

Raport de activitate

privind implementarea proiectului **Cod PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0112, Nr.6/2018** cu titlul **Nanomateriale magnetoplasmonice multifuncționale pentru aplicații de tip point of care**, ianuarie 2022-iunie 2022, Fază unica 2022

Rezumat

În cadrul proiectului au fost preparate nanostructuri magnetoplasmonice anizotrope pe bază de argint și respectiv $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$. Au fost studiate proprietățile fizice ale acestora. Folosind substraturi magnetoplasmonice au fost analizate prin metoda SERS interacțiunile structurale la nivelul ADN-ului celular în mai multe tipuri de cancer și anume, cancerul renal, cancerul de vezică urinară, leucemie asociată cu sindromul Down precum și limfadenopatia malignă. În cazul leucemiei asociate cu sindromul Down, aria benzii marker SERS de ADN de la 1005 cm^{-1} arată o scădere treptată a metilării globale a ADN-ului pe măsură ce celulele progresează de la o pre-leucemie la o leucemie acută complexă. S-a folosit o strategie de biopsie lichidă pentru a detecta carcinomul celular renal (RCC), cel mai răspândit cancer renal (CR). Spectrele SERS atribuite în principal metaboliților purinici au prezentat intensități mai mari iar cele ale carotenoidelor intensități mai mici în grupul RCC. În cazul cancerului de vezică urinară s-a demonstrat că profilarea miARN se completează cu profilarea SERS pentru un diagnostic acurat al acestuia.

Plan de realizare pentru anul 2022, etapa a 5-a :

Validarea conceptului de detecție în practica clinică prin incubarea nanoparticulelor hibride bifuncționalizate cu aptameri cu probe de ser prelevate de la pacienții diagnosticați cu AML,

Activități prevăzute :

Act. 5.1 Achiziționarea dispozitivelor, chimicalelor și a altor obiecte de laborator incluzând consumabilele.

Act. 5.2 Sinteza nanoparticulelor multifuncționale hibride având proprietățile dorite în vederea testării lor în practica clinică și prepararea probelor de sânge provenite de la pacienții diagnosticați cu AML.

Act. 5.3 Verificarea și validarea conceptului de detecție în practica clinică.

Act. 5.4 Elaborarea instrucțiunilor de utilizare a metodei de detecție în practica clinică.

Act. 5.5 Activități de informare și reclamă.

Act. 5.6 Activități pentru obținerea, validarea și protejarea drepturilor de proprietate intelectuală și industrială.

Act. 5.7 Diseminarea & alte activități privind vizibilitatea.

Act. 5.8 Achiziția serviciilor de audit.

Act. 5.9 Raportarea.

Act. 5.1 Achiziționarea dispozitivelor, chimicalelor și a altor obiecte de laborator incluzând consumabilele.

Au fost achiziționate în termen toate chimicalele, obiectele de laborator precum și consumabilele necesare realizării etapei a 5-a a proiectului.

Rezultatele științifice obținute în cadrul acțiunilor 2-4 au fost publicate în 9 lucrări în reviste de specialitate cu factor de impact ridicat (Q1). Spațiul alocat raportului fiind limitat vom prezenta doar succint unele din rezultatele obținute.

Act. 5.2 Sinteza nanoparticulelor multifuncționale hibride având proprietățile dorite în vederea testării lor în practica clinică și prepararea probelor de sânge provenite de la pacienții diagnosticați cu AML.

Nanostructurile de argint au fost sintetizate folosind ca agent reducător și stabilizator citratul de trisodiu, al cărui rol fundamental a fost într-o primă fază acela de a reduce ionii de Ag^+ iar mai apoi de a stabiliza structurile anizotrope sintetizate. Reacția de sinteză a fost efectuată într-un vial introdus într-un cuptor cu microunde, care să asigure o temperatură de sinteză mult mai omogenă decât în cazul metodelor clasice de sinteză. Mai mult, utilizarea microundelor a permis sinteza nanostructurilor într-un interval de timp foarte scurt (~ 3 minute).

Odată încheiată etapa de sinteză, nanoparticulele plasmonice anizotrope au fost analizate prin Microscopie Electronică în Transmisie (TEM), Microscopia de Forță Atomică (AFM), Microscopia în Câmp Întunecat (Dark Field Microscopy).

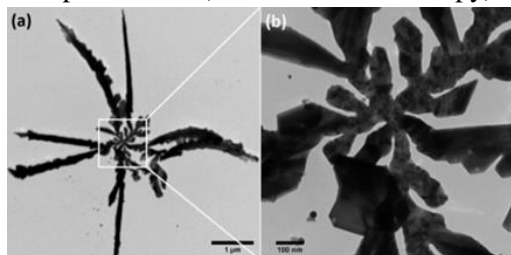


Fig. 5.1.1. Imagini TEM ale nanoparticulelor de argint plasmonice anizotrope sintetizate

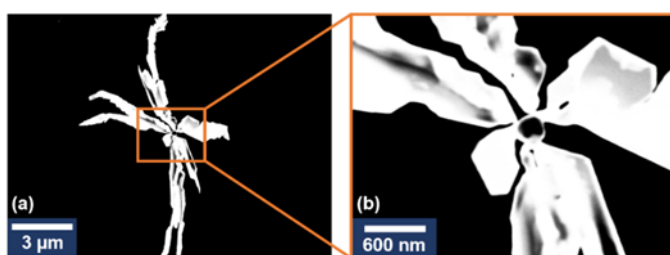


Fig.5.1.2. Analiza STEM a nanoparticulelor de argint sintetizate

În figura 5.1.1 este prezentată o imagine de ansamblu a unei astfel de nanostructuri anizotrope precum și o imagine TEM detaliată a zonei centrale a acestei nanostructuri. Nanostructurile conțin o nanoparticulă centrală interconectată cu mai multe brațe individuale unidirecționale. Analiza EDX (figura 5.1.3) a confirmat faptul că nanostructurile anizotrope sunt alcătuite din atomi de Ag.

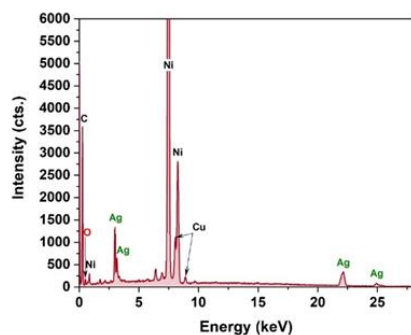


Fig. 5.1.3. Analiza EDX a nanoparticulelor

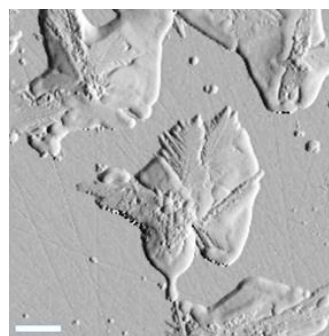


Fig. 5.1.4. Imagine topografică AFM a nanoparticulelor sintetizate

Analiza STEM confirmă observațiile prezentate anterior folosind datele TEM-Fig.5.1.2. În plus, se pare că avem de-a face cu o structură cristalină orientată $\{111\}$ în centrul căreia se află o singură nanoparticulă quasi-sferică. Diferențele foarte mici de contrast observate în cazul brațelor care compun starurile indică faptul că acestea au o structură 2D. În figura 5.1.4 este prezentată o imagine AFM a unor nanostaruri care au fost depuse pe un substrat de CaF_2 în vederea utilizării ca și substrat plasmonice pentru analiza SERS a biofluidelor.

Odată încheiată etapa de sinteză, caracterizare și producere a substratelor plasmonice solide s-a trecut la etapa de validare a acestora folosind ca analiți diverse biofluide cu potențial aplicativ

extrem de ridicat cum ar fi compușii farmaceutici cu secțiune de împrăștiere Raman scăzută (atenolol, metoprolol), aminoacizi sau chiar lizate celulare.

Nanoparticulele de CoFe_2O_4 au fost preparate prin metoda hidrotermală (Bortnic et. al. 2022). Pentru a depozita pe aceste nanoparticule învelișul de SiO_2 s-a folosit metoda Stober. Astfel, nanoparticulele (0.2 mmol) au fost dispersate în 80 mL etanol și agitate mecanic sub acțiunea ultrasunetelor. Particulele dispersate au fost funcționalizate folosind 0.2 mL APTES. Depunerea stratului de SiO_2 pe suprafața acestora s-a realizat prin adăugarea de TEOS (0.2mL) și creșterea pH-ului prin adăugarea unei soluții de NH_4OH . Soluția, conținând acest amestec, a fost agitată timp de 2 ore în prezența ultrasunetelor, menținând temperatura constantă la $T=40^\circ\text{C}$. După spălarea în etanol și dispersarea nanoparticulelor de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2$ în apă, acestea au fost funcționalizate cu APTES. În soluția de nanoparticule dispersate în apă, s-a adăugat secvențial o soluție de acid clorauric, citrat de sodiu dehidrat și borohidru de sodiu, în timpul agitării mecanice în câmp de ultrasunete menținând temperatura la $T=65^\circ\text{C}$ (Bortnic et. al. 2022)..

Table 1. Compositions, lattice parameters, crystallites sizes, magnetizations and coercive fields. AuN is a symbol for $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2@AuN$ nanostructures with $N = 1-3$.

Nanostructure		CoFe_2O_4	Au1	Au2	Au3
Composition (weight %)	CoFe_2O_4	100	46.8	41.8	24.3
	SiO_2	-	11.0	11.6	6.3
	Au	-	42.2	46.6	69.4
Lattice parameter (nm)	CoFe_2O_4 core	0.8379 (9)	0.8375 (4)	0.8372 (9)	0.8376 (9)
Crystallite size (nm)		14.2 (2)	20.2 (3)	17.3 (2)	20.2 (2)
Lattice parameter (nm)	Au shell	-	0.4073 (2)	0.4073 (9)	0.4074 (7)
Crystallite size (nm)		-	23.57 (2)	15.86 (4)	18.88 (6)
Nanocomposite magnetization/ CoFe_2O_4 weight percent (emu/g)		86.9	86.1	84.5	85.5
Coercive field H_C (T)	$T = 4.2$ k	0.35	0.20	0.28	0.19
	$T = 300$ k	0.04	0.03	0.03	0.030

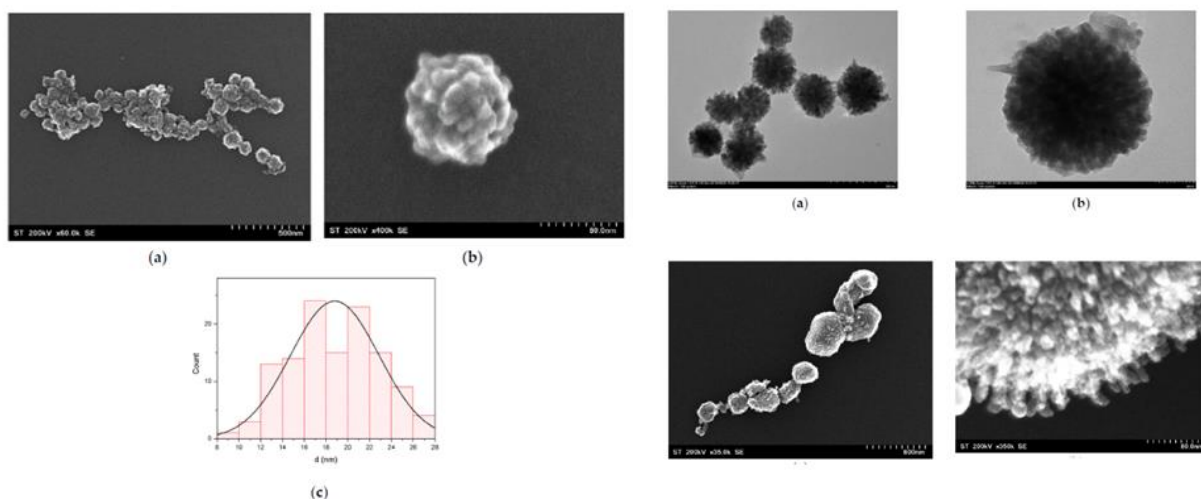


Fig.5.1.5. Imagini SEM ale nanoparticulelor de CoFe_2O_4 (a,b) și histogramele cu dimensiunile particulelor.

Fig.5.1.6. Imagini TEM (sus) respectiv imagini SEM (jos) ale nanocompozitelor $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2@Au2$.

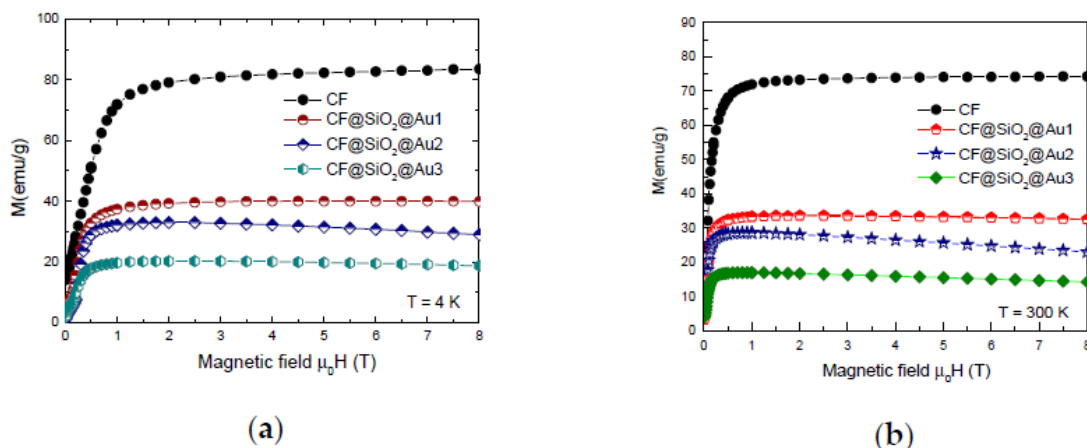


Fig5.1.7. Izoterme de magnetizare măsurate la 4.2 K respectiv 300 K.

Spectrele de raze X a nanoparticulelor de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$ evidențiază prezența liniilor caracteristice atât ale CoFe_2O_4 precum și ale aurului. SiO_2 este în stare amorfă, fapt evidențiat prin prezența unui maxim larg, la unghiuri mici în spectrele de difracție. Imaginile TEM și respectiv SEM evidențiază că nanoparticulele de CoFe_2O_4 au o formă aproape sferică și sunt aglomerate în structuri pseudo-sferice în forma de „zmeură”-Fig.5.1.5a,b. Dimensiunea medie a cristalitelor este de 18 nm-Fig.5.1.5c. Prezența unui înveliș de SiO_2 , care acoperă particulele de CoFe_2O_4 poate fi observată în toate cazurile-Fig.5.1.6. Dimensiunea medie a nanostructurilor $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ este în jur de 79 nm (Bortnic et. al. 2022). Nanostructurile $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$ sunt aproape în întregime acoperite cu Au. Compozițiile acestor nanostructuri precum și proprietățile fizice sunt redată în Tabelul 5.1.1. Izotermele de magnetizare la $T=4.2$ K și respectiv $T=300$ K sunt redată în Fig.5.1.7. Analiza datelor pentru nanoparticulele de CoFe_2O_4 evidențiază prezența unei comportari de tip sticlă de spin suprapusă peste o ordonare dominantă de tip ferrimagnetic. Dependența de câmpul extern a magnetizării componente de tip sticlă de spin este descrisă de relația $M(H)/M(0)=1-bH^{-1/2}$ în care stările de spin sunt corelate(Bortnic et. al. 2022, Burzo et.al.2022).. Compoziția probei este $(\text{Co}_{0.162}\text{Fe}_{0.838})[\text{Co}_{0.838}\text{Fe}_{1.162}]\text{O}_4$ apropiată de o structură de tip spinel invers. Contribuțiile la magnetizare a structurii de tip sticlă de spin sunt în jur de 8% din magnetizările nanoparticulelor. Deviația spinilor de la o aranjare după o singură axă poate fi indusă prin; (1) distrugerea simetriei prin ruperea legăturilor de schimb în stratul de suprafață; (2) competiția dintre interacțiunile feromagnetice din interiorul subrețelelor magnetice și antiferomagnetice și între acestea; (3) anizotropia stratului de suprafață care depinde de modul de distribuție a ionilor magnetici (Bortnic et. al. 2022).. Analiza comparativă a datelor evidențiază că nu toți ionii magnetici aflați în stratul de suprafață (având grosimea ce corespunde la un parametru de rețea) sunt implicați în comportarea de tip sticlă de spin. Din stratul de suprafață având grosimea corespunzătoare unei celule unitate, contribuie doar ionii magnetici care au legături rupte la suprafață.

Câmpurile coercitive la temperatura mediului ambiant sunt cu un ordin de mărime mai mici comparativ cu valorile determinate la $T=4.2$ K-Tabelul 5.1.1. Analiza diagramelor FORC evidențiază că maximul în densitatea de probabilitate pentru CoFe_2O_4 este cu un ordin de mărime mai mare comparativ cu cea la nanostructurile $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}1-3$ -Fig.5.1.8. Maximul în distribuția FORC este deplasat spre valori pozitive ca de altfel și câmpurile de interacțiune în nanostructurile de tip miez-inveliș. Interacțiunile dipolare devin mai importante comparativ cu cele de schimb, în prezența învelișului de SiO_2 -Au, ca urmare a efectelor de ecranare.

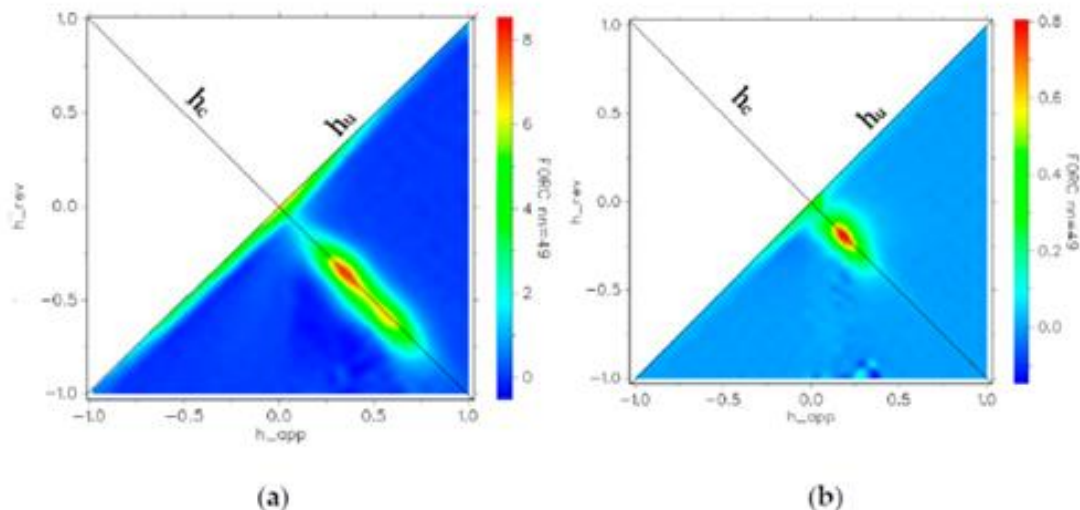


Fig.5.1.8. Diagramele FORC pentru CoFe_2O_4 (a) respectiv $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2@Au_2$ (b)

Analiza curbelor de magnetizare evidențiază prezența unei contribuții gigant diamagnetice. Aceasta își are originea în curenții staționari induși de câmpul aplicat, electronilor cuasi-liberi aflați în stratul de aur de la suprafață. Diamagnetismul aurului, χ_d în unitați relative χ_d/χ_{Au} , unde χ_{Au} este diamagnetismul aurului în stare masivă, crește odată cu diminuarea suprafețelor particulelor. Pe măsură ce dimensiunea particulei de Au crește, susceptibilitatea diamagnetică se apropie de cea a aurului masiv.

Dupa sintetizarea și analiza proprietăților fizice ale nanostructurilor elaborate s-a investigat capacitatea substratelor plasmonice de a detecta și de a pune în evidență interațiuni structurale la nivelul ADN celular.

Act. 5.3 Verificarea și validarea conceptului de detecție în practica clinică.

Conceptul de detecție a cancerului prin SERS în practica clinică în cadrul fazei pe anul 2022 a fost validat în următoarele cazuri: (1) diagnosticul cancerului renal; (2) diagnosticarea și stratificarea moleculară a cancerului de vezică urinară.

5.3.1 Diagnosticul cancerului renal (CR) prin profilarea SERS a serului sanguin

Cancerul renal (CR) reprezintă 3% din toate cancerurile, cu o creștere anuală de 2% a incidenței la nivel mondial, motivând astfel necesitatea screening-ului. Cu toate acestea, nu există în prezent un instrument de screening stabilit pentru CR. Pentru a aborda această problemă, am evaluat profilarea serului prin spectroscopie SERS, ca strategie de biopsie lichidă, pentru a detecta carcinomul celular renal (RCC), cel mai răspândit subtip histologic de CR. Astfel, au fost recoltate probe de ser de la 23 de pacienți cu RCC și 27 de martori (CTRL) cu o patologie urologică benignă, precum litiaza sau hipertrofia benignă de prostată. Profilul SERS a serului deproteinizat a livrat spectre SERS atribuite în principal metaboliților purinici, care au prezentat intensități mai mari în grupul RCC, precum și benzilor Raman ale carotenoidelor, ce au prezentat intensități mai mici în grupul RCC. Analiza componentelor principale (PCA) a spectrelor SERS a arătat o tendință de grupare nesupravegheată a celor două grupuri. Apoi, trei algoritmi de învățare automată (random forest, kNN, Bayes naiv) au fost implementați ca algoritmi de clasificare supravegheați pentru a obține o discriminare între grupurile RCC și CTRL, obținând o valoare AUC de 0,78 pentru algoritmul random forest, 0,78 pentru kNN și 0,76 pentru Bayes naiv (medie AUC $0,77 \pm 0,01$). Prezentul studiu evidențiază potențialul biopsiei lichide SERS ca strategie de diagnostic și screening pentru RCC.

Profilarea SERS. Pentru analiza SERS, 50 μL de ser au fost amestecați cu 450 μL de metanol și s-a centrifugat timp de 10 minute la 5800 g. Supernatantul a fost colectat cu grijă pentru analize ulterioare. Nanoparticulele de argint sintetizate prin reducere cu clorhidrat de hidroxilamină (hya-AgNPs) au fost folosite ca substrat SERS. Analiza SERS a fost efectuată pe un amestec de 45 μL de hya-AgNPs activate cu Ca^{2+} (prin adaos de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) și 5 μL de ser. O picătură de 5 μL din acest amestec a fost depusă pe o lamă de microscop acoperită cu folie de aluminiu, iar spectrele SERS au fost achiziționate imediat. Spectrele SERS au fost înregistrate folosind un spectrometru InVia Raman (Renishaw) echipat cu un laser cu emisie la 532 nm (~ 180 mW) cuplat la un microscop Leica vertical. Laserul de 532 nm a fost focalizat pe probă printr-un obiectiv 5X (Leica, NA = 0,12). Fiecare măsurătoare a constat într-o medie de 3 achiziții, câte 20 de secunde de integrare. Puterea laserului de pe probă a fost setată la 10% (~ 18 mW).

Analize statistice. Spectrele SERS înregistrate au fost preprocesate prin selectarea doar a regiunii spectrale între 400 și 1800 cm^{-1} pentru analize ulterioare. Etapele ulterioare de preprocesare au inclus normalizarea vectorială, scăderea liniei de bază și netezirea (Savitzky–Golay, cu fereastra setată la 5 și polinom de ordinul 2).

Analiza componentelor principale (PCA) a fost efectuată pentru a reduce dimensionalitatea setului de date și a permite vizualizarea grupării nesupravegheate a grupurilor RCC și CTRL. Pentru a selecta componentele principale relevante (PC) care au permis discriminarea între grupurile RCC și CTRL, a fost folosit testul t Student. O valoare p probabilității mai mică de 0,05 a fost considerată semnificativă. PC-urile selectate au fost apoi folosite ca intrări pentru trei algoritmi de învățare automată (random forest, kNN și Bayes naiv) care au fost antrenați pentru a discrimina între grupurile RCC și CTRL. Algoritmii de învățare automată au fost validați intern utilizând validarea încrucișată cu excludere. Analiza statistică a fost efectuată folosind software-ul Quasar-Orange, biblioteca Orange-Spectroscopy (Laboratorul de Bioinformatică al Universității din Ljubljana).

Rezultate. Spectrele SERS medii ale grupurilor RCC și CTRL, împreună cu abaterea lor standard, sunt prezentate în Figura 5.3.1.

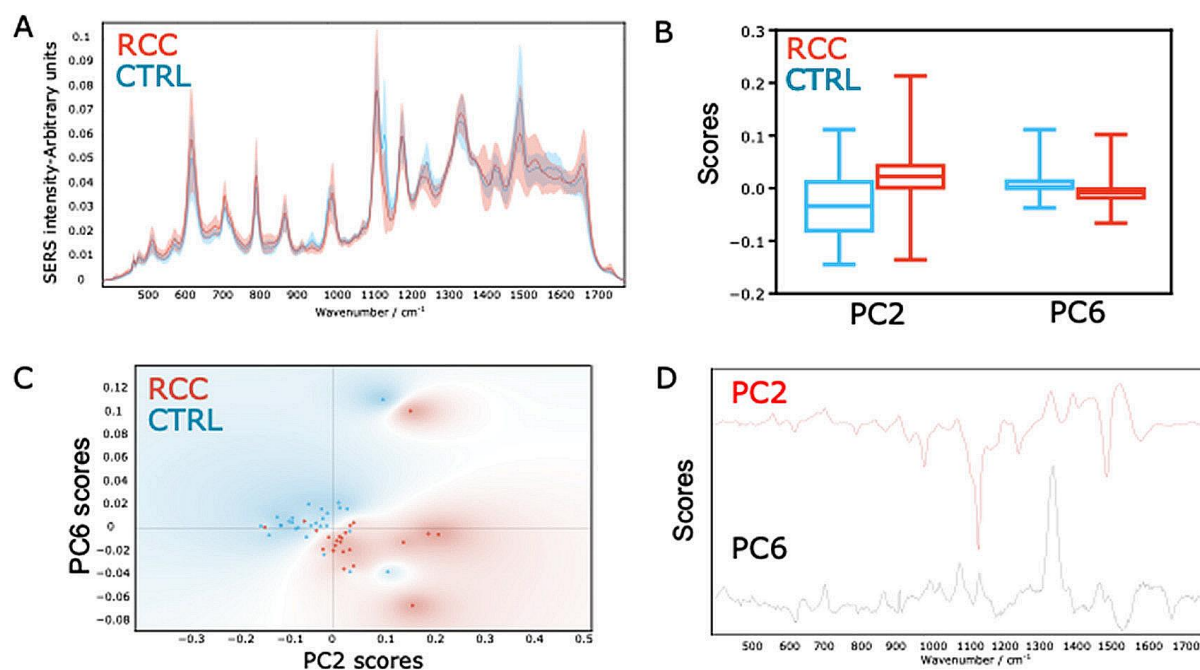


Fig. 5.3.1. (A) Spectrele medii SERS ale serului de la pacienții cu carcinom celular renal (RCC) versus control (CTRL). (B) Distribuția valorilor scorului de analiza PCA pentru componenta principală (PC) 2 și PC6 a pacienților RCC (roșu) și CTRL (albastru). (C) Graficele score plot din analiza PCA pentru PC2 și PC6 pentru pacienții cu RCC (roșu) și CTRL (albastru). (D) Graficele loading plot din analiza PCA pentru PC2 și PC6.

Primele nouă PC-uri au fost păstrate pentru analize ulterioare, acestea explicând 98% din variația din setul de date inițial. Diferențele în valorile scorului celor nouă PC-uri între grupurile RCC și CTRL au fost testate prin testul t Student. Scorurile PC2 și PC6 au arătat diferențe semnificative statistic între cele două grupuri ($p < 0,05$) (Figura 5.3.1B). Graficul score plot pentru PC2 și PC6 a arătat o tendință clară de grupare a celor două grupuri (Figura 5.3.1C). Graficele loading plot corespunzătoare PC2 și PC6 sunt prezentate în Figura 5.3.1D, evidențiind principalii contributory la gruparea spectrelor SERS. Astfel, PC2 este dominat de benzile atribuite carotenoidelor la 1155 și 1520 cm^{-1} , în timp ce PC6 este dominată de benzile atribuite metabolitelor purinici.

Pentru a testa performanța profilării SERS ca instrument de screening pentru RCC, au fost utilizați trei algoritmi de învățare automată (random forest, kNN și Bayes naiv). Cele două componente selectate anterior au fost folosite ca intrare pentru algoritmi de învățare automată, obținând o valoare AUC de 0,78 pentru algoritmul random forest, 0,78 pentru kNN și 0,76 pentru Bayes naiv (AUC medie $0,77 \pm 0,01$) Figura 5.3.2).

Discuții. Creșterea numărului anual de cazuri de CCR nou descoperite și numărul mare de stadii avansate sau metastatice la nivel local determină căutarea unor noi strategii eficiente de screening. În acest studiu, am demonstrat posibilitatea discriminării între grupurile RCC și CTRL pe baza spectrelor SERS ale serului deproteinizat. Dintr-o perspectivă clinică, profilarea bazată pe SERS ar putea fi utilizată ca strategie de screening preliminară, urmată de studii imagistice detaliate CT, RMN sau cu ultrasunete la pacienții la care profilarea SERS sugerează malignitate.

Rezultatele sugerează că abilitatea profilării SERS a serului de a discrimina pacienții cu RCC provine din faptul că aceștia prezintă niveluri mai mari de metaboliți purinici (acid uric, xantină și hipoxantină), și totodată niveluri mai scăzute de carotenoide (Figura 5.3.1).

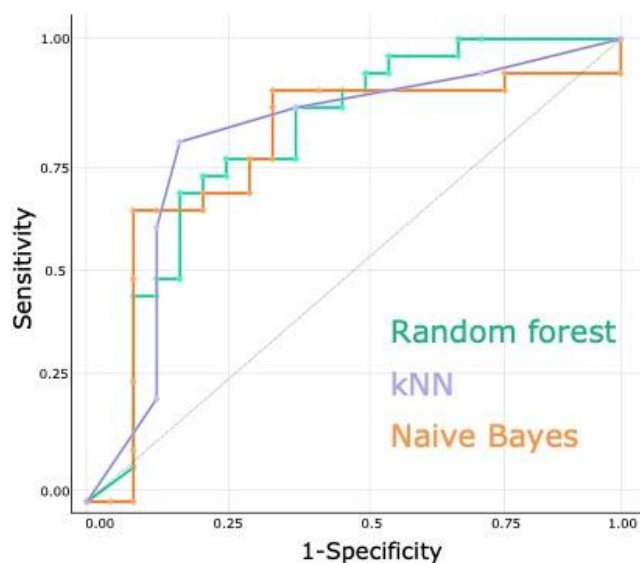


Fig. 5.3.2. Compararea curbelor ROC pentru acuratețea clasificării obținute pe baza analizei SERS a probelor de ser de la pacienți cu carcinom celular renal, și a probelor control, folosind trei algoritmi de clasificare supravegheați (random forest, kNN, Bayes naiv).

Hipoxantina, xantina și acidul uric sunt componente finale în catabolismul nucleotidelor purinice adenozină și guanozin fosfat. Studii epidemiologice extinse au arătat că nivelul inițial crescut al acidului uric seric (hiperuricemie) este asociat cu risc crescut de cancer la toate tipurile de cancer (Fini et al. 2012), și în special în RCC (Dai et al. 2020). Efectul pare să fie exercitat de suprareglarea componentelor cheie ale căilor inflamatorii cronice, cum ar fi adiponectina, proteina C-reactivă și leptina (Fini et al. 2012). Hiperuricemia este cauzată de dezechilibrul dintre producția și excreția acidului uric din cauza unei multitudini de factori genetici și de mediu, inclusiv alimentația și

consumul de alcool (Fini et al. 2012). În plus, odată ce procesul malign a început, acidul uric este eliberat continuu din celulele maligne.

Intensitatea mai mare în benzile SERS atribuite acidului uric în grupul RCC este în conformitate cu studiile noastre SERS anterioare referitoare la detecția cancerelor de sân, gastrointestinal, pulmonar, ovarian, oral și de prostată (Moisoiu et al. 2019). Pe lângă acidul uric, o intensitate mai mare a benzilor SERS atribuite hipoxantinei (725 , 1450 și 1684 cm^{-1}) și xantinei (1684 cm^{-1}) a fost observată și în cazul grupului RCC, în conformitate cu studiile anterioare referitoare la detecția cancerelor de sân, gastrointestinal, pulmonar, ovarian, oral și de prostată (Moisoiu et al. 2019).

Nivelurile crescute de hipoxantină la pacienții cu CCR au fost raportate anterior într-un studiu metabolomic realizat de Monteiro și colab. (Monteiro et al. 2016), autorii raportând, de asemenea, niveluri crescute ale acestui metabolit la pacienții în vârstă și la pacienții fumători, un efect care poate confunda hipoxantina ca marker RCC. Din punct de vedere mecanistic, creșterea nivelurilor de hipoxantină și xantină ar putea fi rezultatul scăderii asociate cancerului a xantin-oxidoreductazei (XOR), enzima care catalizează conversia xantinei și hipoxantinei în acid uric (Battelli et al. 2016). Cu toate acestea, acest mecanism nu este specific RCC.

Spre deosebire de cazul benzilor SERS atribuite metaboliților purinici, care au prezentat intensități scăzute în RCC, benzile Raman rezonante la 1155 cm^{-1} și 1520 cm^{-1} atribuite carotenoidelor au prezentat intensități mai mici (Figura 5.3.1A). Carotenoidele sunt o clasă de peste 750 de pigmenți organici naturali (Johnson 2002). Cele mai studiate carotenoide sunt beta-carotenul, licopenul, luteina și zeaxantina, care se găsesc în diferite fructe și legume. Aportul alimentar scăzut sau concentrațiile sanguine de carotenoide au fost legate de o incidență mai mare a bolilor cardiovasculare, cancerului și mortalității de orice cauză (Aune et al. 2018).

Un efect similar a fost observat și pentru RCC (Lee et al. 2009). Carotenoidele inhibă deteriorarea oxidativă a ADN-ului, mutageneza, creșterea tumorii și transformarea malignă și îmbunătățesc comunicarea celulă-celulă, protejând astfel celulele împotriva transformării maligne (Lee et al. 2009). Cu toate acestea, similar metaboliților purinici, perturbațiile carotenoidelor nu sunt specifice CR.

Analiza PCA a spectrelor SERS a identificat două componente principale (PC) care sunt semnificativ diferite între grupurile RCC și CTRL (PC2 și PC6). PC2 este dominat de benzi negative la 1155 cm^{-1} și 1520 cm^{-1} atribuite carotenoidelor, iar spectrele SERS aferente grupului RCC s-au grupat spre partea negativă a axei, în conformitate cu intensitatea mai mică a acestor benzi SERS în grupul RCC. În schimb, PC6 este dominat de benzi SERS pozitive atribuite metaboliților purinici și, așa cum era de așteptat, spectrele din grupul RCC sunt poziționate spre valori mai mari ale scorului PC6. Luate împreună, rezultatele PCA sugerează că informațiile spectrale privind metaboliții purinici și carotenoidele au fost suficiente pentru a realiza o bună separare între grupurile RCC și CTRL.

Pentru a cuantifica acuratețea clasificării generată de profilarea SERS, trei algoritmi de învățare automată au fost antrenați pentru a discrimina între grupurile RCC și CTRL, obținând o valoare AUC de 0,78 pentru algoritmul random forest, 0,78 pentru kNN și 0,76 pentru Bayes naiv (AUC medie $0,77\pm 0,01$).

Deși nu a fost raportat încă niciun studiu anterior cu privire la profilarea SERS a biofluidelor la pacienții cu RCC, există mai multe studii care utilizează spectroscopia Raman pentru analiza speciilor patologice (vezi meta-analiza de Jin și colab. (Jin et al. 2020)), precum și un studiu ce implică analiza SERS a probelor de țesut omogenizat (Johnson 2002). Profilarea SERS a probelor de țesut omogenizate a rezultat o acuratețe generală de 0,93, mai mare decât acuratețea generală de 0,77 raportată în studiul de față. Este important însă de menționat că metoda necesită mostre de țesut excizat, motiv pentru care nu poate fi implementată ca o strategie de screening, ceea ce reprezintă o limitare importantă.

Alte strategii de biopsie lichidă au fost, de asemenea, luate în considerare pentru RCC, cel mai avansat marker pentru detectarea acestuia fiind molecula de leziune renală-1 (KIM-1), care a rezultat o acuratețe de aproximativ 75% (Scelo et al. 2018). Având în vedere incidența relativ scăzută a CR, implementarea clinică a unei strategii de screening cu o asemenea acuratețe s-ar traduce în mulți subiecți sănătoși care necesită proceduri invazive pentru a exclude constatări fals pozitive. Profilul

microARN a fost, de asemenea, explorat pentru diagnosticul și screeningul RCC, cu o revizuire recentă de Sequira și colab. acuratețe de raportare variind de la 0,7 la 0,93 pentru diferite panouri miARN (Sequeira et al. 2021). Luată împreună, peisajul actual al strategiilor de biopsie lichidă pentru detectarea RCC este promițător. Cu toate acestea, există o lipsă de markeri validați în studii mari, prospective, randomizate (Ljungberg et al. 2019), subliniind necesitatea unor abordări noi.

Concluzii. În acest studiu, am demonstrat, pentru prima dată, că profilarea SERS a serului permite detectarea RCC prin captarea perturbațiilor cheie în metabolismul purinelor și carotenoidelor, obținând o precizie medie de 0,77 pe baza a trei algoritmi diferiți de învățare automată. Studiile viitoare care evaluează acuratețea profilării SERS în cohorte mari prospective cu validare externă sunt justificate pentru a valida această strategie și de a o transla în cadrul clinic actual.

5.3.2. Diagnosticul și stratificarea moleculară a cancerului de vezică urinară prin profilarea SERS a urinei combinată cu secvențiere microARN

Cancerul de vezică urinară (BC) prezintă cel mai mare cost per pacient dintre toate tipurile de cancer. Prin urmare, ne propunem să dezvoltăm un instrument non-invaziv, pentru diagnosticarea și stratificarea moleculară a pacienților cu BC pe baza profilării urinei prin spectroscopie SERS combinată cu informația livrată de secvențierea microARN (miARN).

Metodele folosite sunt: Secvențierea de generație următoare (next-generation sequencing) a întregului miRNom și profilarea SERS au fost efectuate pe probe de urină colectate de la 15 pacienți cu BC și 16 subiecți control (CTRL). O cohortă retrospectivă (BC=66 și CTRL=50) a fost analizată prin RT-qPCR pentru a confirma exprimările diferite ale miARN-urilor selectate. Precizia diagnosticului a fost evaluată folosind algoritmi de învățare automată (logistic regression, Bayes naiv și random forest), ce au fost antrenate să discrimineze între BC și CTRL, folosind ca intrare date miRNA, SERS, sau ambele. Stratificarea moleculară a BC pe baza profilării miARN și SERS a permis discriminarea între tumorile de grad înalt și de grad scăzut și între tipurile luminal și bazal.

Pe baza combinării datelor SERS cu trei miARN-uri exprimate diferențial (miR-34a-5p, miR-205-3p, miR-210-3p) s-a obținut o valoare AUC de $0,92 \pm 0,06$ în discriminarea între BC și CTRL, o precizie care a fost superioară fie miARN-urilor (AUC = $0,84 \pm 0,03$) fie datelor SERS (AUC = $0,84 \pm 0,05$) individuale. La evaluarea acurateții clasificării pentru BC luminal și bazal, combinația de miARN și profilarea SERS a avut o medie AUC de $0,95 \pm 0,03$ pentru cei trei algoritmi de învățare automată, din nou mai bună decât miRNA (AUC = $0,89 \pm 0,04$) sau SERS (AUC = $0,92 \pm 0,05$) individual, deși datele SERS individuale au prezentat rezultate mai bune în ceea ce privește precizia clasificării.

Cancerul de vezică urinară (BC) reprezintă una dintre cele mai frecvente tumori maligne, cu aproximativ 549.000 de cazuri noi și 200.000 de decese anual, 70% dintre ele fiind non-invazive musculare (NMIBC) la diagnosticul inițial (Saginala et al. 2020). BC are cel mai mare cost per pacient (Mossanen and Gore 2014), în principal pentru că diagnosticul BC, urmărirea și stratificarea riscului se bazează pe rapoarte de patologie și cistoscopii multiple, o strategie invazivă și consumatoare de resurse.

Pacienții BC prezintă de obicei simptome ale tractului urinar inferior sau hematurie, necesitând cistoscopie imediată pentru confirmarea cauzei maligne. Tumoarea vezicii urinare este apoi rezecată prin rezecție transuretrală și trimisă pentru analiza patologică, ceea ce permite stadializarea în NMIBC sau BC musculo-invaziv (MIBC).

Din păcate, puterea predictivă a clasificării histologice actuale a BC este suboptimă, nereușind să țină seama de bazele moleculare ale BC (Kardoust Parizi et al. 2021). Recent a fost propusă clasificarea moleculară a BC în două subtipuri majore cu semnificație prognostică diferită: (i) un subtip bazal cu un model de diferențiere scuamoasă și o boală mai agresivă și (ii) un subtip luminal cu un prognostic mai blând (Rodriguez Pena et al. 2019).

Cu toate acestea, similar clasificării histologice, stratificarea BC în subtipuri bazal și luminal este posibilă numai folosind secvențierea ARN sau analiza imunohistochimică a probelor de țesut obținute în timpul procedurilor endoscopice (Kouba et al. 2020). În funcție de rezultatele analizei patologice, tratamentul recomandat poate include fie cistectomia, de obicei pentru MIBC, fie rezecția transuretrală a tumorii vezicii urinare urmată de urmărire pe tot parcursul vieții prin cistoscopie, de obicei pentru NMIBC (Babjuk et al. 2019).

Pentru a depăși nevoia de proceduri endoscopice invazive și costisitoare în diagnosticul BC, urmărirea și stratificarea moleculară, s-a căutat în mod continuu dezvoltarea de instrumente de biopsie lichidă. De exemplu, microARN-urile (miARN-urile), transcripții scurte care reglează expresia genelor la nivel post-transcripțional (Dragomir, Knutsen, and Calin 2018), au fost explorate pe larg ca mijloace de a efectua biopsie lichidă (Matullo, Naccarati, and Pardini 2016). Cu toate acestea, după aproape două decenii de cercetare miRNA în oncologie, niciun instrument de diagnostic bazat pe miRNA nu a fost aprobat. Astfel, credem că trebuie dezvoltate strategii ingenioase pentru a integra miRNA-urile în practica clinică. Spectroscopia SERS a abordat recent sarcina complexă de a efectua biopsie lichidă în cancer (Guerrini and Alvarez-Puebla 2019) și reprezintă o metodă emergentă în spectroscopia clinică.

Bazându-se pe studiile anterioare care sugerează că atât miRNA, cât și profilarea SERS reprezintă strategii promițătoare independente pentru aplicarea în biopsia lichidă, în acest studiu, am evaluat pentru prima dată synergismul dintre miARN și profilarea SERS a urinei pentru diagnosticul și stratificarea moleculară a BC.

Profilare SERS. Pentru analiza SERS, 50 μL de urină au fost amestecați cu 450 μL de metanol și s-a centrifugat timp de 10 minute la 5800xg. Supernatantul a fost colectat cu grijă pentru a nu perturba peletul. Analiza SERS a fost efectuată folosind nanoparticule de argint sintetizate prin reducere cu clorhidrat de hidroxilamină (hya-AgNPs) (Leopold and Lendl 2003). Nouă μL de hya-AgNPs au fost amestecați cu 1 μL de urină centrifugată. Apoi, nanoparticulele hya-AgNP au fost activate prin adăugarea a 1 μL de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ (concentrația finală de $\text{Ca}^{2+} \cdot 10^{-3} \text{ M}$). O picătură de 5 μL din acest amestec a fost depusă pe o lamă de microscop acoperită cu folie de aluminiu, iar spectrele SERS au fost achiziționate imediat. Configurația experimentală a constat dintr-un spectrometru Raman portabil (iRaman, BW-Tek) echipat cu un laser cu emisie la 532 nm și un obiectiv 20X (NA 0,4). Spectrul de fundal a fost achiziționat ca un spectru separat și apoi a fost scăzut din spectrul SERS al probelor. Fiecare măsurătoare a constat într-o medie de 2 achiziții, câte 10 secunde fiecare, și a fost efectuată cu puterea laserului setată la 30% (~18 mW).

Spectrele SERS au fost preprocesate folosind software-ul Quasar-Orange, biblioteca Orange-Spectroscopy (Laboratorul de bioinformatică al Universității din Ljubljana) (Toplak et al. 2021). Preprocesarea aplicată spectrelor SERS din acest studiu este similară cu cea efectuată în studii anterioare, scopul final fiind acela de a translata biopsia lichidă SERS spre o metodă standardizată. În acest sens s-a păstrat regiunea spectrală între 400 și 1800 cm^{-1} ce a fost preprocesată prin normalizarea vectorială, scăderea liniei de bază și netezire (Savitzky-Golay, cu fereastra setată la 5 și ordin polinomial 2).

Pentru a explora datele și pentru a reduce dimensionalitatea, a fost efectuată analiza în componente principale (PCA). Apoi, primele 11 componente principale (PC) (care explică 98% din varianța inițială a datelor) au fost clasate pe baza diferenței de valori ale scorului dintre grupurile BC și CTRL utilizând valoarea p obținută prin testul t Student. O valoare p a probabilității mai mică de 0,05 a fost considerată semnificativă. Valorile scorurilor PC-urilor semnificative statistic au fost apoi utilizate ca intrare pentru algoritmi de clasificare supravegheați (Bayes naiv, regresie logistică și random forest).

Spectrele SERS ale grupului CTRL au prezentat benzi în regiunea 500–550 cm^{-1} și un fundal crescut în intervalul 1730–1800 cm^{-1} ; cu toate acestea, nu a fost găsită nicio atribuire pentru aceste caracteristici spectrale. Astfel, pentru clasificarea BC bazal și luminal am păstrat doar intervalul spectral 550–1730 cm^{-1} . Am testat diferența statistică a primelor 11 PC-uri (care explică 99% din varianța inițială) între grupurile bazal și luminal, PC8 fiind singura PC cu o valoare $p < 0,05$ (testul t Student).

Prin urmare, clasificatorii (Bayes naiv, regresie logistică și random forest) au fost implementați pe scorurile PC8. La compararea BC de grad înalt cu grad scăzut, niciunul dintre PC nu a atins semnificație statistică. Astfel, toate primele 11 PC-uri (care explică 99% din variația inițială) au fost utilizate pentru clasificarea BC de grad înalt și de grad scăzut.

Rezultate

Profilarea urinei miRNA și SERS combinată poate distinge cu precizie pacienții cu cancer de vezică urinară de grupul control. Profilarea miRNom a urinei bazată pe NGS a rezultat niveluri de expresie pentru 200 de miARN testabili între BC și CTRL. Trei algoritmi de învățare automată (Bayes naiv, regresie logistică și random forest) au fost rulați folosind datele de expresie NGS din cohorta prospectivă pe panoul format din miR-34a-5p, miR-205-5p și miR-210-3p, rezultând o valoare AUC de 0,87 pentru Bayes naiv, 0,84 pentru regresia logistică și 0,81 pentru random forest (AUC medie $0,84 \pm 0,03$).

În paralel, am efectuat și profilarea SERS a aceluiași probe de urină. Spectrele medii SERS ale urinei pentru grupurile BC și CTRL sunt prezentate în Figura 5.3.3.

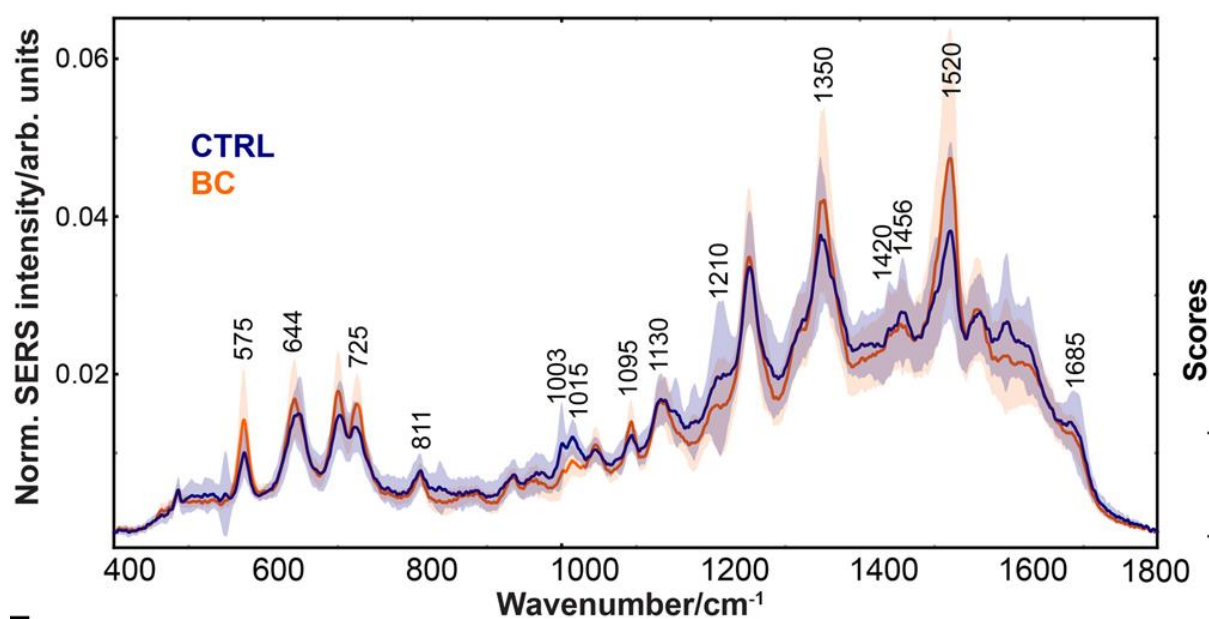


Fig. 5.3.3. Spectrele medii SERS ale urinei pentru grupurile BC și CTRL (linie) și abaterea standard.

Cele mai proeminente diferențe spectrale dintre cele două grupuri au vizat benzile SERS atribuite metaboliților purinici (în principal acid uric și hipoxantină) și creatininei. Intensități mai mari ale benzilor SERS la 644, 725, 1350 cm^{-1} (atribuite acidului uric și hipoxantinei) în probele de urină de la pacienții cu cancer, comparativ cu martorii, au fost raportate de asemenea în studii anterioare (Del Mistro et al. 2015; Iancu et al. 2022). Într-adevăr, niveluri mai mari de acid uric și hipoxantină în probele de la pacienți cu cancer, în comparație cu martorii, erau de așteptat, deoarece cancerul este asociat cu o creștere a ratei de turnover celular (El Ridi and Tallima 2017) și xantina oxidoreductaza, care convertește hipoxantina în xantină, este reglată în jos în cancer (Linder et al. 2005). Apoi, s-a fost efectuat analiza PCA pentru a reduce dimensionalitatea datelor. Primele 11 PC-uri, care au explicat 98,3% din variația inițială, au fost păstrate pentru analize ulterioare.

Din cele 11 PC-uri, 4 dintre ele (PC2, PC6, PC10 și PC11) au prezentat o diferență semnificativă statistic între grupurile BC și CTRL (Figura 5.3.4), așa cum a evidențiat selecția caracteristicii testului t. Din păcate, nu a fost disponibilă urină pentru cohorta retrospectivă pentru a valida PC-urile exprimate diferențial. Valorile scorului PC2 și PC6 au indicat o tendință clară pentru gruparea nesupravegheată a celor două grupuri (Figura 5.3.4). Apoi, cele 4 PC-uri selectate anterior care conțin diferite peak-uri SERS (Figura 5.3.4), au fost folosite ca intrare pentru algoritmi de clasificare

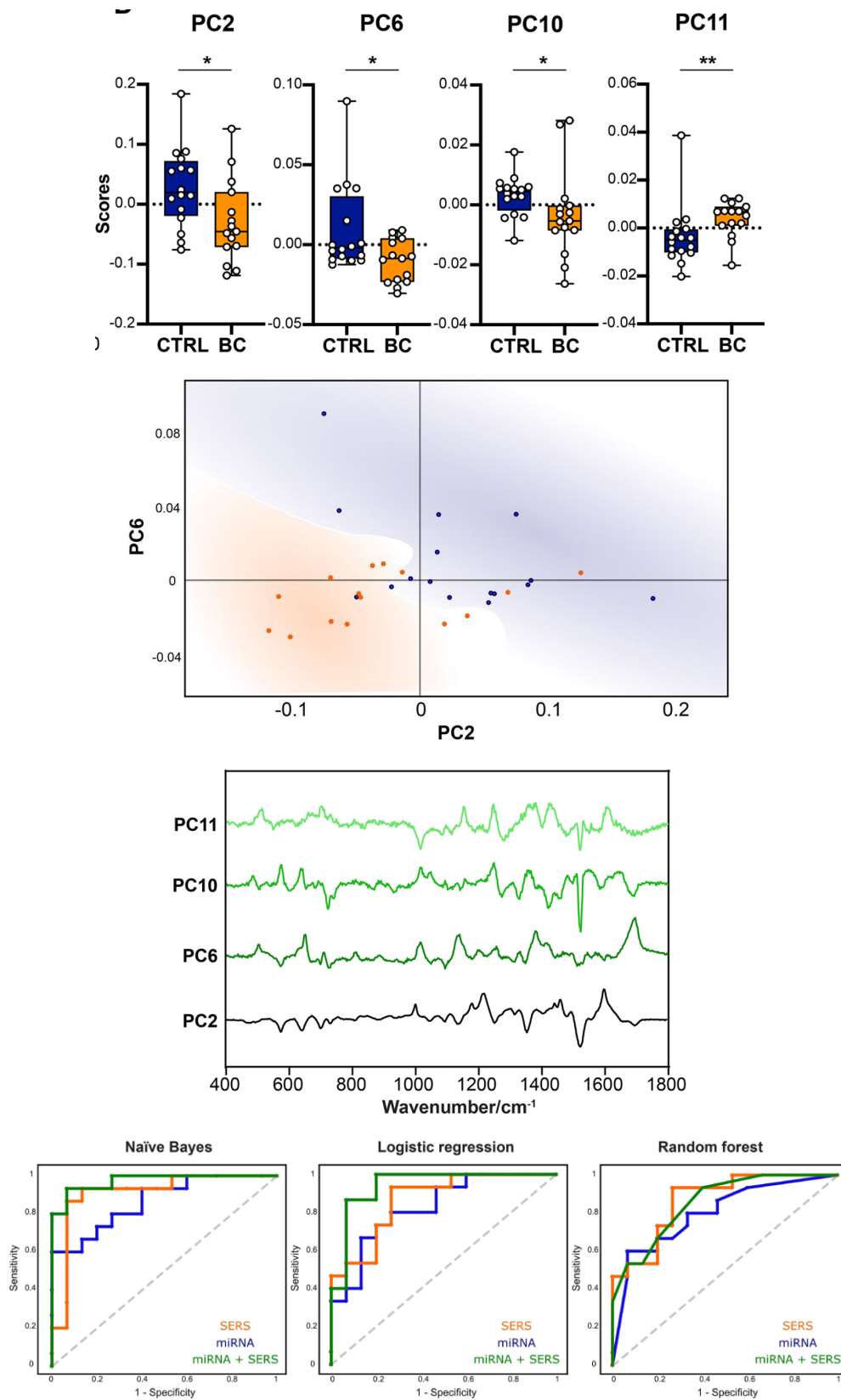


Fig. 5.3.4. De sus în jos: Distribuția valorilor scorurilor pentru componenta principală (PC) 2, 6, 10, 11 pentru BC și CTRL; Diagrama score plot PC6 și PC2 pentru pacienții BC și grupul CTRL; Peak-uri SERS ale PC2, PC6, PC10 și PC11; Compararea curbelor ROC pentru acuratețea clasificării obținută: doar miRNA, doar SERS și combinația celor două folosind trei algoritmi de clasificare supravegheați (Bayes naiv, regresie logistică și random forest). Medic±SD. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

supravegheați, obținând o valoare AUC de 0,86 pentru Bayes naiv, 0,87 pentru regresia logistică și 0,78 pentru random forest (AUC medie 0,84±0,05) (Tabel II.1).

În plus, am căutat să explorăm sinergismul dintre cele două strategii de biopsie lichidă ortogonală. Pentru aceasta, expresia NGS a celor trei miRNA-uri selectate (miR-34a-5p, miR-205-5p și miR-210-3p) a fost combinată cu cele patru PC-uri selectate anterioare, iar algoritmi de învățare automată supravegheați au rulat pe seturi ale datelor combinate. Comparațiile directe ale preciziei de clasificare obținute numai de miARN, SERS individual sau combinația celor două au arătat că acesta din urmă a obținut cele mai bune rezultate în toți cei 3 algoritmi de clasificare, obținând o medie AUC de 0,92±0,06 (AUC de 0,97, 0,94 și 0,86 pentru Bayes naiv, regresie logistică și random forest), (Figura 5.3.4 și Tabelul II.1).

Table II.1. Capacitatea de diagnosticare pentru distingerea pacienților cu cancer de vezică urinară și grupul de control cu trei algoritmi de clasificare (Bayes naiv, regresie logistică și random forest) rulată pe seturi de date constând numai din primele trei miARN-uri exprimate diferit (miR-34a-5p, miR-205-5p și miR-210-3p), datele SERS individuale sau o combinație a celor două (miARN + SERS).

Model	input	AUC	CA	F1	Precision	Recall
Logistic Regression	miRNA	0.84	0.74	0.74	0.74	0.74
	SERS	0.87	0.84	0.84	0.84	0.84
	miRNA + SERS	0.94	0.90	0.90	0.90	0.90
Naïve Bayes	miRNA	0.87	0.77	0.77	0.77	0.77
	SERS	0.86	0.84	0.84	0.84	0.84
	miRNA + SERS	0.97	0.93	0.93	0.93	0.93
Random Forest	miRNA	0.81	0.74	0.74	0.74	0.74
	SERS	0.78	0.71	0.71	0.71	0.71
	miRNA + SERS	0.86	0.74	0.74	0.74	0.74

AUC = Aria de sub curba ROC; CA = acuratețe de clasificare;

Profilarea urinei miARN și SERS combinată nu prezice gradul BC, dar se corelează cu clasificarea moleculară a BC.

În continuare, am decis să testăm capacitatea profilării miARN și SERS de a stratifica pacienții cu BC în grad înalt și scăzut. Spectrele SERS medii ale urinei pentru BC de grad înalt și scăzut sunt prezentate în Figura 5.3.5.

Rezultatele analizei PCA au arătat că niciuna dintre componentele principale nu a atins semnificație statistică între grupurile cu grad înalt și grad scăzut, și că a existat o tendință slabă pentru gruparea nesupravegheată a celor două grupuri (Figura 5.3.5). Așa cum era de așteptat, nici nivelurile de expresie miR-1246 NGS (AUC medie de 0,47) și nici profilarea SERS (AUC medie de 0,46) nu au putut prezice eficient gradul tumorii, setul de date combinat miARN și SERS prezentând o valoare AUC de 0,39 pentru algoritmul regresia logistică, 0,64 pentru Bayes naiv și 0,62 pentru random forest. Aceste date arată cât de puțin reflectă gradul tumorii fenotipul unei tumori. Astfel, am evaluat acuratețea profilării miARN și SERS a urinei în realizarea unei stratificări moleculare a pacienților.

În ceea ce privește profilarea SERS, diferența spectrală dintre subtipurile luminal și bazal a prezentat un model complex, implicând mai multe benzi SERS atribuite metabolizilor de purinici și creatininei (Figura 5.3.6).

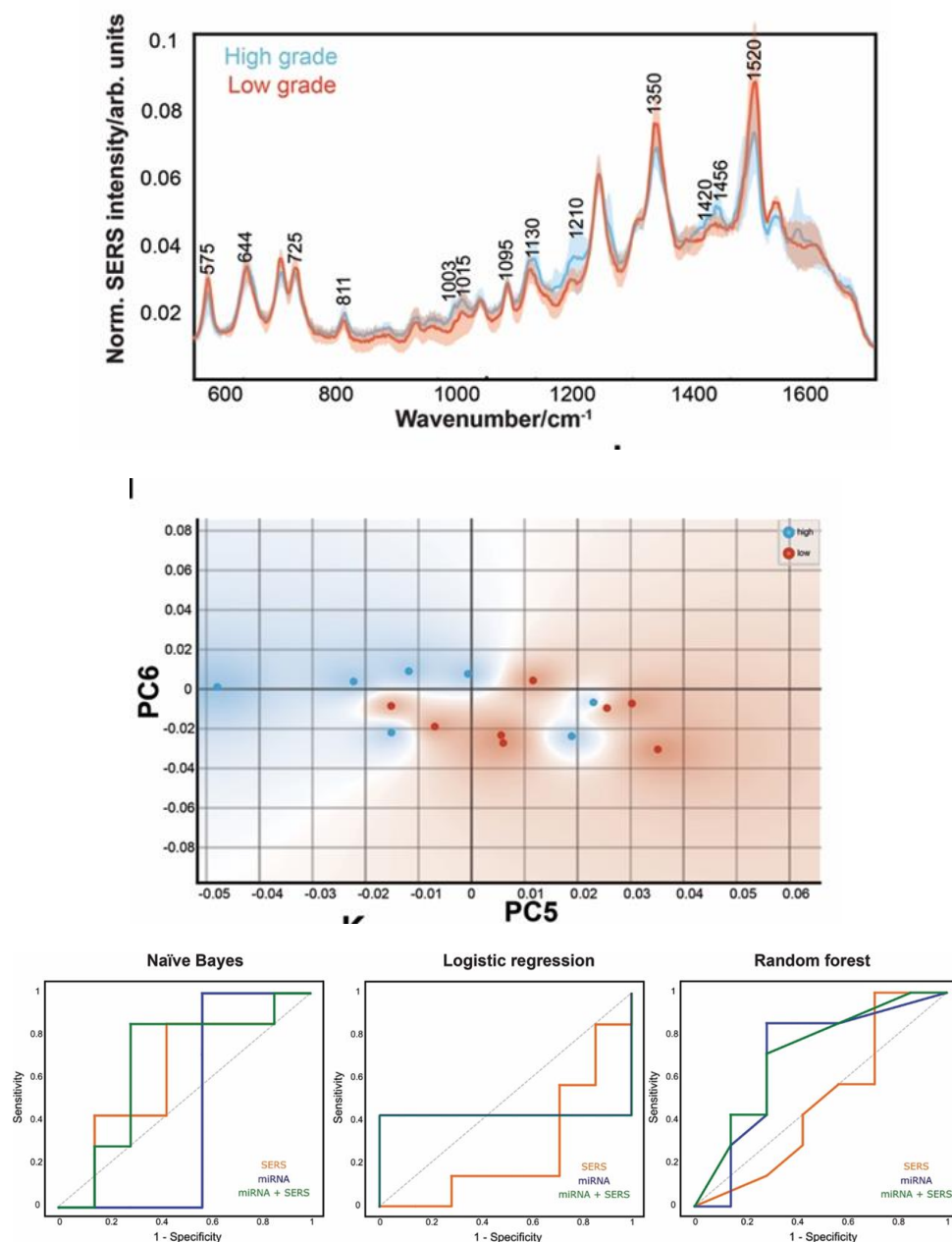


Fig. 5.3.5. De susu în jos: Spectrul mediu SERS al urinei de la pacienții cu grad scăzut comparativ cu pacienții cu grad înalt BC; Distribuția valorilor scorurilor pentru componenta principală (PC) PC5 și PC6 la pacienții cu BC de grad scăzut (roșu) față de BC de grad înalt (albastru); Curba ROC pentru clasificarea BC de grad scăzut și de grad înalt, realizată prin algoritmul Bayes naiv, rulat pe seturi de date constând numai din miARN-uri exprimate diferențial (miR-1246), numai date SERS (primele 11 PC-uri) sau o combinație a celor două. Curba ROC pentru clasificarea BC de grad scăzut și de grad înalt realizată prin algoritmul de regresie logistică rulat pe seturi de date constând numai din miARN-uri exprimate diferit (miR-1246), numai date SERS (primele 11 PC-uri) sau o combinație a celor două. Curba ROC pentru clasificarea BC de grad scăzut și de grad înalt realizată prin algoritmul random forest rulat pe seturi de date constând numai din miARN-uri exprimate diferit (miR-1246), numai date SERS (primele 11 PC-uri) sau o combinație de celor două. Media ± SD. ns = nesemnificativ, **p < 0,01.

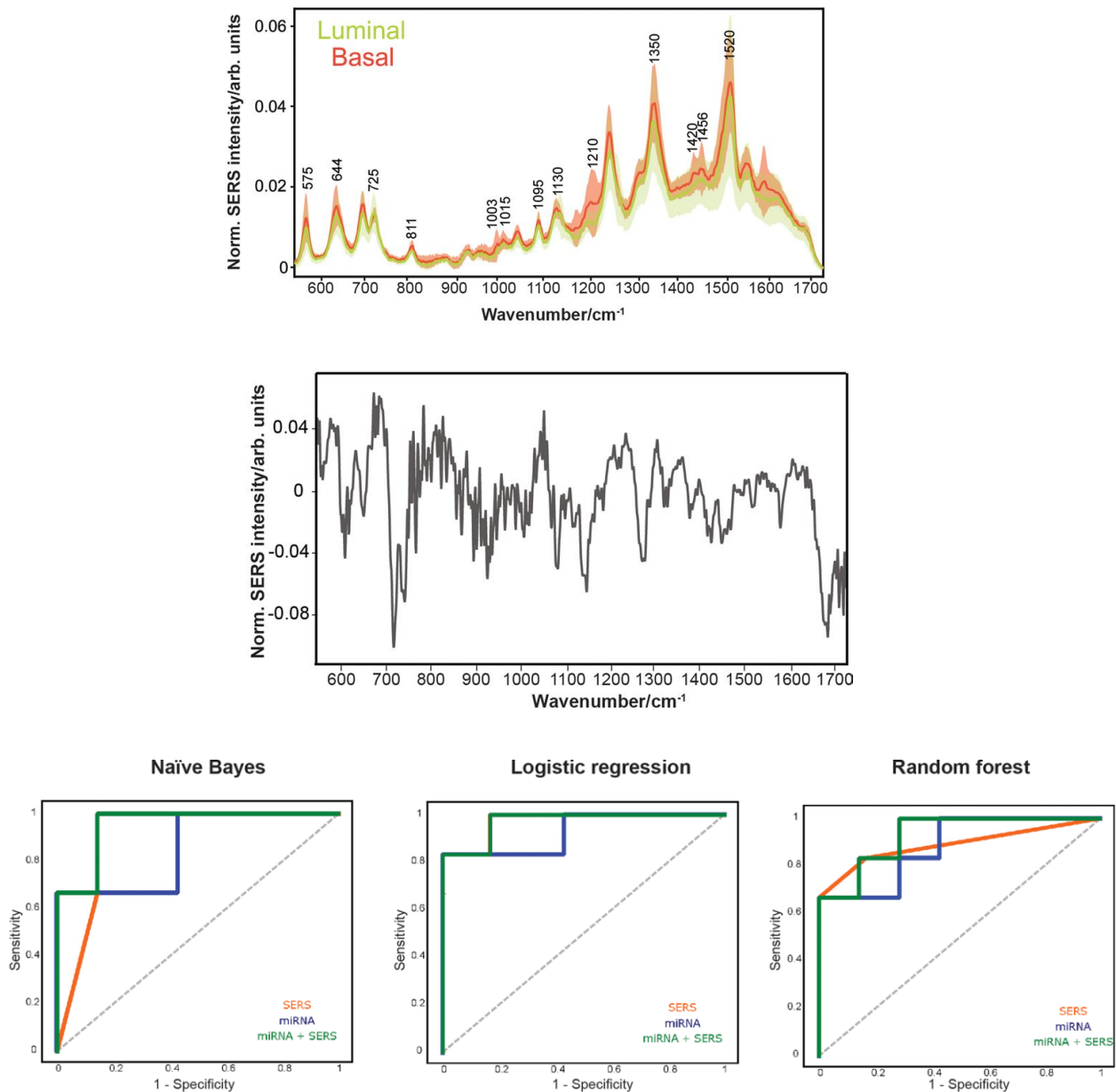


Fig. 5.3.6. De sus în jos: Spectrele SERS medii ale urinei pentru BC luminal și bazal; Graficul loadings PC8; Comparația curbelor ROC pentru acuratețea clasificării obținută doar de miARN, doar SERS sau combinația celor două folosind trei algoritmi de clasificare supravegheați (Bayees naiv, regresie logistică și random forest) pentru BC luminal și bazal. Medie±SD. ***p < 0,001

Pentru a explora datele, s-a efectuat analiza PCA, obținând o singură PC care a prezentat o diferență semnificativă statistic între subtipurile luminal și bazal (PC8) (test t Student, $p < 0,001$) (Figura 5.3.6). Graficul loadings PC8 este prezentat în Figura 5.3.6. Apoi, PC8 selectat anterior a fost folosit ca intrare pentru algoritmi de învățare automată supravegheați, rezultând o valoare AUC de 0,91, 0,98 și 0,88 pentru algoritmi Bayes naiv, regresie logistică și random forest (valoare medie $0,92 \pm 0,05$).

În cele din urmă, sinergismele între miARN și SERS au fost găsite în toți cei trei algoritmi de clasificare în ceea ce privește AUC (Figura 5.3.6). Astfel, combinația dintre miRNA și profilarea SERS a avut o medie AUC de $0,95 \pm 0,03$ pentru cei trei algoritmi de învățare automată (AUC de 0,95, 0,98 și 0,93 pentru Bayes naiv, regresie logistică și random forest), mai mult decât datele miARN individual (AUC= $0,89 \pm 0,04$) sau SERS individual (AUC= $0,92 \pm 0,05$).

De notat, în ceea ce privește acuratețea clasificării, SERS individual a avut rezultate mai bune decât miRNA individual sau miRNA și SERS combinate. Aceste date confirmă clar că o combinație a celor două metode de biopsie lichidă îmbunătățește diagnosticul și stratificarea BC.

Concluzii. În acest studiu, am demonstrat că profilarea miRNA a urinei se completează cu profilarea SERS pentru o mai bună stratificare moleculară și diagnosticare a cancerului de vezică. Considerăm că prin combinarea a două metode de biopsie lichidă poate fi dezvoltat un instrument relevant din punct de vedere clinic, care poate ajuta diagnosticul acurat al cancerului de vezică.

Referințe

- Aune, Dagfinn, NaNa Keum, Edward Giovannucci, Lars T Fadnes, Paolo Boffetta, Darren C Greenwood, Serena Tonstad, Lars J Vatten, Elio Riboli, and Teresa Norat. 2018. 'Dietary intake and blood concentrations of antioxidants and the risk of cardiovascular disease, total cancer, and all-cause mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 108: 1069-91.
- Babjuk, M., M. Burger, E. M. Compérat, P. Gontero, A. H. Mostafid, J. Palou, B. W. G. van Rhijn, M. Roupêt, S. F. Shariat, R. Sylvester, R. Zigeuner, O. Capoun, D. Cohen, J. L. D. Escrig, V. Hernández, B. Peyronnet, T. Seisen, and V. Soukup. 2019. 'European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update', *Eur Urol*, 76: 639-57.
- Battelli, Maria Giulia, Letizia Polito, Massimo Bortolotti, and Andrea Bolognesi. 2016. 'Xanthine oxidoreductase in cancer: more than a differentiation marker', *Cancer Med*, 5: 546-57
- Bortnic, R., A. Szatmari, G. Souca, R. Hirian, R. Dudric, L. Barbu-Tudoran, V. Toma, R. Stiuțiu, R. Tetean, and E. Burzo, "New Insights into the Magnetic Properties of CoFe₂O₄@SiO₂@Au Magnetoplasmonic Nanoparticles", *Nanomaterials* 12, 942 (2022)
- Burzo, E and Tetean R., "New Insights on the Spin Glass Behavior in Ferrites Nanoparticles" *Nanomaterials* 12, 1782 (2022)
- Dai, X. Y., Q. S. He, Z. Jing, and J. Q. Yuan. 2020. 'Serum uric acid levels and risk of kidney cancer incidence and mortality: A prospective cohort study', *Cancer Med*, 9: 5655-61.
- Del Mistro, G., S. Cervo, E. Mansutti, R. Spizzo, A. Colombatti, P. Belmonte, R. Zucconelli, A. Steffan, V. Sergio, and A. Bonifacio. 2015. 'Surface-enhanced Raman spectroscopy of urine for prostate cancer detection: a preliminary study', *Anal Bioanal Chem*, 407: 3271-5.
- Dragomir, M. P., E. Knutsen, and G. A. Calin. 2018. 'SnapShot: Unconventional miRNA Functions', *Cell*, 174: 1038-38.e1.
- El Ridi, R., and H. Tallima. 2017. 'Physiological functions and pathogenic potential of uric acid: A review', *J Adv Res*, 8: 487-93.
- Fini, M. A., A. Elias, R. J. Johnson, and R. M. Wright. 2012. 'Contribution of uric acid to cancer risk, recurrence, and mortality', *Clin Transl Med*, 1: 16.
- Guerrini, Luca, and Ramon A. Alvarez-Puebla. 2019. 'Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in Cancer Diagnosis, Prognosis and Monitoring', *Cancers*, 11: 748.
- Iancu, Stefania D., Ramona G. Cozan, Andrei Stefancu, Maria David, Tudor Moisoiu, Cristiana Moroz-Dubenco, Adel Bajcsi, Camelia Chira, Anca Andreica, Loredana F. Leopold, Daniela Eniu, Adelina Staicu, Iulian Goidescu, Carmen Socaciu, Dan T. Eniu, Laura Diosan, and Nicolae Leopold. 2022. 'SERS liquid biopsy in breast cancer. What can we learn from SERS on serum and urine?', *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 273: 120992.
- Jin, H., X. He, H. Zhou, M. Zhang, Q. Tang, L. Lin, J. Hao, and R. Zeng. 2020. 'Efficacy of raman spectroscopy in the diagnosis of kidney cancer: A systematic review and meta-analysis', *Medicine (Baltimore)*, 99: e20933.
- Johnson, E. J. 2002. 'The role of carotenoids in human health', *Nutr Clin Care*, 5: 56-65.

- Kardoust Parizi, M., V. Margulis, E. Compe Rat, and S. F. Shariat. 2021. 'The value and limitations of urothelial bladder carcinoma molecular classifications to predict oncological outcomes and cancer treatment response: A systematic review and meta-analysis', *Urol Oncol*, 39: 15-33.
- Kouba, E., A. Lopez-Beltran, R. Montironi, F. Massari, K. Huang, M. Santoni, M. Chovanec, M. Cheng, M. Scarpelli, J. Zhang, A. Cimadamore, and L. Cheng. 2020. 'Liquid biopsy in the clinical management of bladder cancer: current status and future developments', *Expert Rev Mol Diagn*, 20: 255-64.
- Lee, J. E., S. Männistö, D. Spiegelman, D. J. Hunter, L. Bernstein, P. A. van den Brandt, J. E. Buring, E. Cho, D. R. English, A. Flood, J. L. Freudenheim, G. G. Giles, E. Giovannucci, N. Håkansson, P. L. Horn-Ross, E. J. Jacobs, M. F. Leitzmann, J. R. Marshall, M. L. McCullough, A. B. Miller, T. E. Rohan, J. A. Ross, A. Schatzkin, L. J. Schouten, J. Virtamo, A. Wolk, S. M. Zhang, and S. A. Smith-Warner. 2009. 'Intakes of fruit, vegetables, and carotenoids and renal cell cancer risk: a pooled analysis of 13 prospective studies', *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18: 1730-9.
- Leopold, Nicolae, and Bernhard Lendl. 2003. 'A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride', *The Journal of Physical Chemistry B*, 107: 5723-27.
- Linder, N., J. Lundin, J. Isola, M. Lundin, K. O. Raivio, and H. Joensuu. 2005. 'Down-regulated xanthine oxidoreductase is a feature of aggressive breast cancer', *Clin Cancer Res*, 11: 4372-81.
- Ljungberg, B., L. Albiges, Y. Abu-Ghanem, K. Bensalah, S. Dabestani, S. Fernández-Pello, R. H. Giles, F. Hofmann, M. Hora, M. A. Kuczyk, T. Kuusk, T. B. Lam, L. Marconi, A. S. Merseburger, T. Powles, M. Staehler, R. Tahbaz, A. Volpe, and A. Bex. 2019. 'European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2019 Update', *Eur Urol*, 75: 799-810.
- Matullo, G., A. Naccarati, and B. Pardini. 2016. 'MicroRNA expression profiling in bladder cancer: the challenge of next-generation sequencing in tissues and biofluids', *Int J Cancer*, 138: 2334-45.
- Moisoiu, V., A. Stefancu, D. Gulei, R. Boitor, L. Magdo, L. Raduly, S. Pasca, P. Kubelac, N. Mehterov, V. Chiş, M. Simon, M. Muresan, A. I. Irimie, M. Baciut, R. Stiufiuc, I. E. Pavel, P. Achimas-Cadariu, C. Ionescu, V. Lazar, V. Sarafian, I. Notingher, N. Leopold, and I. Berindan-Neagoe. 2019. 'SERS-based differential diagnosis between multiple solid malignancies: breast, colorectal, lung, ovarian and oral cancer', *Int J Nanomedicine*, 14: 6165-78.
- Monteiro, Márcia S., António S. Barros, Joana Pinto, Márcia Carvalho, Ana S. Pires-Luís, Rui Henrique, Carmen Jerónimo, Maria de Lourdes Bastos, Ana M. Gil, and Paula Guedes de Pinho. 2016. 'Nuclear Magnetic Resonance metabolomics reveals an excretory metabolic signature of renal cell carcinoma', *Scientific Reports*, 6: 37275.
- Mossanen, M., and J. L. Gore. 2014. 'The burden of bladder cancer care: direct and indirect costs', *Curr Opin Urol*, 24: 487-91.
- Rodriguez Pena, M. D. C., A. Chaux, M. L. Eich, A. C. Tregnago, D. Taheri, W. Borhan, R. Sharma, M. K. Rezaei, and G. J. Netto. 2019. 'Immunohistochemical assessment of basal and luminal markers in non-muscle invasive urothelial carcinoma of bladder', *Virchows Arch*, 475: 349-56.
- Saginala, Kalyan, Adam Barsouk, John Sukumar Aluru, Prashanth Rawla, Sandeep Anand Padala, and Alexander Barsouk. 2020. 'Epidemiology of Bladder Cancer', *Medical Sciences*, 8: 15.
- Scelo, G., D. C. Muller, E. Riboli, M. Johansson, A. J. Cross, P. Vineis, K. K. Tsilidis, P. Brennan, H. Boeing, P. H. M. Peeters, R. C. H. Vermeulen, K. Overvad, H. B. Bueno-de-Mesquita, G. Severi, V. Perduca, M. Kvaskoff, A. Trichopoulou, C. La Vecchia, A. Karakatsani, D. Palli, S. Sieri, S. Panico, E. Weiderpass, T. M. Sandanger, T. H. Nøst, A. Agudo, J. R. Quirós, M. Rodríguez-Barranco, M. D. Chirlaque, T. J. Key, P. Khanna, J. V. Bonventre, V. S. Sabbisetti, and R. S. Bhatt. 2018. 'KIM-1 as a Blood-Based Marker for Early Detection of Kidney Cancer: A Prospective Nested Case-Control Study', *Clin Cancer Res*, 24: 5594-601.

- Sequeira, José Pedro, Vera Constâncio, João Lobo, Rui Henrique, and Carmen Jerónimo. 2021. 'Unveiling the World of Circulating and Exosomal microRNAs in Renal Cell Carcinoma', *Cancers*, 13: 5252.
- Toplak, Marko, Stuart T. Read, Christophe Sandt, and Ferenc Borondics. 2021. 'Quasar: Easy Machine Learning for Biospectroscopy', *Cells*, 10: 2300.

Act. 5.4 Elaborarea instrucțiunilor de utilizare a metodei de detecție în practica clinică

Am prezentat în detaliu metodele folosite pentru validarea conceptului de detecție în practica clinică a diferitelor forme de cancer folosind spectroscopia SERS. În vederea utilizării acestei metode de detecție în practica clinică trebuie parcurs următoarele etape:

- 1) Prelevare probelor de sânge (între 5 și 10mL) folosind vacutainere adecvate pentru tipul de biofluid dorit (ser și/sau plasmă)
- 2) Sinteza nanoparticulelor magnetoplasmonice folosind metodele descrise în cadrul proiectului
- 3) Optimizare concentrațiilor soluțiilor coloidale în intervalul dorit
- 4) Biofuncționalizarea nanoparticulelor cu aptamerii doriți folosind metodele descrise în cadrul proiectului
- 5) Separarea exozomilor din probele de sânge
- 6) Incubarea soluțiilor coloidale care conțin nanoparticule magnetoplasmonice biofuncționalizate cu soluțiile care conțin exozomi obținuți din probele sangvine
- 7) Separarea magnetică a nanohibrizilor
- 8) Depunerea nanohibrizilor pe substrat solide în vederea analizei Raman amplificate de suprafață
- 9) Analiza SERS a nanohibrizilor folosind diferite radiații laser excitatoare (532, 633, 785 nm)
- 10) Prelucrarea datelor spectrale obținute
- 11) Analiza nesupervizată de tip PCA (Principal Component Analysis) a datelor spectrale obținute
- 12) Analiza multivariată supervizată a datelor spectrale
- 13) Determinarea specificității, sensibilității și preciziei metodei de detecție
- 14) Stabilirea diagnosticului final

Act. 5.5 Activități de informare și reclamă.

Rezultatele științifice obținute în cadrul proiectului, în anul 2022 au fost publicate în 9 lucrări apărute în reviste internaționale cu factor de impact ridicat. Toate publicațiile menționează proiectul în cadrul căruia au fost realizate cercetările.

1. **R. Bortnic, A. Szatmari, G. Souca, R. Hirian, R. Dudric, L. Barbu-Tudoran, V. Toma, R. Stiufiuc, R. Tetean, and E. Burzo**, "New Insights into the Magnetic Properties of $CoFe_2O_4@SiO_2@Au$ Magnetoplasmonic Nanoparticles", *Nanomaterials* 12, 942 (2022) **Q1, IF=5.076**
2. **E. Burzo and R. Tetean**, "New Insights on the Spin Glass Behavior in Ferrites Nanoparticles" *Nanomaterials* 12, 1782 (2022) **Q1, IF=5.076**
3. A. Stefancu, L. Nan, L. Zhu, **V. Chiș, I. Bald, M. Liu, N. Leopold, S.A. Maier, E. Cortes**, *Controlling Plasmonic Chemistry Pathways through Specific Ion Effects*", *Advanced Optical Materials*, 2200397 (2022), **Q1, IF 9.926**

4. A. Stefancu, O.M. Biro, O. Todor-Boer, I. Botiz, E. Cortes, **N. Leopold**, *Halide-Metal Complexes at Plasmonic Interfaces Create New Decay Pathways for Plasmons and Excited Molecules*. ACS Photonics, 9 (3), 895-904 (2022), **Q1, IF 7.52**
5. T. Moisoiu, M. P. Dragomir, S.D. Iancu, S. Schallenberg, G. Birolo, G. Ferrero, D. Burghilea, A. Stefancu, R.G. Cozan, E. Licarete, A. Allione, G. Matullo, G. Iacob, Z. Balint, R.I. Badea, A. Naccarati, D. Horst, B. Pardini, **N. Leopold**, F. Elec, *Combined miRNA and SERS urine liquid biopsy for the point-of-care diagnosis and molecular stratification of bladder cancer*. Molecular Medicine, 28,1 (2022), **Q1, IF 6.354**
6. T. Moisoiu, S.D. Iancu, D. Burghilea, M.P. Dragomir, G. Iacob, A. Stefancu, R.G. Cozan, O. Antal, Z. Balint, V. Muntean, R.I. Badea, E. Licarete, **N. Leopold**, F.I. Elec, *SERS Liquid Biopsy Profiling of Serum for the Diagnosis of Kidney Cancer*. Biomedicines, 10, 233 (2022), **Q1, IF 6.081**
7. A. Stefancu, V. Moisoiu, M. Desmirean, S.D. Iancu, A.B.Tigu, B. Petrushev, A. Jurj, R.G.Cozan, L. Budisan, B. Fetica, A. Roman, G. Dobie, C. Turcas, M. Zdrenghia, P. Teodorescu, S. Pasca, D. Piciu, **D. Dima**, Z. Balint, **N. Leopold**, **C. Tomuleasa**, *SERS-based DNA methylation profiling allows the differential diagnosis of malignant lymphadenopathy*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 264, 120216 (2022), **Q1, IF 4.098**
8. T. Dipponga, M. D. Lazar, **I. G. Deac**, P. Palade, I. Petean, G. Borodi, O. Cadar, *The effect of cation distribution and heat treatment temperature on the structural, surface, morphological and magnetic properties of $MnxCo1-xFe2O4@SiO2$ nanocomposites*, Journal of Alloys and Compounds, 895 16715 (2022) **Q1, IF 5.316**

Act. 5.6 Activități pentru obținerea, validarea și protejarea drepturilor de proprietate intelectuală și industrială.

Drepturile de proprietate intelectuală, pentru lucrările publicate, sunt asigurate prin legislațiile internaționale. Astfel este interzis a prelua figuri sau date din lucrările publicate, chiar dacă acestea sunt modificate, fără acceptul autorilor.

Act. 5.7 Diseminarea & alte activități privind vizibilitatea

Vizibilitatea rezultatelor științifice obținute este asigurată prin accesul la revistele în care au fost publicate, majoritatea articolelor fiind cu acces liber. În aceste reviste se publică lucrări care contin rezultate valoroase, gradul de acceptare a manuscriselor trimise spre publicare pentru revistele din grupa Q1, situându-se între 10-20 %. Originalitatea rezultatelor științifice este oglindită prin numărul mare de citari ale lucrărilor elaborate în cadrul contractului. Astfel, în primele 5 luni ale anului 2022 acestea au fost menționate în literatura de specialitate de peste 100 ori. Rezultatele cercetărilor științifice totodată au fost prezentate la 2 Conferințe internaționale:

1. **R. Bortnic, A. Szatmari, G. Souca, R. Dudric, R. Stiuftuc, A. Moldovan, R. Hirian, I. Deac, E. Burzo, R. Tetean**, *Structural and Magnetic Properties of Core-Shell Magnetoplasmonic Nanoparticles*, 16th International Conference of nanostructured Materials, NANO2022, Sevilla, June 4-10, 2022, Spania, oral presentation

2. **I. Deac**, T. Dippong, **R. Tetean**, *Magnetic properties of (Mn(Ni;Co))Fe₂O₄ nanoparticles embedded in SiO₂ matrix* 16th International Conference of nanostructured Materials, NANO2022, Sevilla, June 4-10, 2022, Spain, oral presentation.
3. **R. Stiuftuc**, **V. Toma**, A. Onaciu Ghent, C. Moldovan, **R. Tetean**, **G. Stiuftuc**, **V. Chis**, *Exploring the nanoscale interactions responsible for chiral separation of pharmaceutical compounds by means of SERS and quantum chemistry calculations*, matrix 16th International Conference of nanostructured Materials, NANO2022, Sevilla, June 4-10, 2022, Spain, oral presentation.
4. **G. Stiuftuc**, **V. Toma**, A. Onaciu, C. Moldovan, R. Marginean, **R. Stiuftuc**, *A new type of solid plasmonic substrates based on TFF filtered silver nanoparticles for biomedical applications: from early cancer detection to chiral separation*, 16th International Conference of nanostructured Materials, NANO2022, Sevilla, June 4-10, 2022, Spain, poster presentation
5. **N. Leopold**, S. Iancu, R. Cozan, *SERS liquid biopsy: an emerging tool for medical diagnosis*, 12th International Conference on clinical Spectroscopy, Dublin June 19-23, 2022, oral presentation.