malignant pleural mesothelioma from pleural fluid by Fourier transform-infrared spectroscopy coupled with chemometrics. *J Biomed Opt*. 2018;23(10):105003–105003.
39. Feller-Kopman D, Light R. Pleural Disease. *N Engl J Med*. 2018;378(8):740–51.
40. Obacz J, Yung H, Shamseddin M, Linnane E, Liu X, Azad AA, et al. Biological basis for novel mesothelioma therapies. *Br J Cancer*. 2021;125(8):1039–55.

41. Garrido VV, Sancho JF, Blasco H, Gafas A de P, Rodríguez EP, Panadero FR, et al. Diagnosis and Treatment of Pleural Effusion. Arch Bronconeumol ((Engl Ed)). 2006;42(7):349–72.
42. Light RW. Pleural Effusion. N Engl J Med. 2002;346(25):1971–7.
43. Karpathiou G, Péoc'h M, Sundaralingam A, Rahman N, Froudarakis ME. Inflammation of the Pleural Cavity: A Review on Pathogenesis, Diagnosis and Implications in Tumor Pathophysiology. Cancers. 2022;14(6):1415.
44. Karpathiou G, Benli J, Désage AL, Jacob M, Tiffet O, Peoc'h M, et al. Prognostic role of immune microenvironment in pleural metastases from breast and lung adenocarcinomas. Ann Transl Med. 2022;10(8):430.
45. McCauley L, Dean N. Pneumonia and empyema: causal, casual or unknown. J Thorac Dis. 2015;7(6):992–8.
46. Light R, Hamm H. Malignant pleural effusion: would the real cause please stand up? Eur Respir J. 1997;10(8):1701–2.
47. Kroegel C, Antony VB. Immunobiology of pleural inflammation: potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. Eur Respir J. 1997;10(10):2411–8.
48. Hassan M, Patel S, Sadaka AS, Bedawi EO, Corcoran JP, Porcel JM. Recent Insights into the Management of Pleural Infection. Int J Gen Med. 2021;14(0):3415–29.
49. Jeon D. Tuberculous Pleurisy: An Update. Tuberc Respir Dis. 2014;76(4):153–9.
50. Tang C, Luo Y, Li S, Huang B, Xu S, Li L. Characteristics of inflammation process in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. Biomed Pharmacother. 2021;133:111081.
51. Udovicic M, Sever M, Kavur L, Loncaric K, Barisic I, Balenovic D, et al. Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157 Therapy for Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats Leads to Prevention and Reversal. Biomedicines. 2021;9(7):822.
52. Porcel JM, Azzopardi M, Koegelenberg C, Maldonado F, Rahman N, Lee Y. The diagnosis of pleural effusions. Expert Rev Respir Med. 2015;9(6):801–15.
53. Light RW. The Undiagnosed Pleural Effusion. Clin Chest Med. 2006;27(2):309–19.
54. Light RW. Parapneumonic Effusions and Empyema. Proc Am Thorac Soc. 2006;3(1):75–80.
55. Porcel JM, Light RW. Pleural effusions. Dis-a-Mon. 2013;59(2):29–57.
56. Skok K, Hladnik G, Grm A, Crnjac A. Malignant Pleural Effusion and Its Current Management: A Review. Medicina. 2019;55(8):490.

57. Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the Origin of Cancer Metastasis. *Crit Rev Oncog*. 2012;18(1–2):43–73.
58. Augustyniak K, Chrabaszc K, Jaształ A, Smeda M, Quintas G, Kuligowski J, et al. High and ultra-high definition of infrared spectral histopathology gives an insight into chemical environment of lung metastases in breast cancer. *J Biophotonics*. 2019;12(4):e201800345.
59. Chrabaszc K, Jaształ A, Smeda M, Zieliński B, Blat A, Diem M, et al. Label-free FTIR spectroscopy detects and visualizes the early stage of pulmonary micrometastasis seeded from breast carcinoma. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Basis Dis*. 2018;1864(11):3574–84.
60. Blat A, Wiercigroch E, Smeda M, Wislocka A, Chlopicki S, Malek K. Fourier transform infrared spectroscopic signature of blood plasma in the progression of breast cancer with simultaneous metastasis to lungs. *J Biophotonics*. 2019;12(10):e201900067.
61. Lee YCG, Light RW, Musk AW. Management of malignant pleural mesothelioma: a critical review. *Curr Opin Pulm Med*. 2000;6(4):267–74.
62. Gunatilake S, Lodge D, Neville D, Jones T, Fogg C, Bassett P, et al. Predicting survival in malignant pleural mesothelioma using routine clinical and laboratory characteristics. *BMJ Open Respir Res*. 2021;8(1):e000506.
63. Pastorino S, Yoshikawa Y, Pass HI, Emi M, Nasu M, Pagano I, et al. A Subset of Mesotheliomas With Improved Survival Occurring in Carriers of BAP1 and Other Germline Mutations. *J Clin Oncol*. 2018;36(35):JCO.2018.79.035.
64. Abbott DM, Bortolotto C, Benvenuti S, Lancia A, Filippi AR, Stella GM. Malignant Pleural Mesothelioma: Genetic and Microenvironmental Heterogeneity as an Unexpected Reading Frame and Therapeutic Challenge. *Cancers*. 2020;12(5):1186.
65. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*. 2015;10(9):1243–60.
66. Flores RM, Zakowski M, Venkatraman E, Krug L, Rosenzweig K, Dycoco J, et al. Prognostic Factors in the Treatment of Malignant Pleural Mesothelioma at a Large Tertiary Referral Center. *J Thorac Oncol*. 2007;2(10):957–65.
67. Delgermaa V, Takahashi K, Park EK, Le GV, Hara T, Sorahan T. Global mesothelioma deaths reported to the World Health Organization between 1994 and 2008. *Bull World Heal Organ*. 2011;89(10):716–24.
68. Attanoos RL, Churg A, Galateau-Salle F, Gibbs AR, Roggli VL. Malignant Mesothelioma and Its Non-Asbestos Causes. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(6):753–60.
69. Meerbeeck JP van, Scherpereel A, Surmont VF, Baas P. Malignant pleural mesothelioma: The standard of care and challenges for future management. *Crit Rev OncolHematol*. 2011;78(2):92–111.

70. Woolhouse I, Bishop L, Darlison L, Fonseka DD, Edey A, Edwards J, et al. British Thoracic Society Guideline for the investigation and management of malignant pleural mesothelioma. *Thorax*. 2018;73(Suppl 1):i1–30.
71. Carbone M, Ly BH, Dodson RF, Pagano I, Morris PT, Dogan UA, et al. Malignant mesothelioma: Facts, Myths, and Hypotheses. *J Cell Physiol*. 2012;227(1):44–58.
72. Carbone M, Kratzke RA, Testa JR. The pathogenesis of mesothelioma. *Semin Oncol*. 2002;29(1):2–17.
73. Klerk N de, Alfonso H, Olsen N, Reid A, Sleith J, Palmer L, et al. Familial aggregation of malignant mesothelioma in former workers and residents of Wittenoom, Western Australia. *Int J Cancer*. 2013;132(6):1423–8.
74. Ji J, Sundquist J, Sundquist K. Incidence and familial risk of pleural mesothelioma in Sweden: a national cohort study. *Eur Respir J*. 2016;48(3):873–9.
75. Baas P, Fennell D, Kerr KM, Schil PEV, Haas RL, Peters S, et al. Malignant pleural mesothelioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2015;26:v31–9.
76. Prins J, Williamson KA, Kamp MMK, Hezik EJV, Kwast THV der, Hagemeyer A, et al. The gene for the cyclin-dependent-kinase-4 inhibitor, CDKN2A, is preferentially deleted in malignant mesothelioma. *Int J Cancer*. 1998;75(4):649–53.
77. Bott M, Brevet M, Taylor BS, Shimizu S, Ito T, Wang L, et al. The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma. *Nat Genet*. 2011;43(7):668–72.
78. Hylebos M, Camp GV, Meerbeeck JP van, Beeck KO de. The Genetic Landscape of Malignant Pleural Mesothelioma: Results from Massively Parallel Sequencing. *J Thorac Oncol*. 2016;11(10):1615–26.
79. Testa JR, Cheung M, Pei J, Below JE, Tan Y, Sementino E, et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet*. 2011;43(10):1022–5.
80. Chu GJ, Zandwijk N van, Rasko JEJ. The Immune Microenvironment in Mesothelioma: Mechanisms of Resistance to Immunotherapy. *Front Oncol*. 2019;9:1366.
81. Kanteti R, Dhanasingh I, Kawada I, Lennon FE, Arif Q, Bueno R, et al. MET and PI3K/mTOR as a Potential Combinatorial Therapeutic Target in Malignant Pleural Mesothelioma. *PLoS ONE*. 2014;9(9):e105919.
82. Jagadeeswaran R, Ma PC, Seiwert TY, Jagadeeswaran S, Zumba O, Nallasura V, et al. Functional Analysis of c-Met/Hepatocyte Growth Factor Pathway in Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer Res*. 2006;66(1):352–61.
83. Hylebos M, Beeck KO de, Ende J van den, Pauwels P, Lammens M, Meerbeeck JP van, et al. Molecular analysis of an asbestos-exposed Belgian family with a high prevalence of mesothelioma. *Fam Cancer*. 2018;17(4):569–76.

84. Poste G. Bring on the biomarkers. *Nature*. 2011;469(7329):156–7.
85. Comin CE, Novelli L, Boddi V, Paglierani M, Dini S. Calretinin, thrombomodulin, CEA, and CD15: A useful combination of immunohistochemical markers for differentiating pleural epithelial mesothelioma from peripheral pulmonary adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2001;32(5):529–36.
86. Kitazume H, Kitamura K, Mukai K, Inayama Y, Kawano N, Nakamura N, et al. Cytologic differential diagnosis among reactive mesothelial cells, malignant mesothelioma, and adenocarcinoma. *Cancer Cytopathol*. 2000;90(1):55–60.
87. Politi E, Kandaraki C, Apostolopoulou C, Kyritsi T, Koutselini H. Immunocytochemical panel for distinguishing between carcinoma and reactive mesothelial cells in body cavity fluids. *Diagn Cytopathol*. 2005;32(3):151–5.
88. Cury PM, Butcher DN, Fisher C, Corrin B, Nicholson AG. Value of the Mesothelium-Associated Antibodies Thrombomodulin, Cytokeratin 5/6, Calretinin, and CD44H in Distinguishing Epithelioid Pleural Mesothelioma from Adenocarcinoma Metastatic to the Pleura. *Mod Pathol*. 2000;13(2):107–12.
89. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Soares TR, Pereira H, Bedrossian C, Michael C, et al. CD147 immunohistochemistry discriminates between reactive mesothelial cells and malignant mesothelioma. *Diagn Cytopathol*. 2012;40(6):478–83.
90. Cigognetti M, Lonardi S, Fisogni S, Balzarini P, Pellegrini V, Tironi A, et al. BAP1 (BRCA1-associated protein 1) is a highly specific marker for differentiating mesothelioma from reactive mesothelial proliferations. *Mod Pathol*. 2015;28(8):1043–57.
91. Baker MJ, Hussain SR, Lovergne L, Untereiner V, Hughes C, Lukaszewski RA, et al. Developing and understanding biofluid vibrational spectroscopy: a critical review. *Chem Soc Rev*. 2015;45(7):1803–18.
92. Robinson BWS, Lake RA. Advances in Malignant Mesothelioma. *N Engl J Med*. 2005;353(15):1591–603.
93. Kao SC, Kirschner MB, Cooper WA, Tran T, Burgers S, Wright C, et al. A proteomics-based approach identifies secreted protein acidic and rich in cysteine as a prognostic biomarker in malignant pleural mesothelioma. *Br J Cancer*. 2016;114(5):524–31.
94. White R, Pulford E, Elliot DJ, Thurgood LA, Klebe S. Quantitative mass spectrometry to identify protein markers for diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *J Proteom*. 2019;192:374–82.
95. LACERENZA S, CIREGIA F, GIUSTI L, BONOTTI A, GRECO V, GIANNACCINI G, et al. Putative Biomarkers for Malignant Pleural Mesothelioma Suggested by Proteomic Analysis of Cell Secretome. *Cancer Genom - Proteom*. 2020;17(3):225–36.
96. Zahedi S, Carvalho AS, Ejtehadifar M, Beck HC, Rei N, Luis A, et al. Assessment of a Large-Scale Unbiased Malignant Pleural Effusion Proteomics Study of a Real-Life Cohort. *Cancers*. 2022;14(18):4366.

97. Wang Z, Wang C, Huang X, Shen Y, Shen J, Ying K. Differential proteome profiling of pleural effusions from lung cancer and benign inflammatory disease patients. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Proteins Proteom.* 2012;1824(4):692–700.
98. Zeng T, Ling B, Hu X, Wang S, Qiao W, Gao L, et al. The Value of Adenosine Deaminase 2 in the Detection of Tuberculous Pleural Effusion: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Can Respir J.* 2022;2022(1):7078652.
99. Izhakian S, Wasser WG, Fox BD, Vainshelboim B, Kramer MR. The Diagnostic Value of the Pleural Fluid C-Reactive Protein in Parapneumonic Effusions. *Dis Markers.* 2016;2016(1):7539780.
100. Fujimoto N, Gemba K, Asano M, Fuchimoto Y, Wada S, Ono K, et al. Hyaluronic acid in the pleural fluid of patients with malignant pleural mesothelioma. *Respir Investig.* 2013;51(2):92–7.
101. Liu PJ, Chen CD, Wang CL, Wu YC, Hsu CW, Lee CW, et al. In-depth Proteomic Analysis of Six Types of Exudative Pleural Effusions for Nonsmall Cell Lung Cancer Biomarker Discovery* [S]. *Mol Cell Proteom.* 2015;14(4):917–32.
102. Robak A, Kistowski M, Wojtas G, Perzanowska A, Targowski T, Michalak A, et al. Diagnosing pleural effusions using mass spectrometry-based multiplexed targeted proteomics quantitating mid- to high-abundance markers of cancer, infection/inflammation and tuberculosis. *Sci Rep.* 2022;12(1):3054.
103. Mundt F, Johansson HJ, Forshed J, Arslan S, Metintas M, Dobra K, et al. Proteome Screening of Pleural Effusions Identifies Galectin 1 as a Diagnostic Biomarker and Highlights Several Prognostic Biomarkers for Malignant Mesothelioma*. *Mol Cell Proteom.* 2014;13(3):701–15.
104. Ostroff RM, Mehan MR, Stewart A, Ayers D, Brody EN, Williams SA, et al. Early Detection of Malignant Pleural Mesothelioma in Asbestos-Exposed Individuals with a Noninvasive Proteomics-Based Surveillance Tool. *PLoS ONE.* 2012;7(10):e46091.
105. I. PH, M. LS, R. HM, Jonathan M, Luis C, Jessica D, et al. Fibulin-3 as a Blood and Effusion Biomarker for Pleural Mesothelioma. *N Engl J Med.* 2012;367(15):1417–27.
106. Sun HH, Vaynblat A, Pass HI. Diagnosis and prognosis-review of biomarkers for mesothelioma. *Ann Transl Med.* 2017;5(11):244.
107. Franceschini MC, Ferro P, Canessa PA, Battolla E, Dessanti P, Valentino A, et al. Mesothelin in serum and pleural effusion in the diagnosis of malignant pleural mesothelioma with non-positive cytology. *Anticancer Res.* 2014;34(12):7425–9.
108. Lagniau S, Lamote K, Meerbeeck JP van, Vermaelen KY. Biomarkers for early diagnosis of malignant mesothelioma: Do we need another moonshot? *Oncotarget.* 2017;8(32):53751–62.

109. Kirschner MB, Cheng YY, Badrian B, Kao SC, Creaney J, Edelman JJB, et al. Increased circulating miR-625-3p: a potential biomarker for patients with malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol : Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2012;7(7):1184–91.
110. Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2019;15(6):346–66.
111. Wang Y, Liu Y, Liu S, Cheng L, Liu X. Recent advances in N-glycan biomarker discovery among human diseases. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2024;56(8):1156–71.
112. Paton B, Herrero P, Peraire J, Pino A del, Chafino S, Martinez-Picado J, et al. Fucosylated N-glycans as early biomarkers of COVID-19 severity. *Front Immunol*. 2023;14:1204661.
113. Shkunnikova S, Mijakovac A, Sironic L, Hanic M, Lauc G, Kavur MM. IgG glycans in health and disease: Prediction, intervention, prognosis, and therapy. *Biotechnol Adv*. 2023;67:108169.
114. Ruhaak LR, Miyamoto S, Lebrilla CB. Developments in the Identification of Glycan Biomarkers for the Detection of Cancer. *Mol Cell Proteom : MCP*. 2013;12(4):846–55.
115. Balbisi M, Sugár S, Turiák L. Protein glycosylation in lung cancer from a mass spectrometry perspective. *Mass Spectrom Rev*. 2025;
116. Nakashima K, Sakai Y, Hoshino H, Umeda Y, Kawashima H, Sekido Y, et al. Sulfated Glycans Recognized by S1 Monoclonal Antibody can Serve as a Diagnostic Marker for Malignant Pleural Mesothelioma. *Lung*. 2022;200(3):339–46.
117. Fujihira H, Takakura D, Matsuda A, Abe M, Miyazaki M, Nakagawa T, et al. Bisecting-GlcNAc on Asn388 is characteristic to ERC/mesothelin expressed on epithelioid mesothelioma cells. *J Biochem*. 2021;170(3):317–26.
118. Creaney J, Segal A, Sterrett G, Platten MA, Baker E, Murch AR, et al. Overexpression and altered glycosylation of MUC1 in malignant mesothelioma. *Br J Cancer*. 2008;98(9):1562–9.
119. Chen Z, Gaudino G, Pass HI, Carbone M, Yang H. Diagnostic and prognostic biomarkers for malignant mesothelioma: an update. *Transl Lung Cancer Res*. 2017;6(3):259–69.
120. Matsuura R, Kaji H, Tomioka A, Sato T, Narimatsu H, Moriwaki Y, et al. Identification of mesothelioma-specific sialylated epitope recognized with monoclonal antibody SKM9-2 in a mucin-like membrane protein HEG1. *Sci Rep*. 2018;8(1):14251.
121. Kassem A, Abbas L, Coutinho O, Opara S, Najaf H, Kasperek D, et al. Applications of Fourier Transform-Infrared spectroscopy in microbial cell biology and environmental microbiology: advances, challenges, and future perspectives. *Front Microbiol*. 2023;14:1304081.

122. Kasperek J, Verchere D, Jacquet D, Phillips N. Analysis of the corrosion products on galvanized steels by FTIR spectroscopy. *Mater Chem Phys*. 1998;56(3):205–13.
123. Şahin Y. Investigation of Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy and Chemometric Analysis Method as an Alternative Method in the Diagnosis of Prostate Cancer. *Türk Doğa ve Fen Derg*. 2024;13(1):35–9.
124. Wang R, Wang Y. Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Oral Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1206.
125. Derenne A, Derfoufi KM, Cowper B, Delporte C, Butré CI, Goormaghtigh E. Analysis of Glycoproteins by ATR-FTIR Spectroscopy: Comparative Assessment. *Methods Mol Biol (Clifton, NJ)*. 2021;2271:361–74.
126. Derenne A, Derfoufi KM, Cowper B, Delporte C, Goormaghtigh E. FTIR spectroscopy as an analytical tool to compare glycosylation in therapeutic monoclonal antibodies. *Anal Chim Acta*. 2020;1112:62–71.
127. Su KY, Lee WL. Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Cancer Screening and Diagnostic Tool: A Review and Prospects. *Cancers*. 2020;12(1):115.
128. Yonar D, Sandal A, Emri S, Severcan F. A Novel Method for Early Diagnosis of Malignant Pleural Mesothelioma from Human Serum Samples: ATR-FTIR Spectroscopy. *Biophys J*. 2015;108(2):626a.
129. Yonar D, Severcan M, Gurbanov R, Sandal A, Yilmaz U, Emri S, et al. Rapid diagnosis of malignant pleural mesothelioma and its discrimination from lung cancer and benign exudative effusions using blood serum. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Basis Dis*. 2022;1868(10):166473.
130. Zhang ZM, Chen S, Liang YZ. Baseline correction using adaptive iteratively reweighted penalized least squares. *Analyst*. 2010;135(5):1138–46.
131. Guo Q, Wu W, Massart DL. The robust normal variate transform for pattern recognition with near-infrared data. *Anal Chim Acta*. 1999;382(1–2):87–103.
132. Tang H. Image Classification based on CNN: Models and Modules. 2022 Int Conf Big Data, Inf Comput Netw (BDICN). 2022;00:693–6.
133. Bhatt D, Patel C, Talsania H, Patel J, Vaghela R, Pandya S, et al. CNN Variants for Computer Vision: History, Architecture, Application, Challenges and Future Scope. *Electronics*. 2021;10(20):2470.
134. Klarić T, Gudelj I. High-Throughput Glycomics and Glycoproteomics, Methods and Protocols. *Methods Mol Biol*. 2016;1503:207–16.
135. Vacchini M, Cipolla L, Gornik O, Lauc G, Klarić T. A precise and versatile platform for rapid glycosylation analysis of brain tissue. *Anal Methods*. 2020;12(13):1786–97.

136. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman DrI ur. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl Spectrosc Rev.* 2008;43(2):134–79.
137. Eissa T, Voronina L, Huber M, Fleischmann F, Žigman M. The Perils of Molecular Interpretations from Vibrational Spectra of Complex Samples. *Angew Chem Int Ed.* 2024;63(50):e202411596.
138. Lattová E, Skříčková J, Hausnerová J, Frola L, Křen L, Ihnatová I, et al. N-Glycan profiling of lung adenocarcinoma in patients at different stages of disease. *Mod Pathol.* 2020;33(6):1146–56.
139. Dall'Olio G, Gagneux P. N-Glycan biosynthesis. *Reactome - a curated knowledgebase Biol Pathw.* 2010;33.
140. Buschman H. N-glycan biosynthesis: Flipping for precursors. *Funct Glycom.* 2009;
141. Araujo MG da S, Sallé A, Cahais V, Renard C, Cuenin C, Poubel CP, et al. Disruption of the epigenetic regulator BAP1 drives chromatin remodeling leading to the emergence of cells with breast cancer stem cell properties and aberrant glycosylation. *bioRxiv.* 2024;2024.12.12.628129.
142. Hiltbrunner S, Fleischmann Z, Sokol ES, Zoche M, Felley-Bosco E, Curioni-Fontecedro A. Genomic landscape of pleural and peritoneal mesothelioma tumours. *Br J Cancer.* 2022;127(11):1997–2005.
143. Rienzo AD, Chirieac LR, Hung YP, Severson DT, Freyaldenhoven S, Gustafson CE, et al. Large-scale analysis of BAP1 expression reveals novel associations with clinical and molecular features of malignant pleural mesothelioma. *J Pathol.* 2021;253(1):68–79.
144. Mangiante L, Alcalá N, Sexton-Oates A, Genova AD, Gonzalez-Perez A, Khandekar A, et al. Multiomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies molecular axes and specialized tumor profiles driving intertumor heterogeneity. *Nat Genet.* 2023;55(4):607–18.
145. Righi L, Duregon E, Vatrano S, Izzo S, Giorcelli J, Rondón-Lagos M, et al. BRCA1-Associated Protein 1 (BAP1) Immunohistochemical Expression as a Diagnostic Tool in Malignant Pleural Mesothelioma Classification: A Large Retrospective Study. *J Thorac Oncol.* 2016;11(11):2006–17.
146. Zoldoš V, Grgurević S, Lauc G. Epigenetic regulation of protein glycosylation. *Biomol Concepts.* 2010;1(3–4):253–61.
147. Zoldoš V, Novokmet M, Bečeheli I, Lauc G. Genomics and epigenomics of the human glycome. *Glycoconj J.* 2013;30(1):41–50.
148. Lauc G, Vojta A, Zoldoš V. Epigenetic regulation of glycosylation is the quantum mechanics of biology. *Biochim Biophys acta.* 2013;1840(1):65–70.
149. Hall MK, Weidner DA, Dayal S, Schwalbe RA. Cell surface N-glycans influence the level of functional E-cadherin at the cell–cell border. *FEBS Open Bio.* 2014;4(1):892–7.

150. Vajaria BN, Patel PS. Glycosylation: a hallmark of cancer? *Glycoconj J*. 2017;34(2):147–56.
151. Carvalho S, Oliveira T, Bartels MF, Miyoshi E, Pierce M, Taniguchi N, et al. O-mannosylation and N-glycosylation: two coordinated mechanisms regulating the tumour suppressor functions of E-cadherin in cancer. *Oncotarget*. 2016;7(40):65231–46.
152. Szczepanski AP, Wang L. Emerging multifaceted roles of BAP1 complexes in biological processes. *Cell Death Discov*. 2021;7(1):20.
153. Matsuzaki H, Maeda M, Lee S, Nishimura Y, Kumagai-Takei N, Hayashi H, et al. Asbestos-Induced Cellular and Molecular Alteration of Immunocompetent Cells and Their Relationship with Chronic Inflammation and Carcinogenesis. *BioMed Res Int*. 2012;2012(1):492608.
154. Wen Y, Zhu Y, Zhang C, Yang X, Gao Y, Li M, et al. Chronic inflammation, cancer development and immunotherapy. *Front Pharmacol*. 2022;13:1040163.
155. Lee G, Walser TC, Dubinett SM. Chronic inflammation, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer. *Curr Opin Pulm Med*. 2009;15(4):303–7.

8 Prilozi

Tablica P1. Rezultati Kruskal Wallis testa. Značajne vrijednosti $P < 0.05 = *$, vrlo značajne vrijednosti $P < 1E-05 = **$, i izuzetno značajne vrijednosti $p < 1E-25 = ***$

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
451	0,019851	*	500	0,000756	**	549	2,59E-06	**
452	0,002266	*	501	0,010698	*	550	4,96E-07	**
453	0,018956	*	502	0,010805	*	551	1,78E-05	**
454	0,806667		503	2,7E-05	**	552	0,000231	*
455	0,098082		504	4,73E-06	**	553	3,95E-05	**
456	0,055284		505	8,23E-07	**	554	3,34E-09	**
457	0,251852		506	3,15E-07	**	555	6,72E-09	**
458	0,440703		507	0,001609	*	556	7,52E-08	**
459	0,830517		508	0,023529	*	557	5,69E-07	**
460	0,254179		509	0,004122	*	558	0,000479	*
461	0,045019	*	510	0,176336		559	4,19E-05	**
462	2,94E-05	**	511	0,046035	*	560	6,11E-10	**
463	3,9E-11	**	512	0,005855	*	561	3,72E-07	**
464	4,94E-10	**	513	0,000172	*	562	0,001486	*
465	0,00062	*	514	3,13E-06	**	563	0,000507	*
466	0,208813		515	1,29E-05	**	564	0,002492	*
467	0,001221	*	516	0,002109	*	565	2,43E-07	**
468	1,54E-08	**	517	0,008071	*	566	1,31E-09	**
469	4,18E-13	**	518	0,000134	*	567	2,95E-07	**
470	9,89E-11	**	519	3,93E-05	**	568	0,000646	*
471	6,66E-05	**	520	0,002006	*	569	0,079925	
472	0,002758	*	521	0,001234	*	570	0,888444	
473	9,39E-05	**	522	0,000486	*	571	8,39E-07	**
474	6,05E-08	**	523	0,000485	*	572	1,83E-08	**
475	2,9E-10	**	524	8,28E-05	**	573	0,019306	*
476	3,08E-07	**	525	2,28E-05	**	574	1,56E-05	**
477	0,016227	*	526	5,6E-05	**	575	0,009685	*
478	0,285918		527	9,61E-05	**	576	0,001402	*
479	0,007208	*	528	5,24E-06	**	577	6,44E-06	**
480	8,76E-07	**	529	2,32E-06	**	578	0,227583	
481	2,53E-11	**	530	1,38E-06	**	579	0,000235	*
482	1,2E-10	**	531	2,82E-07	**	580	1,23E-07	**
483	1,57E-05	**	532	3,37E-08	**	581	0,000194	*
484	0,000519	*	533	2,22E-09	**	582	0,32175	
485	2,63E-06	**	534	2,08E-07	**	583	0,262201	
486	9,65E-10	**	535	0,722664		584	0,001281	*
487	2,37E-11	**	536	0,004635	*	585	0,000287	*
488	9,79E-08	**	537	6,12E-05	**	586	0,066529	
489	0,001215	*	538	0,00051	*	587	0,001758	*
490	0,000543	*	539	0,059821		588	1,07E-08	**
491	7,08E-09	**	540	0,278562		589	3,57E-10	**
492	5,28E-13	**	541	0,180318		590	6,07E-08	**
493	8,17E-12	**	542	0,367189		591	4,53E-05	**
494	1,55E-07	**	543	0,362878		592	4,36E-07	**
495	0,000532	*	544	0,002908	*	593	8,38E-09	**
496	0,005099	*	545	0,00011	*	594	3,91E-11	**
497	0,009246	*	546	0,002709	*	595	1,73E-06	**

498	0,016213	*	547	0,000327	*	596	1,61E-05	**
499	0,004071	*	548	1,63E-05	**	597	8,02E-07	**
Valna			Valna			Valna		
Duljina	P-vrijednost		Duljina	P-vrijednost		Duljina	P-vrijednost	
598	0,076364		647	3,86E-06	**	696	2,08E-07	**
599	0,235321		648	1,15E-07	**	697	0,004357	*
600	0,068995		649	2,26E-06	**	698	0,002726	*
601	0,512899		650	0,000146	**	699	3,98E-08	**
602	0,977436		651	7,39E-07	**	700	5,9E-07	**
603	0,438183		652	4,34E-09	**	701	0,244243	
604	0,039694	*	653	4,6E-08	**	702	0,711048	
605	0,040176	*	654	1,91E-07	**	703	0,160822	
606	0,234881		655	2,04E-09	**	704	0,018697	*
607	0,32349		656	3,89E-10	**	705	0,258147	
608	0,10146		657	2,06E-08	**	706	0,003633	*
609	0,017232	*	658	8,77E-08	**	707	0,000286	*
610	0,004213	*	659	1,76E-07	**	708	0,050623	
611	0,001528	*	660	5,89E-06	**	709	0,082603	
612	0,000982	*	661	0,00437	*	710	0,140279	
613	0,001552	*	662	0,993319		711	0,109945	
614	0,000684	*	663	0,56569		712	0,00822	*
615	2,7E-05	**	664	0,073271		713	0,001355	*
616	3,58E-09	**	665	0,021507	*	714	0,000588	*
617	3,76E-12	**	666	0,057407		715	0,000256	*
618	2,78E-10	**	667	0,025561	*	716	0,000552	*
619	0,00974	*	668	1,57E-07	**	717	0,000832	*
620	0,301496		669	6,32E-12	**	718	0,000159	*
621	0,525047		670	5,92E-10	**	719	8,74E-07	**
622	1,18E-07	**	671	0,00674	*	720	3,17E-10	**
623	1,14E-09	**	672	0,722546		721	3,39E-12	**
624	0,211849		673	0,001245	*	722	5,34E-15	**
625	0,021144	*	674	8,6E-11	**	723	1,78E-15	**
626	0,619598		675	1,06E-08	**	724	1,49E-10	**
627	5,52E-06	**	676	0,14685		725	1,52E-06	**
628	6,68E-13	**	677	0,087443		726	4,78E-09	**
629	1,51E-09	**	678	1,55E-06	**	727	3,97E-15	**
630	0,106323		679	2,17E-09	**	728	7,69E-13	**
631	0,551504		680	2,55E-07	**	729	0,006226	*
632	1,28E-06	**	681	0,105631		730	0,636406	
633	7,73E-11	**	682	0,441775		731	0,02779	*
634	0,000101	*	683	0,000336	*	732	3,84E-09	**
635	0,417183		684	2,31E-07	**	733	1,44E-09	**
636	0,050688		685	5,32E-05	**	734	0,000515	*
637	4,12E-09	**	686	0,224139		735	0,025491	*
638	7,8E-09	**	687	0,822768		736	3,36E-08	**
639	0,012172	*	688	0,878957		737	8,89E-15	**
640	0,291902		689	0,992563		738	3,04E-16	**
641	0,223553		690	0,87838		739	9,55E-13	**
642	2,88E-09	**	691	0,361628		740	2,59E-08	**
643	2,14E-12	**	692	0,003459	*	741	7,53E-09	**
644	1,42E-05	**	693	2,59E-05	**	742	8,95E-06	**
645	0,026546	*	694	1,4E-05	**	743	0,035194	*
646	0,002757	*	695	2,74E-07	**	744	0,634436	

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
745	0,001340005	*	794	3,09954E-09	**	843	1,2063E-36	***
746	0,210270318		795	4,78287E-16	**	844	3,56065E-35	***
747	1,5067E-10	**	796	2,2432E-17	**	845	6,26208E-34	***
748	1,6845E-15	**	797	9,57411E-15	**	846	2,26803E-33	***
749	4,10789E-11	**	798	1,48043E-16	**	847	1,77119E-34	***
750	0,000132944	*	799	5,54051E-29	***	848	3,4897E-36	***
751	0,009872742	*	800	3,91095E-44	***	849	1,03695E-35	***
752	0,407802987		801	9,39815E-51	***	850	1,41924E-31	***
753	0,824161172		802	5,40495E-53	***	851	2,66438E-28	***
754	0,479616583		803	1,27987E-51	***	852	3,41797E-27	***
755	0,467198913		804	1,33231E-49	***	853	2,04188E-26	***
756	0,869118939		805	1,49013E-50	***	854	1,72451E-26	***
757	0,866410554		806	3,82732E-52	***	855	4,47268E-29	***
758	0,000233319	*	807	3,24906E-51	***	856	6,34131E-31	***
759	6,9156E-23	**	808	5,83458E-46	***	857	1,13823E-25	***
760	1,36125E-36	***	809	3,06733E-38	***	858	1,44479E-18	**
761	1,71653E-45	***	810	4,0147E-38	***	859	4,28509E-19	**
762	3,46109E-52	***	811	1,73897E-36	***	860	3,5047E-25	***
763	7,51595E-42	***	812	8,07697E-24	**	861	1,04388E-30	***
764	2,91123E-31	***	813	2,71154E-13	**	862	5,59797E-34	***
765	1,56085E-17	**	814	5,32295E-21	**	863	2,6621E-35	***
766	0,007304803	*	815	3,69041E-37	***	864	9,81579E-36	***
767	0,002070558	*	816	1,33902E-27	***	865	1,90167E-36	***
768	2,78013E-19	**	817	4,66335E-15	**	866	3,77028E-37	***
769	2,22441E-28	***	818	3,63161E-18	**	867	1,84414E-37	***
770	4,61153E-18	**	819	1,14986E-33	***	868	7,55256E-38	***
771	1,55408E-11	**	820	3,16377E-43	***	869	3,65402E-38	***
772	1,99848E-10	**	821	9,80514E-42	***	870	1,05747E-37	***
773	3,49128E-19	**	822	6,71229E-31	***	871	1,71128E-36	***
774	2,01355E-23	**	823	1,46036E-24	**	872	1,20329E-34	***
775	1,25143E-21	**	824	1,68318E-27	***	873	1,08507E-29	***
776	1,63217E-12	**	825	9,49647E-31	***	874	1,13922E-22	**
777	2,34404E-18	**	826	2,81257E-29	***	875	1,01315E-19	**
778	2,24831E-43	***	827	6,35267E-28	***	876	4,70824E-24	**
779	3,92004E-52	***	828	1,16423E-30	***	877	1,42155E-30	***
780	7,46081E-53	***	829	1,25906E-36	***	878	4,33989E-30	***
781	2,0831E-50	***	830	2,02141E-42	***	879	1,31363E-25	***
782	2,28226E-43	***	831	1,72596E-42	***	880	1,00466E-24	**
783	2,39631E-36	***	832	4,69202E-37	***	881	1,67522E-27	***
784	4,74518E-28	***	833	1,16958E-32	***	882	8,8467E-31	***
785	2,56293E-18	**	834	2,29541E-33	***	883	1,60503E-32	***
786	2,07038E-15	**	835	1,90946E-37	***	884	1,11392E-32	***
787	3,01313E-20	**	836	3,07234E-40	***	885	3,08963E-32	***
788	7,50622E-25	***	837	2,49266E-37	***	886	4,84543E-32	***
789	4,34977E-30	***	838	4,01468E-32	***	887	2,8763E-32	***
790	2,21757E-31	***	839	1,01212E-30	***	888	1,3299E-32	***
791	3,09019E-17	**	840	1,25885E-33	***	889	1,30018E-32	***
792	2,25658E-07	**	841	1,40657E-36	***	890	3,32263E-32	***
793	7,09107E-05	**	842	1,89378E-37	***	891	2,97746E-31	***

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
892	1,89206E-29	***	941	2,58E-18	**	990	5,64328E-13	**
893	6,05777E-28	***	942	1,29845E-17	**	991	1,13196E-12	**
894	2,0336E-27	***	943	2,73641E-17	**	992	1,78699E-12	**
895	2,77876E-27	***	944	3,13781E-17	**	993	2,78071E-12	**
896	1,90662E-26	***	945	2,87599E-17	**	994	5,69543E-12	**
897	7,1594E-25	***	946	1,86878E-17	**	995	8,54923E-12	**
898	5,5849E-23	**	947	7,31804E-18	**	996	1,30768E-11	**
899	1,23252E-21	**	948	4,32491E-18	**	997	2,98315E-11	**
900	2,67469E-21	**	949	6,61659E-18	**	998	5,61784E-11	**
901	3,08807E-22	**	950	1,35729E-17	**	999	3,80362E-11	**
902	2,23549E-24	**	951	1,63705E-17	**	1000	1,53651E-11	**
903	6,87463E-27	***	952	9,67723E-18	**	1001	8,12276E-12	**
904	2,9812E-28	***	953	6,88381E-18	**	1002	1,17435E-11	**
905	7,64757E-28	***	954	9,02032E-18	**	1003	4,24122E-11	**
906	1,37944E-26	***	955	2,36114E-17	**	1004	2,15259E-10	**
907	1,40564E-25	***	956	8,30456E-17	**	1005	7,84372E-10	**
908	7,82902E-25	***	957	2,45093E-16	**	1006	2,06541E-09	**
909	1,7023E-24	**	958	3,29977E-16	**	1007	4,88942E-09	**
910	3,31614E-25	***	959	1,95823E-16	**	1008	9,77138E-09	**
911	6,13815E-27	***	960	7,90344E-17	**	1009	1,25933E-08	**
912	1,97517E-28	***	961	8,09984E-17	**	1010	1,10435E-08	**
913	6,26333E-29	***	962	4,62485E-16	**	1011	7,73866E-09	**
914	1,75752E-28	***	963	6,51946E-15	**	1012	8,21227E-09	**
915	1,07564E-27	***	964	3,62026E-14	**	1013	1,32297E-08	**
916	1,58106E-26	***	965	3,17495E-14	**	1014	1,747E-08	**
917	4,5057E-25	***	966	8,61414E-15	**	1015	1,52347E-08	**
918	1,23985E-23	**	967	2,26311E-15	**	1016	8,6756E-09	**
919	1,02405E-22	**	968	1,33974E-15	**	1017	4,15618E-09	**
920	1,86847E-22	**	969	1,57294E-15	**	1018	2,78528E-09	**
921	1,21189E-22	**	970	2,2906E-15	**	1019	2,80299E-09	**
922	6,35332E-23	**	971	4,74914E-15	**	1020	4,89902E-09	**
923	1,06746E-23	**	972	1,65857E-14	**	1021	1,02438E-08	**
924	5,9834E-25	***	973	1,55721E-13	**	1022	1,62966E-08	**
925	5,95919E-26	***	974	1,87754E-12	**	1023	1,39281E-08	**
926	1,14424E-25	***	975	1,17824E-11	**	1024	1,09983E-08	**
927	2,68695E-24	**	976	1,98859E-11	**	1025	1,26203E-08	**
928	5,57554E-23	**	977	1,32941E-11	**	1026	1,56143E-08	**
929	2,65391E-22	**	978	6,83868E-12	**	1027	2,0648E-08	**
930	4,2538E-22	**	979	2,97359E-12	**	1028	3,36139E-08	**
931	5,12911E-22	**	980	1,31316E-12	**	1029	7,47455E-08	**
932	3,15375E-22	**	981	6,64473E-13	**	1030	2,12824E-07	**
933	1,15377E-22	**	982	8,63245E-13	**	1031	4,34118E-07	**
934	2,67421E-23	**	983	1,83805E-12	**	1032	6,61866E-07	**
935	3,30208E-23	**	984	3,29918E-12	**	1033	8,36124E-07	**
936	1,66687E-22	**	985	3,27943E-12	**	1034	7,63047E-07	**
937	1,66539E-21	**	986	1,52307E-12	**	1035	5,72408E-07	**
938	1,65387E-20	**	987	5,9177E-13	**	1036	4,26117E-07	**
939	1,00079E-19	**	988	2,90663E-13	**	1037	4,36169E-07	**
940	4,1156E-19	**	989	3,2998E-13	**	1038	6,15111E-07	**

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
1039	1,03E-06	**	1088	0,002086	*	1137	0,008216	*
1040	2,5E-06	**	1089	0,002838	*	1138	0,004587	*
1041	6,22E-06	**	1090	0,004626	*	1139	0,003177	*
1042	1,37E-05	**	1091	0,008075	*	1140	0,002654	*
1043	2,32E-05	**	1092	0,012941	*	1141	0,002008	*
1044	2,41E-05	**	1093	0,017998	*	1142	0,001441	*
1045	1,81E-05	**	1094	0,020342	*	1143	0,00087	*
1046	1,04E-05	**	1095	0,019545	*	1144	0,000475	*
1047	7,67E-06	**	1096	0,019007	*	1145	0,000238	*
1048	1,07E-05	**	1097	0,020064	*	1146	0,00011	*
1049	2,05E-05	**	1098	0,023952	*	1147	4,66E-05	**
1050	3,42E-05	**	1099	0,031251	*	1148	1,95E-05	**
1051	4,66E-05	**	1100	0,042319	*	1149	7,8E-06	**
1052	5,19E-05	**	1101	0,056696		1150	3,58E-06	**
1053	4,75E-05	**	1102	0,074012		1151	1,95E-06	**
1054	3,2E-05	**	1103	0,099		1152	1,14E-06	**
1055	2,04E-05	**	1104	0,127044		1153	6,9E-07	**
1056	1,4E-05	**	1105	0,157303		1154	4,62E-07	**
1057	1,13E-05	**	1106	0,185788		1155	2,64E-07	**
1058	1,03E-05	**	1107	0,204641		1156	1,47E-07	**
1059	1,01E-05	**	1108	0,221119		1157	8,36E-08	**
1060	1,22E-05	**	1109	0,236942		1158	4,3E-08	**
1061	2,17E-05	**	1110	0,260778		1159	2,18E-08	**
1062	4,16E-05	**	1111	0,289586		1160	8,4E-09	**
1063	6,45E-05	**	1112	0,3284		1161	3,39E-09	**
1064	7,28E-05	**	1113	0,390989		1162	1,5E-09	**
1065	8,73E-05	**	1114	0,477081		1163	8,57E-10	**
1066	0,000115	*	1115	0,56296		1164	5,38E-10	**
1067	0,000149	*	1116	0,628261		1165	2,96E-10	**
1068	0,00015	*	1117	0,694839		1166	1,31E-10	**
1069	0,000132	*	1118	0,749827		1167	5,68E-11	**
1070	0,00013	*	1119	0,78908		1168	2,51E-11	**
1071	0,000169	*	1120	0,826447		1169	1,37E-11	**
1072	0,000339	*	1121	0,843137		1170	7,78E-12	**
1073	0,000738	*	1122	0,8465		1171	3,95E-12	**
1074	0,001483	*	1123	0,835525		1172	1,74E-12	**
1075	0,002336	*	1124	0,793255		1173	9,28E-13	**
1076	0,002883	*	1125	0,710015		1174	5,73E-13	**
1077	0,002804	*	1126	0,606402		1175	6,04E-13	**
1078	0,002212	*	1127	0,524772		1176	6,72E-13	**
1079	0,001596	*	1128	0,455549		1177	6,31E-13	**
1080	0,001254	*	1129	0,391664		1178	4,49E-13	**
1081	0,001256	*	1130	0,312782		1179	3,87E-13	**
1082	0,001561	*	1131	0,229504		1180	4,34E-13	**
1083	0,002269	*	1132	0,149077		1181	5,34E-13	**
1084	0,003045	*	1133	0,088048		1182	5,73E-13	**
1085	0,003195	*	1134	0,048136	*	1183	5,23E-13	**
1086	0,002679	*	1135	0,028254	*	1184	4,37E-13	**
1087	0,002106	*	1136	0,015727	*	1185	3,19E-13	**

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
1186	2,92E-13	**	1235	4,91E-12	**	1284	1,42E-21	**
1187	2,84E-13	**	1236	4,14E-12	**	1285	6,5E-22	**
1188	3,05E-13	**	1237	2,87E-12	**	1286	3,25E-22	**
1189	2,84E-13	**	1238	1,98E-12	**	1287	2,12E-22	**
1190	3,35E-13	**	1239	1,68E-12	**	1288	1,02E-22	**
1191	4,96E-13	**	1240	1,85E-12	**	1289	2,2E-23	**
1192	1,01E-12	**	1241	1,21E-12	**	1290	3,04E-24	**
1193	1,74E-12	**	1242	5,92E-13	**	1291	1,08E-24	**
1194	2,12E-12	**	1243	2,74E-13	**	1292	1,26E-24	**
1195	1,8E-12	**	1244	1,6E-13	**	1293	1,56E-24	**
1196	1,47E-12	**	1245	1,11E-13	**	1294	1,56E-24	**
1197	1,53E-12	**	1246	1,05E-13	**	1295	1,38E-24	**
1198	2,87E-12	**	1247	1,13E-13	**	1296	1,12E-24	**
1199	7,42E-12	**	1248	8,42E-14	**	1297	1,08E-24	**
1200	1,51E-11	**	1249	4,05E-14	**	1298	1,14E-24	**
1201	1,63E-11	**	1250	2,24E-14	**	1299	1,44E-24	**
1202	1,52E-11	**	1251	1,53E-14	**	1300	1,09E-24	**
1203	1,52E-11	**	1252	1,08E-14	**	1301	3,05E-25	***
1204	2,1E-11	**	1253	6,02E-15	**	1302	6,45E-26	***
1205	3,26E-11	**	1254	2,56E-15	**	1303	1,57E-26	***
1206	4,79E-11	**	1255	1,25E-15	**	1304	4,5E-27	***
1207	5,29E-11	**	1256	7,88E-16	**	1305	2,23E-27	***
1208	3,46E-11	**	1257	7,68E-16	**	1306	1,83E-27	***
1209	1,92E-11	**	1258	8,15E-16	**	1307	2,68E-27	***
1210	1,18E-11	**	1259	6,03E-16	**	1308	6,82E-27	***
1211	1,09E-11	**	1260	4,05E-16	**	1309	1,36E-26	***
1212	1,5E-11	**	1261	2,4E-16	**	1310	2,38E-26	***
1213	2,29E-11	**	1262	1,52E-16	**	1311	2,3E-26	***
1214	3,08E-11	**	1263	1,23E-16	**	1312	1,06E-26	***
1215	4,1E-11	**	1264	9,79E-17	**	1313	2,09E-27	***
1216	7,16E-11	**	1265	4,2E-17	**	1314	7,27E-28	***
1217	9,97E-11	**	1266	1,2E-17	**	1315	1,14E-27	***
1218	1,01E-10	**	1267	5,4E-18	**	1316	4,61E-27	***
1219	7,2E-11	**	1268	3,77E-18	**	1317	1,52E-26	***
1220	5,88E-11	**	1269	4,22E-18	**	1318	2,05E-26	***
1221	5,82E-11	**	1270	3,34E-18	**	1319	1,42E-26	***
1222	6,2E-11	**	1271	1,49E-18	**	1320	8,73E-27	***
1223	7,17E-11	**	1272	5,71E-19	**	1321	4,32E-27	***
1224	6,5E-11	**	1273	2,67E-19	**	1322	1,78E-27	***
1225	4,49E-11	**	1274	1,52E-19	**	1323	9,19E-28	***
1226	2,98E-11	**	1275	9,87E-20	**	1324	9,7E-28	***
1227	2,56E-11	**	1276	6,48E-20	**	1325	1,29E-27	***
1228	2,75E-11	**	1277	2,78E-20	**	1326	2,34E-27	***
1229	2,87E-11	**	1278	1,21E-20	**	1327	3,9E-27	***
1230	2,04E-11	**	1279	8,16E-21	**	1328	1,22E-26	***
1231	1,24E-11	**	1280	1,18E-20	**	1329	3,93E-26	***
1232	9,24E-12	**	1281	1,47E-20	**	1330	1,35E-25	***
1233	6,7E-12	**	1282	1,02E-20	**	1331	1,12E-24	**
1234	5,68E-12	**	1283	3,95E-21	**	1332	1,26E-23	**

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
1333	6,35E-23	**	1382	6,53E-25	***	1431	3,54E-91	***
1334	1,18E-22	**	1383	1,75E-26	***	1432	1,22E-91	***
1335	1,3E-22	**	1384	8,45E-28	***	1433	1,06E-91	***
1336	2,21E-22	**	1385	1,02E-28	***	1434	3,88E-90	***
1337	6,92E-22	**	1386	6,9E-30	***	1435	4,98E-87	***
1338	3,41E-21	**	1387	3,53E-31	***	1436	5,27E-83	***
1339	2,27E-20	**	1388	1,54E-32	***	1437	4,09E-77	***
1340	1,73E-19	**	1389	4,36E-34	***	1438	2,01E-71	***
1341	7,14E-19	**	1390	1,09E-35	***	1439	1,14E-67	***
1342	1,61E-18	**	1391	3,73E-37	***	1440	3,91E-66	***
1343	4,56E-18	**	1392	1,02E-38	***	1441	3,52E-65	***
1344	1,78E-17	**	1393	1,46E-40	***	1442	1,47E-62	***
1345	5,25E-17	**	1394	1,21E-42	***	1443	8,48E-56	***
1346	7,44E-17	**	1395	7,35E-44	***	1444	1,61E-47	***
1347	8,97E-17	**	1396	1,35E-44	***	1445	2,88E-41	***
1348	2,22E-16	**	1397	6,81E-46	***	1446	5,11E-05	**
1349	6,87E-16	**	1398	5,84E-48	***	1447	1,58E-36	***
1350	3,02E-15	**	1399	5,13E-50	***	1448	2,38E-46	***
1351	1,2E-14	**	1400	7,45E-52	***	1449	8,65E-50	***
1352	1,33E-14	**	1401	1,02E-53	***	1450	8,47E-52	***
1353	6,16E-15	**	1402	2,42E-55	***	1451	1,25E-52	***
1354	2,93E-15	**	1403	1,19E-56	***	1452	3,96E-53	***
1355	3,74E-15	**	1404	9,67E-58	***	1453	1,35E-54	***
1356	6,41E-15	**	1405	8,98E-60	***	1454	6,14E-57	***
1357	7,93E-15	**	1406	4,54E-62	***	1455	4,86E-59	***
1358	6,78E-15	**	1407	5,4E-64	***	1456	2,24E-59	***
1359	5,9E-15	**	1408	2,63E-65	***	1457	1,35E-57	***
1360	3,94E-15	**	1409	1,02E-66	***	1458	9,68E-54	***
1361	1,89E-15	**	1410	4,03E-68	***	1459	5,86E-49	***
1362	6,9E-16	**	1411	9,21E-70	***	1460	2,55E-44	***
1363	2,29E-16	**	1412	4,64E-71	***	1461	1,82E-39	***
1364	1,24E-16	**	1413	2,77E-72	***	1462	3,57E-35	***
1365	8,54E-17	**	1414	3,13E-73	***	1463	3,28E-31	***
1366	1,23E-16	**	1415	3,31E-74	***	1464	9,49E-28	***
1367	4,86E-16	**	1416	8,19E-76	***	1465	2,08E-24	**
1368	3,35E-15	**	1417	9,59E-78	***	1466	2,07E-21	**
1369	9,77E-15	**	1418	5,06E-79	***	1467	2,13E-18	**
1370	7,53E-15	**	1419	4,88E-79	***	1468	3,96E-15	**
1371	1,25E-15	**	1420	1,26E-78	***	1469	6,66E-12	**
1372	1,62E-16	**	1421	1,04E-78	***	1470	3,11E-09	**
1373	2,92E-17	**	1422	4,43E-80	***	1471	3,4E-07	**
1374	4,07E-18	**	1423	8,59E-82	***	1472	1,12E-05	**
1375	2,82E-19	**	1424	1,76E-83	***	1473	0,000247	*
1376	1,07E-20	**	1425	2,42E-84	***	1474	0,003587	*
1377	6,41E-22	**	1426	4,38E-85	***	1475	0,029482	*
1378	2,03E-22	**	1427	1,99E-86	***	1476	0,101173	*
1379	1,85E-22	**	1428	6,71E-88	***	1477	0,14258	*
1380	1,65E-22	**	1429	2,76E-89	***	1478	0,128441	*
1381	2,76E-23	**	1430	1,92E-90	***	1479	0,097199	*

Valna Duljina	P-vrijednost	Valna Duljina	P-vrijednost	Valna Duljina	P-vrijednost
1480	0,061852	1529	0,000923 *	1578	1,12E-12 **
1481	0,029337 *	1530	0,00055 *	1579	1,57E-10 **
1482	0,010888 *	1531	0,000733 *	1580	9,77E-09 **
1483	0,004186 *	1532	0,002517 *	1581	9,02E-08 **
1484	0,002708 *	1533	0,011153 *	1582	4,13E-07 **
1485	0,002277 *	1534	0,027851 *	1583	3,6E-06 **
1486	0,001893 *	1535	0,029888 *	1584	0,000123 *
1487	0,001038 *	1536	0,017509 *	1585	0,003574 *
1488	0,000463 *	1537	0,008041 *	1586	0,037051 *
1489	0,000238 *	1538	0,003463 *	1587	0,081378
1490	0,00021 *	1539	0,001693 *	1588	0,027608 *
1491	0,000367 *	1540	0,000896 *	1589	0,000757 *
1492	0,001526 *	1541	0,000575 *	1590	1,46E-06 **
1493	0,005769 *	1542	0,000499 *	1591	7,35E-10 **
1494	0,013585 *	1543	0,000627 *	1592	3,53E-12 **
1495	0,022908 *	1544	0,000979 *	1593	2,07E-12 **
1496	0,044423 *	1545	0,001225 *	1594	4,46E-11 **
1497	0,07875	1546	0,001058 *	1595	2,72E-09 **
1498	0,106731	1547	0,000936 *	1596	2,34E-07 **
1499	0,089589	1548	0,001348 *	1597	2,24E-05 **
1500	0,050365	1549	0,00279 *	1598	0,001311 *
1501	0,024875 *	1550	0,005718 *	1599	0,036283 *
1502	0,01347 *	1551	0,010554 *	1600	0,223349
1503	0,010155 *	1552	0,015761 *	1601	0,209983
1504	0,014435 *	1553	0,022885 *	1602	0,048605 *
1505	0,025082 *	1554	0,028965 *	1603	0,004017 *
1506	0,043737 *	1555	0,042393 *	1604	0,000193 *
1507	0,056801	1556	0,062349	1605	4,04E-06 **
1508	0,066458	1557	0,083433	1606	1,03E-07 **
1509	0,083358	1558	0,097295	1607	4,35E-09 **
1510	0,112555	1559	0,119101	1608	3,47E-10 **
1511	0,132627	1560	0,162707	1609	2,01E-11 **
1512	0,122175	1561	0,212506	1610	8,07E-13 **
1513	0,088395	1562	0,211906	1611	6,11E-14 **
1514	0,072156	1563	0,181294	1612	2,31E-14 **
1515	0,072145	1564	0,111628	1613	2,78E-14 **
1516	0,081364	1565	0,039955 *	1614	2,76E-14 **
1517	0,097455	1566	0,011451 *	1615	1,29E-14 **
1518	0,117196	1567	0,002492 *	1616	1,61E-15 **
1519	0,168875	1568	0,000221 *	1617	6,39E-17 **
1520	0,243954	1569	4,16E-06 **	1618	7,45E-18 **
1521	0,360877	1570	2,28E-08 **	1619	4,71E-18 **
1522	0,429808	1571	2,68E-10 **	1620	8,83E-18 **
1523	0,420397	1572	1,47E-11 **	1621	4,54E-18 **
1524	0,318837	1573	1,82E-12 **	1622	7,99E-19 **
1525	0,162315	1574	2,25E-13 **	1623	1,75E-19 **
1526	0,059842	1575	3,43E-14 **	1624	1,11E-19 **
1527	0,015658 *	1576	1,1E-14 **	1625	9,18E-20 **
1528	0,003437 *	1577	2,68E-14 **	1626	9,45E-20 **

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
1627	5,01E-20	**	1676	0,131418		1725	1,14E-12	**
1628	1,11E-20	**	1677	0,462121		1726	3,09E-12	**
1629	1,66E-21	**	1678	0,214857		1727	1,76E-09	**
1630	1,09E-21	**	1679	0,004419	*	1728	6,79E-07	**
1631	5E-21	**	1680	0,002175	*	1729	3E-06	**
1632	1,41E-20	**	1681	0,039357	*	1730	3,09E-08	**
1633	1,32E-20	**	1682	0,052698		1731	2,17E-12	**
1634	1,5E-21	**	1683	0,072818		1732	1,63E-14	**
1635	3,49E-22	**	1684	0,012433	*	1733	2,22E-12	**
1636	4,69E-22	**	1685	0,002224	*	1734	2,86E-08	**
1637	2,76E-21	**	1686	0,029714	*	1735	2,63E-06	**
1638	8,54E-21	**	1687	0,252244		1736	9,37E-08	**
1639	6,91E-21	**	1688	0,222223		1737	1,12E-09	**
1640	1,02E-21	**	1689	0,074891		1738	7,4E-09	**
1641	3,42E-22	**	1690	0,00056	*	1739	4,05E-06	**
1642	1,53E-21	**	1691	1,91E-05	**	1740	0,001033	*
1643	1,33E-20	**	1692	0,000139	*	1741	0,000857	*
1644	1,24E-20	**	1693	0,000507	*	1742	1,37E-05	**
1645	2,94E-22	**	1694	0,000328	*	1743	5,02E-08	**
1646	1,53E-24	**	1695	0,000153	*	1744	1,03E-07	**
1647	2,93E-25	**	1696	9,2E-06	**	1745	0,000144	*
1648	1,13E-23	**	1697	1,28E-06	**	1746	0,022588	*
1649	1,77E-20	**	1698	1,35E-05	**	1747	0,01039	*
1650	6,78E-19	**	1699	3,81E-05	**	1748	5,99E-05	**
1651	1,38E-19	**	1700	5,43E-06	**	1749	1,17E-06	**
1652	2,96E-22	**	1701	1,69E-09	**	1750	6,02E-05	**
1653	5,32E-25	***	1702	7,68E-14	**	1751	0,06555	
1654	3,47E-25	***	1703	1,29E-13	**	1752	0,395992	
1655	2,01E-22	**	1704	1,15E-09	**	1753	0,324167	
1656	6,94E-19	**	1705	7,53E-06	**	1754	0,009072	*
1657	8,48E-17	**	1706	1,93E-05	**	1755	0,000109	*
1658	5,79E-17	**	1707	3,2E-08	**	1756	0,000509	*
1659	2,02E-16	**	1708	2,61E-12	**	1757	0,157086	
1660	4,36E-13	**	1709	3,96E-13	**	1758	0,738403	
1661	1,23E-09	**	1710	1,13E-09	**	1759	0,661756	
1662	1,09E-08	**	1711	2,08E-07	**	1760	1,02E-07	**
1663	7,17E-10	**	1712	1,06E-07	**	1761	7,99E-05	**
1664	1,76E-11	**	1713	7,22E-11	**	1762	0,04742	*
1665	6,68E-11	**	1714	2,04E-12	**	1763	0,427387	
1666	3,28E-07	**	1715	1,35E-10	**	1764	0,324646	
1667	0,002819	*	1716	4,64E-08	**	1765	0,20329	
1668	0,022737	*	1717	1,94E-06	**	1766	0,131376	
1669	0,000102	*	1718	2,96E-07	**	1767	0,036271	*
1670	0,000177	*	1719	4,24E-10	**	1768	0,002484	*
1671	0,406164	*	1720	8,21E-13	**	1769	4,81E-05	**
1672	0,054597	*	1721	4,72E-12	**	1770	2,24E-05	**
1673	0,000246	*	1722	3,37E-09	**	1771	0,003441	*
1674	0,00548	*	1723	3,64E-08	**	1772	0,200462	
1675	0,055397		1724	8,17E-10	**	1773	0,172705	

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
1774	0,019472	*	1823	5,3E-20	**	1872	1,83E-12	**
1775	4,3E-05	**	1824	3,84E-17	**	1873	2,46E-12	**
1776	4,67E-06	**	1825	5,67E-14	**	1874	7,03E-16	**
1777	4,86E-05	**	1826	1,51E-13	**	1875	9,25E-19	**
1778	0,002132	*	1827	1,46E-16	**	1876	1,02E-16	**
1779	0,002213	*	1828	4,45E-20	**	1877	4,01E-12	**
1780	1,18E-05	**	1829	2,62E-19	**	1878	4,5E-10	**
1781	1,98E-09	**	1830	1,23E-17	**	1879	4,74E-11	**
1782	4,31E-13	**	1831	1,16E-15	**	1880	1,38E-15	**
1783	3,09E-13	**	1832	1,59E-15	**	1881	3,29E-20	**
1784	3,33E-10	**	1833	1,51E-18	**	1882	4,37E-19	**
1785	4,28E-08	**	1834	1,91E-21	**	1883	1,51E-13	**
1786	3,21E-10	**	1835	3,94E-21	**	1884	2,26E-08	**
1787	5,25E-14	**	1836	7,69E-18	**	1885	5,15E-08	**
1788	1,32E-13	**	1837	4,04E-16	**	1886	1,48E-11	**
1789	1,58E-09	**	1838	1E-17	**	1887	1,71E-14	**
1790	4,24E-06	**	1839	3,9E-21	**	1888	2,89E-11	**
1791	1,27E-05	**	1840	4,91E-23	**	1889	1,96E-06	**
1792	5,29E-08	**	1841	8,89E-21	**	1890	6,32E-05	**
1793	1,24E-11	**	1842	2,95E-17	**	1891	7,31E-06	**
1794	8,36E-12	**	1843	3,09E-15	**	1892	1,08E-08	**
1795	3,14E-08	**	1844	2,66E-16	**	1893	4,07E-10	**
1796	1,22E-05	**	1845	2,33E-20	**	1894	7,84E-06	**
1797	1,19E-05	**	1846	6,65E-23	**	1895	0,308179	
1798	5,37E-08	**	1847	1,21E-21	**	1896	0,566348	
1799	1,78E-10	**	1848	1,33E-18	**	1897	0,97695	
1800	3,37E-10	**	1849	1,31E-17	**	1898	0,011357	*
1801	2,33E-08	**	1850	3,04E-19	**	1899	6,96E-05	**
1802	8,18E-07	**	1851	1,87E-22	**	1900	0,010696	*
1803	1,3E-06	**	1852	7,82E-24	**	1901	0,012231	*
1804	2,65E-09	**	1853	1,61E-21	**	1902	0,000206	*
1805	1,38E-11	**	1854	2,27E-17	**	1903	0,003591	*
1806	2,25E-11	**	1855	6,89E-15	**	1904	0,006056	*
1807	2,47E-09	**	1856	1,01E-15	**	1905	4,24E-07	**
1808	8,47E-08	**	1857	6,42E-19	**	1906	2,11E-13	**
1809	5,99E-09	**	1858	1,58E-20	**	1907	3,29E-18	**
1810	8,72E-13	**	1859	1,28E-18	**	1908	3,75E-18	**
1811	1,46E-15	**	1860	2,29E-14	**	1909	8,79E-15	**
1812	4,24E-14	**	1861	9,19E-12	**	1910	4,8E-12	**
1813	2,01E-10	**	1862	1,39E-14	**	1911	3,18E-13	**
1814	2,12E-08	**	1863	7,16E-19	**	1912	8,11E-18	**
1815	3,24E-10	**	1864	7,96E-19	**	1913	3E-21	**
1816	3,41E-13	**	1865	3,06E-15	**	1914	1,04E-20	**
1817	8,5E-15	**	1866	7,54E-12	**	1915	9,87E-18	**
1818	1,44E-13	**	1867	1,34E-11	**	1916	7,78E-16	**
1819	2,76E-12	**	1868	1,09E-13	**	1917	1,17E-16	**
1820	8,8E-12	**	1869	9,61E-17	**	1918	2,64E-19	**
1821	1,64E-14	**	1870	3,66E-17	**	1919	1,7E-21	**
1822	6,41E-19	**	1871	4,12E-15	**	1920	2,39E-21	**

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
1921	1,89E-19	**	1970	2,61E-23	**	2019	2,22E-23	**
1922	7,81E-18	**	1971	2,95E-24	**	2020	3,48E-23	**
1923	1,34E-18	**	1972	1,66E-24	**	2021	1,02E-22	**
1924	4,07E-21	**	1973	8,38E-24	**	2022	1,6E-22	**
1925	2,06E-22	**	1974	9,48E-23	**	2023	1,24E-22	**
1926	8,66E-21	**	1975	1,84E-22	**	2024	9,26E-23	**
1927	4,29E-18	**	1976	4,61E-23	**	2025	1,5E-22	**
1928	1,08E-16	**	1977	6,09E-24	**	2026	6,11E-22	**
1929	1,14E-17	**	1978	5,4E-24	**	2027	1,44E-21	**
1930	2,96E-19	**	1979	3,29E-23	**	2028	1,1E-21	**
1931	3,42E-20	**	1980	1,9E-22	**	2029	3,76E-22	**
1932	1,57E-19	**	1981	1,99E-22	**	2030	1,75E-22	**
1933	5,33E-18	**	1982	8,14E-23	**	2031	1,77E-22	**
1934	2,62E-17	**	1983	1,62E-23	**	2032	3,21E-22	**
1935	8,35E-19	**	1984	8,92E-24	**	2033	5,66E-22	**
1936	1,51E-21	**	1985	1,81E-23	**	2034	5,63E-22	**
1937	9,34E-23	**	1986	5,17E-23	**	2035	2,29E-22	**
1938	5,69E-22	**	1987	5,13E-23	**	2036	1,19E-22	**
1939	9,27E-21	**	1988	1,21E-23	**	2037	1,68E-22	**
1940	2,32E-20	**	1989	3,83E-24	**	2038	5,87E-22	**
1941	7,21E-21	**	1990	6,48E-24	**	2039	1,79E-21	**
1942	2,26E-21	**	1991	3,87E-23	**	2040	1,45E-21	**
1943	1,54E-21	**	1992	1,04E-22	**	2041	6,51E-22	**
1944	4,19E-21	**	1993	8,35E-23	**	2042	5,78E-22	**
1945	4,51E-20	**	1994	3,26E-23	**	2043	1,15E-21	**
1946	8,66E-20	**	1995	1,06E-23	**	2044	2,05E-21	**
1947	6,91E-21	**	1996	1,43E-23	**	2045	2,32E-21	**
1948	5,92E-22	**	1997	5,42E-23	**	2046	1,49E-21	**
1949	9,71E-22	**	1998	2,2E-22	**	2047	4,98E-22	**
1950	9,03E-21	**	1999	8,46E-23	**	2048	2,32E-22	**
1951	2,81E-20	**	2000	1,04E-23	**	2049	4,35E-22	**
1952	4,5E-21	**	2001	2,95E-24	**	2050	1,58E-21	**
1953	1,73E-22	**	2002	5,12E-24	**	2051	3,01E-21	**
1954	1,7E-23	**	2003	2,21E-23	**	2052	2,14E-21	**
1955	2,11E-23	**	2004	7,9E-23	**	2053	1,09E-21	**
1956	1,96E-22	**	2005	7,67E-23	**	2054	9,47E-22	**
1957	2,01E-21	**	2006	2,7E-23	**	2055	1,38E-21	**
1958	1,92E-21	**	2007	1,01E-23	**	2056	2,4E-21	**
1959	1,96E-22	**	2008	1,52E-23	**	2057	5,34E-21	**
1960	2,11E-23	**	2009	5,26E-23	**	2058	1,43E-20	**
1961	2,43E-23	**	2010	1,08E-22	**	2059	1,58E-20	**
1962	1,32E-22	**	2011	6,18E-23	**	2060	1,09E-19	**
1963	3,55E-22	**	2012	1,85E-23	**	2061	1,19E-17	**
1964	1,11E-22	**	2013	1,54E-23	**	2062	1,02E-14	**
1965	2,07E-23	**	2014	4,31E-23	**	2063	6E-12	**
1966	7,58E-24	**	2015	1E-22	**	2064	6,83E-10	**
1967	2E-23	**	2016	1,53E-22	**	2065	2,39E-08	**
1968	8,31E-23	**	2017	1,05E-22	**	2066	1,69E-07	**
1969	1,16E-22	**	2018	4,89E-23	**	2067	2,46E-07	**

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
2068	1,93E-07	**	2117	0,464704		2166	4,37E-27	***
2069	9,84E-08	**	2118	0,33477		2167	2,34E-26	***
2070	1,57E-08	**	2119	0,11661		2168	4,88E-26	***
2071	9,94E-09	**	2120	0,025188	*	2169	2,72E-26	***
2072	4,99E-07	**	2121	0,109518		2170	3,19E-26	***
2073	0,001312	*	2122	0,87976		2171	5,47E-26	***
2074	0,164046		2123	0,174606		2172	6,8E-26	***
2075	0,24453		2124	0,253376		2173	2,75E-26	***
2076	0,015553	*	2125	0,35309		2174	8,87E-27	***
2077	0,001535	*	2126	0,24154		2175	6,36E-27	***
2078	0,044432	*	2127	0,093734		2176	5,47E-27	***
2079	0,726202		2128	0,002156	*	2177	2,11E-27	***
2080	0,903125		2129	0,000129	*	2178	5,68E-28	***
2081	0,463287		2130	0,0004	*	2179	3,55E-28	***
2082	0,010988	*	2131	0,003871	*	2180	8,23E-28	***
2083	9,14E-05	*	2132	0,068228		2181	9,15E-28	***
2084	0,000483	*	2133	0,082965		2182	1,7E-28	***
2085	0,386085		2134	0,076776		2183	1,16E-29	***
2086	0,019395	*	2135	0,022426	*	2184	4,8E-30	***
2087	0,002786	*	2136	0,003823	*	2185	1,1E-29	***
2088	0,003641	*	2137	0,002771	*	2186	2,38E-29	***
2089	0,010963	*	2138	0,000409	*	2187	7,3E-30	***
2090	0,039433	*	2139	0,000211	*	2188	4,42E-31	***
2091	0,105832		2140	0,000226	*	2189	7E-32	***
2092	0,031319	*	2141	0,000148	*	2190	9,12E-32	***
2093	0,026817	*	2142	2,89E-05	**	2191	2,64E-31	***
2094	0,182181		2143	3,97E-06	**	2192	2,06E-31	***
2095	0,218087		2144	1,24E-06	**	2193	4,52E-32	***
2096	0,03653	*	2145	1,25E-06	**	2194	3,73E-33	***
2097	0,027434	*	2146	2,11E-07	**	2195	7,84E-34	***
2098	0,099824		2147	7,68E-09	**	2196	5,08E-34	***
2099	0,018981	*	2148	1,66E-10	**	2197	9,63E-34	***
2100	5,77E-05	**	2149	3,69E-12	**	2198	1,23E-33	***
2101	6,98E-11	**	2150	2,32E-13	**	2199	5,86E-34	***
2102	4,73E-17	**	2151	7,87E-15	**	2200	2,89E-34	***
2103	1,67E-21	**	2152	4,55E-16	**	2201	1,4E-34	***
2104	6,43E-15	**	2153	5,94E-17	**	2202	1,39E-34	***
2105	2,3E-10	**	2154	7,51E-18	**	2203	1,29E-34	***
2106	1,53E-07	**	2155	4,23E-19	**	2204	1,08E-34	***
2107	0,000316	*	2156	3,35E-21	**	2205	7,92E-35	***
2108	0,021976	*	2157	2,12E-23	**	2206	7,72E-35	***
2109	0,010883	*	2158	1,3E-25	***	2207	6,21E-35	***
2110	0,000118	*	2159	1,04E-27	***	2208	2,35E-35	***
2111	0,002128	*	2160	1,84E-29	***	2209	8,84E-36	***
2112	0,187394		2161	4,73E-30	***	2210	3,9E-36	***
2113	0,600578		2162	8,89E-30	***	2211	1,98E-36	***
2114	0,006606	*	2163	3,44E-29	***	2212	1,31E-36	***
2115	0,00012	*	2164	1,75E-28	***	2213	1,86E-36	***
2116	0,001998	*	2165	9,66E-28	***	2214	4,43E-36	***

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
2215	5,39E-36	***	2264	2,95E-40	***	2313	3,76E-44	***
2216	3,4E-36	***	2265	3,4E-40	***	2314	2,16E-43	***
2217	2,02E-36	***	2266	1,12E-39	***	2315	7,22E-43	***
2218	1,26E-36	***	2267	2,68E-39	***	2316	1,52E-43	***
2219	8,1E-37	***	2268	2,77E-39	***	2317	4,54E-44	***
2220	4,77E-37	***	2269	1,98E-39	***	2318	4,68E-44	***
2221	3,72E-37	***	2270	1,37E-39	***	2319	6,03E-44	***
2222	3,03E-37	***	2271	1,24E-39	***	2320	1,19E-44	***
2223	2,11E-37	***	2272	6,25E-40	***	2321	1,5E-45	***
2224	1,61E-37	***	2273	3,18E-40	***	2322	2,93E-46	***
2225	1,42E-37	***	2274	9,17E-41	***	2323	8,49E-47	***
2226	1,6E-37	***	2275	2E-41	***	2324	5,65E-47	***
2227	1,05E-37	***	2276	9,64E-42	***	2325	3,08E-46	***
2228	7,45E-38	***	2277	2,08E-41	***	2326	9,31E-45	***
2229	6,41E-38	***	2278	7,43E-41	***	2327	8,21E-44	***
2230	6,83E-38	***	2279	8,36E-41	***	2328	7,92E-44	***
2231	8,41E-38	***	2280	3,64E-41	***	2329	3,88E-44	***
2232	9,01E-38	***	2281	2,93E-41	***	2330	1,18E-43	***
2233	8,73E-38	***	2282	4,58E-41	***	2331	7,24E-44	***
2234	5,38E-38	***	2283	5,06E-41	***	2332	1,28E-44	***
2235	2,18E-38	***	2284	5,62E-41	***	2333	1,24E-44	***
2236	1,28E-38	***	2285	5,64E-41	***	2334	2,2E-44	***
2237	1,36E-38	***	2286	3,06E-41	***	2335	2,63E-44	***
2238	1,84E-38	***	2287	1,07E-41	***	2336	5,63E-44	***
2239	1,38E-38	***	2288	6,22E-42	***	2337	4,17E-43	***
2240	9,39E-39	***	2289	5,62E-42	***	2338	2,96E-42	***
2241	9,1E-39	***	2290	8,03E-42	***	2339	1,15E-42	***
2242	1,72E-38	***	2291	8,88E-42	***	2340	4,46E-43	***
2243	2,28E-38	***	2292	4,49E-42	***	2341	3,6E-42	***
2244	2,24E-38	***	2293	1,76E-42	***	2342	3,27E-41	***
2245	1,32E-38	***	2294	1,4E-42	***	2343	9,96E-41	***
2246	6,19E-39	***	2295	1,97E-42	***	2344	3,59E-41	***
2247	3,81E-39	***	2296	2,45E-42	***	2345	7,57E-42	***
2248	4,99E-39	***	2297	1,67E-42	***	2346	2,95E-41	***
2249	7,38E-39	***	2298	9,04E-43	***	2347	1,63E-38	***
2250	7,52E-39	***	2299	4,12E-43	***	2348	5,28E-34	***
2251	4,54E-39	***	2300	2,46E-43	***	2349	2,25E-28	***
2252	1,59E-39	***	2301	2,14E-43	***	2350	1,35E-25	***
2253	9,5E-40	***	2302	3,21E-43	***	2351	1,91E-27	***
2254	1,44E-39	***	2303	4,87E-43	***	2352	1,07E-27	***
2255	1,85E-39	***	2304	2,77E-43	***	2353	8,99E-21	**
2256	1,07E-39	***	2305	1,22E-43	***	2354	1,21E-15	**
2257	3,25E-40	***	2306	1,25E-43	***	2355	1,83E-12	**
2258	1,57E-40	***	2307	2,04E-43	***	2356	7,91E-12	**
2259	1,34E-40	***	2308	1,06E-42	***	2357	3,41E-14	**
2260	1,55E-40	***	2309	1,62E-42	***	2358	2,39E-19	**
2261	2,72E-40	***	2310	1,47E-42	***	2359	1,3E-21	**
2262	4,08E-40	***	2311	1,92E-43	***	2360	4,27E-05	**
2263	4,03E-40	***	2312	4,04E-44	***	2361	0,004085	*

Valna Duljina	P-vrijednost	Valna Duljina	P-vrijednost	Valna Duljina	P-vrijednost
2362	0,728127	2411	1,66E-11 **	2460	9,14E-06 **
2363	0,131652	2412	2,56E-10 **	2461	9,89E-06 **
2364	0,000406 *	2413	4,23E-09 **	2462	5,76E-06 **
2365	1,19E-05 **	2414	4,09E-08 **	2463	2,57E-06 **
2366	0,000284 *	2415	3,82E-08 **	2464	1,25E-06 **
2367	0,002723 *	2416	1,91E-09 **	2465	2,13E-06 **
2368	3,46E-05 **	2417	2,03E-10 **	2466	7,65E-06 **
2369	5,33E-09 **	2418	1,13E-09 **	2467	9,57E-06 **
2370	1,7E-11 **	2419	1,39E-08 **	2468	1,26E-06 **
2371	2,69E-11 **	2420	4,42E-09 **	2469	1,12E-07 **
2372	1,33E-09 **	2421	1,09E-10 **	2470	2,06E-07 **
2373	6,52E-08 **	2422	7,59E-12 **	2471	2,19E-06 **
2374	2,16E-07 **	2423	1,84E-12 **	2472	1,1E-05 **
2375	1,96E-08 **	2424	1,76E-12 **	2473	9,6E-06 **
2376	4,03E-12 **	2425	1,1E-13 **	2474	1,21E-06 **
2377	1,15E-11 **	2426	1,56E-12 **	2475	1,37E-06 **
2378	5,84E-08 **	2427	1,91E-10 **	2476	5,25E-06 **
2379	3,84E-07 **	2428	1,56E-09 **	2477	8,05E-06 **
2380	2,19E-08 **	2429	4,5E-09 **	2478	9,45E-07 **
2381	1,24E-10 **	2430	6,01E-08 **	2479	1,19E-06 **
2382	6,67E-14 **	2431	1,29E-06 **	2480	1,07E-05 **
2383	6,91E-13 **	2432	5,79E-07 **	2481	2,97E-06 **
2384	2,51E-11 **	2433	3,93E-08 **	2482	5,16E-07 **
2385	1,48E-10 **	2434	4,48E-09 **	2483	3,91E-07 **
2386	2,06E-10 **	2435	8,54E-10 **	2484	4,55E-07 **
2387	1,69E-11 **	2436	3,52E-10 **	2485	4,75E-07 **
2388	5,4E-12 **	2437	1,71E-09 **	2486	9,52E-08 **
2389	1,29E-10 **	2438	8,01E-09 **	2487	8,74E-09 **
2390	2,48E-09 **	2439	6,11E-09 **	2488	2,99E-09 **
2391	4,33E-10 **	2440	3,8E-09 **	2489	7,27E-09 **
2392	3,91E-12 **	2441	1,32E-08 **	2490	5,22E-08 **
2393	4,84E-13 **	2442	1,29E-07 **	2491	1,69E-07 **
2394	3,06E-12 **	2443	3,5E-07 **	2492	1,78E-07 **
2395	3,95E-10 **	2444	1,71E-07 **	2493	3,22E-07 **
2396	1,18E-08 **	2445	3,94E-08 **	2494	1,66E-06 **
2397	6,38E-09 **	2446	1,51E-08 **	2495	4E-06 **
2398	1,58E-10 **	2447	4,66E-08 **	2496	2,66E-06 **
2399	5,41E-12 **	2448	1,94E-07 **	2497	3,67E-06 **
2400	6,3E-12 **	2449	5,41E-08 **	2498	1,31E-05 **
2401	7,4E-10 **	2450	1,02E-06 **	2499	0,000632 *
2402	1,14E-08 **	2451	2,71E-05 **	2500	0,018867 *
2403	1,24E-08 **	2452	6,29E-05 **	2501	0,079167
2404	7,67E-10 **	2453	9,25E-05 **	2502	0,158097
2405	2,84E-12 **	2454	7,73E-05 **	2503	0,280727
2406	4,38E-13 **	2455	0,000282 *	2504	0,253089
2407	2,7E-11 **	2456	1,05E-05	2505	0,044407 *
2408	1,97E-10 **	2457	2,4E-07 **	2506	0,003554 *
2409	5,35E-11 **	2458	6,32E-08 **	2507	0,000682 *
2410	7,16E-12 **	2459	1,04E-06 **	2508	0,000121 *

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
2509	2,42E-05	**	2558	0,211128		2607	8,94E-05	**
2510	4,62E-06	**	2559	0,00133	*	2608	0,00023	*
2511	2,41E-06	**	2560	4,74E-05	**	2609	0,000123	*
2512	9,63E-06	**	2561	2,1E-07	**	2610	0,000165	*
2513	7,31E-05	**	2562	5,48E-07	**	2611	0,00129	*
2514	0,000203	*	2563	1,62E-05	**	2612	0,018296	*
2515	0,000147	*	2564	2,15E-05	**	2613	0,045733	*
2516	4,94E-05	**	2565	8,43E-06	**	2614	0,036461	*
2517	5,54E-05	**	2566	9,96E-06	**	2615	0,022563	*
2518	3,24E-05	**	2567	1,52E-05	**	2616	0,030555	*
2519	0,001955	*	2568	1,01E-05	**	2617	0,236786	
2520	0,008672	*	2569	1,65E-05	**	2618	0,969002	
2521	0,013796	*	2570	0,000127	*	2619	0,851476	
2522	0,017756	*	2571	0,000311	*	2620	0,854226	
2523	0,039032	*	2572	4,16E-07	**	2621	0,616068	
2524	0,881187		2573	6,85E-07	**	2622	0,012593	*
2525	0,979542		2574	2,21E-05	**	2623	1,61E-05	**
2526	0,979851		2575	6,65E-05	**	2624	8,1E-08	**
2527	0,914024		2576	6,07E-05	**	2625	6,56E-11	**
2528	0,712516		2577	0,01435	*	2626	3,5E-14	**
2529	0,272415		2578	0,175245		2627	5,07E-15	**
2530	0,156456		2579	0,15761		2628	9,94E-14	**
2531	0,130684		2580	0,399631		2629	1,44E-10	**
2532	0,123207		2581	1,85E-05		2630	8,43E-08	**
2533	0,186755		2582	4,52E-08	**	2631	8,15E-07	**
2534	0,249153		2583	2,01E-09	**	2632	3,44E-05	**
2535	0,272258		2584	8,68E-11	**	2633	0,014813	*
2536	0,354242		2585	2,63E-11	**	2634	0,355921	
2537	0,263163		2586	9,61E-11	**	2635	0,664962	
2538	0,251721		2587	8,22E-10	**	2636	0,456241	
2539	0,582437		2588	1,38E-08	**	2637	0,062719	
2540	0,522302		2589	8,77E-07	**	2638	0,003832	*
2541	0,157417		2590	9,01E-06	**	2639	2,5E-05	**
2542	0,103104		2591	4,2E-06	**	2640	4,7E-08	**
2543	0,054259		2592	1,01E-06	**	2641	6,36E-09	**
2544	0,004461	*	2593	3,09E-06	**	2642	1,09E-07	**
2545	0,002893	*	2594	8,9E-05	**	2643	4,58E-07	**
2546	0,625018		2595	0,003867	*	2644	3,31E-06	**
2547	0,751379		2596	0,030278	*	2645	6,73E-05	**
2548	0,778045		2597	0,039784	*	2646	0,002415	*
2549	0,884121		2598	0,013108	*	2647	0,055938	
2550	0,850563		2599	0,002745	*	2648	0,223351	
2551	0,847146		2600	0,002802	*	2649	0,721185	
2552	0,549562		2601	0,003597	*	2650	0,881389	
2553	0,363787		2602	0,006854	*	2651	0,694707	
2554	0,321682		2603	0,011837	*	2652	0,846343	
2555	0,402854		2604	0,010549	*	2653	0,916195	
2556	0,628311		2605	1,42E-05	**	2654	0,736611	
2557	0,691852		2606	2,65E-06	**	2655	0,038933	*

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
2656	0,000179	*	2705	0,13444		2754	1,25E-52	***
2657	1,72E-05	**	2706	0,142775		2755	1,88E-50	***
2658	2,14E-05	**	2707	0,053614		2756	2,07E-43	***
2659	0,000207	*	2708	0,028677	*	2757	1,28E-30	***
2660	0,000783	*	2709	0,083741		2758	1,08E-23	***
2661	0,003062	*	2710	0,072081		2759	1,86E-29	***
2662	0,168329		2711	0,050372		2760	1,63E-53	***
2663	0,791162		2712	0,476645		2761	2,73E-82	***
2664	0,686707		2713	0,20871		2762	3,24E-68	***
2665	0,769512		2714	0,019844	*	2763	4,05E-56	***
2666	0,987942		2715	0,031374	*	2764	4,79E-56	***
2667	0,838982		2716	1,32E-11	**	2765	6,38E-62	***
2668	0,614649		2717	2,81E-15	**	2766	2,01E-74	***
2669	0,278078		2718	1,75E-14	**	2767	1,14E-87	***
2670	0,095251		2719	6,6E-15	**	2768	2,07E-78	***
2671	0,033787	*	2720	1,31E-15	**	2769	1,97E-73	***
2672	0,007948	*	2721	1,26E-17	**	2770	1,33E-79	***
2673	0,000426	*	2722	2,99E-22	**	2771	7,28E-82	***
2674	0,094606		2723	2,74E-27	***	2772	1,61E-76	***
2675	0,054257		2724	2,42E-25	***	2773	2,32E-71	***
2676	0,001574	*	2725	3,23E-16	**	2774	3,33E-68	***
2677	3,87E-05	**	2726	2,15E-17	**	2775	3,01E-68	***
2678	1,5E-06	**	2727	5,82E-09	**	2776	1,5E-72	***
2679	0,010195	*	2728	2,78E-07	**	2777	3,73E-69	***
2680	2,49E-06	**	2729	3,16E-08	**	2778	5,05E-61	***
2681	3,73E-05	**	2730	3,99E-13	**	2779	1,94E-62	***
2682	0,000235	*	2731	1,9E-16	**	2780	5,95E-59	***
2683	0,004648	*	2732	1,46E-16	**	2781	1,1E-45	***
2684	0,041926	*	2733	9,57E-15	**	2782	2,45E-37	***
2685	0,000474	*	2734	3,58E-09	**	2783	1,21E-34	***
2686	8,96E-05	**	2735	8,6E-06	**	2784	2,16E-31	***
2687	0,006024	*	2736	0,0299	*	2785	8,78E-29	***
2688	0,01523	*	2737	5,23E-08	**	2786	3,51E-28	***
2689	0,08439		2738	1,53E-16	**	2787	2,24E-31	***
2690	0,420354		2739	5,28E-40	***	2788	3,21E-28	***
2691	0,374874		2740	1,63E-33	***	2789	3,67E-14	**
2692	0,350929		2741	2,08E-35	***	2790	3,36E-10	**
2693	0,37615		2742	1,67E-42	***	2791	0,001651	*
2694	0,359091		2743	5,93E-15	**	2792	0,002793	*
2695	0,167284		2744	2,88E-07	**	2793	3,92E-05	**
2696	0,052697		2745	7,51E-06	**	2794	NaN	
2697	0,003981	*	2746	8,33E-10	**	2795	0,48357	
2698	0,001973	*	2747	1,82E-28	***	2796	0,840538	
2699	0,017307	*	2748	2,17E-31	***	2797	0,087829	
2700	0,032583	*	2749	1,2E-38	***	2798	3,08E-06	**
2701	0,022706	*	2750	1,11E-57	***	2799	7,51E-08	**
2702	0,014363	*	2751	9,96E-71	***	2800	1,84E-07	**
2703	0,016289	*	2752	6,69E-65	***	2801	8,32E-06	**
2704	0,048462	*	2753	2,82E-58	***	2802	6,92E-06	**

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
2803	7,27E-06	**	2852	1,30602E-37	***	2901	1,46E-10	**
2804	0,000217	*	2853	2,56916E-41	***	2902	7,73E-10	**
2805	0,063545		2854	1,13397E-44	***	2903	4,21E-09	**
2806	0,111616		2855	3,42114E-48	***	2904	3,58E-10	**
2807	6,06E-05	**	2856	4,18981E-52	***	2905	2,01E-06	**
2808	6,15E-06	**	2857	2,33414E-56	***	2906	3,37E-08	**
2809	1,42E-05	**	2858	1,75621E-60	***	2907	6,43E-30	**
2810	3,12E-05	**	2859	1,12589E-64	***	2908	3,49E-42	**
2811	0,000928	*	2860	9,24164E-69	***	2909	8,37E-43	**
2812	0,007829	*	2861	7,47306E-73	***	2910	5,14E-14	**
2813	0,019464	*	2862	1,63317E-76	***	2911	9E-07	**
2814	0,012998	*	2863	5,61693E-79	***	2912	2,32E-12	**
2815	0,001201	*	2864	1,08523E-81	***	2913	4,26E-33	***
2816	0,000137	*	2865	4,86492E-86	***	2914	2,44E-29	***
2817	0,000107	*	2866	7,30399E-86	***	2915	2,52E-27	***
2818	0,00082	*	2867	5,76093E-74	***	2916	1,45E-27	***
2819	0,017575	*	2868	7,70411E-64	***	2917	9,08E-24	**
2820	0,27418		2869	2,23341E-63	***	2918	1,02E-17	**
2821	0,187032		2870	8,47231E-74	***	2919	9,12E-14	**
2822	0,00151	*	2871	1,32468E-84	***	2920	1,18E-12	**
2823	1,32E-07	**	2872	6,31521E-85	***	2921	7,08E-16	**
2824	4,09E-09	**	2873	1,12285E-74	***	2922	7,11E-26	**
2825	7,91E-10	**	2874	5,55302E-63	***	2923	8,06E-17	**
2826	1,19E-10	**	2875	7,84511E-59	***	2924	1,02E-11	**
2827	3,26E-12	**	2876	3,19978E-63	***	2925	3,96E-10	**
2828	1,32E-13	**	2877	1,83028E-80	***	2926	5,16E-10	**
2829	1,15E-14	**	2878	2,20723E-92	***	2927	1,78E-10	**
2830	1,77E-14	**	2879	3,35127E-81	***	2928	3,29E-12	**
2831	3,76E-13	**	2880	6,04852E-77	***	2929	7,55E-14	**
2832	5,04E-13	**	2881	4,93074E-80	***	2930	1,57E-10	**
2833	5,26E-13	**	2882	1,73918E-80	***	2931	4,68E-06	**
2834	1,5E-12	**	2883	7,72092E-53	***	2932	0,000131	*
2835	1,45E-12	**	2884	9,47107E-39	***	2933	2,56E-05	**
2836	7,03E-14	**	2885	3,98887E-40	***	2934	4,47E-06	**
2837	1,11E-15	**	2886	2,31622E-35	***	2935	4,57E-05	**
2838	4,3E-17	**	2887	9,86325E-33	***	2936	3,2E-05	**
2839	4,55E-18	**	2888	3,78165E-33	***	2937	1,33E-12	**
2840	1,24E-18	**	2889	2,21473E-30	***	2938	4,37E-13	**
2841	3,79E-19	**	2890	1,08357E-25	***	2939	2,34E-09	**
2842	1,84E-20	**	2891	1,95977E-29	***	2940	3,43E-10	**
2843	5,63E-22	**	2892	9,46821E-55	***	2941	4,62E-13	**
2844	2,09E-23	**	2893	6,50678E-61	***	2942	2,52E-14	**
2845	1,03E-24	**	2894	1,1935E-51	***	2943	9,14E-14	**
2846	5,37E-26	***	2895	1,95574E-48	***	2944	1,04E-12	**
2847	3,58E-27	***	2896	3,33296E-51	***	2945	3,55E-09	**
2848	1,75E-28	***	2897	2,59832E-52	***	2946	1,52E-06	**
2849	6,78E-30	***	2898	2,72612E-27	***	2947	3,17E-05	**
2850	1,32E-31	***	2899	1,64349E-13	**	2948	1,56E-05	**
2851	3,47E-34	***	2900	4,54056E-11	**	2949	7,25E-07	**

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
2950	1,61816E-08	**	2999	3,3849E-54	***	3048	1,22458E-50	***
2951	4,63051E-07	**	3000	8,63785E-64	***	3049	4,44233E-41	***
2952	2,11915E-05	**	3001	2,84307E-67	***	3050	4,17173E-33	***
2953	9,85119E-06	**	3002	2,37717E-67	***	3051	5,9039E-30	***
2954	1,37532E-07	**	3003	1,08042E-67	***	3052	1,84547E-36	***
2955	0,002291108	*	3004	7,8718E-71	***	3053	2,42438E-50	***
2956	0,039273018	*	3005	4,30999E-72	***	3054	1,24076E-58	***
2957	0,444999302		3006	5,27787E-43	***	3055	3,96534E-38	***
2958	2,10883E-07	**	3007	2,88669E-18	**	3056	1,36557E-13	**
2959	0,000989807	*	3008	3,01721E-15	**	3057	4,88876E-10	**
2960	0,000996502	*	3009	2,72578E-23	**	3058	6,30057E-18	**
2961	3,8831E-05	**	3010	5,81482E-35	***	3059	8,88158E-54	***
2962	4,28616E-09	**	3011	2,77388E-45	***	3060	6,37447E-56	***
2963	1,60268E-14	**	3012	4,18116E-47	***	3061	2,16397E-50	***
2964	2,19194E-17	**	3013	7,83664E-40	***	3062	3,76084E-49	***
2965	4,39778E-15	**	3014	5,98969E-34	***	3063	4,17393E-47	***
2966	1,47369E-13	**	3015	1,34515E-35	***	3064	9,90255E-46	***
2967	7,08736E-13	**	3016	8,10234E-46	***	3065	4,90931E-48	***
2968	7,28054E-13	**	3017	5,56971E-58	***	3066	2,17103E-51	***
2969	2,04966E-13	**	3018	4,67757E-58	***	3067	2,90235E-47	***
2970	5,25093E-16	**	3019	3,30181E-47	***	3068	9,97101E-40	***
2971	9,53789E-27	***	3020	5,69711E-37	***	3069	1,52312E-37	***
2972	8,36942E-43	***	3021	9,76949E-36	***	3070	8,06837E-31	***
2973	5,72202E-32	***	3022	9,00778E-49	***	3071	9,49974E-19	**
2974	2,59586E-33	***	3023	3,27141E-70	***	3072	1,17382E-14	**
2975	5,8956E-40	***	3024	2,99681E-12	**	3073	1,0929E-19	**
2976	1,18846E-40	***	3025	1,1218E-05	**	3074	1,30083E-25	***
2977	1,45241E-35	***	3026	7,67088E-10	**	3075	6,22101E-20	**
2978	1,0694E-27	***	3027	5,34177E-36	***	3076	2,31957E-15	**
2979	1,90825E-23	**	3028	1,75149E-74	***	3077	6,43655E-14	**
2980	1,20554E-23	**	3029	1,27432E-73	***	3078	2,40314E-14	**
2981	8,70188E-29	***	3030	3,31682E-71	***	3079	1,74394E-13	**
2982	3,37943E-37	***	3031	6,07149E-68	***	3080	8,96468E-08	**
2983	1,22423E-40	***	3032	1,39912E-65	***	3081	0,000266414	*
2984	2,55029E-38	***	3033	1,17386E-65	***	3082	0,00090762	*
2985	9,14146E-36	***	3034	7,94659E-67	***	3083	2,77985E-07	**
2986	1,32416E-36	***	3035	9,46158E-68	***	3084	0,496323491	
2987	8,86723E-37	***	3036	4,4326E-71	***	3085	0,044197028	*
2988	5,66858E-37	***	3037	3,39826E-77	***	3086	0,684029589	
2989	5,76844E-51	***	3038	1,34907E-56	***	3087	0,13448299	
2990	2,40713E-75	***	3039	2,86202E-31	***	3088	0,000322868	*
2991	1,13902E-76	***	3040	7,30884E-30	***	3089	2,57373E-08	**
2992	4,59791E-80	***	3041	6,64544E-49	***	3090	4,18567E-13	**
2993	3,2974E-79	***	3042	4,00626E-73	***	3091	2,69751E-15	**
2994	2,72336E-67	***	3043	6,4126E-64	***	3092	7,0407E-14	**
2995	2,19971E-46	***	3044	1,69462E-34	***	3093	1,07245E-13	**
2996	1,08558E-34	***	3045	7,3814E-21	**	3094	5,01329E-17	**
2997	4,15013E-34	***	3046	2,01447E-30	***	3095	3,19539E-21	**
2998	1,0903E-41	***	3047	8,01491E-57	***	3096	2,13614E-24	**

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
3097	1,7189E-27	***	3146	4,06E-26	***	3195	6,33131E-83	***
3098	7,75426E-31	***	3147	3,99E-28	***	3196	9,18667E-83	***
3099	8,2404E-33	***	3148	1,34E-29	***	3197	1,43606E-82	***
3100	2,15033E-34	***	3149	3,64E-30	***	3198	2,58625E-82	***
3101	2,85813E-39	***	3150	6,36E-30	***	3199	9,60635E-82	***
3102	2,19653E-50	***	3151	8,12E-29	***	3200	2,72688E-81	***
3103	1,555E-53	***	3152	3,53E-27	***	3201	4,67301E-81	***
3104	1,87431E-67	***	3153	3,34E-24	**	3202	3,61508E-81	***
3105	3,00939E-62	***	3154	1,44E-18	**	3203	5,38787E-81	***
3106	7,94799E-40	***	3155	7,57E-11	**	3204	1,43949E-80	***
3107	6,25704E-33	***	3156	0,000123	*	3205	5,61098E-80	***
3108	8,88897E-38	***	3157	0,470907		3206	3,43308E-79	***
3109	1,45955E-47	***	3158	0,005087	*	3207	3,56531E-78	***
3110	3,12403E-54	***	3159	8,06E-10	**	3208	4,28077E-77	***
3111	8,30722E-54	***	3160	2,49E-16	**	3209	5,98123E-76	***
3112	2,08429E-51	***	3161	1,51E-22	**	3210	1,06966E-74	***
3113	6,33289E-50	***	3162	3,26E-28	***	3211	3,16814E-73	***
3114	1,73502E-48	***	3163	1,94E-31	***	3212	2,72961E-71	***
3115	2,97147E-46	***	3164	1,86E-33	***	3213	2,6283E-69	***
3116	1,35586E-44	***	3165	5,46E-37	***	3214	6,16217E-67	***
3117	2,15644E-43	***	3166	4,74E-39	***	3215	3,26958E-64	***
3118	2,48969E-41	***	3167	1,05E-38	***	3216	4,51448E-61	***
3119	1,2156E-37	***	3168	2E-37	***	3217	1,06239E-57	***
3120	5,67119E-34	***	3169	1,03E-33	***	3218	8,6005E-54	***
3121	1,25876E-31	***	3170	1,29E-24	**	3219	2,31316E-49	***
3122	5,42751E-31	***	3171	2,45E-13	**	3220	9,6098E-45	***
3123	6,02595E-33	***	3172	1,9E-08	**	3221	1,62071E-39	***
3124	4,37333E-30	***	3173	4,64E-08	**	3222	3,80957E-34	***
3125	5,68488E-25	**	3174	2,11E-10	**	3223	5,51505E-29	***
3126	6,73303E-24	**	3175	1,73E-13	**	3224	1,10086E-24	**
3127	3,6195E-30	***	3176	7,85E-14	**	3225	2,74566E-21	**
3128	1,04148E-42	***	3177	1,69E-10	**	3226	8,62681E-19	**
3129	2,68961E-41	***	3178	9,02E-08	**	3227	4,01281E-17	**
3130	5,57658E-26	***	3179	5,74E-06	**	3228	4,60576E-16	**
3131	1,72253E-13	**	3180	0,000762	*	3229	1,7862E-15	**
3132	4,99835E-08	**	3181	6,33E-14	**	3230	1,21917E-15	**
3133	4,24882E-05	**	3182	1,91E-18	**	3231	1,97733E-16	**
3134	0,003252845	*	3183	5,19E-17	**	3232	8,25537E-18	**
3135	0,008387742	*	3184	1,4E-21	**	3233	3,63301E-20	**
3136	0,000870424	*	3185	3,66E-36	***	3234	1,99944E-23	**
3137	3,59256E-05	**	3186	3,12E-61	***	3235	3,07225E-28	***
3138	1,30107E-06	**	3187	1,24E-74	***	3236	2,93045E-34	***
3139	3,19067E-09	**	3188	1,19E-76	***	3237	1,92435E-40	***
3140	5,32276E-12	**	3189	5,56E-79	***	3238	4,84815E-46	***
3141	2,2261E-14	**	3190	2,43E-80	***	3239	2,44069E-50	***
3142	1,49528E-16	**	3191	3,46E-81	***	3240	1,32833E-53	***
3143	1,02653E-18	**	3192	5,39E-82	***	3241	2,98538E-56	***
3144	2,84081E-21	**	3193	9,5E-83	***	3242	4,97276E-58	***
3145	1,19648E-23	**	3194	4,61E-83	***	3243	2,93081E-59	***

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
3244	7,54281E-60	***	3293	7,26372E-39	***	3342	9,81987E-08	**
3245	6,03706E-60	***	3294	1,4879E-35	***	3343	6,69594E-07	**
3246	2,17585E-59	***	3295	1,41518E-32	***	3344	1,2272E-07	**
3247	3,72396E-58	***	3296	3,00102E-29	***	3345	4,06794E-09	**
3248	1,30003E-56	***	3297	1,37226E-25	***	3346	2,14006E-10	**
3249	1,51286E-54	***	3298	6,63508E-22	**	3347	4,71509E-11	**
3250	5,85571E-52	***	3299	7,3392E-19	**	3348	4,8761E-11	**
3251	3,55755E-49	***	3300	2,4535E-16	**	3349	3,1007E-11	**
3252	4,68499E-46	***	3301	3,38018E-14	**	3350	9,42736E-12	**
3253	2,34648E-42	***	3302	3,60248E-12	**	3351	1,35326E-12	**
3254	4,48393E-38	***	3303	4,96181E-10	**	3352	1,10562E-13	**
3255	3,37362E-33	***	3304	4,66102E-08	**	3353	2,63035E-15	**
3256	5,13908E-28	***	3305	1,12742E-06	**	3354	3,52101E-17	**
3257	4,64543E-23	**	3306	1,42962E-05	**	3355	2,60984E-19	**
3258	3,70576E-19	**	3307	0,000125557	*	3356	1,35603E-21	**
3259	1,22255E-15	**	3308	0,000371617	*	3357	3,72881E-24	**
3260	1,99452E-12	**	3309	0,000329756	*	3358	4,0156E-27	***
3261	5,20571E-09	**	3310	0,000151481	*	3359	5,82082E-30	***
3262	5,38176E-06	**	3311	3,83242E-05	**	3360	3,4881E-32	***
3263	NaN		3312	7,34084E-06	**	3361	6,56706E-34	***
3264	8,37174E-11	**	3313	1,33817E-06	**	3362	4,79933E-35	***
3265	1,22453E-05	**	3314	1,31573E-07	**	3363	9,95609E-36	***
3266	0,026314378	*	3315	3,68945E-09	**	3364	4,99447E-36	***
3267	0,548621447		3316	3,30101E-11	**	3365	5,18013E-36	***
3268	0,51209445		3317	5,21435E-13	**	3366	9,49689E-36	***
3269	0,033782861	*	3318	1,22864E-14	**	3367	6,00409E-35	***
3270	0,000241318	*	3319	2,12892E-16	**	3368	3,64547E-34	***
3271	1,0401E-07	**	3320	2,07007E-18	**	3369	1,57843E-33	***
3272	5,87922E-12	**	3321	9,41239E-21	**	3370	6,44264E-33	***
3273	5,03584E-18	**	3322	1,10285E-23	**	3371	2,49363E-32	***
3274	3,55759E-25	***	3323	1,88526E-27	***	3372	7,77926E-32	***
3275	1,02286E-33	***	3324	1,56842E-30	***	3373	1,50358E-31	***
3276	9,06844E-44	***	3325	7,95107E-33	***	3374	3,10882E-31	***
3277	3,74899E-53	***	3326	3,87968E-34	***	3375	3,58363E-31	***
3278	2,89367E-60	***	3327	3,85639E-34	***	3376	2,67213E-31	***
3279	1,19413E-64	***	3328	1,6698E-30	***	3377	1,5505E-31	***
3280	1,16637E-66	***	3329	1,7358E-23	**	3378	1,03906E-31	***
3281	5,73607E-67	***	3330	4,13834E-16	**	3379	8,28285E-32	***
3282	9,92814E-67	***	3331	7,85476E-11	**	3380	7,07922E-32	***
3283	8,30759E-66	***	3332	2,17472E-07	**	3381	5,13816E-32	***
3284	1,85456E-64	***	3333	1,25398E-05	**	3382	3,62046E-32	***
3285	1,16545E-62	***	3334	3,10875E-05	**	3383	2,1954E-32	***
3286	3,27974E-60	***	3335	3,12706E-06	**	3384	1,43323E-32	***
3287	1,25078E-57	***	3336	8,57731E-08	**	3385	7,75426E-33	***
3288	5,38157E-55	***	3337	4,91106E-09	**	3386	5,01541E-33	***
3289	3,53939E-52	***	3338	2,43876E-10	**	3387	2,72177E-33	***
3290	4,57586E-49	***	3339	1,1962E-08	**	3388	1,59441E-33	***
3291	8,28853E-46	***	3340	1,49283E-09	**	3389	7,39585E-34	***
3292	4,69591E-42	***	3341	6,23835E-08	**	3390	2,75172E-34	***

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
3391	1,00547E-34	***	3440	8,05909E-51	***	3489	3,1698E-11	**
3392	2,03207E-35	***	3441	9,96957E-50	***	3490	NaN	
3393	3,63279E-36	***	3442	1,62896E-48	***	3491	1,24494E-35	***
3394	6,94774E-37	***	3443	5,19795E-47	***	3492	1,04501E-35	***
3395	1,11517E-37	***	3444	2,27153E-45	***	3493	1,89381E-34	***
3396	1,64294E-38	***	3445	6,44933E-44	***	3494	1,49172E-32	***
3397	2,29643E-39	***	3446	1,30257E-42	***	3495	1,03972E-31	***
3398	5,57595E-40	***	3447	3,34441E-41	***	3496	2,79188E-33	***
3399	1,71431E-40	***	3448	5,60777E-40	***	3497	2,79201E-36	***
3400	3,38683E-41	***	3449	4,9192E-39	***	3498	1,20213E-38	***
3401	5,57003E-42	***	3450	4,59282E-38	***	3499	1,4668E-40	***
3402	1,05866E-42	***	3451	6,72194E-37	***	3500	2,36876E-43	***
3403	1,82271E-43	***	3452	4,41476E-36	***	3501	4,97822E-47	***
3404	1,72811E-44	***	3453	1,70199E-35	***	3502	6,23838E-52	***
3405	9,94383E-46	***	3454	5,83831E-35	***	3503	7,63339E-58	***
3406	3,89103E-47	***	3455	1,19252E-34	***	3504	5,01473E-63	***
3407	1,22088E-48	***	3456	2,70547E-34	***	3505	1,30676E-66	***
3408	2,62865E-50	***	3457	8,16845E-34	***	3506	1,26611E-68	***
3409	2,88163E-52	***	3458	1,9946E-33	***	3507	1,95572E-69	***
3410	8,03581E-54	***	3459	2,85945E-33	***	3508	1,04206E-69	***
3411	2,5293E-55	***	3460	1,30255E-33	***	3509	7,86703E-69	***
3412	1,54592E-56	***	3461	3,61191E-34	***	3510	5,11273E-67	***
3413	2,23652E-57	***	3462	5,71875E-35	***	3511	9,23156E-67	***
3414	1,18021E-57	***	3463	4,05929E-36	***	3512	1,7503E-67	***
3415	1,32386E-57	***	3464	6,32838E-38	***	3513	5,36589E-68	***
3416	2,5553E-57	***	3465	1,20712E-39	***	3514	4,07793E-67	***
3417	7,19831E-57	***	3466	5,23757E-41	***	3515	5,69712E-65	***
3418	3,01705E-56	***	3467	3,27122E-42	***	3516	2,65856E-63	***
3419	1,63032E-55	***	3468	1,10456E-43	***	3517	4,31812E-62	***
3420	7,42178E-55	***	3469	3,52953E-44	***	3518	2,3234E-61	***
3421	3,7131E-54	***	3470	5,83724E-43	***	3519	1,59586E-60	***
3422	1,28708E-53	***	3471	2,03421E-40	***	3520	1,69755E-60	***
3423	4,44355E-53	***	3472	3,54304E-36	***	3521	2,44323E-60	***
3424	7,94363E-53	***	3473	3,25686E-30	***	3522	4,92166E-59	***
3425	1,03472E-52	***	3474	1,63309E-22	**	3523	1,12912E-56	***
3426	7,36323E-53	***	3475	2,43132E-14	**	3524	2,81027E-53	***
3427	3,33796E-53	***	3476	5,08766E-08	**	3525	4,86501E-47	***
3428	1,35695E-53	***	3477	2,91193E-05	**	3526	1,84458E-35	***
3429	6,35507E-54	***	3478	3,84896E-05	**	3527	4,34193E-21	**
3430	3,24788E-54	***	3479	4,63782E-06	**	3528	1,23472E-08	**
3431	2,29887E-54	***	3480	2,18152E-07	**	3529	0,021154775	*
3432	1,85286E-54	***	3481	7,36897E-09	**	3530	0,819075874	
3433	2,49788E-54	***	3482	5,10915E-10	**	3531	0,090244045	
3434	3,05969E-54	***	3483	1,79238E-10	**	3532	6,7815E-05	**
3435	5,21175E-54	***	3484	5,09319E-10	**	3533	8,27896E-09	**
3436	1,18993E-53	***	3485	3,27884E-09	**	3534	2,64933E-12	**
3437	3,53658E-53	***	3486	1,27316E-08	**	3535	2,08123E-14	**
3438	1,53812E-52	***	3487	7,07951E-09	**	3536	1,70163E-16	**
3439	1,04302E-51	***	3488	1,12029E-09	**	3537	8,05971E-19	**

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
3538	3,4977E-20	**	3587	4,00212E-46	***	3636	3,16382E-70	***
3539	2,35685E-20	**	3588	2,79754E-45	***	3637	1,19532E-70	***
3540	1,01127E-19	**	3589	3,09593E-44	***	3638	6,61865E-71	***
3541	6,83867E-18	**	3590	6,80232E-43	***	3639	2,38999E-71	***
3542	1,88445E-14	**	3591	2,17782E-41	***	3640	1,23536E-71	***
3543	1,53892E-12	**	3592	6,78887E-40	***	3641	7,87458E-72	***
3544	1,09166E-12	**	3593	1,75581E-38	***	3642	5,54467E-72	***
3545	1,27107E-13	**	3594	5,45041E-38	***	3643	3,30093E-72	***
3546	2,60814E-14	**	3595	7,17536E-39	***	3644	8,70157E-73	***
3547	2,64656E-14	**	3596	2,11203E-40	***	3645	1,85964E-73	***
3548	2,90341E-13	**	3597	2,60707E-41	***	3646	6,98433E-74	***
3549	5,60458E-12	**	3598	4,0989E-42	***	3647	8,14529E-74	***
3550	1,37162E-11	**	3599	7,80702E-44	***	3648	4,39184E-73	***
3551	8,6834E-13	**	3600	1,61522E-46	***	3649	3,61828E-72	***
3552	5,06967E-14	**	3601	2,45175E-49	***	3650	2,37033E-71	***
3553	5,15736E-15	**	3602	3,95643E-52	***	3651	2,95092E-70	***
3554	9,93917E-16	**	3603	7,52108E-55	***	3652	6,79014E-69	***
3555	5,7579E-16	**	3604	3,58457E-57	***	3653	1,59782E-67	***
3556	2,24518E-16	**	3605	4,15275E-59	***	3654	1,29009E-66	***
3557	1,22057E-15	**	3606	3,2577E-61	***	3655	1,31331E-66	***
3558	1,13625E-14	**	3607	2,08978E-63	***	3656	1,1176E-66	***
3559	1,68834E-13	**	3608	1,02242E-64	***	3657	8,7098E-67	***
3560	2,06095E-11	**	3609	9,99564E-66	***	3658	1,88728E-67	***
3561	2,11158E-07	**	3610	8,87364E-67	***	3659	1,1941E-68	***
3562	6,07576E-09	**	3611	9,47166E-68	***	3660	5,64347E-70	***
3563	0,002080897	*	3612	6,10075E-68	***	3661	1,14121E-71	***
3564	8,36362E-15	**	3613	2,35899E-67	***	3662	8,05742E-74	***
3565	2,19766E-13	**	3614	1,30727E-66	***	3663	3,64258E-76	***
3566	4,58005E-14	**	3615	8,59958E-66	***	3664	1,85205E-77	***
3567	1,09872E-15	**	3616	3,19657E-64	***	3665	3,4318E-78	***
3568	5,29419E-17	**	3617	1,14078E-62	***	3666	1,42606E-78	***
3569	5,00425E-18	**	3618	1,51116E-61	***	3667	7,44611E-77	***
3570	6,63002E-19	**	3619	9,62501E-61	***	3668	1,70853E-71	***
3571	2,38075E-20	**	3620	1,38572E-59	***	3669	7,3821E-66	***
3572	1,64637E-22	**	3621	8,85228E-59	***	3670	5,7894E-61	***
3573	1,38167E-25	***	3622	9,43646E-59	***	3671	2,75944E-55	***
3574	6,25382E-29	***	3623	2,13197E-59	***	3672	2,71816E-48	***
3575	1,36362E-32	***	3624	3,14374E-60	***	3673	5,63921E-42	***
3576	1,04158E-36	***	3625	8,58165E-61	***	3674	5,84359E-36	***
3577	5,16662E-41	***	3626	1,44091E-61	***	3675	3,70569E-32	***
3578	1,10137E-45	***	3627	2,21087E-62	***	3676	2,8716E-30	***
3579	2,64803E-49	***	3628	4,66452E-63	***	3677	0,066344617	
3580	4,8094E-51	***	3629	8,09265E-64	***	3678	4,0335E-30	***
3581	1,06484E-51	***	3630	6,44172E-65	***	3679	3,73195E-31	***
3582	4,8324E-52	***	3631	5,50007E-66	***	3680	7,69716E-36	***
3583	1,60503E-51	***	3632	4,89836E-67	***	3681	1,41128E-40	***
3584	1,47192E-50	***	3633	6,72873E-68	***	3682	6,23314E-46	***
3585	6,34381E-49	***	3634	8,07028E-69	***	3683	4,52486E-51	***
3586	3,17966E-47	***	3635	1,16896E-69	***	3684	6,01713E-55	***

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
3685	1,7193E-57	***	3734	2,92671E-53	***	3783	9,17404E-45	***
3686	1,35496E-58	***	3735	1,80452E-52	***	3784	1,75338E-44	***
3687	1,32319E-59	***	3736	8,93075E-52	***	3785	9,41855E-41	***
3688	9,0955E-60	***	3737	6,19545E-51	***	3786	2,15283E-35	***
3689	4,92317E-59	***	3738	5,18822E-50	***	3787	5,33337E-33	***
3690	2,12726E-58	***	3739	6,22927E-49	***	3788	2,22735E-32	***
3691	2,9729E-57	***	3740	5,31477E-48	***	3789	2,7322E-32	***
3692	5,34964E-56	***	3741	5,08255E-47	***	3790	2,03459E-31	***
3693	1,17775E-55	***	3742	6,70748E-46	***	3791	6,6413E-30	***
3694	1,02314E-55	***	3743	1,7059E-44	***	3792	3,30343E-28	***
3695	5,774E-55	***	3744	7,84968E-43	***	3793	1,4791E-27	***
3696	1,09316E-53	***	3745	3,4092E-41	***	3794	1,07796E-27	***
3697	9,52449E-53	***	3746	2,68001E-39	***	3795	1,27946E-27	***
3698	7,10181E-52	***	3747	1,93481E-37	***	3796	5,662E-28	***
3699	1,05164E-50	***	3748	1,60519E-35	***	3797	1,68933E-28	***
3700	1,01675E-49	***	3749	9,01975E-34	***	3798	7,26756E-29	***
3701	3,31521E-49	***	3750	2,54278E-32	***	3799	3,73865E-29	***
3702	2,76894E-48	***	3751	2,72988E-31	***	3800	4,04085E-30	***
3703	8,15786E-47	***	3752	1,21719E-30	***	3801	1,86054E-31	***
3704	7,08229E-46	***	3753	4,56092E-30	***	3802	1,04228E-32	***
3705	1,92129E-46	***	3754	8,17609E-29	***	3803	1,8222E-34	***
3706	9,05135E-48	***	3755	1,55479E-27	***	3804	3,59006E-36	***
3707	1,32488E-48	***	3756	1,41308E-25	***	3805	1,31613E-37	***
3708	2,57757E-49	***	3757	4,10212E-24		3806	1,1622E-38	***
3709	9,62364E-51	***	3758	2,08526E-23	**	3807	6,15279E-39	***
3710	1,16886E-51	***	3759	9,99202E-23	**	3808	3,38023E-38	***
3711	4,52655E-51	***	3760	1,83935E-22	**	3809	2,02158E-37	***
3712	1,60894E-49	***	3761	2,70121E-23	**	3810	1,11792E-37	***
3713	8,56787E-48	***	3762	4,8373E-23	**	3811	4,44754E-39	***
3714	5,31106E-46	***	3763	1,05563E-22	**	3812	8,22197E-41	***
3715	3,33344E-45	***	3764	7,80482E-23	**	3813	9,43829E-42	***
3716	1,68529E-46	***	3765	2,75872E-23	**	3814	4,46062E-42	***
3717	3,5651E-49	***	3766	3,89359E-24	**	3815	3,80697E-42	***
3718	1,73167E-51	***	3767	3,67078E-25	***	3816	6,66744E-42	***
3719	3,22719E-53	***	3768	1,84963E-26	***	3817	1,67983E-41	***
3720	2,86884E-54	***	3769	6,01322E-28	***	3818	5,08747E-41	***
3721	1,26626E-52	***	3770	6,23739E-29	***	3819	2,12457E-40	***
3722	2,25485E-42	***	3771	1,30846E-29	***	3820	1,43759E-39	***
3723	3,10487E-27	***	3772	4,10345E-30	***	3821	1,10632E-38	***
3724	1,83693E-21	***	3773	9,93662E-29	***	3822	1,64147E-37	***
3725	6,66773E-25	***	3774	1,25791E-16	**	3823	3,5233E-36	***
3726	1,14301E-37	***	3775	7,10549E-05	**	3824	1,64995E-34	***
3727	2,23625E-48	***	3776	0,212692212		3825	3,9854E-31	***
3728	2,03242E-54	***	3777	0,195813186		3826	9,46615E-27	***
3729	2,37214E-57	***	3778	0,054584608		3827	5,50514E-26	***
3730	8,77427E-58	***	3779	2,56874E-07	**	3828	2,46626E-29	***
3731	6,32902E-57	***	3780	9,31965E-45	***	3829	4,9061E-33	***
3732	1,35956E-55	***	3781	9,36984E-49	***	3830	3,04486E-35	***
3733	3,23675E-54	***	3782	6,1356E-44	***	3831	4,70286E-36	***

Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost		Valna Duljina	P-vrijednost	
3832	1,02488E-35	***	3881	2,98213E-46	***	3930	4,69977E-30	***
3833	3,65996E-35	***	3882	4,92469E-46	***	3931	2,65895E-27	***
3834	1,16408E-34	***	3883	5,46627E-46	***	3932	2,11926E-25	***
3835	3,38337E-34	***	3884	7,1281E-46	***	3933	1,5333E-25	***
3836	5,3833E-34	***	3885	1,3077E-45	***	3934	2,11392E-25	***
3837	4,72186E-34	***	3886	2,95034E-45	***	3935	2,33647E-22	**
3838	1,52167E-34	***	3887	6,82907E-45	***	3936	1,07131E-14	**
3839	2,11587E-35	***	3888	1,15738E-44	***	3937	5,77974E-09	**
3840	2,27677E-36	***	3889	1,96709E-44	***	3938	8,69955E-07	**
3841	6,6959E-37	***	3890	2,76676E-44	***	3939	7,21631E-09	**
3842	1,57202E-36	***	3891	7,63904E-44	***	3940	3,37367E-21	**
3843	4,43769E-35	***	3892	6,24789E-43	***	3941	7,15821E-29	***
3844	1,0101E-33	***	3893	6,02079E-41	***	3942	4,13491E-26	***
3845	1,99103E-34	***	3894	3,46603E-38	***	3943	2,78096E-25	***
3846	3,63022E-37	***	3895	4,05851E-36	***	3944	6,63373E-27	***
3847	1,21052E-39	***	3896	4,33147E-36	***	3945	6,90491E-28	***
3848	3,33059E-41	***	3897	1,02649E-37	***	3946	1,36938E-22	**
3849	1,3306E-41	***	3898	1,04066E-38	***	3947	1,56831E-19	**
3850	3,59645E-40	***	3899	7,1538E-39	***	3948	1,19409E-19	**
3851	1,98918E-35	***	3900	2,05491E-38	***	3949	4,8907E-19	**
3852	3,6761E-28	***	3901	1,72331E-37	***	3950	2,11728E-15	**
3853	3,77066E-26	***	3902	1,43361E-36	***	3951	1,24422E-08	**
3854	1,04195E-29	***	3903	3,67339E-36	***	3952	0,000121601	*
3855	2,82202E-39	***	3904	5,80319E-36	***	3953	0,002607284	*
3856	6,08473E-44	***	3905	9,43009E-36	***	3954	0,000588796	*
3857	1,52273E-46	***	3906	4,29257E-35	***	3955	1,083E-06	**
3858	1,1281E-47	***	3907	9,24378E-34	***	3956	1,0716E-09	**
3859	5,05E-48	***	3908	1,05041E-32	***	3957	5,24695E-09	**
3860	3,62893E-48	***	3909	1,12132E-32	***	3958	1,53847E-07	**
3861	1,59839E-48	***	3910	1,84479E-33	***	3959	1,74066E-07	**
3862	6,64273E-48	***	3911	2,58877E-34	***	3960	4,85405E-06	**
3863	2,69137E-45	***	3912	1,31516E-34	***	3961	1,98713E-05	**
3864	9,59102E-44	***	3913	9,98917E-35	***	3962	1,45082E-06	**
3865	4,7457E-44	***	3914	2,11342E-34	***	3963	8,82553E-09	**
3866	2,0076E-46	***	3915	2,02975E-34	***	3964	2,36364E-11	**
3867	3,37885E-46	***	3916	1,64422E-36	***	3965	3,53068E-12	**
3868	1,8361E-43	***	3917	2,90624E-36	***	3966	3,53093E-12	**
3869	5,86101E-43	***	3918	1,45654E-32	***	3967	7,94647E-12	**
3870	5,34858E-45	***	3919	8,09615E-31	***	3968	1,2467E-11	**
3871	1,34514E-46	***	3920	4,81411E-33	***	3969	6,38548E-15	**
3872	1,6766E-45	***	3921	3,74551E-35	***	3970	2,58301E-15	**
3873	5,19328E-45	***	3922	4,34735E-34	***	3971	5,4571E-08	**
3874	8,24781E-46	***	3923	9,54255E-34	***	3972	5,8794E-05	**
3875	7,45349E-47	***	3924	7,14604E-34	***	3973	0,000778065	*
3876	5,05257E-48	***	3925	3,99707E-32	***	3974	0,002659257	*
3877	2,83888E-48	***	3926	5,66535E-30	***	3975	0,004642709	*
3878	5,50928E-48	***	3927	4,71331E-28	***	3976	0,507780528	
3879	2,3337E-47	***	3928	5,93828E-28	***	3977	0,337582098	
3880	9,45418E-47	***	3929	1,17361E-29	***	3978	0,371872447	

Valna Duljina	P-vrijednost	
3979	0,365266822	
3980	0,364866855	
3981	0,060000121	
3982	0,003180452	*
3983	0,000124722	*
3984	5,84544E-07	**
3985	3,69806E-05	**
3986	0,019594816	*
3987	0,211985438	
3988	0,721416534	
3989	0,983984144	
3990	0,317155579	
3991	0,072026321	
3992	0,000232716	*
3993	6,24903E-06	**
3994	1,30342E-05	**

P2 Program za CNN

Osnovni kod u Pythonu koji je bio zadužen za definiranje neuralne mreže je bio sljedeći:

```
# Define the CNN model
class CNN(nn.Module):
    def __init__(self, input_size):
        super(CNN, self).__init__()
        self.conv1 = nn.Conv2d(1, 16, kernel_size=(1, 3), padding=(0, 1))
        self.pool = nn.MaxPool2d(kernel_size=(1, 2))
        self.conv2 = nn.Conv2d(16, 32, kernel_size=(1, 3), padding=(0, 1))
        self.fc1 = nn.Linear(32 * (input_size // 2 // 2), 128)
        self.fc2 = nn.Linear(128, 64)
        self.fc3 = nn.Linear(64, 2)
    def forward(self, x):
        x = self.pool(torch.relu(self.conv1(x)))
```

```
x = self.pool(torch.relu(self.conv2(x)))  
x = x.view(x.size(0), -1)  
x = torch.relu(self.fc1(x))  
x = torch.relu(self.fc2(x))  
x = self.fc3(x)  
return x
```

9 Životopis

Lovro Kavur, doktor medicine, rođen je 30. prosinca 1984. u Zagrebu. Osnovnu školu pohađao je u Zagrebu te je završio Privatnu Klasičnu gimnaziju, također u Zagrebu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 2003. godine, a diplomirao 2009. godine. Tijekom studija nagrađen je Dekanovom nagradom za najboljeg studenta medicine i Dekanovom nagradom za najbolji znanstveni rad.

Pripravnički staž odradio je u KBC Sestre Milosrdnice, a nakon položenog stručnog ispita 2010. godine zaposlen je u Kliničkoj bolnici Merkur, Zagreb kao specijalizant radiologije na Kliničkom Zavodu za Dijagnostičku i Intervencijsku Radiologiju. Tijekom specijalizacije proveo je 3 mjeseca na Sveučilištu Case Western Reserve, Cleveland, SAD, u sklopu ESOR Visiting Scholarship programa u abdominalnoj radiologiji, fokusirajući se na MRI tijela, CT tijela i Fusion PET-MRI. 2015. godine u sklopu svoje edukacije proveo je tri mjeseca na Medicinskom sveučilištu u Beču, Austrija. Specijalistički ispit položio je u rujnu 2015. godine te je od tada na istoj Klinici zaposlen kao specijalist radiologije, Stručno se prvenstveno bavi CT-om tijela, MR-om abdomena i zdjelice te ultrazvukom.

Doktorski studij na Prirodoslovno-matetičkom Fakultetu u Zagrebu upisao je 2015. godine. Aktivno sudjeluje na stručnim i znanstvenim domaćim i međunarodnim kongresima i izradi znanstvenih radova te prisustvuje poslijediplomskim tečajevima trajne medicinske izobrazbe liječnika. Koautor je više znanstvenih članaka koji su objavljeni u indeksiranim časopisima. Volontirao je dugi niz godina u Eko Centru Caput Insulae, Beli, otok Cres, gdje je sudjelovao u projektu zaštite bjeloglavih supova, biodiverziteta i kulturne baštine otoka Cresa. Oženjen je i sa suprugom Marinom ima dva sina, Toma i Vala, Aktivno se služi engleskim jezikom, a pasivno njemačkim.