



UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI
FACULTATEA DE FIZICĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE FIZICĂ



Biopsia lichidă SERS pentru aplicații clinice

Rezumatul tezei de doctorat

Doctorand:

Ramona-Gabriela COZAN

Conducător de doctorat:

Prof. dr. Nicolae LEOPOLD

Cluj-Napoca

2026

Content

LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI A CONFERINȚELOR.....	iii
INTRODUCERE	6
1. SPECTROSCOPIA RAMAN CU AMPLIFICARE DE SUPRAFAȚĂ (SERS).....	7
2. SERS ÎN MEDICINĂ.....	9
3. MATERIALE ȘI METODE.....	12
4. RESULTATE ȘI DISCUȚII.....	14
4.1 Optimizarea metodologiei SERS pentru detecția precoce a cancerului de sân pe baza analizei urinei	14
4.2 Detectarea și evaluarea răspunsului terapeutic în cancerul colorectal.....	17
4.3 Caracterizarea SERS a lichidului pleural	22
5. FINAL CONCLUSIONS	26
BIBLIOGRAPHY	28

LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI A CONFERINȚELOR

Publicații în domeniul tezei

1. S. D. Iancu, **R. G. Cozan**, O. M. Biro, V. Moisoiu and N. Leopold, “Label-free SERS liquid biopsy for medical diagnostics” in *Vibrational Biospectroscopy*, Bayden Wood & Max Diem Eds., Wiley (accepted).
2. D. Andras, **R. G. Cozan**, D. E. Muresan, V. Moisoiu, G. Crisan, V. Bintintan, G. C. Dindelegan, N. Leopold, and S. D. Iancu, “Advancing breast cancer diagnosis: Optimization of Raman spectroscopy for urine-based early detection”, *Biomedicines*, vol. 13, no. 2, p. 505, 2025, doi: 10.3390/biomedicines13020505. (Q2, IF: 3.9, AIS: 0.89)
3. D. Andras, S. D. Iancu, **R. G. Cozan**, M. Zetes, G. Crisan, C. F. Buldus, I. Andras, V. Bintintan, G. C. Dindelegan, and N. Leopold, “SERS liquid biopsy in colorectal cancer detection and treatment response: Revealing metabolic memory post-radiochemotherapy”, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 68, p. 102840, 2025, doi: 10.1016/j.nano.2025.102840. (Q2, IF: 4.6, AIS: 0.776)
4. **R. G. Cozan**, S. Pop, L. M. Crețu, M. Mocan, D. Andraș, D. A. Maniu, I. Mandruțiu, Z. Barabas-Cuzmici, L. Szabó, S. D. Iancu, and N. Leopold, “Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) metabolite profiling of pleural fluid”, *Appl. Phys. Lett.*, vol. 127, no. 25, p. 253703, Dec. 2025, doi: 10.1063/5.0300864 (IF: 3.6, AIS: 0.773).
5. S. D. Iancu, **R. G. Cozan**, A. Ștefancu, M. David, T. Moisoiu, C. Moroz-Dubenco, A. Bajcsi, C. Chira, A. Andreica, L. F. Leopold, D. Eniu, A. Staicu, I. Goidescu, C. Socaciu, D. T. Eniu, L. Diosan, and N. Leopold, “SERS liquid biopsy in breast cancer: What can we learn from SERS on serum and urine?” *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 273, p. 120992, 2022, doi: 10.1016/j.saa.2022.120992. (Q1, IF: 4.6, AIS: 0.551)

Alte publicații

1. A. Ștefancu, V. Moisoiu, M. Desmirean, S. D. Iancu, A. B. Țigu, B. Petrushev, A. Jurj, **R. G. Cozan**, L. Budișan, B. Fetica, A. Roman, G. Dobie, C. Turcaș, M. Zdrenghea, P. Teodorescu, S. Pașca, D. Piciu, D. Dima, Z. Bálint, N. Leopold, and C. Tomuleasa, “SERS-based DNA methylation profiling allows the differential diagnosis of malignant lymphadenopathy”, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 264, p. 120216, 2022, doi: 10.1016/j.saa.2021.120216. (Q1, IF: 4.6, AIS: 0.551)
2. T. Moisoiu, S. D. Iancu, D. Burghelea, M. P. Dragomir, G. Iacob, A. Ștefancu, **R. G. Cozan**, O. Antal, Z. Bálint, V. Muntean, R. I. Badea, E. Licărețe, N. Leopold, and F. I. Elec, “SERS liquid biopsy profiling of serum for the diagnosis of kidney cancer”, *Biomedicines*, vol. 10, no. 2, p. 233, 2022, doi: 10.3390/biomedicines10020233. (Q2, IF: 3.9, AIS: 0.89)
3. T. Moisoiu, M. P. Dragomir, S. D. Iancu, S. Schallenberg, G. Birolo, G. Ferrero, D. Burghelea, A. Ștefancu, **R. G. Cozan**, E. Licărețe, A. Allione, G. Matullo, G. Iacob, Z. Bálint, R. I. Badea, A. Naccarati, D. Horst, B. Pardini, N. Leopold, and F. Elec, “Combined miRNA and SERS urine liquid biopsy for the point-of-care diagnosis and molecular stratification of bladder cancer”, *Mol. Med.*, vol. 28, 2022, doi: 10.1186/s10020-022-00462-z. (Q1, IF: 6.4, AIS: 1.346)

Conferințe

1. **R. G. Cozan**, S. D. Iancu, V. Moisoiu, T. Moisoiu and N. Leopold, “Experimental parameters optimization for reliable urine SERS analysis” in *The 13th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS 13)*, Xiamen, China, Nov. 30-Dec. 05 2025 – poster presentation and flash talk

2. **R. G. Cozan**, S. D. Iancu and N. Leopold, “Refining the SERS Protocol for Urine Analysis in Cancer Diagnostics” in *Women in Photonics*, Jena, Germany, June 1-5, 2025 – oral presentation
3. **R. G. Cozan**, S. D. Iancu and N. Leopold, “SERS liquid biopsy of serum and urine for breast cancer detection” in *The 13th International Conference on Clinical Spectroscopy*, Ioannina, Greece, June 2-4, 2024 – poster presentation
4. **R. G. Cozan**, S. D. Iancu, A. Ștefancu, C. Moroz-Dubenco, A. Bajcsi, C. Chira, L. Diosan, and N. Leopold, “SERS liquid biopsy in breast cancer: What can we learn from SERS on serum and urine?” in *The 17th National Conference of Biophysics (CNB)*, Târgu Mureș, Romania, September 23-25, 2022 – poster presentation
5. **R. G. Cozan**, S. D. Iancu, A. Ștefancu, C. Moroz-Dubenco, A. Bajcsi, C. Chira, A. Andreica, L. Diosan, and N. Leopold, “SERS assessment of metabolic variation in serum and urine of breast cancer patients” in *Metabolomics 2022*, Valencia, Spain, June 19-23, 2022 – poster presentation

Școli de vară și alte activități

1. EUTOPIA HEALTH Hackathon (September 15-17, 2025, Ljubljana, Slovenia)
2. EUTOPIA Doctoral Summer School 2025 (July 8-22, 2025, Lisbon, Portugal)
3. CLIRSPEC Summer School 2023 (July 17-21, 2023, Windermere, United Kingdom)
4. The International Science and Technology Week (July, 3-7, 2023, Zaragoza, Spain)

INTRODUCERE

Medicina modernă se concentrează din ce în ce mai mult pe dezvoltarea unor metode de diagnostic precoce, precise și minim invazive. Tehnicile tradiționale de diagnostic, precum biopsiile de țesut și metodele imagistice, rămân utilizate pe scară largă, însă sunt adesea invazive și prezintă limitări în ceea ce privește surprinnderea modificărilor moleculare dinamice. În consecință, abordările bazate pe biopsia lichidă, care utilizează biofluide ușor accesibile, precum sângele sau urina, au câștigat un interes deosebit în ultimii ani.

Una dintre tehnicile utilizate în biopsia lichidă este spectroscopia Raman cu amplificare de suprafață (Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS), care oferă o sensibilitate moleculară ridicată și poate fi aplicată cu eficiență în analiza probelor biologice [1-6]. SERS detectează amprentele vibraționale moleculare prin interacțiunea dintre molecule și nanostructurile plasmonice, permițând analiza biofluidelor cu o sensibilitate foarte ridicată. În cazul SERS label-free (fără markeri), spectrele obținute reflectă însă comportamentul combinat de adsorbție al mai multor biomolecule, și nu semnătura unor biomarkeri individuali. Metaboliții purinici, precum acidul uric, hipoxantina și xantina, domină profilurile SERS și pot fi asociați cu diverse afecțiuni, inclusiv cancerul, bolile inflamatorii și afecțiunile cardiovasculare [1-6].

În pofida potențialului său, implementarea clinică a tehnicii SERS este încă limitată de variabilitatea experimentală, lipsa standardizării și dificultățile asociate interpretării spectrelor biologice complexe. Depășirea acestor limitări necesită optimizarea protocoalelor experimentale, utilizarea unor metode avansate de analiză a datelor și validarea rezultatelor în cadrul unor studii desfășurate în multiple contexte clinice.

În acest context, prezenta teză de doctorat se situează la intersecția dintre dezvoltarea metodologică fundamentală a tehnicii SERS și aplicațiile sale clinice. Prin combinarea

unui design experimental riguros, a instrumentației Raman portabile și a metodelor de analiză multivariată a datelor, obiectivul principal al acestei teze este evaluarea și dezvoltarea label-free SERS ca metodă analitică neinvazivă pentru aplicații de biopsie lichidă în domeniul clinic.

1. SPECTROSCOPIA RAMAN CU AMPLIFICARE DE SUPRAFAȚĂ (SERS)

Capitolul 1 prezintă fundamentele teoretice ale spectroscopiei Raman și ale spectroscopiei Raman cu amplificare de suprafață (SERS). Spectroscopia Raman este o tehnică spectroscopică vibrațională bazată pe împrăștierea inelastică a luminii de către molecule, care furnizează informații moleculare cu o pregătire minimă a probelor. Efectul Raman apare ca urmare a modificării polarizabilității moleculare în timpul vibrațiilor și include procesele de împrăștiere Rayleigh, Stokes și anti-Stokes [7, 8].

Cu toate acestea, întrucât doar o proporție redusă a fotonilor este împrăștiată Raman, sensibilitatea spectroscopiei Raman convenționale este limitată [9]. Prin urmare, sunt necesare strategii de amplificare a semnalului pentru creșterea sensibilității de detecție.

În acest scop, s-a dezvoltat spectroscopia SERS, una dintre cele mai eficiente tehnici de amplificare a semnalului Raman, cu un factor de amplificare de până la 10^{14} și permițând detecția la nivel de moleculă unică [1-6]. Fenomenul SERS a fost observat pentru prima dată de Fleischmann *et al.* în anul 1974, utilizând piridină adsorbită pe electrozi ruгоși din argint [10]. Ulterior, mecanismul de amplificare a fost confirmat independent de Jeanmaire și Van Duyne [11] precum și de Creighton *et al.* [12]. De atunci, SERS a devenit un domeniu de cercetare de interes major, amplificarea semnalului fiind atribuită, în general, acțiunii complementare a două mecanisme principale: amplificarea electromagnetică și amplificarea chimică [13].

Mecanismul de amplificare electromagnetică are la bază rezonanțele plasmonice de suprafață localizate, generate pe nanostructuri metalice, de regulă nanoparticule din metale nobile [14, 15]. Atunci când lumina incidentă interacționează cu electronii cvasi-liberi de la suprafața metalului, sunt induse oscilații colective ale acestora, care conduc la apariția unor câmpuri electromagnetice locale puternic amplificate în vecinătatea suprafeței nanoparticulei. Intensitatea acestor câmpuri depinde de dimensiunea nanoparticulelor, de proprietățile dielectrice ale materialului și de distanța dintre moleculă și suprafața metalică [16]. Moleculele aflate în imediata apropiere a nanostructurii sunt supuse acestui câmp electromagnetic intensificat, ceea ce determină o creștere semnificativă a intensității semnalului Raman.

Pe de altă parte, **mecanismul de amplificare chimică** se bazează pe procese de transfer de sarcină între molecula adsorbită și substratul metalic [13, 17]. Adsorbția poate avea loc prin interacțiuni slabe de tip fizisorbție sau prin procese de chimisorbție, mai puternice, care implică hibridizarea orbitalilor și formarea unor complexe metal-moleculă [18]. Amplificarea chimică este asociată cu tranziții electronice rezonante în cadrul acestor complexe, în special între orbitalii HOMO și LUMO, ceea ce conduce la amplificarea selectivă a anumitor moduri vibraționale [19]. Moleculele care prezintă o afinitate ridicată pentru suprafețele metalice, cum sunt compușii ce conțin gruparea tiol, adsorb cu ușurință pe substrat și contribuie semnificativ la intensificarea efectului SERS [20].

Nici mecanismul de amplificare electromagnetică, nici cel de amplificare chimică nu pot explica în mod individual fenomenul SERS. În consecință, efectul SERS este în prezent interpretat ca rezultatul acțiunii sinergice a celor două mecanisme. Amplificarea chimică explică necesitatea adsorbției moleculelor pe suprafața metalică, iar amplificarea electromagnetică este responsabilă de creșterea semnificativă a intensității semnalului Raman.

2. SERS ÎN MEDICINĂ

Capitolul 2 prezintă aplicațiile spectroscopiei Raman cu amplificare de suprafață (SERS) în cercetarea biomedicală, cu accent pe utilizarea acesteia ca platformă de biopsie lichidă fără markeri (label-free). Datorită sensibilității ridicate, achiziției rapide a spectrelor, limitelor scăzute de detecție, compatibilității cu biofluidele și necesității unei prelucrări minime a probelor, tehnica SERS s-a impus ca o metodă promițătoare pentru diagnosticul molecular minim invaziv și aplicațiile de tip *point-of-care* [5, 23].

Spre deosebire de biopsiile de țesut convenționale, biopsia lichidă SERS permite analiza rapidă a biofluidelor fără utilizarea markerilor moleculari sau a unor proceduri complexe de pregătire a probelor, furnizând informații biochimice relevante direct din compoziția acestora [24] (Figura 2.1.).

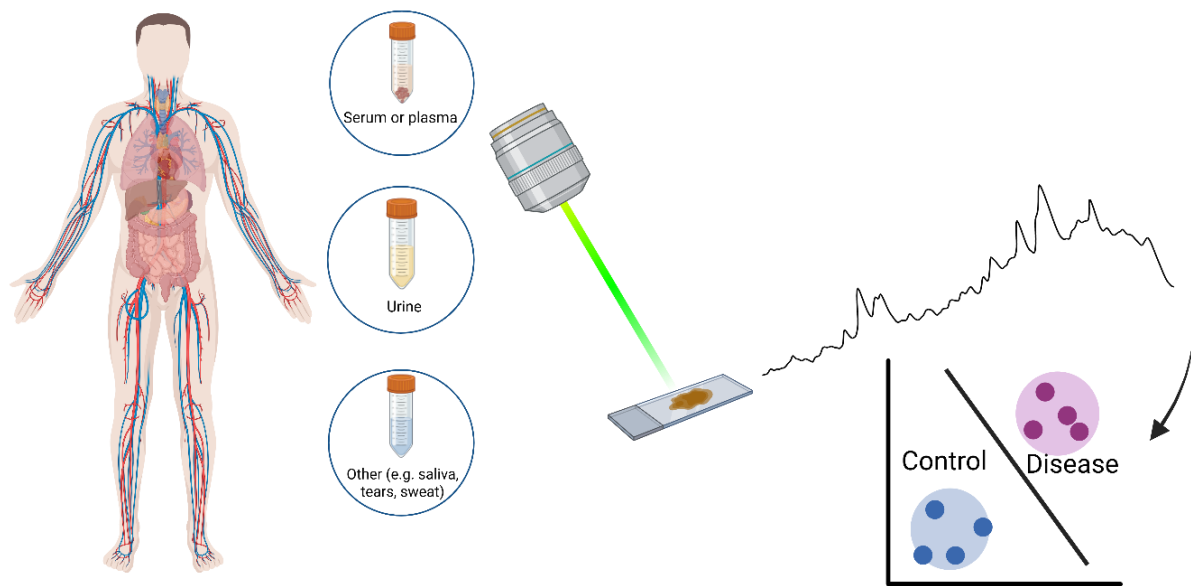


Figura 2.1. Reprezentare schematică a fluxului de lucru al biopsiei lichide SERS, incluzând etapele de recoltare și preprocesare a probelor, achiziția spectrelor, analiza datelor și clasificarea probelor.

În plus, aplicațiile extinse ale spectroscopiei SERS în oncologie [25], bolile infecțioase [26], afecțiunile metabolice [27], bolile neurologice [28], și patologii cardiovasculare [29] demonstrează versatilitatea acestei tehnici pentru detectarea bolilor, clasificarea acestora și monitorizarea răspunsului la tratament.

Un aspect central al acestui capitol îl constituie interpretarea moleculară a spectrelor SERS fără markeri ale biofluidelor, bazată pe selectivitatea moleculară indusă de suprafață. Întrucât procesele de adsorbție la suprafața nanoparticulelor favorizează detectarea anumitor specii moleculare [6, 30], metaboliții purinici (acidul uric, hipoxantina și xantina), reprezintă principalii contribuitori din spectrele SERS ale biofluidelor (Figura 2.2.). Acest lucru se datorează atât afinității lor ridicate pentru suprafețele metalelor nobile, cât și concentrațiilor lor biologice relativ mari [31-33].

Capitolul evidențiază, de asemenea, faptul că spectrele SERS *label-free* ale biofluidelor reflectă echilibre colective de adsorbție, și nu prezența unor biomarkeri individuali [34, 35]. Profilul spectral înregistrat este rezultatul unor procese competitive de adsorbție, influențate de compoziția biochimică globală a probei, inclusiv de concentrația metaboliților, conținutul de proteine, pH-ul și afinitatea moleculelor pentru suprafața substratului. În consecință, tehnica SERS *label-free* surprinde modificările metabolice și biochimice de ansamblu asociate diferitelor stări patologice, permițând discriminarea clinică chiar și în absența unor biomarkeri specifici.

În plus, Capitolul 2 analizează aspectele metodologice esențiale pentru implementarea clinică a tehnicii SERS, inclusiv strategiile de preprocesare a probelor, care îmbunătățesc accesibilitatea analiților și reproductibilitatea spectrelor [35-41].

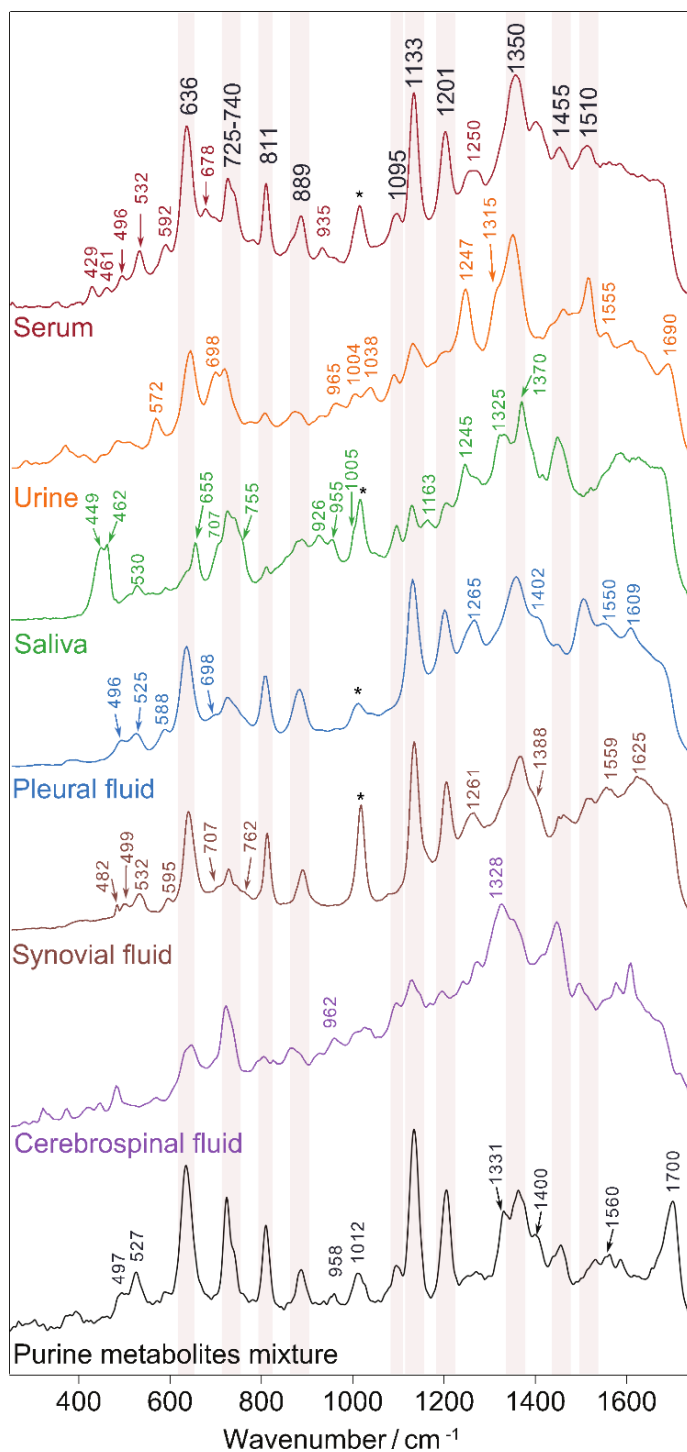


Figura 2.2. Spectrele SERS ale serului sanguin deproteinizat, urinei, salivei, lichidului pleural, lichidului sinovial și lichidului cefalorahidian, precum și ale unui amestec de metaboliți purinici (10^{-5} M), obținute utilizând nanoparticule coloidale de argint (AgNPs) sintetizate prin reducere cu clorhidrat de hidroxilamină și excitație laser la 532 nm. Sunt

evidențiate benzile spectrale comune tuturor biofluidelor, atribuite metaboliților purinici. Simbolul * indică banda Raman a metanolului utilizat în etapa de deproteinizare a probelor.

În final, capitolul abordează principalele limitări care împiedică în prezent transpunerea clinică a spectroscopiei SERS, incluzând variabilitatea substraturilor, lipsa unor protocoale experimentale standardizate, dificultățile asociate interpretării spectrelor și provocările legate de reproducibilitatea rezultatelor între diferite laboratoare și cohorte de pacienți. Aceste aspecte stabilesc cadrul conceptual și metodologic necesar investigațiilor experimentale prezentate în capitolele următoare ale tezei și evidențiază importanța optimizării și a validării metodelor pentru facilitarea implementării tehnicii SERS label-free în practica clinică de rutină și în aplicațiile de diagnostic point-of-care.

3. MATERIALE ȘI METODE

Acest capitol descrie protocolul experimental general, procedurile de prelucrare a probelor, parametrii utilizați pentru măsurătorile SERS și metodele de analiză a datelor aplicate în cadrul a trei studii independente privind profilarea *label-free* a biofluidelor prin spectroscopia SERS: (i) analiza urinei, (ii) analiza serului și (iii) caracterizarea lichidului pleural. Aspectele metodologice specifice fiecărui studiu sunt prezentate în subcapitolele corespunzătoare din Capitolul 4.

Probele de biofluide, incluzând urină, ser și lichid pleural, au fost recoltate de la pacienți diagnosticați cu afecțiuni maligne și de la grupurile de control corespunzătoare, după obținerea consimțământului informat. Pentru a facilita detectarea metaboliților prin spectroscopia SERS, probele de ser și lichid pleural au fost supuse centrifugării și

depleției proteinelor prin precipitare cu metanol, în timp ce probele de urină au fost analizate în stare nativă. Toate probele preprocesate au fost păstrate la -80°C până la achiziția spectrelor.

Nanoparticulele de argint (AgNPs), sintetizate prin reducerea nitratului de argint cu clorhidrat de hidroxilamină, conform metodei Leopold-Lendl [46], au fost utilizate drept substrat activ SERS în toate experimentele.

Măsurătorile SERS au fost efectuate în mediu clinic, utilizând spectrometre Raman portabile, echipate cu laser de excitație la 532 nm. Pentru achiziția spectrelor, probele de biofluide au fost amestecate cu nanoparticule de argint (AgNPs) și ioni de Ca^{2+} înainte de a fi depuse pe lamele de microscop acoperite cu folie de aluminiu. Adăugarea ionilor de Ca^{2+} favorizează adsorbția metaboliților anionici pe suprafața nanoparticulelor prin mecanisme descrise anterior [47].

Spectrele au fost înregistrate imediat după depunerea amestecurilor, iar pentru fiecare probă au fost efectuate mai multe achiziții succesive, a căror medie a constituit spectrul final utilizat în analiză.

Toate spectrele au fost prelucrate utilizând un flux de lucru standardizat în platforma Quasar-Orange [48, 49]. Etapele de preprocesare au inclus selectarea domeniului spectral de interes, corecția baseline-ului prin algoritmul rubber-band și normalizarea vectorială.

Capitolul prezintă, de asemenea, metodele de analiză statistică: analiza componentelor principale (PCA) a fost utilizată ca metodă de reducere a dimensionalității, pentru identificarea tendințelor de grupare și evidențierea principalelor surse de variație din seturile de date spectrale, iar pentru clasificare au fost folosiți algoritmi de machine learning Logistic Regression (LR) și Random Forest (RF).

4. RESULTATE ȘI DISCUȚII

4.1 Optimizarea metodologiei SERS pentru detecția precoce a cancerului de sân pe baza analizei urinei

Secțiunea 4.1 investighează aplicabilitatea spectroscopiei Raman cu amplificare de suprafață (SERS) asupra probelor de urină ca metodă de biopsie lichidă neinvazivă pentru detecția precoce a cancerului de sân. Deși analiza SERS a urinei reprezintă o strategie de diagnostic promițătoare, datorită caracterului neinvaziv al recoltării, necesității minime de preprocesare a probelor și sensibilității la modificările metabolice [50], implementarea sa în practica clinică este limitată de variabilitatea compoziției urinei, în special a pH-ului și a gradului de diluție, precum și de înțelegerea încă incompletă a contribuției moleculare la spectrele înregistrate [35].

În cadrul acestui studiu au fost analizate probe de urină recoltate de la paciente cu cancer de sân în stadiu incipient – BC (n = 18) și de la subiecți din grupul de control – CTRL (n = 10), în condiții controlate de pH (pH nativ, 5, 7 și 9). Clasificarea probelor a fost realizată prin Analiza Componentelor Principale (PCA) și Logistic Regression (LR).

Rezultatele studiului indică faptul că pH-ul urinei influențează semnificativ adsorbția moleculelor pe suprafața nanoparticulelor de argint și, implicit, modulează spectrele SERS obținute. La pH-ul nativ al urinei, spectrele au fost dominate de benzile caracteristice hipoxantinei, în timp ce în condiții alcaline s-a observat o intensificare a contribuțiilor acidului uric, hipoxantinei și creatininei (Figura 4.1.). În schimb, benzile corespunzătoare xantinei s-au diminuat în mediu alcalin, cel mai probabil ca urmare a efectelor de adsorbție competitivă la interfața nanoparticulă-soluție. Analiza amestecului de urină sintetică a confirmat că aceste variații spectrale sunt determinate nu numai de proprietățile de adsorbție ale metaboliților individuali, ci și de echilibrele colective de adsorbție, dependente de pH și de competiția moleculară pentru suprafața metalică.

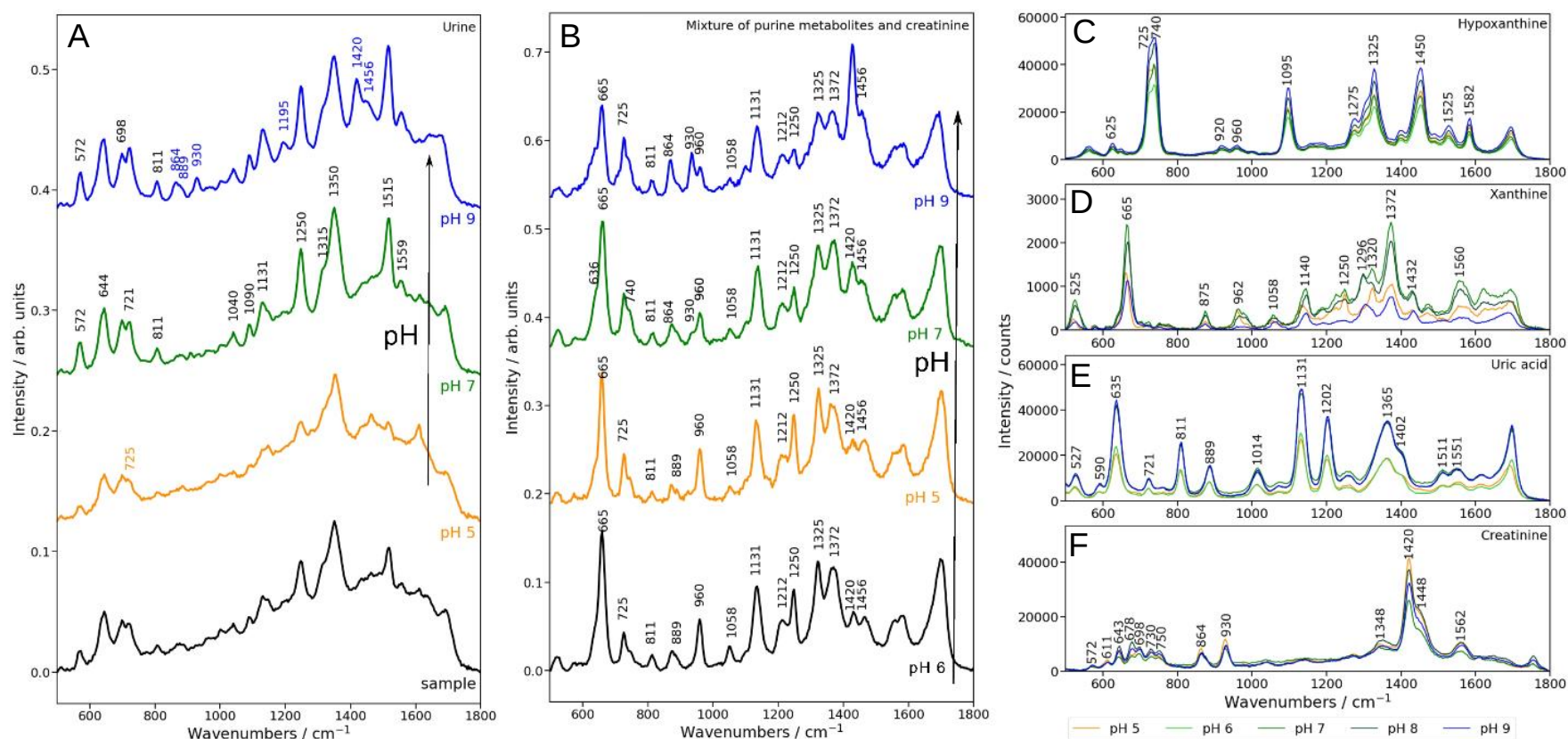


Figura 4.1. (A) Spectrele SERS medii ale probelor de urină provenite de la pacienți cu cancer de sân, înregistrate la pH-ul nativ (negru) și după ajustarea pH-ului la 5 (portocaliu), 7 (verde) și 9 (albastru). (B) Spectrele SERS ale unui amestec model conținând creatinină (10^{-3} M), acid uric (10^{-4} M), hipoxantină (10^{-5} M) și xantină (10^{-5} M), înregistrate în intervalul de pH 5-9. (C-F) Spectrele SERS ale fiecărui component individual, înregistrate la diferite valori ale pH-ului: (C) hipoxantină, (D) xantină, (E) acid uric și (F) creatinină, la pH 5 (portocaliu), pH 6 (verde deschis), pH 7 (verde), pH 8 (verde închis) și pH 9 (albastru) [35]

Un rezultat important al acestui studiu a fost identificarea benzii creatininei de la 1420 cm^{-1} ca standard intern adecvat pentru normalizarea spectrelor și corectarea variațiilor determinate de gradul de diluție al urinei. Deoarece excreția creatininei este relativ constantă [51], normalizarea spectrelor la această bandă a redus variabilitatea spectrală asociată stării de hidratare și diferențelor de concentrație ale urinei, îmbunătățind astfel reproductibilitatea măsurătorilor SERS și facilitând interpretarea lor în context clinic.

Examinarea vizuală a spectrelor SERS evidențiază diferențe între probele BC și cele CTRL, pentru toate valorile de pH investigate, spectrele înregistrate la pH 9 furnizând cele mai multe informații. De asemenea, normalizarea spectrelor SERS utilizând banda creatininei de la 1420 cm^{-1} a evidențiat diferențe semnificative între grupurile CTRL și BC. În mod particular, au fost observate variații ale intensității benzilor atribuite hipoxantinei (725 cm^{-1}) și acidului uric (889 și 1131 cm^{-1}) (Figura 4.3.A).

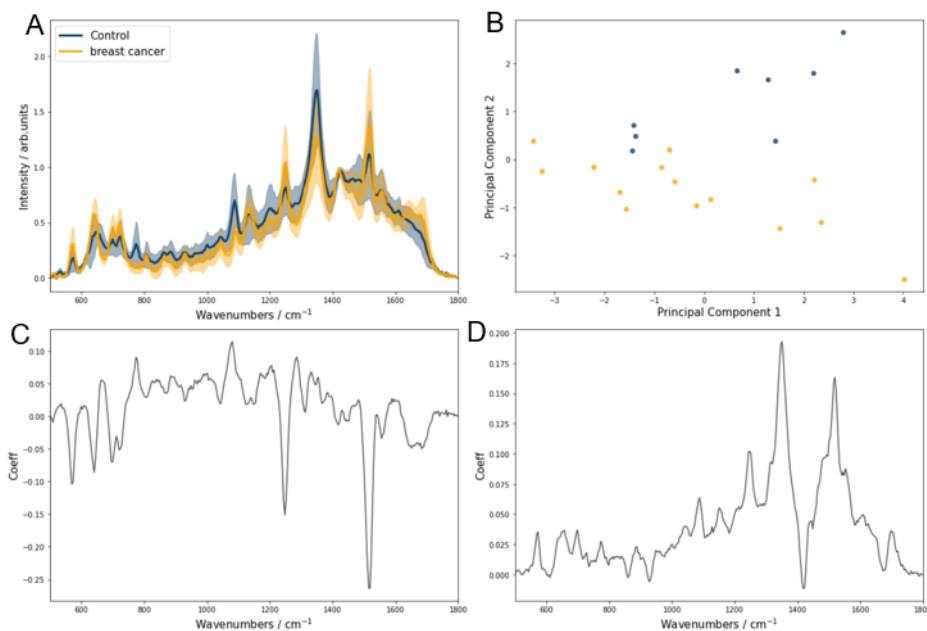


Figura 4.2. (A) Spectrele SERS medii ale grupelor CTRL și BC la pH 9, normalizate utilizând banda creatininei de la 1420 cm^{-1} . (B) Scatter plot-ul corespunzător PC1 și PC2. (C–D) Loading plot-urile corespunzătoare PC1 (C) și PC2 (D) [35].

Reprezentarea PCA a evidențiat o grupare nesupravegheată a probelor, separarea dintre grupuri fiind realizată predominant de-a lungul PC2 (Figura 4.3.B). Loading plot-ul corespunzător PC2 a indicat o corelație negativă între benzile de la 725, 889 și 1131 cm^{-1} și cele situate la 774, 1080 și 1334 cm^{-1} , care nu au putut fi atribuite metaboliților purinici investigați în acest studiu, dar au prezentat intensități mai ridicate în grupul CTRL. În schimb, benzile asociate acidului uric și xantinei au avut intensități mai ridicate în grupul BC, ceea ce sugerează potențialul acestora ca markeri spectrali cu valoare diagnostică.

Modelul de clasificare LR a obținut cea mai ridicată acuratețe de clasificare pentru probele de urină ajustate la pH 9 (89.3%), în timp ce spectrele normalizate utilizând banda creatininei au menținut o performanță ridicată a clasificării (85.7%) și au prezentat o robustețe sporită față de variabilitatea determinată de gradul de diluție al urinei.

În ansamblu, acest studiu demonstrează că standardizarea pH-ului urinar și aplicarea unei normalizări bazate pe banda creatininei îmbunătățesc semnificativ interpretabilitatea, reproductibilitatea și performanța clasificării în analiza SERS a urinei. Totuși, numărul redus al probelor reprezintă o limitare a prezentei cercetări, fiind necesară validarea rezultatelor pe cohorte independente mai extinse.

4.2 Detectarea și evaluarea răspunsului terapeutic în cancerul colorectal

Secțiunea 4.2 investighează aplicabilitatea metodei SERS în detectarea cancerului colorectal și evaluarea răspunsului la radiochemioterapie (RCT) preoperatorie la pacienții cu adenocarcinom rectal (READ). Deși imagistica prin rezonanță magnetică (IRM) este utilizată în mod curent pentru evaluarea răspunsului la tratament înaintea intervenției chirurgicale, acuratețea sa diagnostică rămâne limitată și depinde în mare măsură de interpretarea radiologică [52]. În consecință, există un interes tot mai mare

pentru dezvoltarea unor metode de biopsie lichidă neinvazive și obiective, capabile să monitorizeze răspunsul la tratament prin analiza profilului metabolic sistemic.

Acest studiu a inclus probe de ser provenite de la pacienți cu adenocarcinom de colon (COAD, $n = 35$), adenocarcinom rectal tratat prin RCT (READ, $n = 33$) și pacienți control cu patologii benigne (CTRL, $n = 31$). Dintre pacienții cu READ, 11 au prezentat regresie tumorală aproape completă după RCT (respondenți, R), în timp ce 22 au prezentat boală reziduală (non-respondenți, NR), conform sistemului Ryan de evaluare a regresiei tumorale. Măsurătorile SERS au fost efectuate utilizând instrumentație Raman portabilă, iar prelucrarea și interpretarea datelor spectrale a inclus Analiza Componentelor Principale (PCA) cu modele de învățare automată supravegheată, incluzând Logistic Regression (LR) și Random Forest (RF).

Studiul a investigat inițial dacă prin spectrele SERS ale serului se pot diferenția respondenții de non-respondenți după RCT (Figura 4.6.). Spectrele medii ale probelor provenite de la respondenți au prezentat intensități mai ridicate ale benzilor asociate acidului uric și hipoxantinei comparativ cu cele ale non-respondenților, împreună cu o bandă distinctă la 910 cm^{-1} , observată exclusiv la respondenți. Analiza PCA a identificat diferențe între cele două grupuri, în principal prin PC5 și PC17.

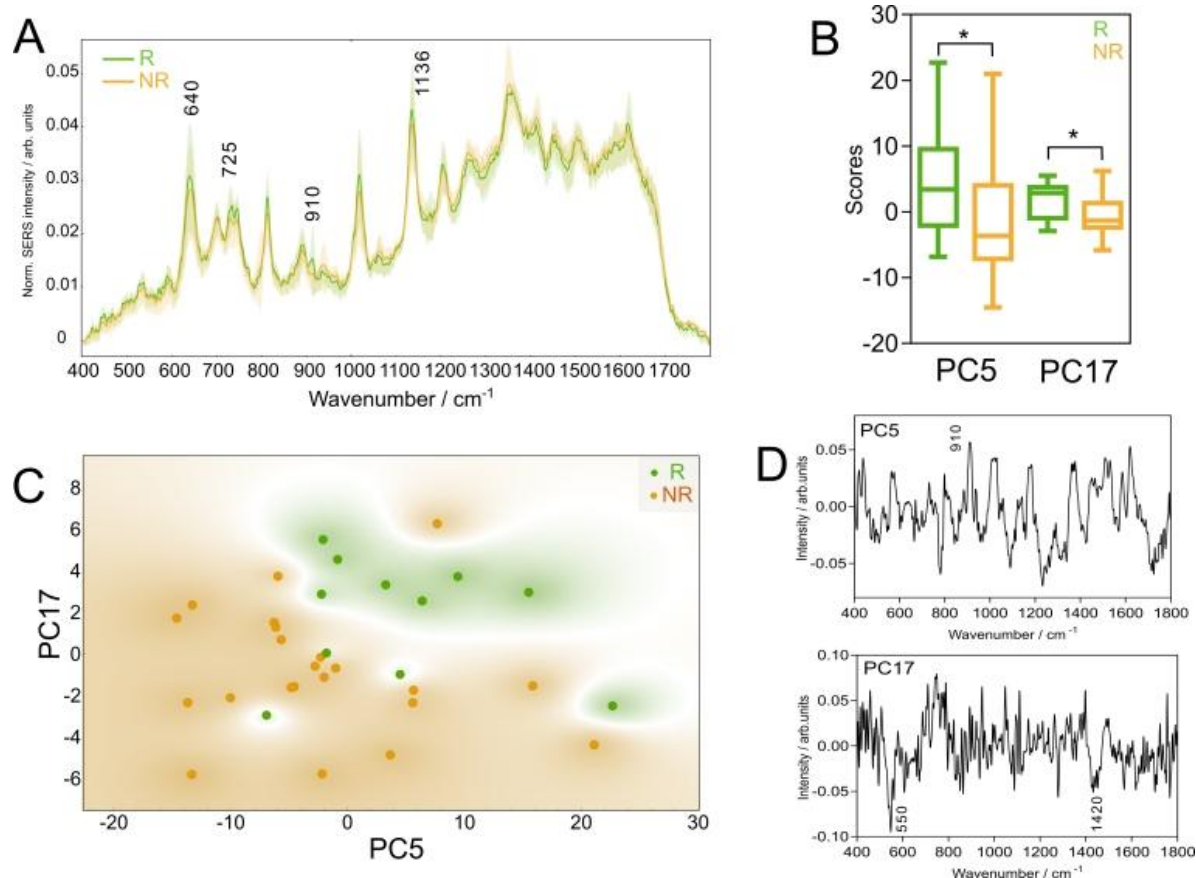


Figura 4.3. (A) Spectrele SERS medii ale serului provenit de la pacienți READ care au prezentat regresie tumorală aproape completă (R) și lipsa răspunsului (NR) la RCT; (B) Distribuția scorurilor pentru PC5 ($p = 0,048$) și PC17 ($p = 0,019$) la pacienții R și NR; * indică diferențe semnificative statistice între grupuri ($p < 0,05$); (C) Reprezentarea scorurilor probelor în funcție de PC5 și PC17; (D) Loading plot-urile corespunzătoare componentelor principale PC5 și PC17 [53].

Un al doilea obiectiv al studiului a fost evaluarea măsurii în care profilurile metabolice ale pacienților READ, după tratament, se aseamănă cu cele specifice pacienților cu cancer sau cu cele caracteristice indivizilor sănătoși. Având în vedere că adenocarcinomul de colon (COAD) și adenocarcinomul rectal (READ) prezintă caracteristici histologice

similare, a fost dezvoltat un model de clasificare capabil să diferențieze probele COAD de cele control (CTRL), care a fost ulterior aplicat în mod independent grupurilor de respondenți (R) și non-respondenți (NR). Algoritmii LR și RF au obținut acurateți de clasificare de 75%, respectiv 74%, pentru diferențierea probelor COAD de cele CTRL (Tabelul 4.6.). Atunci când au fost aplicați probelor READ, algoritmul RF a identificat 86% dintre probele provenite de la non-respondenți (NR) ca fiind asociate cu cancerul, în concordanță cu rezultatele histopatologice.

Tabelul 4.1. Clasificarea pacienților cu READ (R și NR la RCT) în grupurile COAD și CTRL. Matricea de confuzie a clasificatorilor LR și RF.

Logistic Regression				Random Forest			
Real	READ	Clasa prezisă		Real	READ	Clasa prezisă	
		Probe				Probe	
			COAD CTRL				COAD CTRL
		R (n = 11)	8 3			R (n = 11)	7 4
		NR (n = 22)	15 7			NR (n = 22)	19 3

În mod neașteptat, majoritatea probelor provenite de la respondenți au fost, de asemenea, clasificate ca având un profil asemănător celui asociat cancerului, în ciuda evidențelor histopatologice care indicau o regresie tumorală aproape completă. Aceste rezultate sugerează persistența unor modificări metabolice asociate cancerului chiar și după o regresie tumorală histologică substanțială, susținând ipoteza existenței unui posibil efect de „memorie metabolică” sau a unei semnături metabolice reziduale asociate bolii.

Interpretarea spectrelor a indicat că principalele caracteristici SERS au fost asociate în principal cu metaboliții purinici, precum acidul uric, hipoxantina și xantina, ale căror intensități relative au fost diferite între grupurile cancer și cel de control. În particular,

variațiile raportului de intensitate dintre benzile 725 și 740 cm^{-1} (Figura 4.9.) par să contribuie la diferențierea profilurilor metabolice asociate cancerului de cele non-canceroase.

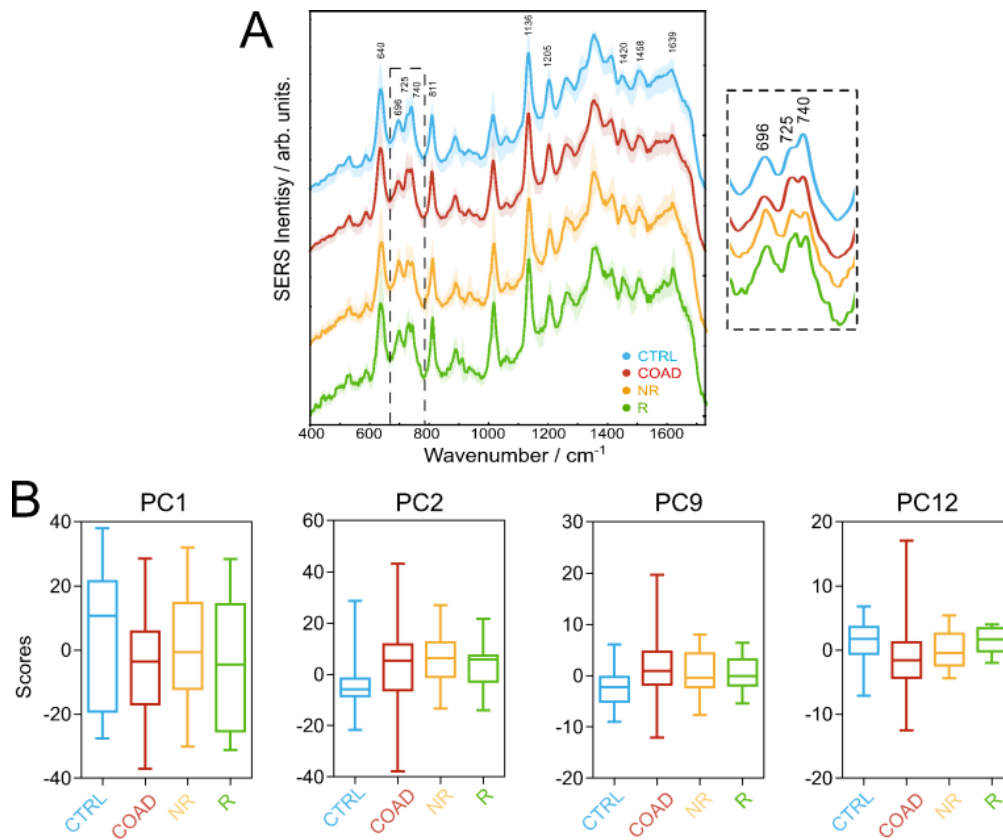


Figura 4.4. (A) Spectrele SERS medii ale probelor de la pacienți COAD, READ (R și NR) și CTRL; (B) Proiecția spectrelor SERS ale grupurilor READ (R și NR), COAD și CTRL pe componentele principale semnificative pentru discriminarea dintre COAD și CTRL (PC1, PC2, PC9 și PC12) [53].

În ansamblu, acest studiu demonstrează potențialul biopsiei lichide bazate pe SERS pe probe de ser, atât pentru detectarea cancerului colorectal, cât și pentru monitorizarea răspunsului la tratament. Strategia de clasificare independentă, împreună cu concordanța

dintre predicțiile bazate pe SERS și rezultatele histopatologice, evidențiază potențialul SERS ca metodă rapidă, neinvazivă și ușor de integrat în practica clinică pentru detecția și monitorizarea cancerului. Cu toate acestea, dimensiunea relativ redusă a probelor și complexitatea interpretării spectrelor SERS obținute din biofluide reprezintă limitări importante, fiind necesară validarea pe cohorte independente mai mari.

4.3 Caracterizarea SERS a lichidului pleural

Secțiunea 4.3 explorează aplicabilitatea spectroscopiei SERS pentru analiza lichidului pleural, cu scopul dezvoltării unei metode rapide și minim invazive pentru caracterizarea revărsatului pleural (PE). Revărsatul pleural reprezintă complicații frecvente ale bolilor pulmonare și sistemice, inclusiv ale afecțiunilor maligne, infecțioase și cardiace, iar diagnosticul se bazează adesea pe infrastructură de laborator specializată. În acest context, SERS reprezintă o alternativă promițătoare datorită capacității sale de a furniza rapid informații metabolice din biofluide complexe, utilizând instrumentație Raman portabilă [54-56].

Acest studiu pilot a investigat caracterizarea SERS a lichidului pleural, concentrându-se în principal pe stabilirea unui protocol de preprocesare practic și reproductibil. Probele de lichid pleural au fost analizate în trei forme: neprelucrate (bulk), supernatant obținut prin centrifugare și supernatant obținut prin centrifugare și deproteinizare (Figura 4.10.). Măsurătorile efectuate pe probele bulk și pe cele centrifugate au generat spectre de calitate redusă, cu un raport semnal-zgomot scăzut și informații metabolice limitate. În schimb, deproteinizarea pe bază de metanol a îmbunătățit semnificativ calitatea spectrală și raportul semnal-zgomot, demonstrând că îndepărtarea proteinelor reprezintă o etapă esențială pentru obținerea unor spectre SERS ale lichidului pleural care să fie interpretabile.

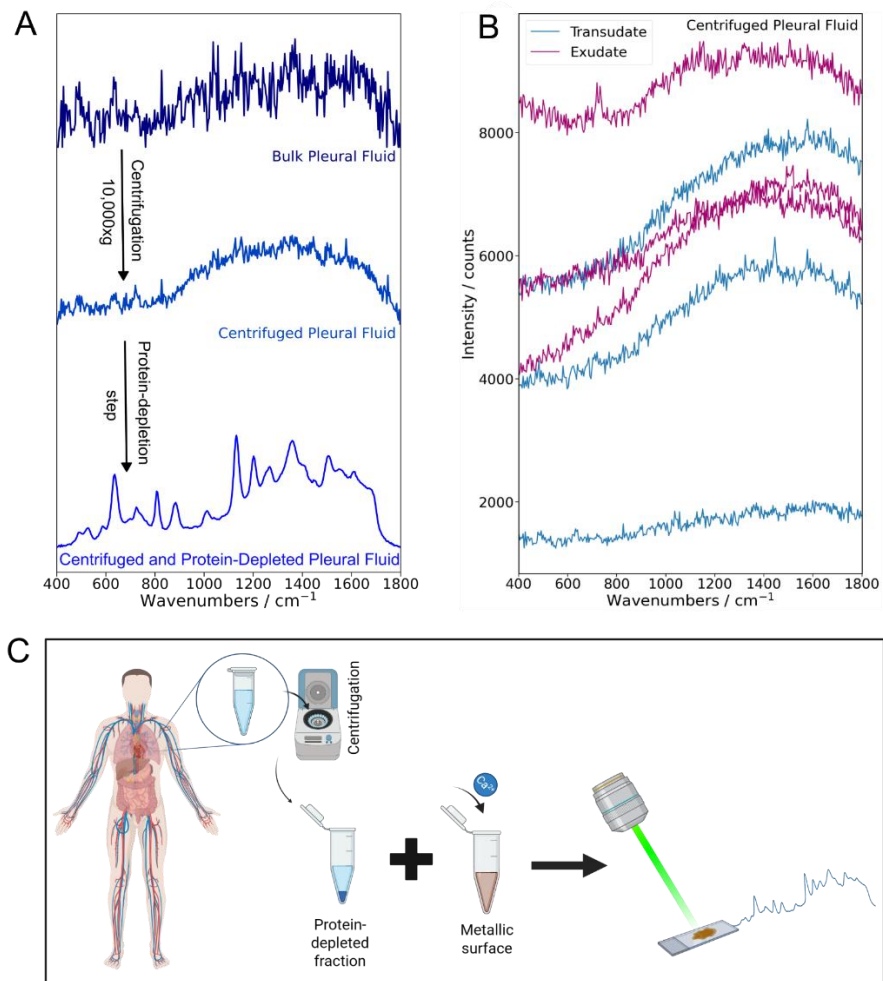


Figura 4.5. (A) Etapele de preprocesare (bulk, supernatant obținut prin centrifugare și supernatant obținut prin centrifugare și deproteinizare) împreună cu spectrele SERS medii. (B) Spectrele SERS individuale ale probelor de lichid pleural centrifugate, grupate în transudate și exsudate. (C) Reprezentare schematică a fluxului experimental utilizat pentru caracterizarea SERS a lichidului pleural [57].

O analiză comparativă a spectrelor SERS ale lichidului pleural cu cele ale urinei și serului a arătat contribuții similare între cele 3 biofluide (Figura 4.11.), benzile spectrale

dominante provenind de la metabolii purinici, în special acidul uric ($636, 811, 881, 1130$ și 1201 cm^{-1}).

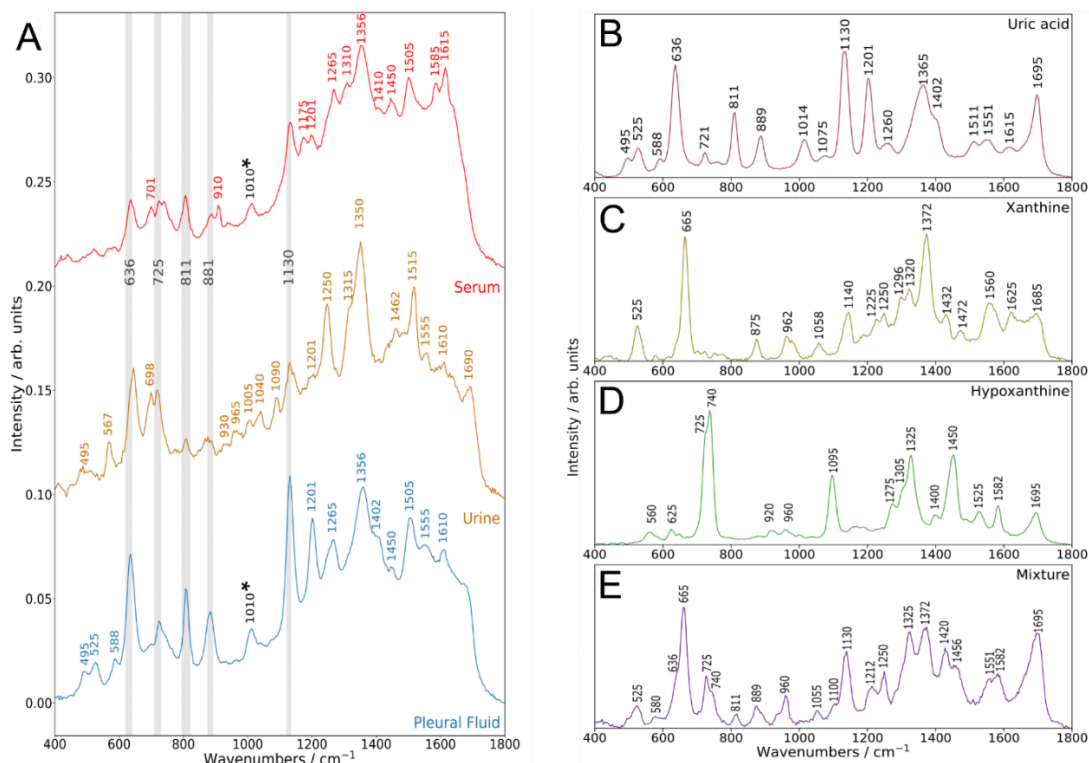


Figura 4.6. (A) Spectrele SERS medii al lichidului pleural (albastru), serului deproteinizat (roșu) și urinei (portocaliu). Banda Raman de la 1010 cm^{-1} din spectrele lichidului pleural și ale serului (marcată cu *) este atribuită metanolului utilizat în etapa de deproteinizare a probelor. Spectrele SERS ale compușilor individuali: (B) acid uric, (C) xantină și (D) hipoxantină. (E) Spectrul SERS al unui amestec care conține acid uric, xantină și hipoxantină [57].

În continuare, studiul a urmărit diferențierea dintre revărsatele pleurale transudate și cele exudate. Deși ambele grupuri au prezentat profiluri spectrale în mare parte similare, au fost identificate diferențe în intensitatea relativă a benzilor și în reproductibilitatea

spectrelor. Probele de tip transudat au evidențiat benzi asociate acidului uric mai intense și mai bine definite, însoțite de o variabilitate mai mare între probe. În schimb, revărsatele pleurale exudate au prezentat benzi de intensitate crescută la 725, 740 și 1265 cm^{-1} , precum și o consistență spectrală superioară.

Analiza componentelor principale (PCA) a susținut în continuare diferențierea dintre probele de revărsat pleural transudate și exudate prin grupare nesupervizată (Figura 4.12). Analiza loading plot-urilor a arătat că separarea dintre cele două grupuri a fost determinată în principal de diferențele dintre regiunile spectrale dominate de benzile acidului uric.

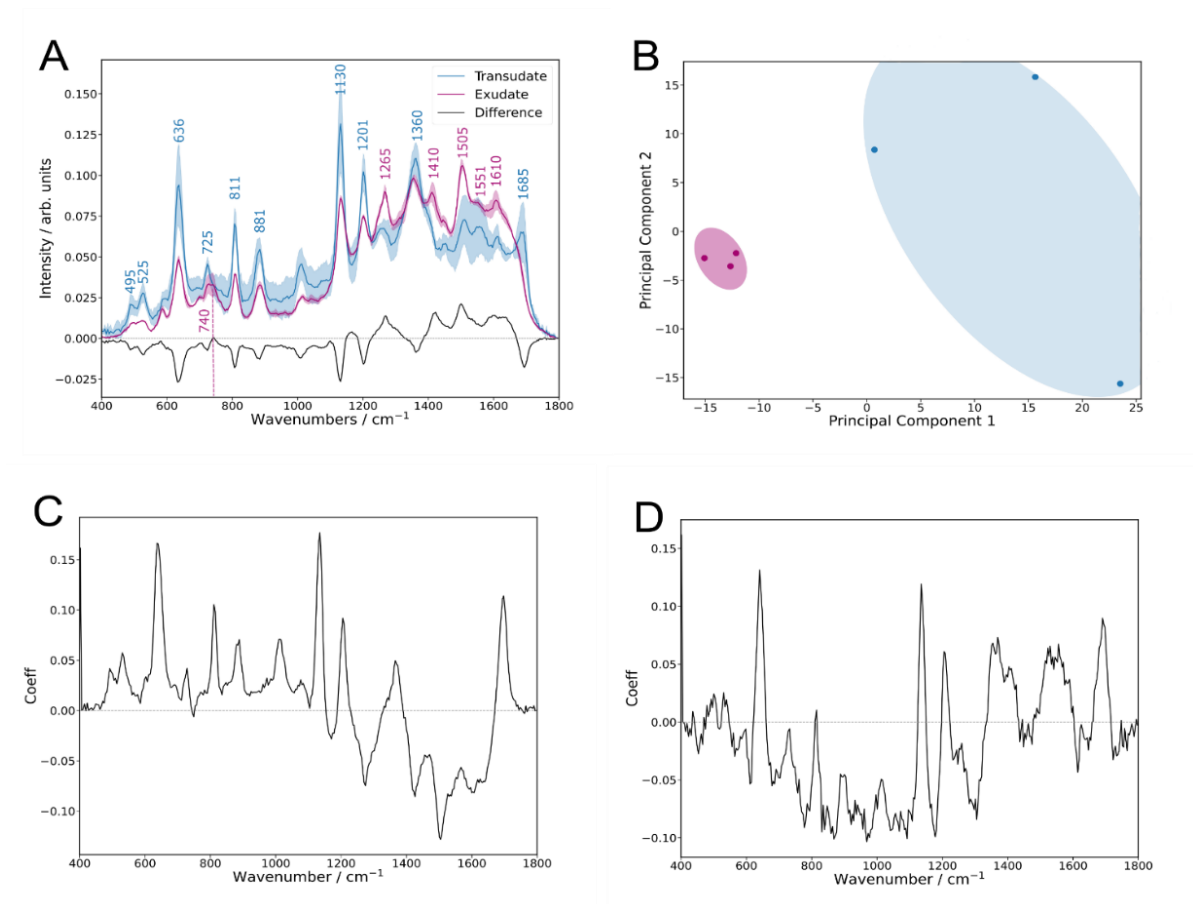


Figura 4.7. (A) Spectrele SERS medii și deviația standard ale probelor de lichid pleural deproteinizat transudate (albastru) și exudate (mov), împreună cu diferențele dintre ele

(negru). (B) Reprezentarea scorurilor probelor de lichid pleural pe PC1 și PC2. Loading plot-ul pentru PC1 (C) și PC2 (D) [57].

În concluzie, acest studiu propune un protocol pentru analiza SERS a lichidului pleural. Rezultatele evidențiază potențialul SERS ca metodă rapidă pentru caracterizarea lichidului pleural, subliniind totodată importanța standardizării protocolului de preprocesare, în special a etapei de deproteinizare. Cu toate acestea, dimensiunea relativ redusă a cohorței și caracterul exploratoriu al studiului impun validarea rezultatelor pe loturi mai mari și mai diverse din punct de vedere clinic.

5. FINAL CONCLUSIONS

Capitolul 5 sintetizează principalele rezultate obținute în cadrul acestei teze de doctorat și evidențiază versatilitatea și potențialul clinic al spectroscopiei SERS ca metodă de biopsie lichidă label-free. Prin intermediul a trei studii complementare, axate pe analiza urinei, serului și lichidului pleural, această lucrare arată că SERS poate detecta modificările metabolice asociate diferitelor patologii direct din biofluide complexe, susținând aplicabilitatea sa într-o gamă largă de contexte clinice.

Un rezultat important comun tuturor studiilor a fost implementarea cu succes a instrumentației Raman portabile în medii clinice. Acest aspect demonstrează fezabilitatea măsurărilor SERS în afara laboratoarelor specializate și susține potențialul integrării acestei tehnici în fluxurile de diagnostic point-of-care. În combinație cu protocoale automate de preprocesare și algoritmi de învățare automată, sistemele SERS portabile pot reduce dependența de operatori specializați și pot crește accesibilitatea metodelor spectroscopice în practica clinică.

În pofida acestor progrese, teza evidențiază și o serie de limitări care împiedică, în prezent, transpunerea tehnicii SERS în practica clinică. Interpretarea spectrelor SERS rămâne dificilă din cauza suprapunerii contribuțiilor provenite de la diferiți metaboliți și a existenței unor benzi spectrale care nu au fost încă atribuite în literatura de specialitate. În plus, studiile de față au fost realizate pe cohorte relativ reduse de pacienți, ceea ce subliniază caracterul exploratoriu al cercetării. Prin urmare, vor fi necesare studii multicentrice pe loturi mai mari, standardizarea protocoalelor experimentale și validări suplimentare pentru ca SERS să devină o tehnică de diagnostic clinic fiabilă.

BIBLIOGRAPHY

- [1] M. Moskovits, "Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective", *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 36, no. 6-7, pp. 485-496, 2005/06/01 2005, doi: <https://doi.org/10.1002/jrs.1362>.
- [2] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, I. Itzkan, R. R. Dasari *et al.*, "Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)", *Physical Review Letters*, vol. 78, no. 9, pp. 1667-1670, 03/03/ 1997, doi: 10.1103/PhysRevLett.78.1667.
- [3] S. Nie and S. R. Emory, "Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering", *Science*, vol. 275, no. 5303, pp. 1102-1106, 1997/02/21 1997, doi: 10.1126/science.275.5303.1102.
- [4] P. G. Etchegoin and E. C. Le Ru, "A perspective on single molecule SERS: current status and future challenges", *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10.1039/B809196J vol. 10, no. 40, pp. 6079-6089, 2008, doi: 10.1039/B809196J.
- [5] J. Langer, D. Jimenez de Aberasturi, J. Aizpurua, R. A. Alvarez-Puebla, B. Auguie, J. J. Baumberg *et al.*, "Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering", *ACS Nano*, vol. 14, no. 1, pp. 28-117, 2020/01/28 2020, doi: 10.1021/acsnano.9b04224.
- [6] A. M. Michaels, M. Nirmal, and L. E. Brus, "Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Individual Rhodamine 6G Molecules on Large Ag Nanocrystals", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 121, no. 43, pp. 9932-9939, 1999/11/01 1999, doi: 10.1021/ja992128q.
- [7] G. Keresztury, "Raman Spectroscopy: Theory", vol. 1, 2006.
- [8] N. Leopold, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. Selected Applications*. Cluj-Napoca: Napoca Star, 2009, p. 155.
- [9] R. R. Jones, D. C. Hooper, L. Zhang, D. Wolverson, and V. K. Valev, "Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers", (in eng), no. 1931-7573 (Print).
- [10] M. Fleischmann, P. J. Hendra, and A. J. McQuillan, "Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode", *Chemical Physics Letters*, vol. 26, no. 2, pp. 163-166, 1974/05/15/ 1974, doi: [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(74\)85388-1](https://doi.org/10.1016/0009-2614(74)85388-1).
- [11] D. L. Jeanmaire and R. P. Van Duyne, "Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode", *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, vol. 84, no. 1, pp. 1-20, 1977/11/10/ 1977, doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(77\)80224-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(77)80224-6).
- [12] J. A. Creighton, M. G. Albrecht, R. E. Hester, and J. A. D. Matthew, "The dependence of the intensity of Raman bands of pyridine at a silver electrode on the wavelength of excitation", *Chemical Physics Letters*, vol. 55, no. 1, pp. 55-58, 1978/04/01/ 1978, doi: [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(78\)85131-8](https://doi.org/10.1016/0009-2614(78)85131-8).

- [13] J. Yi, E.-M. You, R. Hu, D.-Y. Wu, G.-K. Liu, Z.-L. Yang *et al.*, "Surface-enhanced Raman spectroscopy: a half-century historical perspective", *Chemical Society Reviews*, vol. 54, no. 3, pp. 1453-1551, 2025, doi: 10.1039/d4cs00883a.
- [14] G. Haran, "Single-Molecule Raman Spectroscopy: A Probe of Surface Dynamics and Plasmonic Fields", *Accounts of Chemical Research*, vol. 43, no. 8, pp. 1135-1143, 2010/08/17 2010, doi: 10.1021/ar100031v.
- [15] E. C. Le Ru, M. Meyer, E. Blackie, and P. G. Etchegoin, "Advanced aspects of electromagnetic SERS enhancement factors at a hot spot", *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 39, no. 9, pp. 1127-1134, 2008/09/01 2008, doi: <https://doi.org/10.1002/jrs.1945>.
- [16] J. A. Koningstein, *Introduction to the Theory of the Raman Effect*. Dordrecht-Holland: D. Reidel Publishing Company, 1971.
- [17] A. T. a. H. Zayak, Y. S. and Choo, H. and Bokor, J. and Cabrini, S. and Schuck, P. J. and Neaton, J. B., "Chemical Raman Enhancement of Organic Adsorbates on Metal Surfaces", *Physical Review Letters*, vol. 106, 2011, doi: 10.1103/physrevlett.106.083003.
- [18] A. Dąbrowski, "Adsorption — from theory to practice", *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 93, no. 1, pp. 135-224, 2001/10/08/ 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(00\)00082-8](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(00)00082-8).
- [19] J. a. F. Ziroff, F. and Schöll, A. and Puschnig, P. and Reinert, F., "Hybridization of Organic Molecular Orbitals with Substrate States at Interfaces: PTCDA on Silver", *Physical Review Letters*, vol. 104, 2010, doi: 10.1103/physrevlett.104.233004.
- [20] C. Vericat, M. Vela, G. Corthey, E. Pensa, E. Cortés, M. H. Fonticelli *et al.*, "Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals: A Review Article on Sulfur-Metal Chemistry and Surface Structures", *RSC Advances*, vol. 4, p. 27730, 11/18 2014, doi: 10.1039/c4ra04659e.
- [21] H. Xu, E. J. Bjerneld, M. Käll, and L. Börjesson, "Spectroscopy of Single Hemoglobin Molecules by Surface Enhanced Raman Scattering", *Physical Review Letters*, vol. 83, no. 21, pp. 4357-4360, 11/22/ 1999, doi: 10.1103/PhysRevLett.83.4357.
- [22] V. Brabec and K. Niki, "Raman scattering from nucleic acids adsorbed at a silver electrode", *Biophysical Chemistry*, vol. 23, no. 1, pp. 63-70, 1985/11/01/ 1985, doi: [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(85\)80064-8](https://doi.org/10.1016/0301-4622(85)80064-8).
- [23] D. Cialla-May, X. S. Zheng, K. Weber, and J. Popp, "Recent progress in surface-enhanced Raman spectroscopy for biological and biomedical applications: from cells to clinics", *Chemical Society Reviews*, 10.1039/C7CS00172J vol. 46, no. 13, pp. 3945-3961, 2017, doi: 10.1039/C7CS00172J.
- [24] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Surface-enhanced Raman scattering: A new tool for biomedical spectroscopy", *Current Science*, vol. 77, no. 7, pp. 915-924, 1999. [Online]. Available: <http://www.jstor.org/stable/24103661>.

- [25] L. Ma, H. Guo, Y. Zhao, Z. Liu, C. Wang, J. Bu *et al.*, "Liquid biopsy in cancer: current status, challenges and future prospects", *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 9, no. 1, p. 336, 2024/12/02 2024, doi: 10.1038/s41392-024-02021-w.
- [26] P. Eiamchai, C. Juntagran, P. Somboonsaksri, U. Waiwijit, J. Eisiri, J. Samarnjit *et al.*, "Determination of latent tuberculosis infection from plasma samples via label-free SERS sensors and machine learning", *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 250, p. 116063, 2024/04/15/ 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2024.116063>.
- [27] S. Li, Y. Zheng, Y. Yang, H. Yang, C. Han, P. Du *et al.*, "Diagnosis and classification of intestinal diseases with urine by surface-enhanced Raman spectroscopy", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 312, p. 124081, 2024/05/05/ 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.124081>.
- [28] H. Jiang, Y. Zhang, L. Zhang, L. Liu, H. Wang, Y. Wang *et al.*, "Comprehensive Serum Analysis via an AI-Assisted Magnetically Driven SERS Platform for the Diagnosis and Etiological Differentiation of Childhood Epilepsy", *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 17, no. 8, pp. 11731-11741, 2025/02/26 2025, doi: 10.1021/acsami.4c19603.
- [29] A. C. Espinosa-Garavito, E. N. Quiroz, N. J. Galán-Freyte, G. Aroca-Martinez, S. P. Hernández-Rivera, J. Villa-Medina *et al.*, "Surface-enhanced Raman Spectroscopy in urinalysis of hypertension patients with kidney disease", *Scientific Reports*, vol. 14, no. 1, p. 3035, 2024/02/06 2024, doi: 10.1038/s41598-024-53679-9.
- [30] S. E. J. Bell and N. M. S. Sirimuthu, "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for Sub-Micromolar Detection of DNA/RNA Mononucleotides", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, no. 49, pp. 15580-15581, 2006/12/01 2006, doi: 10.1021/ja066263w.
- [31] M. Pagliai, S. Caporali, M. Muniz-Miranda, G. Pratesi, and V. Schettino, "SERS, XPS, and DFT Study of Adenine Adsorption on Silver and Gold Surfaces", *The Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 3, no. 2, pp. 242-245, 2012/01/19 2012, doi: 10.1021/jz201526v.
- [32] Y. Dong, J. Ma, J. Bian, Q. Zou, T. Jiang, C. Zhao *et al.*, "Reliable detection of uric acid in urine by SERS technique on three-dimension carbon framework decorated with Ag nanoparticles", *Journal of Molecular Liquids*, vol. 423, p. 127020, 2025/04/01/ 2025, doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2025.127020>.
- [33] C. Westley, Y. Xu, B. Thilaganathan, A. J. Carnell, N. J. Turner, and R. Goodacre, "Absolute Quantification of Uric Acid in Human Urine Using Surface Enhanced Raman Scattering with the Standard Addition Method", *Analytical Chemistry*, vol. 89, no. 4, pp. 2472-2477, 2017/02/21 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.6b04588.
- [34] A. Bonifacio, S. Dalla Marta, R. Spizzo, S. Cervo, A. Steffan, A. Colombatti *et al.*, "Surface-enhanced Raman spectroscopy of blood plasma and serum using Ag and Au nanoparticles: a systematic study", *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 406, no. 9-10, pp. 2355-65, Apr 2014, doi: 10.1007/s00216-014-7622-1.

- [35] D. Andraș, R. G. Cozan, D. E. Muresan, V. Moisoiu, G. Crișan, V. Bințișan *et al.*, "Advancing Breast Cancer Diagnosis: Optimization of Raman Spectroscopy for Urine-Based Early Detection", Article vol. 13, no. 2, 2025, Art no. 505, doi: 10.3390/biomedicines13020505.
- [36] T. T. Kouri, W. Hofmann, R. Falbo, M. Oyaert, S. Schubert, J. B. Gertsen *et al.*, "The EFLM European Urinalysis Guideline 2023", *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, vol. 62, no. 9, pp. 1653-1786, 2024, doi: 10.1515/cclm-2024-0070.
- [37] G. Del Mistro, S. Cervo, E. Mansutti, R. Spizzo, A. Colombatti, P. Belmonte *et al.*, "Surface-enhanced Raman spectroscopy of urine for prostate cancer detection: a preliminary study", (in eng), *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 407, no. 12, pp. 3271-5, May 2015, doi: 10.1007/s00216-015-8610-9.
- [38] X. Cui, T. Liu, X. Xu, Z. Zhao, Y. Tian, Y. Zhao *et al.*, "Label-free detection of multiple genitourinary cancers from urine by surface-enhanced Raman spectroscopy", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 240, p. 118543, 2020/10/15/ 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118543>.
- [39] D. Hu, X. Xu, Z. Zhao, C. Li, Y. Tian, Q. Liu *et al.*, "Detecting urine metabolites of bladder cancer by surface-enhanced Raman spectroscopy", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 247, p. 119108, 2021/02/15/ 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119108>.
- [40] P. Bernini, I. Bertini, C. Luchinat, P. Nincheri, S. Staderini, and P. Turano, "Standard operating procedures for pre-analytical handling of blood and urine for metabolomic studies and biobanks", *Journal of Biomolecular NMR*, vol. 49, no. 3, pp. 231-243, 2011/04/01 2011, doi: 10.1007/s10858-011-9489-1.
- [41] T. Moisoiu, M. P. Dragomir, S. D. Iancu, S. Schallenberg, G. Birolo, G. Ferrero *et al.*, "Combined miRNA and SERS urine liquid biopsy for the point-of-care diagnosis and molecular stratification of bladder cancer", *Molecular Medicine*, vol. 28, no. 1, p. 39, 2022/04/01 2022, doi: 10.1186/s10020-022-00462-z.
- [42] Y. Lin, Q. Zhang, H. Chen, S. Liu, K. Peng, X. Wang *et al.*, "Multi-cancer early detection based on serum surface-enhanced Raman spectroscopy with deep learning: a large-scale case-control study", *BMC Medicine*, vol. 23, no. 1, p. 97, 2025/02/21 2025, doi: 10.1186/s12916-025-03887-5.
- [43] M. S. Al Ja'farawy, V. T. N. Linh, J.-Y. Yang, C. Mun, S. Lee, S.-G. Park *et al.*, "Whole urine-based multiple cancer diagnosis and metabolite profiling using 3D evolutionary gold nanoarchitecture combined with machine learning-assisted SERS", *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 412, p. 135828, 2024/08/01/ 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2024.135828>.

- [44] N. Gao, Q. Wang, J. Tang, S. Yao, H. Li, X. Yue *et al.*, "Non-invasive SERS serum detection technology combined with multivariate statistical algorithm for simultaneous screening of cervical cancer and breast cancer", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 413, no. 19, pp. 4775-4784, 2021/08/01 2021, doi: 10.1007/s00216-021-03431-3.
- [45] Y. Mi, X. Li, X. Zeng, Y. Cai, X. Sun, Y. Yan *et al.*, "Diagnosis of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus by label-free serum microsphere-coupled SERS fingerprints with machine learning", *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 260, p. 116414, 2024/09/15/ 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2024.116414>.
- [46] N. Leopold and B. Lendl, "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*, vol. 107, no. 24, pp. 5723-5727, 2003/06/01 2003, doi: 10.1021/jp027460u.
- [47] G. Ion, Chiriac A., M., Ciceo-Lucacel R., A., Moisoiu V., Stefancu A., Iancu S., D. and Leopold N., "Role of Ca²⁺ in SERS: surface Ag⁺ formation and anion adsorption - a mechanistic approach", *Romanian Reports in Physics*, vol. In Press: 2026. [Online]. Available: <https://rrp.nipne.ro/IP/AP849.pdf>, <https://rrp.nipne.ro/IP/AP849.pdf>.
- [48] M. R. Toplak, Stuart; borondics; Levandoski, João E.; Solheim, Johanne; oroue; Blazhko, Vlad; larazupan; Noah; Ajda; achimkohler; Godec, Primož; 1rafaelmayer; Tisor, Austin; Sammut, Letizia; rafael; Rosendahl, Scott M.; Kumar, Rahul, "Quasars/orange-spectroscopy: Release 0.5.8 (Version 0.5.8). Zenodo", 2021, doi: <http://doi.org/10.5281/zenodo.4617978>.
- [49] M. Toplak, S. T. Read, C. Sandt, and F. Borondics, "Quasar: Easy Machine Learning for Biospectroscopy", vol. 10, no. 9, p. 2300, 2021. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/9/2300>.
- [50] S. D. Iancu, R. G. Cozan, A. Stefancu, M. David, T. Moisoiu, C. Moroz-Dubenco *et al.*, "SERS liquid biopsy in breast cancer. What can we learn from SERS on serum and urine?", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 273, p. 120992, 2022/05/15/ 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.120992>.
- [51] L. Selistre, V. de Souza, C. Nicola, L. Juillard, S. Lemoine, and L. Derain-Dubourg, "Average creatinine-urea clearance: revival of an old analytical technique?", *Clinical Kidney Journal*, vol. 16, no. 8, pp. 1298-1306, 2023, doi: 10.1093/ckj/sfad050.
- [52] M.-Z. Wei, Z.-H. Zhao, and J.-Y. Wang, "The diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging in restaging of rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy: a meta-analysis and systematic review", *Journal of Computer Assisted Tomography*, vol. 44, no. 1, pp. 102-110, 2020.

- [53] D. Andras, S. D. Iancu, R. G. Cozan, M. Zetes, G. Crisan, C. F. Buldus *et al.*, "SERS liquid biopsy in colorectal cancer detection and treatment response: Revealing metabolic memory post-radiochemotherapy", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 68, p. 102840, 2025/08/01/ 2025, doi: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2025.102840>.
- [54] J. M. Porcel and R. W. Light, "Diagnostic approach to pleural effusion in adults", *American Family Physician*, vol. 73, pp. 1211-1220, 2006, doi: 10.1378/chest.105.5.1338.
- [55] E. E. McGrath and P. B. Anderson, "Diagnosis of Pleural Effusion: A Systematic Approach", *American Journal of Critical Care*, vol. 20, no. 2, pp. 119-128, 2011, doi: 10.4037/ajcc2011685.
- [56] Z. Chen, Y. Wang, and M. Fang, "Analysis of tumor markers in pleural effusion and serum to verify the correlations between serum tumor markers and tumor size, TNM stage of lung adenocarcinoma", *Cancer Medicine*, vol. 9, no. 4, pp. 1392-1399, 2020, doi: 10.1002/cam4.2809.
- [57] R. G. Cozan, S. Pop, L. M. Crețu, M. Mocan, D. Andraș, D. A. Maniu *et al.*, "Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) metabolite profiling of pleural fluid", *Applied Physics Letters*, vol. 127, no. 25, p. 253703, 2025, doi: 10.1063/5.0300864.