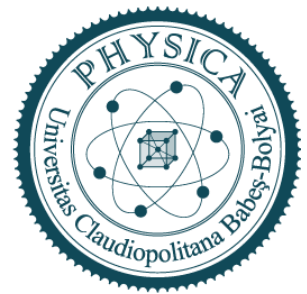




Universitatea Babeş-Bolyai
Facultatea de Fizică
Şcoala doctorală de Fizică



Analiza spectrelor SERS ale biofluidelor prin metode machine learning pentru aplicații clinice

Rezumat teză doctorat

Student doctorand:
Ştefania-Dana Iancu

Conducător:
Prof. dr. Nicolae Leopold

Cluj-Napoca
2023

Content

Abrevieri.....	3
Listă de figuri.....	4
Listă de tabele.....	8
Rezumat.....	10
Cuprins.....	12
Introducere.....	14
Capitol 1. Noțiuni teoretice.....	18
1.1. Spectroscopie amplificată de suprafață Raman (SERS).....	18
Teoria eletromagnetică.....	20
Teoria chimică.....	21
1.2. Markerii ai cancerului detectați prin biopsia lichidă SERS.....	23
Metaboliți purinici.....	23
Proteine.....	24
Carotenoide.....	24
1.3. Metode de analiză a spectrelor SERS.....	26
1.3.1 Machine learning.....	26
1.3.2. Analiză univariată.....	35
Capitol 2. Materiale și metode.....	37
2.1. Prelevarea probelor.....	37
2.2. Sinteza nanoparticulelor de argint.....	37
2.3. Achiziționarea spectrelor SERS.....	38
2.4. Metode de analiză a spectrelor SERS.....	40
Capitol 3. Rezultate și discuții.....	42
3.1. Alegerea biofluidului optim pentru biopsia lichidă SERS.....	42
Introducere.....	42

Materiale și metode.....	43
Rezultate și discuții	43
Concluzie	57
3.2. Detecția cancerului prin analiza SERS a urinei.....	59
Introducere	59
Materiale și metode.....	59
Rezultate și discuții	60
Concluzie	63
3.3. Analiza SERS a urinei ca metodă de reducere a biopsiilor necesare	64
Introducere	64
Materiale și metode.....	65
Rezultate și discuții	68
Concluzie	75
3.4. Optimizarea metodelor de analiză a spectrelor SERS.....	76
3.4.1. Este nevoie de Analiza în Componente Principale?.....	76
3.4.2. Selectarea Componentelor Principale cu conținut discriminatoriu.....	78
3.4.3. Proiectarea spectrelor SERS a biofluidelor pe vector reprezentând spectrele ale metabolizilor purinici, uree și creatiniă.....	83
3.4.4. Detecția cancerului folosind analiza univariată a spectrelor SERS ale serului.....	92
Concluzii finale	98
Lista publicațiilor din domeniul tezei	100
Lista publicațiilor.....	101
Mulțumiri	104
Referințe	105

Cuvinte cheie

Spectroscopie amplificată de suprafață Raman (SERS); machine learning, detecția cancerului; suport de decizie; biopsie lichidă.

Introducere

Spectroscopia clinică este un domeniu de cercetare emergent a cărui scop este translatarea spectroscopiei optice în mediul clinic în vederea îmbunătățirii diagnosticului medical. Domeniul s-a dezvoltat ca răspuns la necesitatea unor tehnici necostisitoare și rapide ca alternativă pentru metodele curente de diagnostic, în special în cazurile unde patologiele trebuie să fie detectate în stadii incipiente pentru a putea fi tratate, cum ar fi cancerul.

Specotroscopia Raman, în special tehnica amplificată spectroscopia Raman amplificată de suprafață a câștigat multă atenție pentru aplicații clinice datorită sensibilității ridicate și a ușurinței de utilizare a unui spectrometru Raman portabil. Cu toate acestea, implementarea ei în mediul clinic este încetinită de lipsa unui ghid standard de utilizare și de lipsa unui studiu care să demonstreze aplicabilitatea SERS în diagnosticul medical realizat pe o cohort mare de pacienți.

Prezenta teză de doctorat nu urmărește dezvoltarea unor noi metode de achiziționare a spectrelor SERS cu aplicabilitate clinică și nici detecția unor noi compuși, ci se axează pe îmbunătățirea analizării spectrelor SERS a biofluidelor. Este important de menționat că majoritatea datelor prezentate în această lucrare au fost achiziționate folosind un spectrometru Raman portabil ce se pretează pentru diagnosticul de tip point-of-care.

Capitolul 1

Primul capitol prezintă aspect teoretice ale spectroscopiei SERS, împreună cu o scurtă introducere în modelele de machine learning utilizate în această teză.

SERS este o metodă de amplificare a efectului de împrăștiere Raman pentru moleculele adsorbite pe o suprafață metalică. Amplificarea semnalului Raman are două explicații: amplificarea dată de câmpul electromagnetic amplificat e la suprafața metalică și amplificarea dată de un transfer electronic între metal și molecula adsorbită la suprafața metalului. Teoria electromagnetică explică efectul SERS ca un rezultat al oscilației plasmonilor de suprafață, care creează un câmp electromagnetic amplificat în jurul structurii metalice ce interacționează cu moleculele din proximitatea metalului. Plasmonii reprezintă moduri proprii de oscilație colectivă a electronilor cuasi-liberi din metale. Diametrul nanoparticulelor este mai mic decât adâncimea de penetrare a

undelor electromagnetice în metale. Prin urmare, unda electromagnetică oscilează “prin” metal și mută electronii cvasi-liberi către un pol al nanoparticulei (Figura 1).

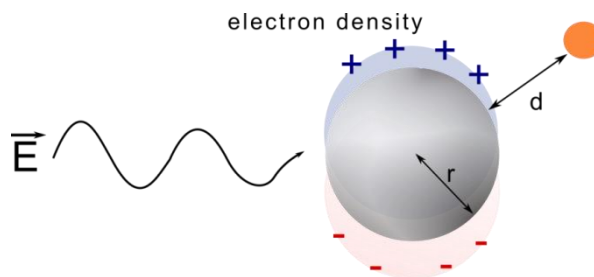


Figura 1. Formarea unui dipol electric într-o sferă metalică nanometrică.

Ionii din rețea din celălalt pol al nanoparticulei, care au o acțiune parțial pozitivă ca forță de restaurare pentru electronii liberi. Prin urmare, electronii vor oscila între cele două poli, ca rezultat al câmpului electromagnetic incident și forței de restaurare din ionii din rețea. [1]. Condiția de rezonanță este îndeplinită la frecvența la care are loc tranziția între transparenta metalului și absorbția unei electromagnetice. Oscilația plasmonilor creează un câmp electromagnetic în jurul nanoparticulei E_{SPR} , care se cuplează cu radiația incidentă rezultând un câmp electromagnetic amplificat. Intensitatea acestui câmp descrește cu cât distanța față de suprafața nanoparticulei (d) crește și este dependent de diametrul nanoparticulei ($2r$) și de constanta dielectrică a nanoparticulei (ϵ) și a mediului (ϵ_0).

$$E_{SPR} = r^3 \frac{\epsilon - \epsilon_0}{\epsilon + 2\epsilon_0} E_0 \frac{1}{(r+d)^3} \quad (1)$$

Amplificarea chimică necesită existența unui transfer de sarcină între metal și molecula analizată (Figura 2) [2], fiind descrisă de două efecte: fizisorpție și chemisorpție [3]. Fizisorpția implică o interacțiune slabă de tip van der Waals între moleculă și metal, fără ca nivelurile electronice ale moleculei să fie modificate. Chemisorpția constă în formarea unui ansamblu metal-moleculă prin hibridizarea orbitalilor moleculei adsorbite și a metalului. Efectul SERS reprezintă în acest model un transfer electronic între ultimul orbital molecular ocupat (HOMO) și primul orbital molecular neocupat al complexului metal-moleculă [4].

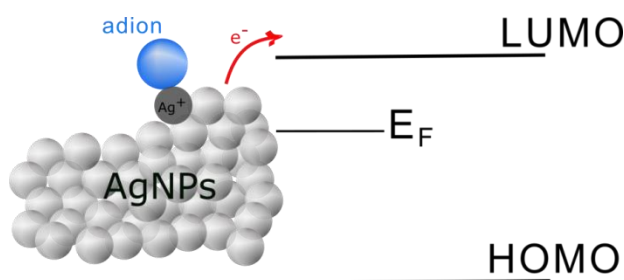


Figura 2. Transferul de sarcină dintre nanoparticulă și o moleculă adsorbită pe suprafața metalică.

Adsorbția moleculelor la suprafața substratului metalic poate avea loc spontan sau promovată de ioni specifici. Adsorbția spontană este specifică pentru moleculele cu afinitate ridicată pentru suprafața metalică, de exemplu molecule care conțin grupări tiol. Totuși, nu toate moleculele interacționează puternic cu suprafețele metalice și ca urmare nu adsorb spontan la suprafața metalice. Pentru aceste molecule, a fost demonstrat recent că adsorbția lor la suprafața structurilor metalice poate fi promovată prin intermediul ionilor precum Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , Br^- , I^- , metodologie care deschide calea către obținerea spectrului SERS și ale moleculelor cu afinitate scăzută pentru suprafața metalică [5]. De exemplu, spectrul SERS al moleculelor anionice acid salicilic, acid fumaric a fost observat. For example, the SERS spectra of anionic molecule such as salicylic acid, fumaric acid is observed după adăugarea adionilor Ca^{2+} , Mg^{2+} la amestecul de acid organic și nanoparticule de argint [6]. Mecanismul care conduce la amplificarea semnalului SERS al moleculelor anionice în prezența acestor ioni nu este întrutotul cunoscut. Pe de altă parte, pentru ionii Cl^- , Br^- , I^- s-a demonstrat că promovează adsorbția moleculelor cationice precum Nile Blue, Methylene Blue sau Cresyl Violet la suprafața nanoparticulelor de argint. Un studiu recent a arătat că ionii halogenoizi conduc la creșterea nivelului Fermi a nanoparticulelor, făcând posibil un transfer electronic de la nanoparticulă la molecula de Methylene Blue adsorbită pe suprafață. Acest transfer electronic a fost evidențiat prin reducerea moleculei de Methylene Blue în prezența ionilor halogenoizi și a radiației incidente ce se potrivește cu diferența energetică dintre nivelul Fermi modificat de adioni și orbitalii moleculei de Methylene Blue [7].

Teoria electromagnetică nu poate explica lipsa amplificării SERS în cazul unor molecule precum apa, surfactantul nanoparticulelor, în timp ce efectul chimic nu poate fi responsabil în totalitate pentru amplificarea efectului SERS întrucât ordinul de amplificare observat în SERS este cu câteva ordine de mărime mai mare decât cel explicat prin teoria chimică. În concluzie, efectul SERS reprezintă o contribuție comună a celor două efecte.

În continuare, primul capitol introduce moleculele din biofluide detectate prin spectroscopia SERS: metaboliți purinici, carotenoide și proteine. Rezultatele promițătoare ale biopsiei lichide SERS derivă din faptul că nivelurile de metaboliți purinici, proteine și carotenoizi sunt informativi privind rata de întoarcere celulară, inflamația și stresul oxidativ, respectiv. Aceste procese sunt perturbate în aproape orice boală, de la cancer la boli autoimune. **Metaboliții purinici** sunt o clasă de molecule rezultate din catabolizarea bazelor nitrogenate purinice (adenină și guanină), pornind de la inozină, hipoxantină, xantină și produsul final acidul uric (Figura 3). Pe de altă parte, bazele nitrogenate pirimidinice (timina, citozina și uracil) se descompun în apă și dioxid de carbon [8].

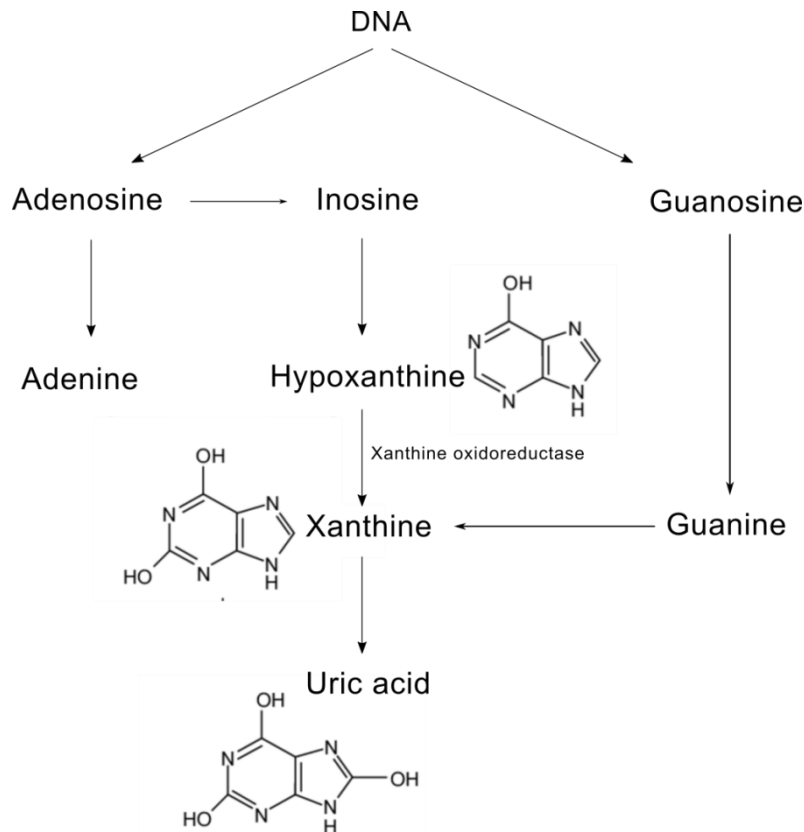


Figura 2. Reprezentare simplă a metabolismului bazelor azotate purinice.

În continuare, teza se axează pe descrierea algoritmilor de tip machine learning (ML) utilizați pentru analizarea datelor spectrale SERS a biofluidelor, în vederea clasificării probelor în cancer și control. Ideea centrală a ML este că un algoritm care a câștigat experiență pentru o anumită sarcină (învățând dintr-un set de date numit set de antrenare) ar trebui să ofere rezultate satisfăcătoare (sau cel puțin similar comparativ cu setul de antrenare) pe un nou input nevăzut anterior numit set de testare. Sarcina este problema de clasificare care va fi realizată cu o anumită performanță măsurată prin metricele de performanță. Pentru a rezolva o sarcină, clasificatorii ML învață din grupul de antrenare prin extragerea caracteristicilor relevante, pragurilor sau densităților. Experiența este aplicată pe un nou set de date pentru a fi evaluată. Performanța modelelor ML poate fi ajustată prin schimbarea pragurilor de eroare, a funcției implicate în discriminare sau a parametrilor modelelor ML. Alegerea modelului ML și a parametrilor acestora este un proces de încercare și eroare. Metricele de performanță ale ML cu diferiți parametri sunt determinate pe un set de validare, diferit de setul de antrenare și setul de testare. De ce avem nevoie de trei seturi de date diferite?

Precum am menționat anterior, ML se definește prin trei pași importanți: câștigarea experienței, care se referă la construirea propriu-zisă a modelului prin învățarea unui tipar pe baza serului de date de antrenare; pentru a înclina algoritmul către sarcina pe care dorim să o realizăm variem parametrii modelelor, a căror performanță o vom analiza pe baza unui set de date de validare; în

final algoritmul contruit pe setul de date de antrenare, cu parametrii optimi determinați folosind setul de date test va fi validat extern pe un nou set de date numit set de validare. Seturile de date de antrenare, testare și validare sunt independente, dar trebuie să fie similar distribuite [9].

Diferențele dintre algoritmi ML utilizați în această teză sunt reprezentate de criteriile matematice utilizate pentru a clasifica setul de date în două grupuri. Înainte de algoritmi de clasificare, dimensiunea datelor este redusă utilizând, de exemplu, Analiza Componentelor Principale (PCA), un algoritm nesupravegheat care găsește vectorii care reprezintă variația cea mai mare în setul de date. Apoi, metodele supravegheate care iau în considerare și categoria fiecărui exemplu extrag caracteristicile esențiale pentru a diferenția clasele/grupele. Analiza Discriminantă Lineară (LDA) găsește vectorii care minimizează variația din fiecare grup și maximizează distanța dintre grupuri și reprezintă datele pe acești vectori. În spațiul de reprezentare nou, se caută o linie care separă cele mai bine grupurile. Mutându-ne de la o linie care separă cele mai bine grupurile (de exemplu LDA) la o limită mai complexă cum ar fi un plan, vom vorbi despre Mașina de Vector de Suport (SVM). SVM se bazează pe transformarea caracteristicilor în puncte într-un spațiu cu mai multe dimensiuni și găsirea unui hiperplan care ar separa clasele. Când clasele nu sunt separat linearly în spațiul inițial, datele sunt transformate într-un spațiu nou cu o dimensiune mai mare utilizând o funcție nucleu (transformare liniară, polinomială sau mai complexă). Pentru orice set de date există o funcție nucleu care permite datelor să fie separate linear. [10]. Totuși adăugarea unei dimensiuni suplimentare, crește riscul de overfitting. În noul spațiu se caută o linie care să separe clasele. Modelul caută o linie de frontieră pentru care distanța dintre ea și punctul cel mai apropiat din fiecare clasă este maximă. Astfel, SVM se concentrează pe mostrele de la marginea fiecărei clase, numite vectori de susținere.

Logistic Regression (LR) este cel mai utilizat model statistic în aplicații medicale cu răspuns binar [11], datorită posibilității analizării importanței fiecărei variabile în atingerea rezultatului. LR utilizează o funcție Sigmoid (Ecuația 2), pe care o aplică asupra sumei ponderate a datelor de intrare (o combinație liniară a caracteristicilor de intrare). Funcția Sigmoid ia valori între 0 și 1. Pentru fiecare probă obținem o probabilitate (de la 0 la 1) pentru ca proba să corespundă clasei 0 sau clasei 1.

$$\text{sigmoid}(x) = \frac{1}{1+e^{-x}} \quad (2)$$

Random Forest (RF) conține mai mulți copaci de decizie necorelați, reprezentați de clasificatori simplii pe modelul deciziei dacă-atunci, altfel. Fiecare copac analizează un subset de date și extrage variabilele semnificative pentru decizia determinării grupei din care fiecare probă face parte. Copacii oferă un rezultat independent, care ulterior va fi decis pe baza votului majoritat a tuturor copacilor implicați. Practic, fiecare copac reprezintă un model diferit de decizii, prin care proba va fi trecută,

decizia finală fiind categoria care a fost atribuită de majoritatea copacilor de decizie. Avantajul major al RF este influența mică a datelor de tip outlier și a datelor cu multă informație care nu ajută la discriminarea datelor [12]. Mai mult, RF nu este afectat de pașii de pre-procesare prin care datele sunt trecute înaintea construirii modelului [13].

Algoritmii Gaussian Naïve Bayes (GNB) au la bază teorema Bayes, care pornește de la prezumția că datele input sunt independente și părezintă o distribuție gaussiană. Modelul calculează probabilitatea a unui eveniment să se întâmple, știind că un alt eveniment s-a întâmplat deja. Produsul tuturor probabilităților este calculat și ipoteza ca o probă să aparțină unei grupe este acceptată și respinsă pe baza rezultatului.

kNN este un model nonparametric care pornește de la ideea că obiectele aparținând aceleași grupe se află în apropiere unul față de altul [14]. Astfel, kNN calculează distanțele dintre k vecinii, și atribuie o clasă probei pe baza clasei probelor aflate la distanța cea mai mică față de proba analizată.

Capitol 2

Capitolul 2 prezintă materialele și metodele comune tuturor studiilor prezentate în această teză.

Capitol 3

Capitolul 2 evidențiază rezultatele acestei lucrări, fiind împărțit în 4 mari subcapitole focusate pe determinarea biofluidului optim pentru analiza SERS, aplicații ale spectroscopiei SERS în vederea diagnosticului clinic al cancerului și îmbunătățirea abordărilor de analiză și clasificare a datelor SERS.

Subcapitolul 3.1. se focusează pe atribuirea semnalelor SERS a probelor de ser și urină și comparația performanței celor două biofluide analizate prin tehnica SERS în vederea screening-ului cancerului de sân. Acurateți de clasificare a probelor cancer și control de peste 80% prin utilizarea spectroscopiei SERS în analizarea biofluidelor recomandă această tehnică pentru aplicații clinice, urina prezentând avantaje. Comparând performanța spectrelor SERS a serului și urinei provenit de la aceeași pacienți în clasificarea pacienților cu cancer și control, am obținut o acuratețe de clasificare ușor mai ridicată pentru urină. Profilul spectral al celor două biofluide, ser și urină este similar, spectrele fiind în principal dominate de benzile SERS ale metaboliților purinici (Figura 4). Întrucât profilul metabolic detectat prin SERS al urinei și serului este și similar, analiza urinei ar fi o metodă mai avantajoasă datorită metodei de recoltare neinvazivă a acesteia.

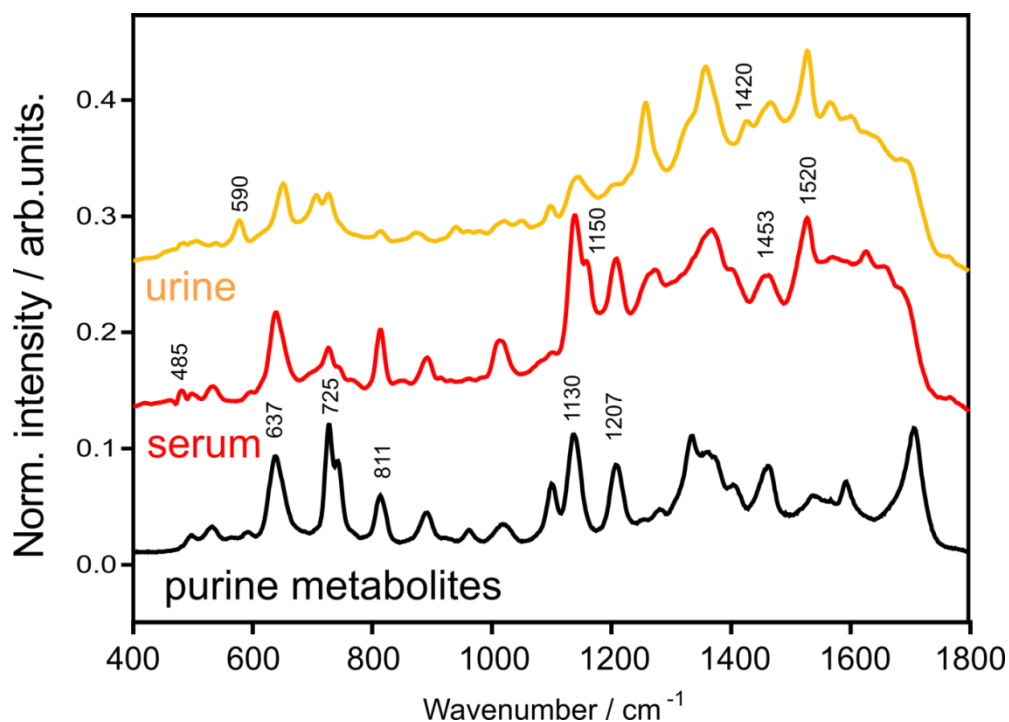


Figura 4. Similarități între spectrele SERS a urinei, serului și a unui amestec de acid uric, hipoxantină și xantină.[15]

Pentru a atribui benzile SERS, au fost achiziționate spectre SERS ale soluțiilor pure de acid uric, hipoxantină, xantină, creatinină și uree (Figura 5).

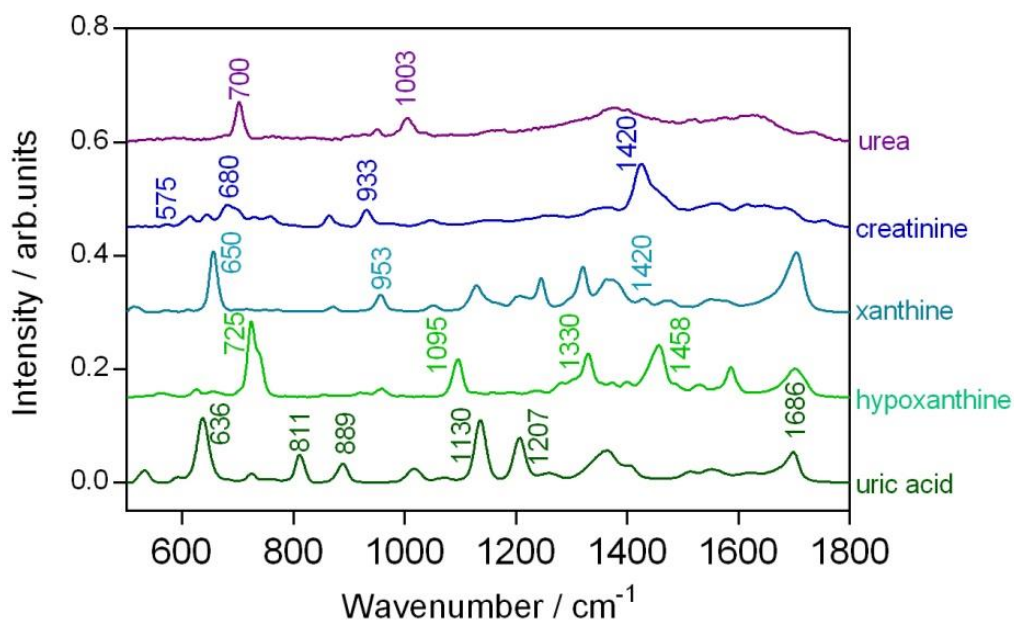


Figura 5. Spectrele SERS ale soluțiilor pure de 10^{-4} M acid uric, 10^{-4} M hipoxantină, 10^{-4} M xantină, 10^{-4} M creatinină and 10^{-2} M uree.

Benzile SERS observate în Figura 5, împreună cu concentrațiile fiziologice a acestor compuși în ser și urină sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabel 1. Concentrațiile fiziologice a metaboliților și atribuirea benzilor SERS pentru biofluidele ser și urină.[15]

Metabolit	Ser [16]	(μM)	Urină (μmol/mmol creatinină) [16]	level	SERS bands (cm ⁻¹)		
					Ser	Urină	Ser și urină
Ergotioneină	0.84 – 1.52				482 [17]		
Acid uric	200 – 420		100 – 800		592, 637, 1260, 1368, 1686		499, 533, 725 811, 886, 1136, 1206
Uree	4000– 8000		6000– 30000			700	
Creatinină	25 – 100					575, 1420, 1459 [18]	
Hipoxantină	8 – 14		1.8 – 24.1		740, 1450, 1686	958	725, 1093
Xantină	0.5 – 2		0 – 30		1368, 1686	1250	
Carotenoide					1150, 1520 [19]		

Dintre metaboliții purinici, acidul uric se găsește în cea concentrație în biofluide (Tabel 1. **Concentrațiile fiziologice a metaboliților și atribuirea benzilor SERS pentru biofluidele ser și urină.**Tabel 1) și ca urmare are cea mai mare contribuție și în spectrul SERS (benzi SERS 637, 811, 889, 1130 and 1207 cm⁻¹). Contribuția lui este mai pronunțată în spectrele SERS ale serului comparativ cu urina, deși concentrația acidului uric este mai scăzută în ser. Acest rezultat este explicat pe variația spectrului SERS a acidului uric ca urmare a pH-ului diferit în cele două biofluide observat prin achiziționarea spectrului SERS al amestecului acid uric, hipoxantină și xantină a fost achiziționat la diferite valori pH, spromiate de valorile realie ale serului și urinei (Figura 6).

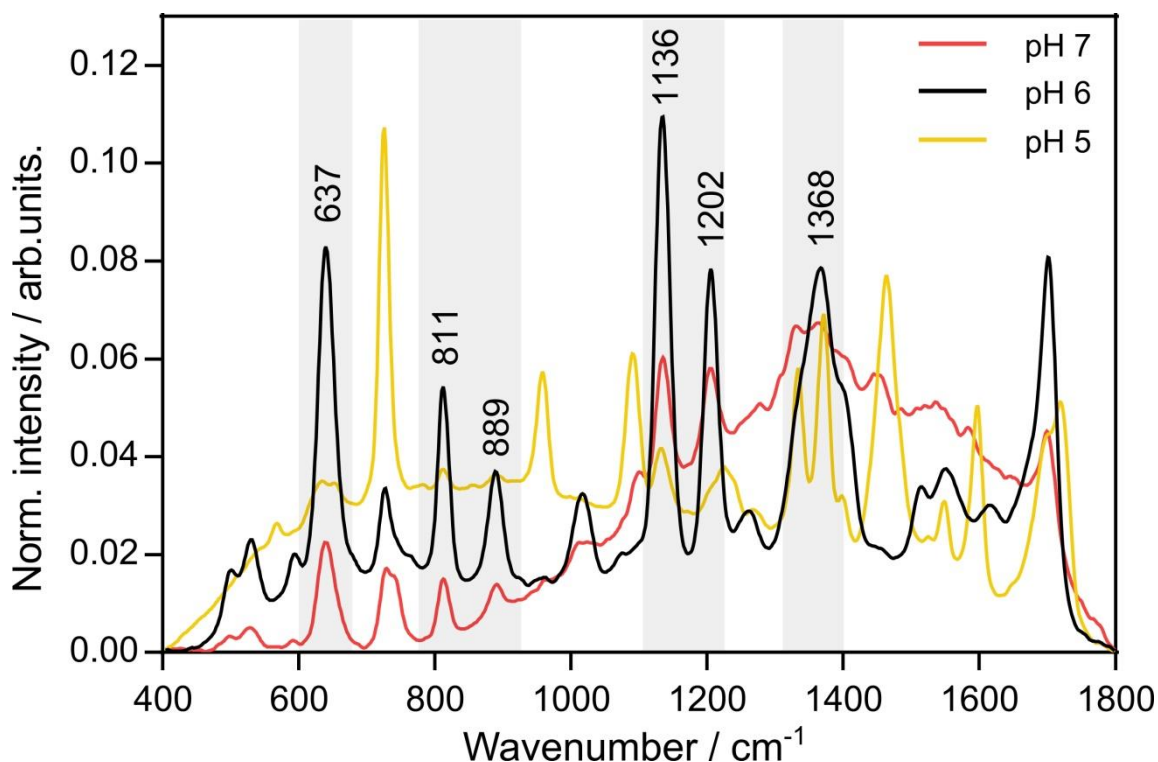


Figura 6. Spectrele SERS ale unui amestec de 0.1 mM acid uric, 0.1 mM xantină, 0.1 mM hipoxantină la pH 5, pH 6 and pH 7. [20]

Dublețul de benzi la 724 and 740 cm^{-1} este atribuit hipoxantinei (Figura 5), banda SERS 724 fiind o contribuție comună a hipoxantinei și a acidului uric. Benzile SERS 1368 and 1686 cm^{-1} nu pot fi atribuite unui singur metabolit, întrucât acestea sunt observate în spectrele SERS ale tuturor metaboliților purinici.

Pe lângă similaritățile observate între spectrele SERS ale serului și urinei datorită contribuției SERS a acidului uric și hipoxantinei, se delimitează trei mari diferențe. Spectrul SERS al serului prezintă benzi Raman ale carotenoidelor la 1150 cm^{-1} și 1520 cm^{-1} , atunci când radiația incidentă îndeplinește condiția de rezonanță [21]. În plus, spectrele SERS ale serului conțin o bandă SERS la 482 cm^{-1} , caracteristică ergotioneinei [17]. Pe de altă parte, spectrul SERS al urinei conține benzi SERS caracteristice creatininei la 575 , 1421 and 1453 cm^{-1} [18].

Deoarece informația spectrală este similară în urină și ser, alegerea biofluidului se face pe baza accesibilității. În plus, urina, care este colectată prin metoda non-invazivă, arată o precizie de clasificare ușor mai mare pentru screening-ul cancerului de sân bazat pe spectroscopia SERS și modelele ML.

Subcapitolele 3.2 și 3.3 prezintă performanța analizării urinei prin spectroscopiei SERS combinată cu metode de analiză machine learning în vederea dezvoltării unei metode de screening al cancerului de vezică și prostată sau de decizie a biopsiei a pacienților suspecți de cancer de prostată.

În aceste subcapitole, evidențiez potențialul biopsiei SERS din urină ca metodă de screening pentru cancerul de vezică urinară, atingând precizii de clasificare cuprinse între 78-87%, în funcție de clasificatorul implicat. Biopsia SERS din urină a fost anterior arătat a fi un instrument eficient de screening pentru o varietate de cancere. Cu toate acestea, cercetarea mea a arătat că prin incorporarea informațiilor complementare precum microRNA, precizia clasificării cancerului de vezică urinară și a controalelor poate fi îmbunătățită. Prin combinarea SERS cu o tehnică complementară precum microRNA, precizia clasificării crește la 86-97% (Figure 7).

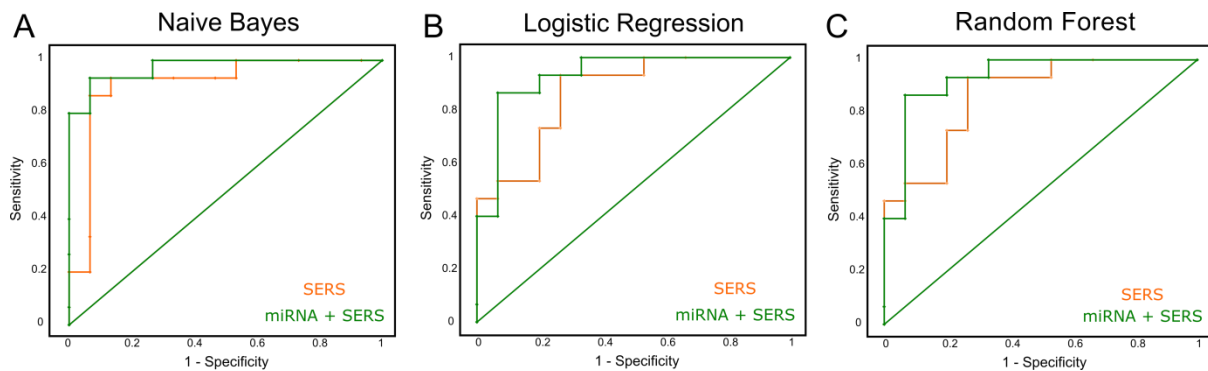


Figura 7. Curbele receiver operating characteristic (ROC) pentru clasificarea probelor de cancer de vezică și control pe baza combinației dintre spectrele SERS și miRNA folosind trei algoritmi de clasificare (naïve Bayes (A), logistic regression (B), and random forest (C)).

În ceea ce privește cancerul de prostată, SERS atinge o acuratețe de clasificare a pacienților cancer și control de 80.95%, cu o sensibilitate de 80% și o specificitate de 81.81% (Table 2).

Tabel 2. Metricile de performanță a clasificatorilor machine learning aplicați pe scorurile PC1 și PC2 pentru grupul de validare care conține 21 de probe de urină provenite de la pacienți cu cancer de prostată (Pca), respective patologie benignă de prostată (BPH).

Classifier	AUC	CA	F1	Precision	Recall	Specificity
SVM	0.945	0.762	0.759	0.788	0.762	0.774
Random Forest	0.904	0.857	0.857	0.861	0.857	0.861
Naïve Bayes	0.840	0.714	0.714	0.714	0.714	0.713
kNN	0.927	0.762	0.755	0.782	0.762	0.747
Logistic Regression	0.945	0.857	0.856	0.859	0.857	0.852

Trecând de la utilizarea biopsiei SERS din urină ca instrument de screening, care țintește pentru specificitate și sensibilitate echilibrate, la un instrument de sprijin, unde scopul este să se asigure că niciun pacient atribuit ca adevărat pozitiv nu este pierdut, s-a constatat că biopsia SERS a urinei este utilă ca instrument de sprijin pentru a reduce numărul de biopsii inutile la pacienții suspecti de

cancer de prostată. Am demonstrat că prin ajustarea fină a unui clasificator de învățare automată, se poate obține o sensibilitate de 100% pentru pacienții cu leziuni Prostate Imaging-Reporting and Data System (PI-RADS) 3 (pacienți pentru care recomandarea clinică pentru biopsie este ambiguă) cu costul unei specificități reduse de la 81.81% pentru instrumentul de screening la 41.67% pentru instrumentul de sprijin. Acest rezultat sugerează că utilizând această configurație, 10 din 24 de pacienți ar fi putut fi salvați de biopsii inutile de prostată.

Tabel 3. Valorile prag și specificitatea modelelor machine learning pentru setul de training atunci când se atinge sensibilitate 100%.

ML	Valoare prag	Senzitivitate	Specificitate
SVM	0.22	1.00	0.630
Random Forest	0.42	1.00	0.815
Naïve Bayes	0.23	1.00	0.481
kNN	0.51	1.00	0.510
Logistic Regression	0.08	1.00	0.556

Doresc să evidențiez faptul că rezultatele prezentate în acest studiu reprezintă performanțele algoritmilor de clasificare și a spectrelor SERS ale urinei obținute prin validare externă. Setul de date pe care au fost validate modelele nu a fost utilizat pentru a antrena algoritmi. Rezultatele similare obținute prin validarea încrucișată în interiorul setului de date de antrenare (Tabel 3) și prin validarea externă (Tabel 4) susțin fiabilitatea rezultatelor și posibilitatea plicării modelului pe alte probe.

Tabel 4. Performanța ansamblului de machine learning construit pe baza votului majoritar rezultată pentru validarea externă. Matricea de confuzie pentru clasificarea probelor de cancer de prostată (PCa) și patologie benignă de prostată (BPH) cu scor PI-RADS 3 a probelor din setul de date test.

		Sample	
		PCa	BPH
Actual	PCa	10	0
	BPH	14	10

Interorarea probelor de ser prin spectroscopie SERS combinată cu un ansamblu de algoritmi ML a atins o sensibilitate de 100% și o specificitate de 41.67% pentru stratificarea pacienților PCa și BPH.

Subcapitolul 3.4. se focusează pe dezvoltarea modelelor statistice utilizate pentru analizarea spectrelor SERS ale biofluidelor. Necesitatea Analizei în Componente Principale (PCA), care

reprezintă cel mai utilizat algoritm de reducere a dimensionalității datelor spectroscopice este pusă sub semnul întrebării în **subcapitolele 3.4.1 and 3.4.2**.

În continuare focusul tezei se va muta de la valorificarea utilizării spectroscopiei SERS în screening-ul sau deciziile clinice către îmbunătățirea algoritmilor utilizați pentru analizarea spectrelor SERS ale biofluidelor. În mod specific, se examinează necesitatea utilizării PCA ca pas de prelucrare a datelor înainte de aplicarea modelelor de clasificare. Majoritatea clasificatorilor învățării automate depind de o tehnică de reducere a dimensiunii care oferă variabile ortogonale, indiferent dacă aceasta îmbunătățește sau nu precizia clasificării. De asemenea, se demonstrează că prin aplicarea unui algoritm de selecție folosind Student's t-test aplicat pe scorurile componentelor principale și alimentarea clasificatorilor doar cu informație discriminatorie, precizia clasificării poate fi îmbunătățită. Întrucât nu toate componentele principale (PCs) conțin informații discriminative, deoarece PCA este o tehnică nesupervizată, vectorii PCs pot accentua informații care nu sunt de ajutor în discriminarea grupurilor de interes. Analizarea unui set de date de spectre SERS de la n=23 pacienți cu cancer renal (RCC) și n=27 pacienți control (CTRL) arată că acuratețea de clasificare a clasificatorilor de tip machine learning poate fi îmbunătățită de la 60-67%. unde au fost folosite ca variabile primele 9 PCS la 76-86% prin utilizarea ca variabile a PC-urilor pentru care grupurilor RCC și CTRL au scoruri diferite.

PCA a fost aplicată spectrelor SERS ale serului provenit de la pacienți RCC și CTRL pentru a reduce dimensionalitatea datelor. Primele 9 PCs au fost păstrate întrucât informația explicată de acestea cumulează un procent de 98% (Figura 8) și nu introduc informație redundantă în noul set de vectori.

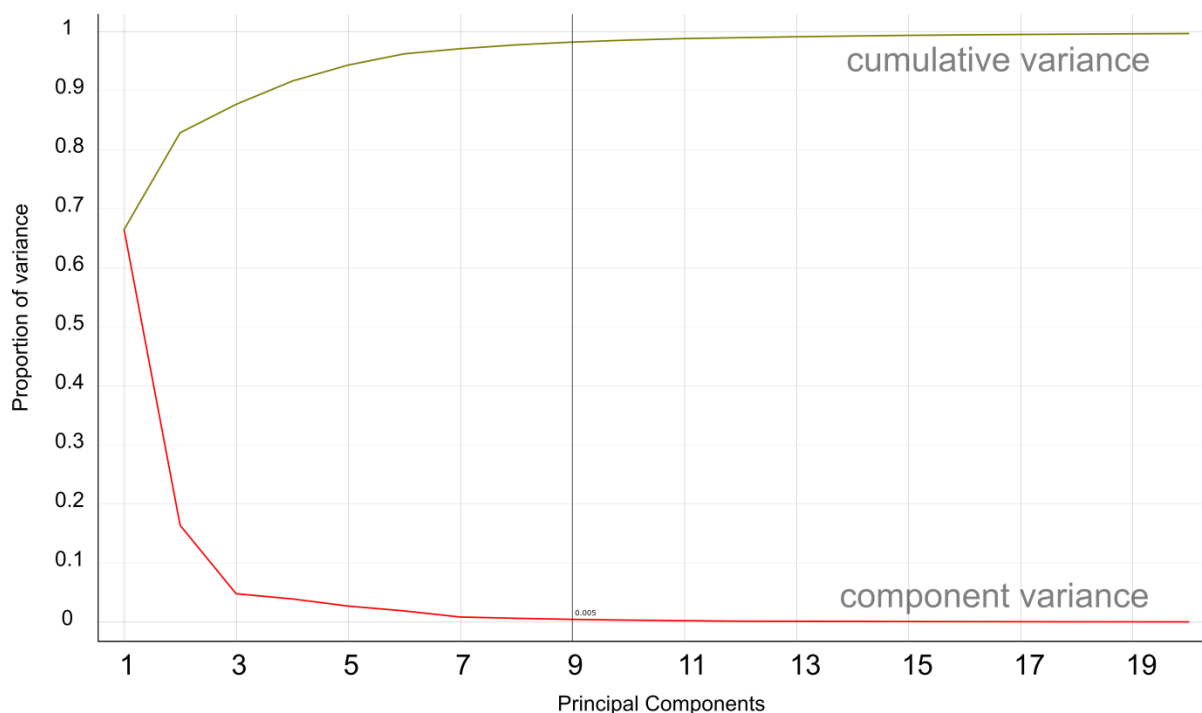


Figura 8. Variața explicată de fiecare componentă principală (roșu) și cumulată (galben).[22]

Diferențele dintre scorurile grupurilor RCC și CTRL pe toate cele 9 PC-uri a fost testată folosind Student's t-test. Scorurile grupurilor pe PC2 și PC6 au fost găsite ca fiind semnificativ diferite ($p < 0.05$). Naive Bayes, Logistic Regression și Random Forest au fost folosiți pentru a testa performanța spectroscopiei SERS în screening-ul RCC. Cei trei algoritmi au fost prima dată antrenați și validați folosind ca variabile primele 9 PCs, obținându-se acurateți de clasificare de 60-67% (Tabel 5).

Tabel 5. Metricile de performanță a clasificatorilor machine learning (Naive Bayes, logistic regression, and random forest) pentru clasificarea cancerului renal (RCC) și probelor control (CTRL) pe baza primelor 9 componente principale.

ML model	AUC	CA	F1	Precision	Recall
Naive Bayes	0.74	0.63	0.63	0.63	0.63
Logistic regression	0.58	0.60	0.60	0.60	0.60
Random forest	0.71	0.67	0.66	0.67	0.67

Aceiași algoritmi au fost aplicați cu același scop, folosindu-se ca variabile doar PC-urile care au distribuție semnificativ diferită în grupurile RCC și CTRL, respectiv PC2 și PC6. În acest caz, acuratețea de clasificare a RCC și CTRL a crescut la 76-86% (Tabel 6). Prin urmare, numărul de PC-uri nu ar trebui să fie ales pe baza procentului de informație cuprinsă în acestea, ci în funcție de tipul de informație (dacă este informație discriminatorie sau nu).

Tabel 6. Metricile de performanță a clasificatorilor machine learning (Naïve Bayes, logistic regression, and random forest) pentru clasificarea cancerului renal (RCC) și probelor control (CTRL) pe baza componentelor principale 2 și 6.

ML model	AUC	CA	F1	Precision	Recall
Naïve Bayes	0.91	0.86	0.86	0.86	0.86
Logistic regression	0.83	0.76	0.76	0.76	0.76
Random forest	0.84	0.80	0.79	0.80	0.80

În **subcapitolul 3.4.3**, am investigat contribuția metaboliților purinici, creatininei și ureei la spectrele SERS ale biofluidelor folosind metode matematice de analiză a spectrelor. Pornind de la ideea că informația majoritară din spectrele SERS ale biofluidelor provine de la acid uric, hipoxantină, xantiă, creatinină și uree spectrele SERS ale serului au fost proiectate pe vectori care reprezintă spectre SERS ale acestor substanțe pure. În acest mod, s-a redus redus numărul de variabile nu prin folosirea unei condiții matematice (de exemplu în PCA se aleg vectorii pentru care datele prezintă varianță maximă), precum varianță maximă, distanță maximă între două sau mai multe puncte etc, ci prin alegerea vectorilor cunoscuți ca fiind reprezentativi pentru molecule ce se regăsesc în biofluide. Scorul obținut prin proiectarea fiecărui spectru SERS pe fiecare vector reprezentând spectrul SERS al unui metabolit au fost utilizate ca variabile pentru construirea unui model de clasificare pentru diferențiere pacienților cu cancer de pacienți control.

Folosind această metodă de reducere a dimensionalității datelor se poate determina care metabolit este responsabil pentru clasificarea rezultată. Mai mult, în spectrele SERS mai multe variabile pot descrie o singură vibrație, iar mai multe vibrații sunt caracteristice unei singure molecule. Prin metode de reducere a dimensionalității datelor precum PCA nu se ține cont de relația dintre benzile de vibrație care provin de la aceeași moleculă. Forțând descompunerea spectrelor pe vectori reprezentând spectrele SERS ale acidului uric, hipoxantinei, xantinei, creatininei și ureei se păstrează relație dintre benzile de vibrație care provin de la o singură moleculă.

Am aplicat acest model de reducere a dimensionalității datelor pe un set de date reprezentând spectrele SERS ale serului de la pacienți cu cancer de prostată (n=30) și pacienți control (n=20). Distribuția scorului acidului uric, hipoxantinei, xantinei, ureei și creatininei pentru grupul cancer și control este reprezentată în figura 10.

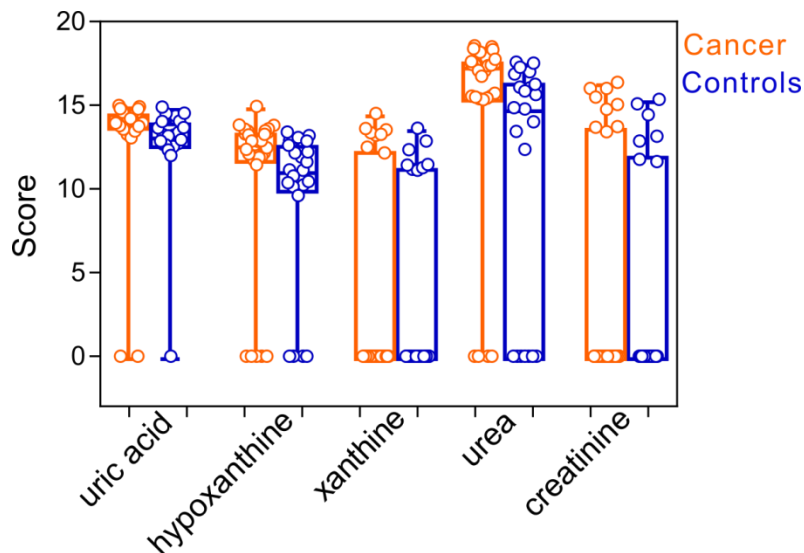


Figura 10. Distribuția scorurilor acidului uric, hipoxantinei, xantinei, ureei și creatininei în grupul cancer și control.

T-test a fost utilizat pentru a determina care dintre cei 5 metaboliți au contribuții diferite în grupul cancer față de control. Scorurile acidului uric ($p=0.001$), hipoxantinei ($p=0.017$) și ureei (0.003) au fost găsite ca având distribuții diferite în cele două grupuri, în timp ce scorurile xantinei și creatininei au avut valori similare indiferent de grup.

Folosind scorurile acidului uric, hipoxantinei și ureei s-a construit o variabilă ce reprezintă o combinație liniară cu ponderi egale a celor trei metaboliți, pe baza căreia s-a construit un model de clasificare univariat. Modelul de clasificare a fost analizat folosind curva receiver operating characteristic (ROC) a cărei arie de sub curbă a atins o valoare de 0.69 cu semnificație statistică ($p=0.02$) (Figura 11).

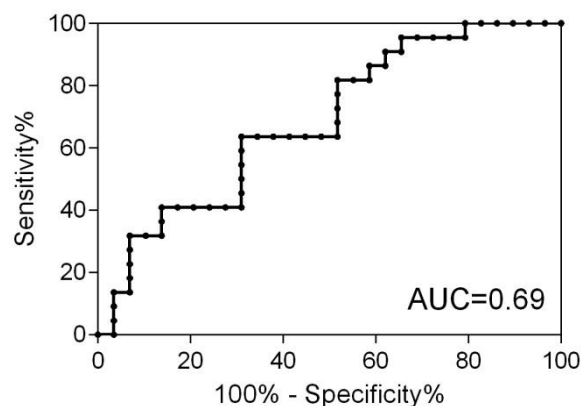


Figura 11. Curba receiver operating characteristic pentru clasificarea cancerului de prostată și probele control pe baza proiecției spectrelor SERS ale serului pe vectori caracterizând acidul uric, hipoxantinei și urea.

Acuratețea de clasificare obținută este similară cu cea atinsă de modele de clasificare ML aplicate după reducerea dimensionalității datelor folosind PCA (64-71%).

În **subcapitolul 3.4.4** a fost dezvoltat un model de clasificare univariat al spectrelor SERS ale serului pacienților cu diverse malignități de spectrele SERS ale serului al pacienților control. Modelul statistic univariat a fost construit pe baza raportului benzilor SERS $740/725\text{ cm}^{-1}$, care a fost corelat cu variația concentrației de acid uric și hipoxantină din ser. Modelul univariat a fost validat pe 6 seturi de date din articole publicate, ce reprezintă aplicații ale spectroscopiei SERS în screening-ul diferitelor tipuri de cancer, spectrele fiind achiziționate pe parcursul a doi ani folosind spectrometre Raman diferite.

Prin analiza vizuală a spectrelor SERS și a vectorilor loading plot rezultați din PCA se poate observa o contribuție semnificativă a dubletului $725\text{ și }740\text{ cm}^{-1}$ la discriminarea probelor cancer și control. Prin urmare, am testat posibilitatea de utilizare a raportului celor două benzi pentru a clasifica probele de cancer de control în nouă studii ce au analizat spectrele SERS ale pacienților cu cancer colorectal (CRC), de prostată (PC), de sân (BC), de plămân (LC), oral (OR) și ovarian (OV). Acurateți de clasificare similare cu cele obținute folosind algoritmi de tip machine learning au fost obținute în șase din cele nouă studii.

Regiunea spectrală $710\text{-}760\text{ cm}^{-1}$ a spectrelor SERS ale serului din fiecare studiu este prezentată în Figura 12A-F. Corelația negativă a benzilor SERS $740\text{ and }725\text{ cm}^{-1}$ se observă pentru toate studiile, indiferent de tipul de cancer și echipament Raman utilizat. Rezultatele pentru clasificarea cancerului de probe control folosind raportul benzilor SERS $740\text{ and }725\text{ cm}^{-1}$ sunt prezentate ca arie de sub curba ROC în figura 12G.

Acuratețea clasificării modelului univariat este între 67% pentru cancerul pulmonar și 95% pentru cancerul ovarian. Moisoiu et. al. au raportat acurateți de clasificare a cancerului ovarian de 94.8% și 92.15% pentru cancerul oral prin utilizarea algoritmului PCA-LDA [23]. Analiza univariată a acestor spectre atinge o precizie similară de 92% pentru cancerul oral și 95% pentru cancerul ovarian. Pe de altă parte, pentru cancerul pulmonar [23], cancer de prostată [24], cancer de sân [15] și cancer colorectal, analiza multivariată a obținut acurateți de clasificare ușor mai crescute comparativ cu modelul univariat.

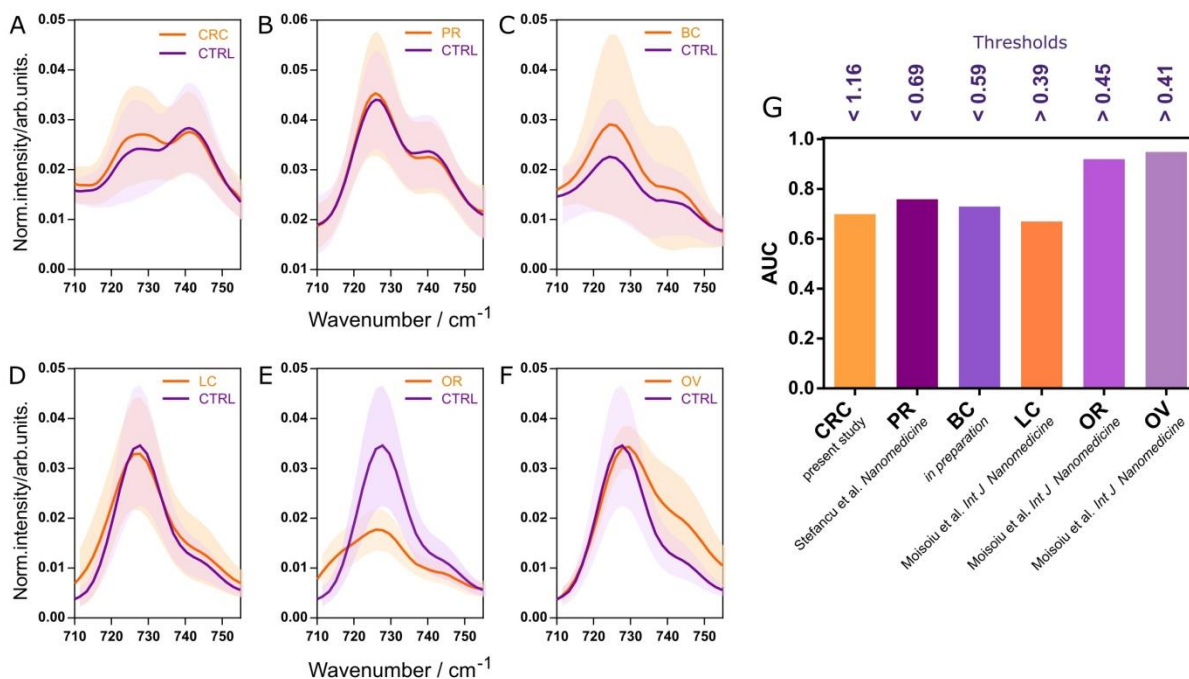


Figura 12. Diagnosticul cancerului pe baza raportului benzilor SERS la 725 cm⁻¹ and 740 cm⁻¹. (A-F) Spectrul SERS mediul pentru grupul cancer (colorectal- CRC, prostată - PR, sân-BC, plămân-LC, oral-OR și ovarian-OV) și grupul control din fiecare studiu analizat. (G) Aria de sub curbă pentru curba receiver operating characteristic construită pe baza raportului benzilor SERS 740/725 cm⁻¹.

Pentru a consolida ideea că raportul dintre benzile SERS de 740 și 725 cm⁻¹ reflectă un dezechilibru în concentrația de acid uric și hipoxantină, am achiziționat spectre SERS ale amestecurilor de hipoxantină, xantină și acid uric, care sunt cunoscute a fi contributorii majori la spectrele SERS ale serului. Pentru acest lucru, am menținut concentrația de xantină și hipoxantină constantă și am variat concentrația de acid uric. Așa cum se observă în Figura 13, intensitatea 740/725 cm⁻¹ este mai mică cu o concentrație mai mare de acid uric. O schimbare spectrală similară este observată atunci când se compară spectrele medii SERS ale grupurilor de control cu cele ale grupurilor cu cancer (Figura 12A-F).

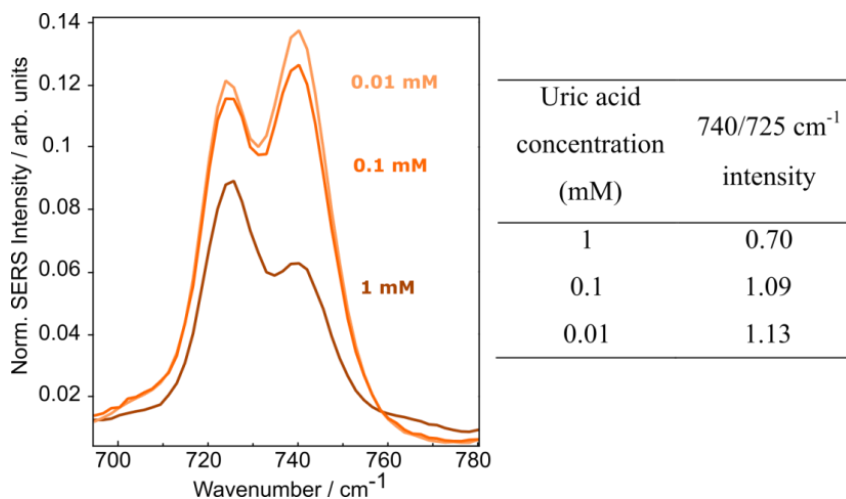


Figura 13. Spectrele SERS spectra a unui amestec de 0.1 mM hipoxantină, 0.1 mM xantină și acid uric în concentrație variabilă între 0.01 to 1 mM și raportul benzilor SERS $740/725 \text{ cm}^{-1}$ în fiecare caz.

Aceste rezultate sunt de ineter întrucât permit detecția cancerului folosind spectroscopia SERS folosind doar două benzi din spectrul SERS. Mai mult, folosind o metodă univariată de analiză informația discriminatorie poate fi interpretată, ceea ce în multe cazuri de algoritmi machine learning nu este posibil.

Concluzie finală

Metodele de analiză utilizate în această lucrare evidențiază contribuția majoră a metaboliților purinici la spectrele SERS a biofluidelor și mai mult, indică dezechilibrul dintre acidul uric și hipoxantina ca fiind contribuitorul majoritar în diferențierea probelor de cancer de control. Întrucât translatarea spectroscopiei SERS în mediul clinic este limitată de existența unui ghid standard, această teză s-a axat pe descrierea unei recomandări a unui workflow pentru aplicații clinice ale spectroscopiei SERS. Pornind de la achiziționarea spectrelor SERS, s-a constatat că urina este fluidul biooptimal pentru screening-ul cancerului bazat pe SERS; deoarece procesarea spectrelor este un factor important în algoritmi de tip machine learning, am arătat că aplicarea unui model de reducere a dimensionalității datelor care să ofere variabile ortogonale este necesar înaintea construirii modelelor de clasificare; pentru a îmbunătăți acuratețea de clasificare este necesară filtrarea variabilelor astfel încât clasificatorii să fie alimentați doar cu informație cu putere discriminatorie. Cu toate acestea, pentru a putea evidenția concret care componentă conduce la prezicerea clasei fiecărei probe, tehnica de reducere a dimensiunii datelor poate fi constrânsă la metaboliții cunoscuți (acid uric, hipoxantină, xantină, creatinină și uree) care ulterior pot fi utilizați ca variabile pentru clasificarea probelor. Ca perspectivă, o combinație a proiecției spectrelor SERS pe metaboliți purinici, creatinină și uree și a reziduurilor rezultate din această tehnică de reducere ar putea ajuta la interpretarea medicală a screening-ului cancerului bazat pe biopsia lichidă SERS.

Acuratețile de clasificare de peste 80% obținute în screening-ul cancerului de vezică și cancerului de prostată obținute pe baza spectrelor SERS ale urinei, spectrele fiind achiziționate în mediul clinic utilizând spectrometru Raman portabil, recomandă această metodă neinvazivă pentru screening-ul cancerului.

Mai mult, în cazul cancerului de prostată a fost construit o unealtă de decizie în vederea necesității biopsierii pacienților cu scor PI-RADS echivoc (scors PI-RADS 3). În acest caz, 11 din 25 pacienți suspecți de cancer de prostată având scors PI-RADS 3 ar fi putut evita biopsierea prostatei folosind spectroscopia SERS ca support tool pentru decizia biopsiei.

Sper ca studiile prezentate în această teză să contribuie la translatarea spectroscopiei SERS în aplicații clinice ca metodă de screening a cancerului având ca beneficii timpul scăzut de analiză, fiind o metodă neinvazivă și accesibilă publicului larg prin costurile tot mai mici necesare pentru construirea spectrometrelor Raman portabile.

References

- [1] N. Leopold, Surface-enhanced Raman spectroscopy, selected applications, Editura Napoca Star (2009).
- [2] W.-H. Park, Z.H. Kim, Charge Transfer Enhancement in the SERS of a Single Molecule, *Nano Letters* 10(10) (2010) 4040-4048.
- [3] F. Huber, J. Berwanger, S. Polesya, S. Mankovsky, H. Ebert, F.J. Giessibl, Chemical bond formation showing a transition from physisorption to chemisorption, *Science* 366(6462) (2019) 235-238.
- [4] A. Otto, I. Mrozek, H. Grabhorn, W. Akemann, Surface-enhanced Raman scattering, *Journal of Physics: Condensed Matter* 4(5) (1992) 1143.
- [5] A. Otto, A. Bruckbauer, Y.X. Chen, On the chloride activation in SERS and single molecule SERS, *Journal of Molecular Structure* 661-662 (2003) 501-514.
- [6] S.D. Iancu, A. Stefancu, V. Moisoiu, L.F. Leopold, N. Leopold, The role of Ag⁺, Ca²⁺, Pb²⁺ and Al³⁺ adions in the SERS turn-on effect of anionic analytes, *Beilstein journal of nanotechnology* 10 (2019) 2338-2345.
- [7] A. Stefancu, S. Lee, L. Zhu, M. Liu, R.C. Lucacel, E. Cortés, N. Leopold, Fermi Level Equilibration at the Metal–Molecule Interface in Plasmonic Systems, *Nano Letters* 21(15) (2021) 6592-6599.
- [8] R. El Ridi, H. Tallima, Physiological functions and pathogenic potential of uric acid: A review, *J Adv Res* 8(5) (2017) 487-493.
- [9] Y.B. Ian Goodfellow, Aaron Courville, Deep learning, MIT Press (2016).
- [10] W.S. Noble, What is a support vector machine?, *Nature biotechnology* 24(12) (2006) 1565-7.
- [11] E.W. Steyerberg, *Clinical Prediction Models A Practical Approach to Development, Validation, and Updating*, Springer New York, NY (2009).
- [12] B.H. Menze, B.M. Kelm, R. Masuch, U. Himmelreich, P. Bachert, W. Petrich, F.A. Hamprecht, A comparison of random forest and its Gini importance with standard chemometric methods for the feature selection and classification of spectral data, *BMC Bioinformatics* 10(1) (2009) 213.
- [13] L. Breiman, Random Forests, *Machine Learning* 45(1) (2001) 5-32.
- [14] F. Lussier, V. Thibault, B. Charron, G.Q. Wallace, J.-F. Masson, Deep learning and artificial intelligence methods for Raman and surface-enhanced Raman scattering, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 124 (2020) 115796.
- [15] S.D. Iancu, R.G. Cozan, A. Stefancu, 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, N. Leopold, 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 (2022).
- [16] J. Lin, Z. Huang, X. Lin, Q. Wu, K. Quan, Y. Cheng, M. Zheng, J. Xu, Y. Dai, H. Qiu, D. Lin, S. Feng, Rapid and label-free urine test based on surface-enhanced Raman spectroscopy for the non-invasive detection of colorectal cancer at different stages, *Biomedical optics express* 11(12) (2020) 7109-7119.
- [17] S. Fornasaro, E. Gurian, S. Pagarin, E. Genova, G. Stocco, G. Decorti, V. Sergio, A. Bonifacio, Ergothioneine, a dietary amino acid with a high relevance for the interpretation of label-free surface enhanced Raman scattering (SERS) spectra of many biological samples, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 246 (2021) 119024.

- [18] M. Li, Y. Du, F. Zhao, J. Zeng, C. Mohan, W.-C. Shih, Reagent- and separation-free measurements of urine creatinine concentration using stamping surface enhanced Raman scattering (S-SERS), *Biomedical Optics Express* 6 (2015).
- [19] M. Casella, A. Lucotti, M. Tommasini, M. Bedoni, E. Forvi, F. Gramatica, G. Zerbi, Raman and SERS recognition of β -carotene and haemoglobin fingerprints in human whole blood, *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 79(5) (2011) 915-9.
- [20] S.D. Iancu, R.G. Cozan, A. Stefancu, 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, N. Leopold, SERS liquid biopsy in breast cancer. What can we learn from SERS on serum and urine?, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (2022) 120992.
- [21] M. Casella, A. Lucotti, M. Tommasini, M. Bedoni, E. Forvi, F. Gramatica, G. Zerbi, Raman and SERS recognition of β -carotene and haemoglobin fingerprints in human whole blood, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 79(5) (2011) 915-919.
- [22] T. Moisoiu, S.D. Iancu, D. Burghelea, M.P. Dragomir, G. Iacob, A. Stefancu, R.G. Cozan, O. Antal, Z. Bálint, 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(2) (2022) 233.
- [23] V. Moisoiu, 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, I. Berindan-Neagoe, SERS-based differential diagnosis between multiple solid malignancies: breast, colorectal, lung, ovarian and oral cancer, *International journal of nanomedicine* 14 (2019) 6165-6178.
- [24] A. Stefancu, M. Badarinza, V. Moisoiu, S.D. Iancu, O. Serban, N. Leopold, D. Fodor, SERS-based liquid biopsy of saliva and serum from patients with Sjögren's syndrome, *Analytical and bioanalytical chemistry* 411(22) (2019) 5877-5883.

Lista publicațiilor pe subiectul tezei de doctorat

SERS liquid biopsy: An emerging tool for medical diagnosis, V Moisoiu*, SD Iancu*, A Stefancu*, T Moisoiu, B Pardini, MP Dragomir, N Crisan, L Avram, D Crisan, I Andras, D Fodor, LF Leopold, C Socaciu, Z Bálint, C Tomuleasa, F Elec, N Leopold, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 208, 2021, 112064.

IF 5.268, Rank Q1 (BIOPHYSICS) AIS 0.707

Combined miRNA and SERS urine liquid biopsy for the point-of-care diagnosis and molecular stratification of bladder cancer T Moisoiu*, MP Dragomir*, SD Iancu*, S Schallenberg, G Birolo, G Ferrero, D Burghilea, A Stefancu, RG Cozan, E Licarete, A Allione, G Matullo, G Iacob, Z Bálint, RI Badea, A Naccarati, D Horst, B Pardini, N Leopold, F Elec, *Molecular Medicine* 2022, 28 (1).

IF 6.354, Rank Q1 (BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY) AIS 1.220

SERS liquid biopsy in breast cancer. What can we learn from SERS on serum and urine? SD Iancu, RG Cozan, A Stefancu, M David, T Moisoiu, C Moroz-Dubenco, A Bacsi, C Chira, A Andreica, L Diosan, N Leopold, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2022;273:120992.

IF 4.098, Rank Q1 (SPECTROSCOPY) AIS 0.491

SERS Liquid Biopsy Profiling of Serum for the Diagnosis of Kidney Cancer T Moisoiu*, SD Iancu*, D Burghilea, MP Dragomir, G Iacob, A Stefancu, RG Cozan, O Antal, Z Bálint, V Muntean, RI Badea, E Licarete, N Leopold, *FI Elec. Biomedicines* 2022, 10 (2).

IF 6.081, Rank Q2 (BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY) AIS 0.799

*these authors contributed equally as first authors

Lista publicațiilor

SERS-based DNA methylation profiling allows the differential diagnosis of malignant lymphadenopathy Stefancu, A.; Moisoiu, V.; Desmirean, M.; Iancu, S.D.; Tigu, A.B.; Petrushev, B.; Jurj, A.; Cozan, R.G.; Budisan, L.; Fetica, B., et al. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2022, 264.

Gadolinium Accumulation and Toxicity on In Vitro Grown Stevia rebaudiana: A Case-Study on Gadobutrol Scurtu, V.F.; Clapa, D.; Leopold, L.F.; Ranga, F.; Iancu, Ș.D.; Cadiș, A.I.; Coman, V.; Socaci, S.A.; Moț, A.C.; Coman, C. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23,.

The effect of 100–200 nm ZnO and TiO₂ nanoparticles on the in vitro-grown soybean plants Leopold, L.F.; Coman, C.; Clapa, D.; Oprea, I.; Toma, A.; Iancu, Ș.D.; Barbu-Tudoran, L.; Suciu, M.; Ciorîță, A.; Cadiș, A.I., et al. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2022, 216, doi:10.1016/j.colsurfb.2022.112536.

Antibacterial Effect of Eco-Friendly Silver Nanoparticles and Traditional Techniques on Aged Heritage Textile, Investigated by Dark-Field Microscopy Ilieș, A.; Hodor, N.; Pantea, E.; Ilieș, D.C.; Indrie, L.; Zdrîncă, M.; Iancu, S.; Caciora, T.; Chiriac, A.; Ghergheles, C., et al. *Coatings* 2022, 12.

The Use of Machine Learning Algorithms and the Mass Spectrometry Lipidomic Profile of Serum for the Evaluation of Tacrolimus Exposure and Toxicity in Kidney Transplant Recipients Burghilea, D.; Moisoiu, T.; Ivan, C.; Elec, A.; Munteanu, A.; Iancu, Ș.D.; Truta, A.; Kacso, T.P.; Antal, O.; Socaciu, C., et al. *Biomedicines* 2022.

Stage related metabolic profile of the synovial fluid in patients with acute flares of knee osteoarthritis Bocsa, D.C.; Socaciu, C.; Iancu, S.D.; Pelea, M.A.; Gutiu, R.I.; Leopold, N.; Fodor, D. *Medicine and Pharmacy Reports* 2022, 95, 438-445.

Selective Single Molecule SERRS of Cationic and Anionic Dyes by Cl⁻ and Mg²⁺ Adions: An Old New Idea Stefancu, A.; Iancu, S.D.; Leopold, N. *Journal of Physical Chemistry C* 2021, 125, 12802-12810.

Tuning the potential of nanoelectrodes to maximum: Ag and Au nanoparticles dissolution by I⁻ adsorption via Mg²⁺ adions Stefancu, A.; Iancu, S.D.; Coman, V.; Leopold, L.F.; Leopold, N. *Romanian Reports in Physics* 2021, 73.

SERS-Based Evaluation of the DNA Methylation Pattern Associated With Progression in Clonal Leukemogenesis of Down Syndrome Moisoiu, V.; Sas, V.; Stefancu, A.; Iancu, S.D.; Jurj, A.; Pasca, S.;

Iluta, S.; Zimta, A.A.; Tigu, A.B.; Teodorescu, P., et al. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2021, 9.

Correlation between Volumes Determined by Echocardiography and Cardiac MRI in Controls and Atrial Fibrillation Patients Manole, S.; Budurea, C.; Pop, S.; Iliescu, A.M.; Ciortea, C.A.; Iancu, S.D.; Popa, L.; Coman, M.; Szabó, L.; Coman, V., et al. *Life* 2021, 11.

Adduct of Aquacobalamin with Hydrogen Peroxide Lehene, M.; Plesa, D.; Ionescu-Zinca, S.; Iancu, S.D.; Leopold, N.; Makarov, S.V.; Brânzanic, A.M.V.; Silaghi-Dumitrescu, R. *Inorganic Chemistry* 2021, 60, 12681-12684.

SERS-Based Assessment of MRD in Acute Promyelocytic Leukemia? Turcas, C.; Moisoiu, V.; Stefanu, A.; Jurj, A.; Iancu, S.D.; Teodorescu, P.; Pasca, S.; Bojan, A.; Trifa, A.; Iluta, S., et al. *Frontiers in Oncology* 2020, 10.

Photothermal property assessment of gold nanoparticle assemblies obtained by hydroxylamine reduction Tóodor, I.S.; Marişca, O.T.; Rugină, D.; Diaconeasa, Z.; Leopold, L.F.; Coman, C.; Antonescu, E.; Szabó, L.; Iancu, S.D.; Bálint, Z., et al. *Colloid and Polymer Science* 2020, 298, 1369-1377.

Contribution of chemical interface damping to the shift of surface plasmon resonance energy of gold nanoparticles Stefanu, A.; Iancu, S.D.; Leopold, L.F.; Leopold, N. *Romanian Reports in Physics* 2020, 72.

Combining surface-enhanced Raman scattering (SERS) of saliva and two-dimensional shear wave elastography (2D-SWE) of the parotid glands in the diagnosis of Sjögren's syndrome Moisoiu, V.; Badarinza, M.; Stefanu, A.; Iancu, S.D.; Serban, O.; Leopold, N.; Fodor, D. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2020, 235.

Assessment of gold-coated iron oxide nanoparticles as negative T2 contrast agent in small animal MRI studies Iancu, S.D.; Albu, C.; Chiriac, L.; Moldovan, R.; Stefanu, A.; Moisoiu, V.; Coman, V.; Szabo, L.; Leopold, N.; Bálint, Z. *International journal of nanomedicine* 2020, 15, 4811-4824.

SERS-based liquid biopsy of gastrointestinal tumors using a portable raman device operating in a clinical environment Avram, L.; Iancu, S.D.; Stefanu, A.; Moisoiu, V.; Colnita, A.; Marconi, D.; Donca, V.; Buzdugan, E.; Craciun, R.; Leopold, N., et al. *Journal of Clinical Medicine* 2020, 9.

SERS-based liquid biopsy of saliva and serum from patients with Sjögren's syndrome Stefancu, A.; Badarinza, M.; Moisoiu, V.; Iancu, S.D.; Serban, O.; Leopold, N.; Fodor, D. Analytical and bioanalytical chemistry 2019, 411, 5877-5883.

SERS assessment of the cancer-specific methylation pattern of genomic DNA: towards the detection of acute myeloid leukemia in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation Moisoiu, V.; Stefancu, A.; Iancu, S.D.; Moisoiu, T.; Loga, L.; Dican, L.; Alecsa, C.D.; Boros, I.; Jurj, A.; Dima, D., et al. Analytical and bioanalytical chemistry 2019, 411, 7907-7913.

Breast cancer diagnosis by surface-enhanced raman scattering (SERS) of urine Moisoiu, V.; Socaciu, A.; Stefancu, A.; Iancu, S.D.; Boros, I.; Alecsa, C.D.; Rachieriu, C.; Chiorean, A.R.; Eniu, D.; Leopold, N., et al. Applied Sciences (Switzerland) 2019, 9.

The role of Ag⁺, Ca²⁺, Pb²⁺ and Al³⁺ adions in the SERS turn-on effect of anionic analytes Iancu, S.D.; Stefancu, A.; Moisoiu, V.; Leopold, L.F.; Leopold, N. Beilstein journal of nanotechnology 2019, 10, 2338-2345.

Specific and selective sers active sites generation on silver nanoparticles by cationic and anionic adatoms Stefancu, A.; Iancu, S.D.; Moisoiu, V.; Leopold, N. Romanian Reports in Physics 2018, 70.

The role of adatoms in chloride-activated colloidal silver nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering enhancement Leopold, N.; Stefancu, A.; Herman, K.; Tódor, I.S.; Iancu, S.D.; Moisoiu, V.; Leopold, L.F. Beilstein journal of nanotechnology 2018, 9, 2236-2247.