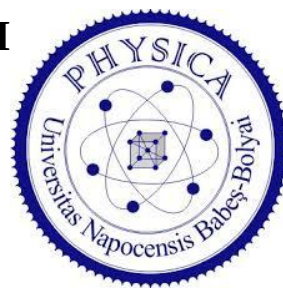




UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI

Facultatea de Fizică

Școala Doctorală de Fizică



TEZĂ DE DOCTORAT REZUMAT

**Metode moderne de analiză a unor materiale cu origine
biologică**

Lavinia Raluca DRĂGAN (căs. ȘAITIȘ)

**Conducător științific
Prof. Dr. Radu FECHETE**

CUPRINS

CUPRINS	i
INTRODUCERE.....	1
CAPITOLUL 1 Fiziologia sângelui	2
1.1. Generalități	2
1.2 Componentele sângelui	2
1.2.1 Cancerul de colorectal	3
1.3 Metode de separare a componentelor sanguine	4
CAPITOLUL 2 METODE DE ANALIZĂ ȘI RESURSE MATERIALE.....	6
2.1 Rezonanța Magnetică Nucleară	6
2.1.1 Principii generale.....	6
2.1.2 Relaxometria RMN a protonului.....	6
2.1.3 Spectroscopie RMN a ^1H în câmpuri înalte localizată	7
2.2 Spectroscopia FT-IR.....	7
2.2.1 Principii generale.....	7
2.3 Resursa materială.....	8
2.3.1 Pacienți cu cancer colorectal	8
2.3.2 Voluntarii sănătoși.....	8
CAPITOLUL 3 CARACTERIZAREA PLASMEI DIN SANGE PRIN RELAXOMETRIE ȘI DIFUZIOMETRIE RMN	12
3.1 Studiul 1 pilot	12
3.1.1 Distribuțiile timpilor de relaxare spin-spin, T_2	12
3.1.2 Distribuțiile coeficientului de autodifuzie, D	13
CAPITOLUL 4 CARACTERIZAREA PLASMEI DIN SÂNGE PRIN SPECTROSCOPIE FT-IR.....	15

4.1	Studiul 1 pilot	15
4.1.1	Spectre FT-IR pentru plasma nativă.....	15
4.1.2	Spectre FT-IR pentru plasma deproteinizată.....	16
CAPITOLUL 5 EVALUAREA GRADULUI DE VINDECARE LA 7 ZILE DUPĂ INTERVENȚIA CHIRURGICALĂ		18
5.1	Date specifice medicale preoperator și postoperator.....	18
5.2	Analiza comparativă a plasmei native din sânge prin metode de relaxometrie RMN	19
5.3	Analiza comparativă a plasmei din sânge prin metode de spectroscopie FT-IR.....	21
CAPITOLUL 6 ANALIZA STATISTICĂ ÎN COMPONENTE PRINCIPALE A PARAMETRIILOR SPECIFICI PENTRU IDENTIFICAREA METABOLITILOR DIN PLASMA SANGUINĂ ȘI INTELIGENȚA ARTIFICIALĂ.....		24
6.1	Analiza PCA utilizată pentru identificarea cancerului colorectal în plasma sanguină folosind măsurători de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) și relaxometrie și difuziometrie prin rezonanță magnetică nucleară a ^1H	24
6.1.1	Parametrii specifici analizei PCA.....	24
6.1.2	Rezultatele analizei PCA.....	26
6.2	Analiza PCA, valorile ROC și AUC utilizate pentru evaluarea vindecării după intervenții chirurgicale la pacienții cu cancer colorectal	27
6.2.1	Analiza PCA.....	27
6.2.2	Curbele ROC și valorile AUC.....	28
6.3	Analiza statistică PCA și predicția prin învățare automată	30
CAPITOLUL 7 IDENTIFICAREA COMPONENTELOR CANCEROASE DIN PLASMA SANGUINA PRIN SPECTROSCOPIE RMN DE ÎNALTA REZOLUȚIE		32
7.1	Analiza spectrelor folosind interfața Processing și cuantificarea metaboliților	32
CAPITOLUL 8 METODE AVANSATE DE RMN ÎN CÂMPURI ÎNALTE PENTRU ANALIZA BIOPSIILOR RECOLTATE DE LA PACIENȚII CU CANCER COLORECTAL		34
8.1	Imagistică RMN pentru evaluarea biopsiilor recoltate din zona colonului și rectului	34

8.1.1	Imagini RMN codate cu T_1	34
8.1.2	Imagini RMN codate cu T_2	36
8.2.	Spectroscopie RMN a biopsiei țesutului tumoral	37
8.3	Relaxometrie RMN în câmpuri înalte	38
8.3.1	Distribuțiile lui T_2 obținute pentru biopsii ale țesutului tumoral și sănătos	38
8.3.2	Mape parametrice de T_2 obținute pentru biopsii ale țesutului tumoral și sănătos	39
CONCLUZII		41
BIBLIOGRAFIE		43
LISTA PUBLICATIILOR DIN DOMENIUL TEZEI		47
Lucrări publicate în reviste cotate ISI		47
Lucrări prezentate la conferințe internaționale.....		47
LISTA PUBLICAȚIILOR DIN AFARA DOMENIULUI TEZEI		49
Lucrări publicate în reviste indexate ISI		49
Lucrări publicate în reviste non-ISI.....		49
Lucrări prezentate la conferințe internaționale.....		49

INTRODUCERE

Cancerul colorectal este al doilea cel mai frecvent cancer din lume și are malignitate agresivă, cu o tendință ridicată de invazie profundă, metastaze ale ganglionilor limfatici și metastaze îndepărtate [1]. Datorită diagnosticării sale frecvente, de obicei numai în stadiu avansat, incidența raportată a cancerului de colon crește remarcabil în fiecare an. În anul 2020, cancerul colorectal s-a clasat pe locul al treilea ca cel mai frecvent tip de cancer diagnosticat la nivel mondial, cu aproximativ 1.9 milioane de cazuri noi și cauzând 930 000 de decese. Proiecțiile epidemiologice indică faptul că până în anul 2040, incidența acestui tip de cancer va crește semnificativ, ajungând la aproximativ 3.2 milioane de cazuri noi anual, în timp ce mortalitatea asociată este de așteptat să crească până la 1.6 milioane de decese pe an [2]. Acesta, deține și a doua poziție în decesele legate de cancer și este principalul contribuitor la decesele legate de cancer la bărbații cu vârsta sub 50 de ani. Mai mult de jumătate din toate cazurile de cancer colorectal pot fi atribuite factorilor de risc modificabili, cum ar fi consumul de tutun, un model alimentar nesănătos, consumul excesiv de alcool, lipsa activității fizice și obezitatea [3]. Un număr substanțial de cazuri de cancer colorectal și mortalitate pot fi evitate prin controlul (*screening*) regulat, monitorizare vigilentă și acces la îngrijiri medicale de înaltă calitate [4]. *Markerii* (indicatorii) serici, cum ar fi antigenul carcinoembrionar (CEA) și antigenul canceros 19-9 (CA 19-9) au specificitate și sensibilitate scăzute [5]. Colonoscopia, una dintre cele mai disponibile metode de diagnostic, are un grad ridicat de invazitate [6].

Obiectivul principal al acestei teze de doctorat este de a utiliza măsurători de relaxometrie și difuziometrie RMN a ^1H în câmpuri magnetice joase, de spectroscopie RMN a ^1H de înaltă rezoluție precum și spectroscopia FT-IR, pentru identificarea caracteristicilor specifice sensibile la prezența trăsăturilor (*markerilor*) specifice cancerului colorectal în plasma sanguină nativă și deproteinizată și a proteinelor pentru plasma sanguină, precum și spectroscopia și imagistica RMN în câmpuri magnetice înalte pentru a caracteriza țesuturi sănătoase sau afectate de cancer colorectal sau a altor materiale cu origine biologică. Pentru asta, datele brute sunt analizate prin proceduri numerice care implică deconvoluția (a spectrelor FT-IR) și transformata Laplace inversă (a curbelor de cădere de tipul CPMG și PGSE prin RMN a ^1H) pentru a obține distribuțiile timpului de relaxare transversală, T_2 și a coeficientul de autodifuzie D . Parametrii relevanți au fost utilizați ca date de intrare pentru analizele PCA iar cele mai importante proprietăți fizice (parametrii care descriu sistemele fizice studiate), sunt identificate probe de sânge sau biopsii prelevate de la pacienții cu cancer colorectal sau din probele prelevate de la voluntari sănătoși.

CAPITOLUL 1 Fiziologia sângelui

1.1. Generalități

Sângele este o componentă fundamentală a vieții umane [7] format din mai multe tipuri de componente cu proprietăți foarte diverse și este adesea numit *organ lichid* [8]. În corpul unui adult, aproximativ 4 până la 5 litri de sânge circulă continuu printr-o rețea complexă de vase, propulsat de contracțiile puternice ale inimii care bate [7], iar distribuția sa, prin sistemul vascular, în întregul corp este esențială pentru existența organismului [8].

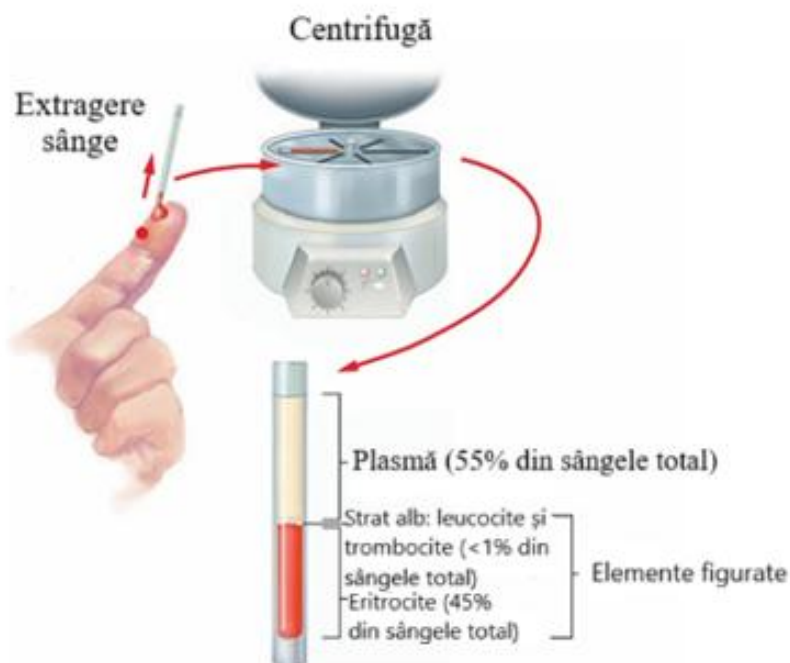


Fig. 1.1 O mică probă de sânge este colectată într-un tub de biochimie și centrifugată pentru a separa celulele de plasmă [după referința 9].

1.2 Componentele sângelui

Sângele este alcătuit din două părți principale și anume celulele sanguine [8] care mai sunt numite și elemente figurate [10] și care sunt sintetizate în principal în măduva osoasă și plasma sanguină, sau partea lichidă a sângelui [8]. Elementele figurate pot fi separate de plasmă prin plasarea unei probe de sânge într-un tub și centrifugarea acestuia timp de câteva minute. Globulele roșii fiind mai dense decât plasma sanguină, se depun la baza tubului și constituie de obicei aproximativ 45 % din volumul total. Această valoare este denumită hematocrit. Globulele albe și trombocitele formează o zonă subțire de culoare crem, numită stratul leucocitar, situată chiar deasupra globulelor roșii. În partea de sus a tubului se află plasma, care are o culoare galben-pal și reprezintă aproape 55 % din volumul total [9].

1.2.1 *Cancerul de colorectal*

Cancerul colorectal (CCR) este unul dintre cele mai frecvente tipuri de cancer în țările occidentale și, tot mai des, la nivel global [11]. Este a doua cauză principală de deces prin cancer la nivel mondial [12], și cel mai mai frecvent la ambele sexe [13, 14], cancerul luând aproape un milion de vieți în 2020 [12]. Există mai mulți factori de risc modificabili asociați cu CCR, iar în cazul unor sindroame ereditare bine definite, care includ CCR ca manifestare, au fost identificate mutații genetice germinale. Polipii, în special adenoamele, reprezintă leziuni preneoplazice recunoscute, iar accesibilitatea lor prin endoscopie permite atât depistarea precoce, cât și diagnosticarea și tratamentul eficient [11]. Pe parcursul vieții, riscul de a dezvolta cancer colorectal (denumit în continuare CCR sau CRC) la pacienții cu risc mediu este de aproximativ 5 %, iar în 90 % dintre cazuri, boala apare după vârsta de 50 de ani. Din păcate, aproape o treime dintre persoanele diagnosticate cu CCR mor din cauza acestei afecțiuni. Deși formele incipiente ale bolii sunt adesea curabile prin intervenție chirurgicală, în stadiile avansate, când metastazele sunt prezente și tratamentul chirurgical nu mai este o opțiune, prognosticul devine sever, iar evoluția este fatală. Aceste aspecte subliniază importanța programelor eficiente de screening și monitorizare, esențiale pentru detectarea precoce a bolii. În plus, identificarea și gestionarea leziunilor premaligne reprezintă un pas crucial în prevenirea dezvoltării cancerului colorectal [13].

Factorii de risc pentru cancerul colorectal sunt atât de natură genetică, cât și de mediu, iar aceștia joacă un rol esențial în determinarea modului în care boala se prezintă, fiind clasificați în trei tipuri: sporadic, moștenit și familial. Cazurile sporadice, în care nu există antecedente familiale de cancer, reprezintă aproximativ 70 % din totalul cazurilor de CCR. De obicei, pacienții cu această formă sunt mai în vârstă de 50 de ani, iar factorii etiologici implicați sunt cei legați de alimentație și mediul înconjurător. Totuși, au fost identificate și modificări genetice ce duc la progresia bolii de la adenom la carcinom [15]. În cazul a mai puțin de 10 % dintre pacienți, există o predispoziție genetică moștenită pentru CCR, iar aceste cazuri pot fi împărțite în funcție de prezența sau absența polipilor colonici ca manifestare principală. Bolile cu polipoză includ polipoza adenomatoasă familială (FAP) și sindroamele polipozei hamartomatose, cum ar fi sindromul Peutz-Jeghers și polipoza juvenilă [16], în timp ce bolile fără polipoză sunt reprezentate de cancerul colorectal ereditar non-polipoză (cunoscut și sub denumirea de sindromul Lynch I) și sindromul familiei canceroase (sindromul Lynch II) [17]. Cel de-al treilea tip de cancer colorectal, cel mai puțin înțeles până în prezent, este cunoscut sub denumirea de cancer colorectal *familial*. Aproape 25% dintre pacienții afectați au un istoric familial de cancer colorectal, dar paternul (structura) acestora nu corespunde celor descrise în sindroamele moștenite menționate anterior. Persoanele provenind din aceste familii prezintă un risc mai mare de a dezvolta cancer colorectal.

1.3 Metode de separare a componentelor sanguine

Separarea componentelor sanguine reprezintă un pas esențial în analiza biochimică și metabolică, fiind necesară pentru investigarea compoziției plasmatice și identificarea metaboliților relevanți în diverse patologii [18].

Etapele I - Procesare a probelor de sânge

a) *Prelevarea probelor de la pacienți.* Prelevarea probelor de sânge se realizează în condiții aseptice, utilizând tehnica venopuncției. Se utilizează un ac de unică folosință și un sistem de recoltare cu vacuum sau seringă.

b) *Transferul sângelui în eprubetă.* Sângele recoltat este distribuit imediat în eprubete specifice, în funcție de tipul de analiză necesar. Se utilizează eprubete de biochimie fără anticoagulant pentru obținerea serului.

c) *Pregătirea eprubetei pentru centrifugare.* Eprubetele sunt inversate de câteva ori pentru omogenizarea sângelui și sunt apoi plasate într-un suport adecvat, pregătite pentru centrifugare. Eprubetele fără anticoagulant sunt lăsate în repaus la temperatura camerei timp de 30–60 de minute.

d) *Centrifugarea probelor.* Eprubetele sunt plasate într-o centrifugă echilibrată, cu capace bine închise, și sunt supuse centrifugării conform protocolului. Parametrii de centrifugare variază în funcție de componenta dorită, astfel: i) Pentru separarea plasmei: 2000–3000 rpm timp de 10–15 minute la 4°C; ii) Separarea fracțiunilor sanguine.

e) *În urma centrifugării,* probele se separă în fracțiuni distincte: i) Plasma sau serul – stratul superior, limpede, utilizat pentru analize biochimice și metabolice; ii) Buffy coat – stratul intermediar, albicios, care conține leucocite și trombocite (utilizat pentru izolarea ADN-ului sau analize imunologice) și iii) Elementele figurate (eritrocite, leucocite, trombocite) – stratul inferior, compactat.

f) *Recoltarea plasmei/serului.* Plasma sau serul este extras cu grijă utilizând o micropipetă sau pipetă automată, fără a perturba stratul buffy coat sau masa eritocitară. Proba este transferată în tuburi sterile și depozitată la temperatura adecvată (-80 °C pentru stocare pe termen lung sau 4 °C pentru analize imediate).

Etapele II - Procesarea probelor de plasmă

a) *Transferul plasmei în microtuburi (Eppendorf).* Plasma obținută după centrifugarea inițială este transferată cu ajutorul unei micropipete într-un microtub Eppendorf steril, asigurând manipularea delicată a probei pentru a evita contaminarea sau hemoliza.

b) *Prelevarea plasmăi pentru precipitare proteică.* Un volum de 100 μL de plasmă este pipetat cu precizie și transferat într-un microtub Eppendorf de 1.5 mL pentru etapa de deproteinizare.

c) *Adăugarea solventului pentru precipitare proteică.* În același microtub Eppendorf, se adaugă 900 μL de metanol rece, pentru a obține un raport 1:9 plasmă/metanol, favorabil precipitației proteinelor. Amestecul este omogenizat prin vortexare ușoară timp de câteva secunde. *Pregătirea probelor pentru centrifugare.* Microtuburile Eppendorf care conțin amestecul plasmă - metanol sunt plasate într-o eprubetă mai mare (de 15 sau 50 mL, în funcție de configurația centrifugei), pentru a asigura echilibrarea rotorului și protecția mecanică a probelor în timpul centrifugării.

d) *Introducerea microtuburilor în centrifugă.* Microtuburile sunt distribuite simetric în rotorul centrifugei, pentru a preveni dezechilibrul mecanic. Se verifică poziționarea corectă și se închide capacul centrifugei.

e) *Centrifugarea pentru separarea fracțiunilor plasmatică.* Centrifugarea probelor se realizează la 4°C, la o forță centrifugă relativă (RCF) de 2000 g, timp de 10-15 minute. Acest proces determină separarea proteinelor precipitate (care se depun la fundul microtubului) de supernatantul clar.

f) *Separarea supernatantului de precipitat.* După centrifugare, probele sunt manipulate cu grijă pentru a evita resuspensia precipitatului proteic. Supernatantul (stratul lichid limpede) este separat cu o micropipetă și transferat într-un microtub Eppendorf nou, steril.

g) *Colectarea supernatantului (plasma deproteinizată).* Supernatantul, care conține metaboliții solubili și alte componente non-proteice, este păstrat pentru analize ulterioare, cum ar fi spectroscopia RMN sau spectroscopia FT-IR. Acesta poate fi stocat temporar la -20 °C sau pe termen lung la -80 °C pentru a preveni degradarea compușilor volatili.

h) *Sedimentul proteic rezultat.* Precipitatul proteic, vizibil ca un depozit albicios la baza microtubului, poate fi eliminat sau utilizat pentru analize proteomice ulterioare, dacă este necesar.

CAPITOLUL 2 METODE DE ANALIZĂ ȘI RESURSE MATERIALE

2.1 Rezonanța Magnetică Nucleară

2.1.1 Principii generale

Spectroscopia este o metodă avansată de studiu a unor tipuri diverse de materiale care oferă informații detaliate bazate pe examinarea modului specific în care materia interacționează cu radiația electromagnetică. Se știe că atomii și moleculele prezintă o serie de niveluri de energie discrete, care corespund stărilor electronice, vibraționale sau rotaționale care sunt cuantificate. Interacțiunea are loc prin absorbția și emisia de fotoni (în domeniul vizibil sau în domeniile adiacente), unde energia fotonilor se potrivește cu diferența de energie dintre două stări de energetice. Deoarece energia unui foton (în general a unei cuante de radiație) este direct legată de frecvența acestuia. Astfel, diferitele tipuri de spectroscopie sunt de obicei definite pe baza frecvențelor radiației electromagnetice specifice implicate în procesul de interacțiune. Procesele de absorbție și emisie a radiației duc la tranziții între stările electronice ale electronilor exteriori și implică de obicei frecvențe în domeniul ultraviolet (UV), ceea ce duce la spectroscopia UV. Modurile de vibrație moleculară sunt caracterizate de valori ale frecvențelor aflate chiar sub acelea ale luminii roșii din domeniul vizibil și sunt astfel analizate folosind spectroscopia în infraroșu (IR). Altfel, spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (pe scurt RMN) utilizează frecvențe în domeniul undelor radio, de obicei în intervalul de la 10 la 1000 MHz [19].

2.1.2 Relaxometria RMN a protonului

Secvența de impulsuri CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) este utilizată pe scară largă în lume în special atunci când se utilizează tehnici de relaxometrie RMN, pentru a obține rapid (*single shoot*) căderile semnalului RMN care conțin informații despre dinamica moleculară pe o scară de timp care acoperă mai multe ordine de mărime și care sunt potrivite pentru a caracteriza majoritatea probelor organice lichide și solide moi sau țesuturi biologice. Căderea trenului de ecouri multiple care apar în CPMG în măsurători efectuate în câmpuri magnetice omogene, sau chiar și neomogene, este generată de o combinație de ecouri stimulate și Hahn.

Analiza multi-exponențială a datelor CPMG

În ultimii ani au fost dezvoltati diverși algoritmi care realizează mai mult sau mai puțin eficient transformata Laplace inversă a datelor experimentale [20, 21-25]. Acestea este o problemă rău condiționată astfel ca datele trebuie să fie regularizate pentru a face efectelor zgomotului. Până în prezent, transformata Laplace inversă a fost aplicată în RMN mai ales pentru sisteme de spini izolați, cum ar fi fluide în medii poroase [21-23, 26, 27] sau mostre de alimente [27] și molecule liber să difuzeze [22, 24, 26-28].

Un algoritm de inversare a datelor (prin transformata inversă de tip-Laplace) a fost descris în referințele [21, 29] a fost utilizat în partea experimentală a acestei teze pentru prelucrarea datelor și obținerea unei distribuții normalizate a timpului de relaxare transversal T_2 , care se notează cu $f(T_2)$ și este legat de magnetizarea sistemului de spini prin,

$$M(\tau) = \int_0^{\infty} f(T_2) e^{-\frac{\tau}{T_2}} dT_2, \quad (2.1)$$

2.1.3 Spectroscopie RMN a ^1H în câmpuri înalte localizată

Spectroscopia prin rezonanță magnetică nucleară, este posibilă pentru orice nucleu care posedă un moment magnetic (spinul nuclear să fie diferit de zero). Pentru aplicațiile *in vivo* ale spectroscopiei prin rezonanță magnetică, nucleele metabolice cu un grad de interes ridicat care au această proprietate sunt protonul (^1H), carbonul-13 (^{13}C), fosforul (^{31}P) și sodiul (^{23}Na). Deși numărul nucleelelor relevante este limitat, fiecare nucleu oferă o cantitate mare de informații, deoarece un număr mare de metaboliți pot fi detectați simultan. Spectroscopia de rezonanță magnetică a ^1H permite detectarea unor neurotransmițători importanți, precum glutamatul, GABA sau aspartatul, împreună cu compuși înrudiți, precum glutamina, și produsul final al glicolizei, lactatul. ^{13}C oferă posibilitatea de a studia *in vivo* dar non-invaziv fluxuri complexe prin căi metabolice importante, precum ciclul acidului tricarboxilic. Spectroscopia ^{31}P furnizează informații despre metaboliți importanți din punct de vedere energetic, pH-ul intracelular, concentrația de magneziu și fluxurile de reacție. Pe lângă nucleele menționate, spectroscopia de rezonanță magnetică sau *in vivo* MRS poate să devină, în cazuri speciale, relevantă și pentru alte nuclee, precum heliu (^3He), litiu (^7Li), azot (^{15}N), oxigen (^{17}O), fluor (^{19}F), siliciu (^{29}Si) și potasiu (^{39}K) [19].

2.2 Spectroscopia FT-IR

2.2.1 Principii generale

Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) este o tehnică utilizată pe scară largă pentru identificarea grupelor funcționale în materiale, fie în stare gazoasă, lichidă sau solidă, prin utilizarea radiației din domeniul infraroșu (IR). Spectroscopia în infraroșu măsoară absorbția radiației IR de către fiecare legătură dintr-o moleculă, rezultând un spectru reprezentat de obicei ca absorbanță (adimensională) sau ca transmitanță (%) versus număr de undă (cm^{-1}). O varietate de materiale cu legături covalente absorb radiații electromagnetice în regiunea IR, care are o energie mai mică și o lungime de undă mai mare decât lumina (radiația electromagnetică din domeniul vizibil) sau radiația UV (care sunt utilizate împreună în cadrul spectroscopiei UV-VIS),

dar o energie mai mare și o lungime de undă mai scurtă decât radiația de microunde. Pentru ca o moleculă să fie identificată prin grupele sale funcționale utilizând spectroscopia IR, aceasta trebuie să fie activă în IR, adică trebuie să aibă un moment dipolar (diferit de zero). Când radiația IR interacționează cu legăturile covalente ale materialelor care au un dipol electric, molecula absoarbe energie, determinând legătura chimică să oscileze. Această oscilație, care modifică momentul dipolar net al moleculei, este cea care permite absorbția radiației IR [30]. Interacțiunea radiației electromagnetice cu substanța se exprimă în două moduri: i) prin absorbția, emisia sau dispersia undelor electromagnetice și ii) prin modificări temporare sau permanente ale proprietăților optice, magnetice, termice sau chimice ale substanței, indiferent dacă aceasta este alcătuită din atomi, molecule, ioni sau alte entități chimice [31]. Interacțiunea substanțelor cu orice parte a spectrului electromagnetic se numește spectroscopie, care reprezintă o analiză între materie și radiația electromagnetică din orice domeniu. Spectrul electromagnetic este format din mai multe tipuri de radiații care includ lungimi de undă variate, fiind o formă de energie radiantă, începând de la raze gamma și raze X, trecând prin radiația UV, lumina vizibilă, infraroșu, microunde și până la unde radio, fiecare dintre acestea putând fi privită ca o undă sau particulă ce se deplasează cu viteza luminii.

2.3 Resursa materială

Pentru desfășurarea acestui studiu, s-a realizat o colaborare strânsă cu echipa medicală din cadrul Secției Chirurgie I, care a contribuit la recoltarea probelor biologice, asigurarea condițiilor adecvate de stocare și menținerea integrității acestora până la etapa de prelevare și procesare în vederea obținerii formei finale pentru analiză.

2.3.1 Pacienți cu cancer colorectal

În cadrul acestui studiu, toți pacienții au oferit consimțământ informat scris, fiind pe deplin informați cu privire la obiectivele cercetării și procedurile specifice de recoltare a probelor biologice. Selecția pacienților diagnosticați cu cancer colorectal s-a realizat pe baza unui diagnostic confirmat prin imagistică de înaltă rezoluție, incluzând rezonanța magnetică nucleară (RMN) pelviană și eco-endoscopia. Pentru studiile I și II, au fost incluși un total de 31 de pacienți cu diagnostic confirmat histopatologic, cu vârste cuprinse între 35 și 81 de ani. Criteriile de excludere au vizat pacienții care au necesitat intervenții chirurgicale în regim de urgență. Studiul a fost desfășurat în cadrul Spitalului Clinic Județean Cluj-Napoca, Secția Chirurgie I.

2.3.2 Voluntarii sănătoși

Similar pacienților diagnosticați cu cancer colorectal, voluntarii din grupul de control au primit și au semnat consimțământul informat referitor la participarea în cadrul studiului. Criteriile

de includere în acest grup au fost riguros definite pentru a asigura o comparație adecvată cu grupul de pacienți. Astfel, participanții din grupul de control nu prezentau un diagnostic de cancer colorectal, aveau vârste și distribuție de gen comparabile cu cele ale pacienților oncologici și nu aveau antecedente de afecțiuni gastrointestinale semnificative, cum ar fi boala Crohn, colita ulcerativă, polipi avansați sau sindroame genetice predispozante, precum sindromul Lynch. De asemenea, au fost excluși indivizii cu istoric de boli neoplazice preexistente.

Tabelul 2.1 Câteva caracteristici extinse (etichetă, vârstă, sex, mediul de proveniență, RCT – tratat radiochimic, diagnostic, gradul histologic, stadializarea cancerului, pn – ganglioni limfatici regionali) specifice pacienților cu cancer colorectal.

PACIENTI CU CANCER COLORECTAL									
Nr. crt.	Etichetă pacient	Vârsta	Sex	Mediul de proveniență	RCT	Diagnostic	Gradul histologic	Stadializarea cancerului	pn (ganglionii limfatici regionali)
1	C031	35	F	RURAL	RCT	ADK COLONIC TRANSVERS	G2	T3N0M1	5N+/41
2	C032	56	M	URBAN	RCT	ADK COLONIC TRANSVERS	G2	T3N0M1	15N0
3	C036	57	M	URBAN	RCT	ADK COLONIC MIJLOCIU	G1	T2N0M0	22N+/32
4	C041	61	M	URBAN	RCT	ADK COLONIC ASCENDENT	G2	T3N0M0	15N0
5	C042	77	M	RURAL	RCT	ADK COLONIC ASCENDENT	G2	T3N0M0	28N0
6	C045	54	M	URBAN	RCT	ADK COLONIC ASCENDENT	G2	T3N0M1	23N0
7	C059	65	M	RURAL	RCT	ADK COLONIC SIGMOID	G2	T3N0M0	25N0
8	C060	50	F	RURAL	RCT	ADK COLONIC SIGMOID	G2	T2N0M0	3N+/3N0
9	C067	60	M	URBAN	RCT	ADK COLONIC SIGMOID	G2	T2N0M0	15N0
10	C074	60	M	RURAL	NU	ADK COLONIC ASCENDENT	G1	T1N0M0	X
11	C075	70	F	URBAN	RCT	ADK colonic mijlociu	G1	T1N0M0	NO
12	C081	43	M	URBAN	RCT	ADK COLONIC MIJLOCIU	G3	T3N3M1	4N+/12N
13	C098	67	M	URBAN	RCT	ADK COLONIC ASCENDENT	G2	T3N2M0	
14	C100	74	F	URBAN	RCT	ADK RECTAL mucinos	G3	T2N1bM0	2N+/17
15	C101	68	M	URBAN	RCT	ADK sigmoid	G2	T3N0M0	8N0
16	C102	54	F	URBAN	NU	ADK colonic transvers	G2	T2N0M0	(0/45)N0
17	C103	68	F	URBAN	NU	ADK colonic nos moderat diferențiat	G2	T3N1cM0	(0/16)N0

18	C104	67	M	URBAN	NU	Adenocarcinom rectal moderat diferențiat	G2	T2N0M0	17N0
19	C105	55	M	URBAN	RCT	ADK SIGMOID	G2	T4N1M0	10N0
20	C0106	60	M	RURAL	RCT	ADK SIGMOID	G2	T2N0M0	6N0
21	C107	80	M	RURAL	NU	ADK colonic de tip mucinos	G2	T4bN2M1	2+/8
22	C108	64	M	URBAN	NU	ADK TRANSVERS colonic bine/moderat diferențiat	G2	T3N0M0	12N0
23	C110	46	F	URBAN	NU	Adenocarcinom tubular de colon descendent	G2	T4bN3M1	5+/10
24	C111	59	F	URBAN	NU	Adenocarcinom bine diferențiat	G1	T3N0M0	18N0
25	C112	85	B	URBAN	NU	Adenocarcinom colonic moderat diferențiat	G2	T4N1M1	5+/5
26	C123	78	B	RURAL	NU	Adenocarcinom colonic moderat diferențiat	G2	T2N0M0	15N0
27	C136	72	F	URBAN	NU	Adenocarcinom cecal, bine diferențiat	G1	T2N0M0	17N0
28	C137	72	F	URBAN	RCT	ADK COLONIC cec	G2	T3N1M0	15N0
29	C140	46	B	RURAL	NU	Adenocarcinom colon sigmoid	G2	T3N0M0	31N0
30	C141	63	F	URBAN	NU	Adenocarcinom colonic moderat diferențiat	G2	T4aN1bM0.	N1+
31	C147	67	F	URBAN	NU	Adenocarcinom colonic moderat diferențiat	G2	T3N0Mo	12N0

Tabelul 2.2 Câteva caracteristici (etichetă, vârstă, sex, mediul de proveniență) ale voluntarilor sănătoși.

VOLUNTARI SĂNĂTOȘI				
Nr.crt	Etichetă pacient	Vârstă	Sex	Mediul de proveniență
1	V01	53	M	URBAN
2	V02	50	M	URBAN
3	V03	49	M	RURAL
4	V04	53	F	URBAN
5	V05	60	F	URBAN
6	V06	34	F	URBAN
7	V07	51	F	URBAN
8	V08	42	F	URBAN
9	V09	49	F	RURAL
10	V10	25	M	RURAL
11	V11	39	M	RURAL
12	V12	74	M	URBAN
13	V13	49	M	URBAN
14	V14	30	M	RURAL
15	V15	55	F	URBAN
16	V16	46	M	RURAL
17	V17	36	M	URBAN
18	V18	44	M	URBAN
19	V19	50	M	URBAN
20	V20	56	F	URBAN

CAPITOLUL 3 CARACTERIZAREA PLASMEI DIN SANGE PRIN RELAXOMETRIE ȘI DIFUZIOMETRIE RMN

3.1 Studiul 1 pilot

3.1.1 Distribuțiile timpilor de relaxare spin-spin, T_2

Sângele are două componente plasmatiche majore care conțin mai mult de 90 % apă și celule sanguine. Această componentă este bine reflectată în timpi de relaxare specifici. Figura 3.1 prezintă distribuțiile timpilor de relaxare transversală T_2 măsurate pentru plasma sanguină colectată de la trei voluntari sănătoși și 7 pacienți cu cancer colorectal. În figura 3.1a se poate observa un număr de patru *peak*-uri. *Peak*-ul principal este situat la o valoare de T_2 puțin mai mică de 1 s, fapt care indică că cea mai mare cantitate de ^1H se găsește în apa din plasma sanguină. Centrul și lărgimea acestui *peak* sunt afectate de substanțe dizolvate. Acest lucru este indicat de faptul că valoarea T_2 este mai mică de 2 s față de cele 3 s caracteristice apei distilate. În plus, față de acest *peak* principal, există alte trei *peak*-uri secundare situate la i) aproximativ 0.9 până la 1.3 ms care sunt asociate cu componente relativ imobile; ii) un alt *peak* situat la aproximativ 3.4 – 4.1 ms, care este asociat cu componente cu mobilitate redusă; și iii) un alt *peak* situat la aproximativ 14.2 - 17.6 ms, care poate fi asociat cu componente cu mobilitate medie. *Peak*-ul principal nu este foarte bine definit. Aceasta are o formă asimetrică și prezintă, la valori mai mari ale T_2 , o *coadă* alungită. Astfel, valoarea timpului de ecou (TE) de 70 μs care a fost folosită în secvența de impulsuri CPMG trebuie să fie mărită. A fost utilizată o altă valoare a timpului de ecou (TE = 0.5 ms), și care a dus la apariția a două efecte. În primul rând, o valoare crescută a TE va avea un efect de filtrare asupra componentelor cu un timp de relaxare mai scurt (a se vedea figura 3.1b). Prin urmare, se poate observa că componentele cu timpii de relaxare în jur de 1 ms dispar. În al doilea rând, se observă o definiție mai bună a principalelor *peak*-uri situate la aproximativ 731 - 771 ms, și care a fost efectul dorit. Există o mare asemănare între distribuțiile lui T_2 măsurate pentru cei trei voluntari, deoarece valorile lui T_2 diferă ușor. Figura 3.1c prezintă distribuțiile timpilor de relaxare obținute folosind transformata Laplace inversă a curbelor de cădere a semnalului CPMG măsurate cu un timp de ecou de 70 ms, pentru un număr de șapte pacienți cu cancer colorectal. Se poate observa, de asemenea, un *peak* principal, situat la valori ale lui T_2 de sub o secundă, între ~ 581 ms până la 761 ms. Din nou, pentru o măsurare mai precisă a poziției *peak*-ului principal, un al doilea set de măsurători au fost realizate cu un timp de ecou de 0.50 ms, iar distribuțiile corespunzătoare sunt prezentate în figura 3.1d. Din punct de vedere vizual, nu se observă modificări majore atunci când se compară timpul de relaxare transversală (distribuțiile lui T_2) măsurate în plasma sanguină nativă a pacienților cu cancer față de cele măsurate pentru voluntarii sănătoși.

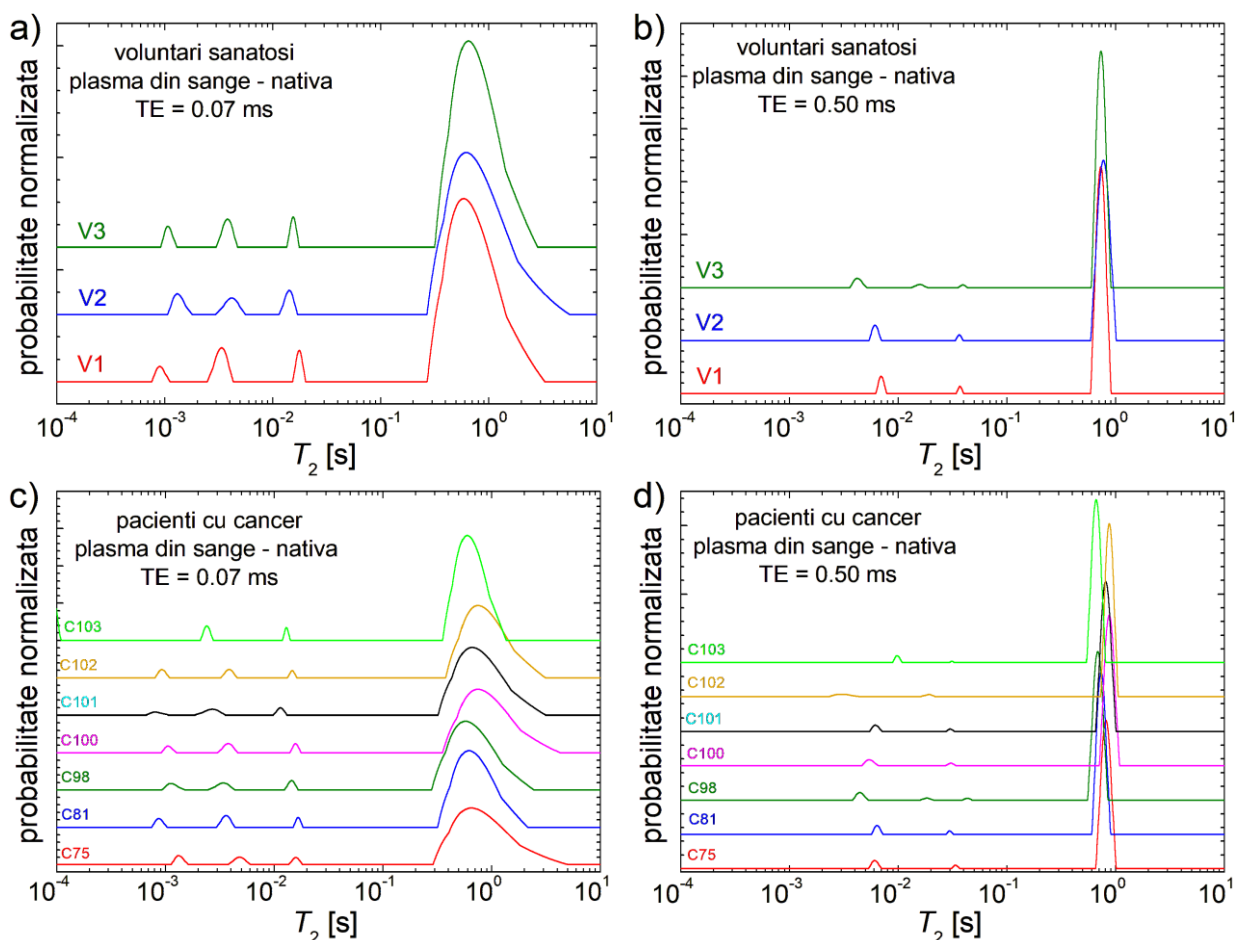


Fig.3.1. Distribuții ale timpului de relaxare T_2 măsurate pentru plasma sanguină nativă recoltată de la V1-V3 voluntari sănătoși (sus, a și b) și pacienți cu cancer colorectal (jos – c și d) cu timp de ecou de TE = 70 μ s (stânga) și TE = 500 μ s = 0.50 ms (dreapta).

3.1.2 Distribuțiile coeficientului de autodifuzie, D

Coeficientul de autodifuzie al moleculelor de sânge (în special moleculele de apă) este un parametru important chiar și în studiile clinice, de exemplu pentru imagistica RMN ponderată cu coeficientul mediu (aparent) de autodifuzie (ADC). Distribuțiile coeficientului de autodifuzie, D măsurat pentru plasma sanguină nativă, sunt prezentate în Figura 3.2. Pentru cei trei voluntari (V1, V2 și V3) distribuția lui D este prezentată în Figura 3.2a, în timp ce în Figura 3.2b se prezintă distribuțiile măsurate pentru cele șapte probe de plasmă sanguină nativă aparținând pacienților cu cancer colorectal. În toate cazurile, se poate observa apariția a două sau mai multe *peak*-uri, unul dintre ele fiind *peak*-ul principal situat de la aproximativ $2.52 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ până la $\sim 4.31 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ și un alt *peak* mai mic (sau două *peak*-uri în cazul voluntarului V1) se află la valori mari ale lui D . În principiu, *peak*-urile principale sunt asociate cu molecule de apă relativ libere.

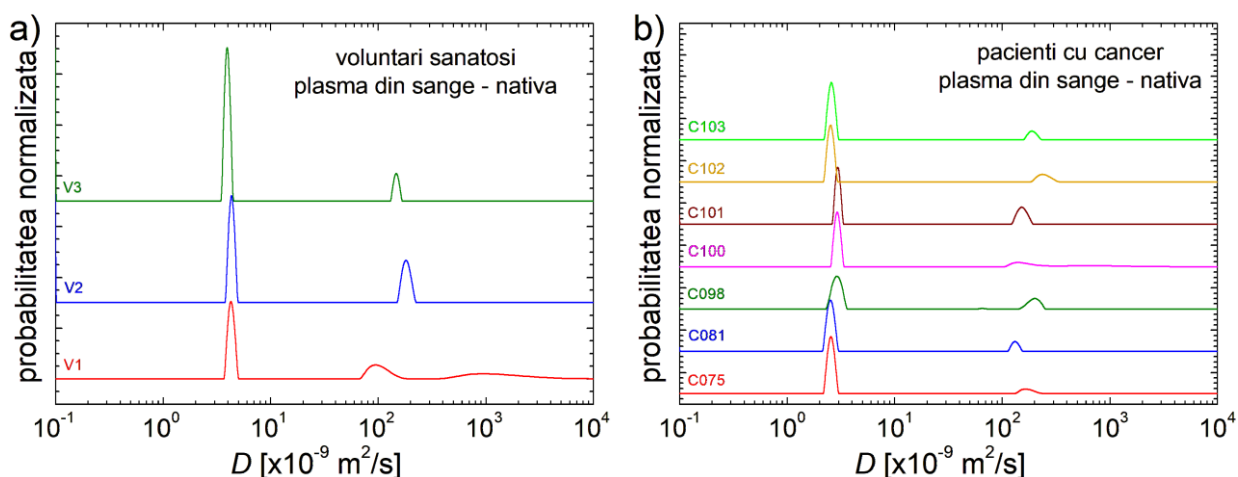


Fig. 3.2. Distribuția coeficient de autodifuzie D măsurată prin RMN a ^1H pentru a) voluntari sănătoși și b) pacienți cu cancer colorectal.

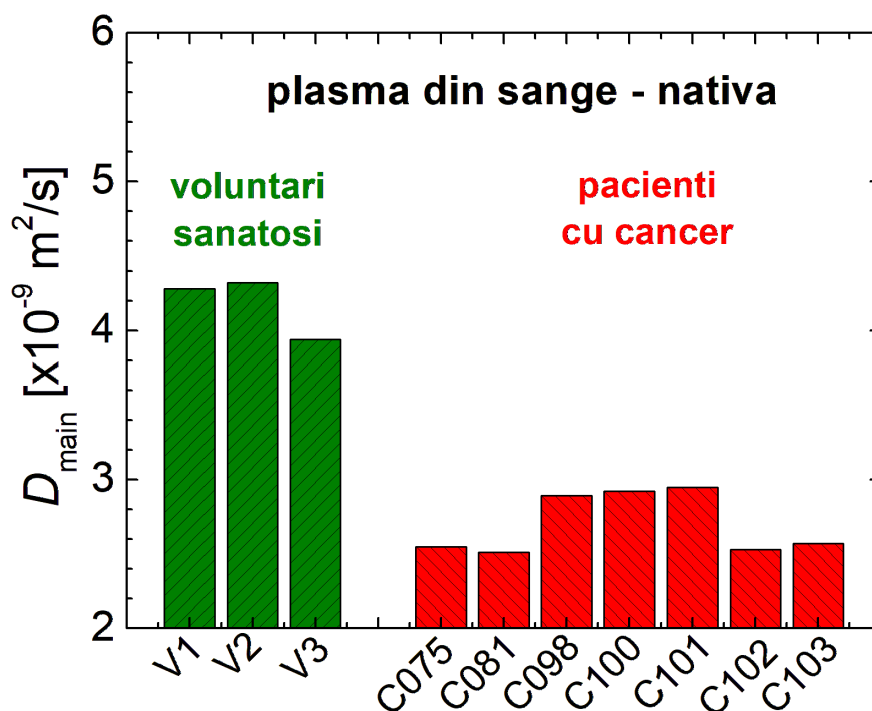


Fig. 3.3. Valorile coeficientului principal (*main*) de autodifuzie a ^1H măsurat prin RMN pentru voluntari sănătoși (V1-V3) și pacienții cu cancer colorectal (C31-C103) din distribuțiile lui D prezentate în Figura 3.4.

În cazul nostru, pentru plasma sanguină aparținând voluntarilor sănătoși, aceste peak-uri sunt situate la valori mai mari de $3.9 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ așa cum se citesc din Figura 3.2a. Se observă valori ale lui D mai scăzute măsurate din poziția *peak*-urilor principale pentru pacienților cu cancer (vezi Figura 3.2b). Măsurători mai precise ale maximului acestor peak-uri principale sunt prezentate în figura 3.3. Pentru voluntarii sănătoși se pot observa trei măsurători la valori de peste $3.9 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ (3.94 , 4.28 și $4.32 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$). În schimb, pentru pacienții cu cancer, valoarea cea mai mare (la care se obține distribuția maximă a peak-ului principal) D_{main} are valori mai mici de $2.95 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$.

CAPITOLUL 4 CARACTERIZAREA PLASMEI DIN SÂNGE PRIN SPECTROSCOPIE FT-IR

4.1 Studiul 1 pilot

4.1.1 Spectre FT-IR pentru plasma nativă

Spectroscopia în infraroșu cu transformare Fourier (FT-IR) este o metodă puternică pentru identificarea compușilor din probele de studiat. Astfel, prin analizarea spectrelor FT-IR, se pot obține informații legate de legăturile chimice ale unor biomarkeri specifici [32]. În Figura 4.1a, sunt prezentate comparativ spectrele FT-IR măsurate pentru plasma sanguină a voluntarilor sănătoși. Se poate observa că spectrele FT-IR sunt relativ simple. Astfel că, în intervalul de 3000-4000 cm^{-1} se observă un *peak* înalt, cu o arie integrată mare, care poate fi asociat în principal cu apa din plasma sanguină. Există, de asemenea, un *peak* mic și larg centrat în jurul valorii de 2085 cm^{-1} . În intervalul de frecvențe specifice, care sunt de obicei asociate cu grupuri funcționale caracteristice (de la 350 la aproximativ 1800 cm^{-1}), se regăsesc (vezi Figurile 4.2): i) un *peak* înalt, cu o arie integrată mare, centrat în jurul valorii de 1644 cm^{-1} asociat cu Amida I; ii) un *peak* mic centrat în jurul valorii de 1552 cm^{-1} asociat cu Amida II; iii) o serie de *peak*-uri mici, care sunt centrate la 1461 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} și care pot fi asociate cu întinderea simetrică a COO⁻ aparținând glutamatului și aminoacizilor de tip aspartat și cu modurile de îndoire simetrică ale grupărilor metil, CH₃ din proteine; iv) un *peak* foarte mic și larg, centrat în jurul valorii de 1243 cm^{-1} asociat cu întinderea asimetrică PO₂⁻; v) o bandă largă centrată în jurul valorilor de 567-577 cm^{-1} , care de obicei este neglijată în analiza plasmei sanguine specifică pacienților cu cancer colorectal [32].

În cele mai importante aspecte, se poate spune că spectrele înregistrate pentru voluntarii sănătoși sunt similare între ele.

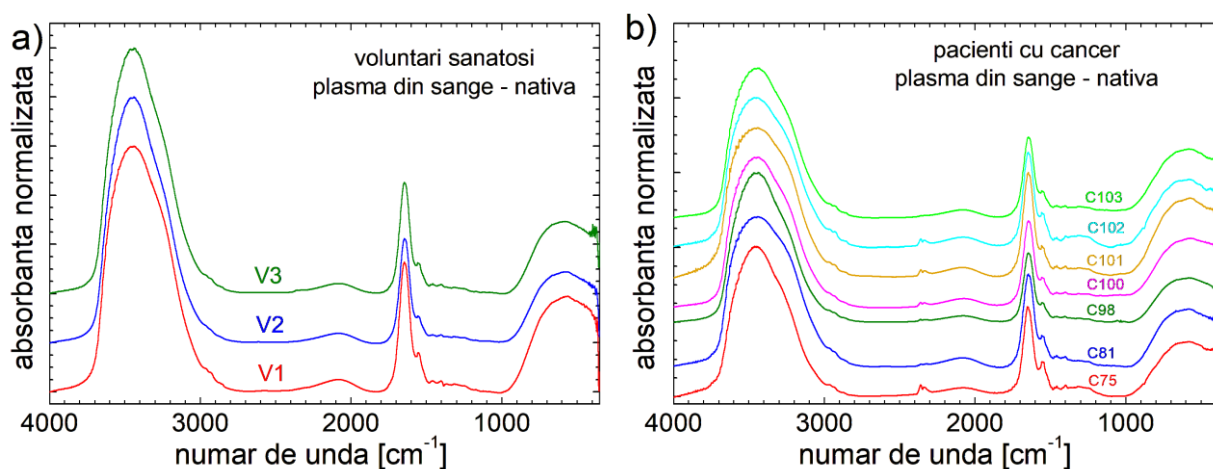


Fig. 4.1. Spectrele FT-IR ale plasmei sanguine măsurate pentru a) voluntari sănătoși (V1-V3) și b) pacienți cu cancer colorectal (C75-C103).

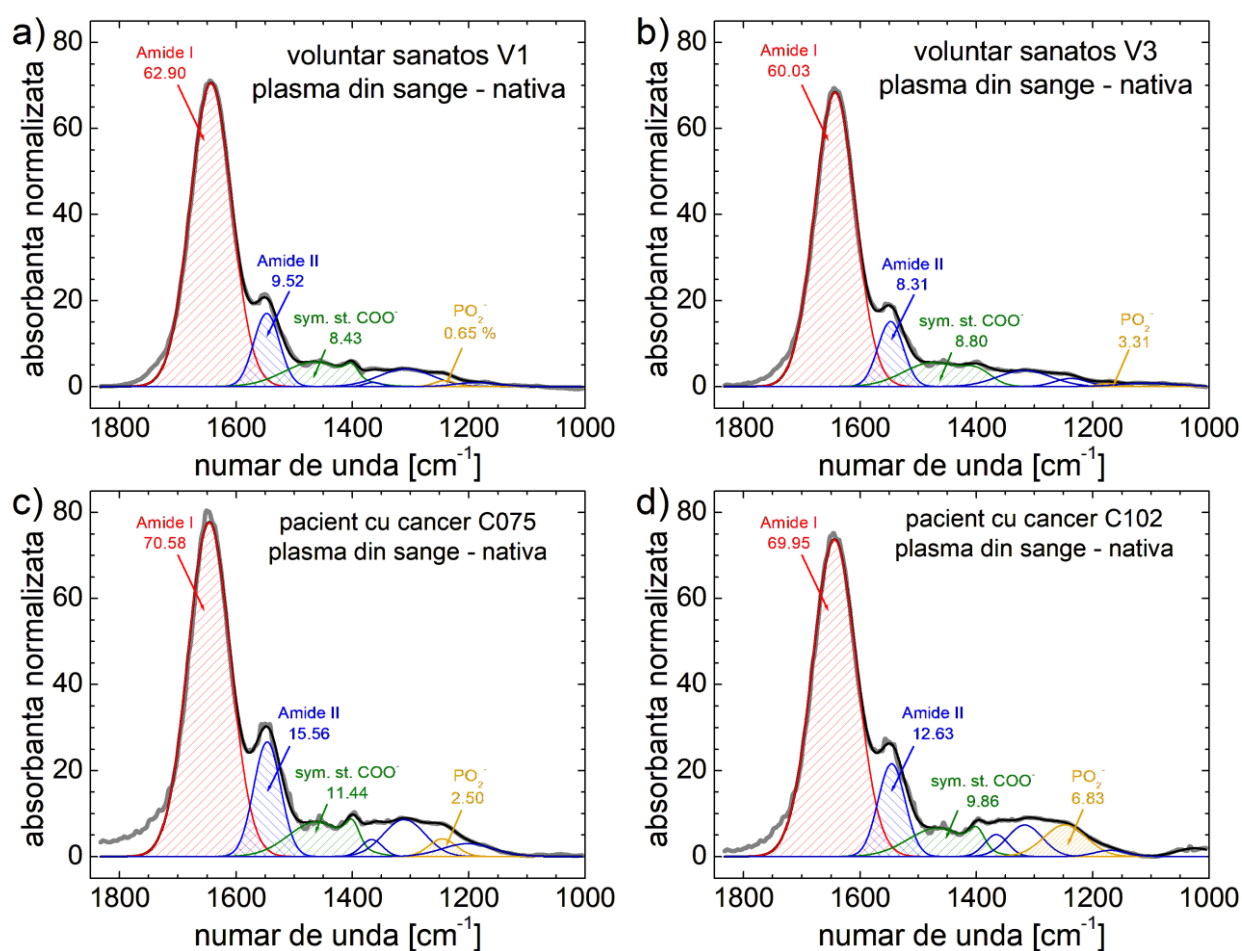


Figure 4.2 Deconvoluția spectrelor FT-IR măsurate pentru plasma nativă colectată de la voluntari sănătoși a) V1 și b) V3 și pentru pacienții cu cancer colorectal c) C075 și d) C102. Aria integrală corespunzătoare Amidei I, Amida II se întinde simetric de COO⁻ și sunt prezentate. PO_2^- .

4.1.2 Spectre FT-IR pentru plasma deproteinizată

Spectrele FT-IR înregistrate pentru plasma sanguină deproteinizată colectate de la voluntarii sănătoși sunt prezentate în Figura 4.3a. Procesul de deproteinizare are loc în prezența alcoolului metilic, de aceea spectrul FT-IR prezintă câteva caracteristici specifice. În aceste cazuri, se poate spune că spectrele FT-IR măsurate pentru plasma sanguină deproteinizată a celor trei voluntari sunt similare. Spectrele FT-IR măsurate pentru plasma sanguină deproteinizată a celor șapte pacienți cu cancer colorectal sunt prezentate în Figura 4.3b. Asocierile specifice ale acestor *peak*-uri pentru spectrul FT-IR prezentat în Figura 4.4 au fost detaliate în subcapitolul 4.1.1.

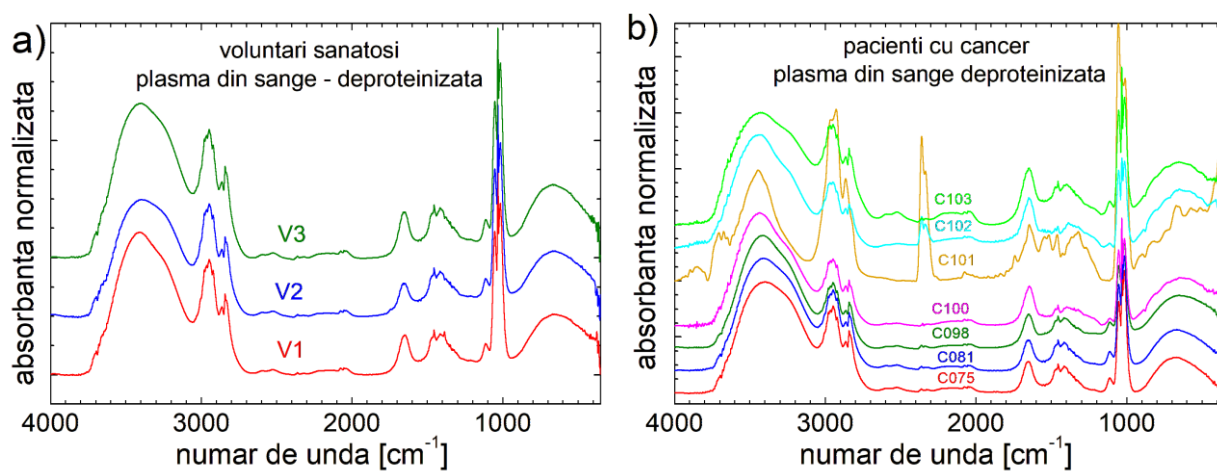


Fig. 4.3. Spectrele FT-IR ale plasmei sanguine deproteinizate măsurate a) voluntari sănătoși (V1-V3) și b) pacienți cu cancer colorectal (C75-C103)

CAPITOLUL 5 EVALUAREA GRADULUI DE VINDECARE LA 7 ZILE DUPĂ INTERVENȚIA CHIRURGICALĂ

5.1 Date specifice medicale preoperator și postoperator

Pentru derularea acestui studiu, s-au utilizat date provenite de la un grup de 20 de voluntari sănătoși, cu vârste între 26 și 65 de ani (vârsta medie a fost de 52 de ani), fără antecedente de cancer, și 10 pacienți diagnosticați cu cancer colorectal (atât bărbați, cât și femei), cu vârste între 45 și 81 de ani (vârsta medie fiind de 67.6 ani).

Au fost luate în considerare mai multe variabile, inclusiv vârsta, tratamentul neoadjuvant, greutatea, diabetul, anemia, scorul Rayan, nivelurile de hemoglobină înainte și după cele șapte zile, printre altele, iar aceste date sunt prezentate în Tabelul 5.1. Un aspect esențial al studiului a fost scorul Rayan, care este determinat pe baza analizei histopatologice și poate dura între patru și șase săptămâni. Acesta a fost un indicator crucial, deoarece a permis corelarea rezultatelor obținute prin metodele RMN și spectroscopie FT-IR, validând astfel acuratețea și aplicabilitatea acestor tehnici. Mai jos în tabelul 5.1 sunt prezentate toate datele culese de la cei 10 pacienți cu cancer colorectal.

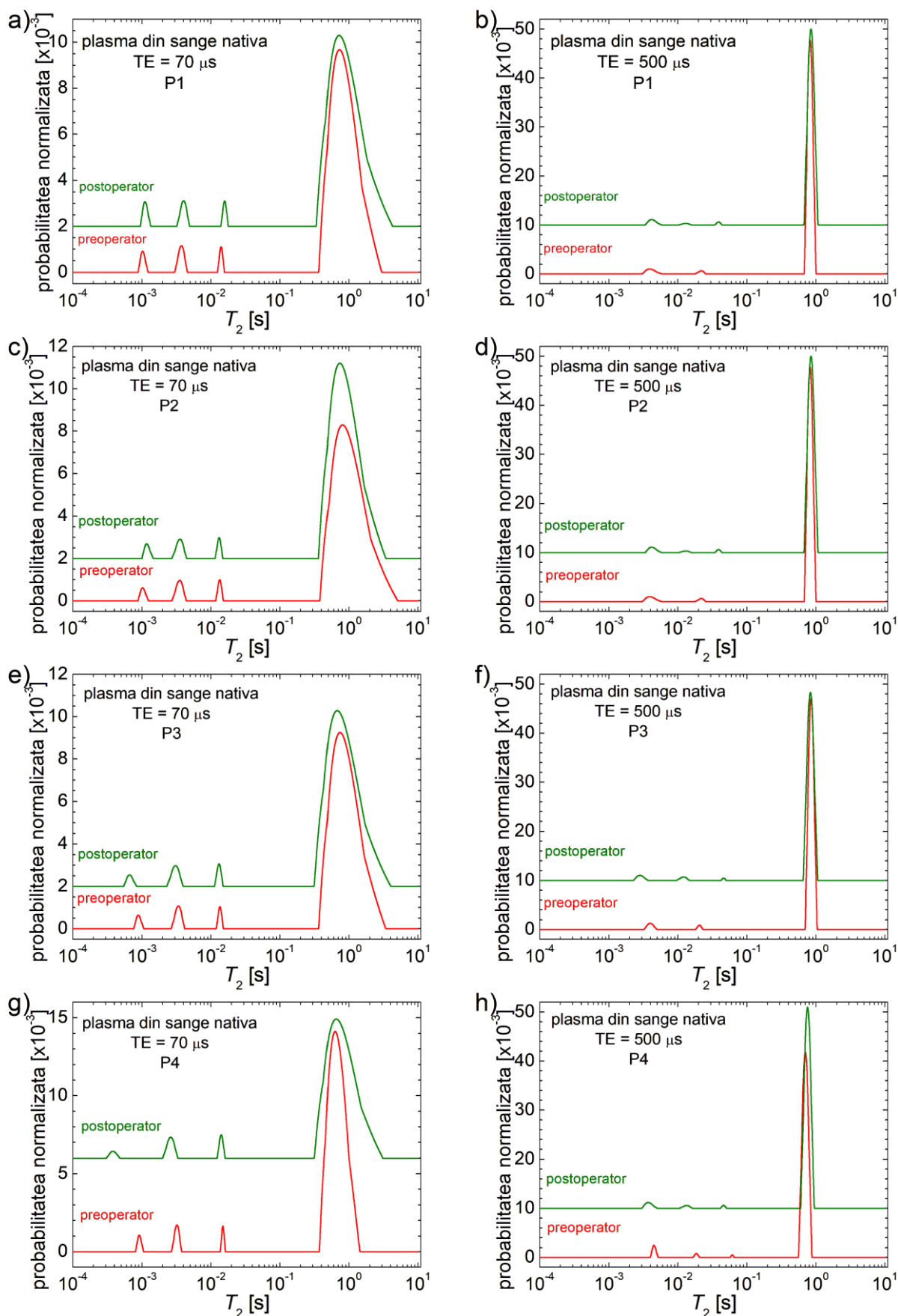
Tabel 5.1 Parametrii sociali și clinici ai pacienților studiați (P1 până la P10) [33].

Pacient	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Sex	F	M	M	M	M	M	F	M	F	M
Varstă	45	67	66	67	81	67	72	81	55	75
Mediul de origine	urban	urban	rural	urban	urban	urban	urban	urban	urban	urban
Diagnostic ADK	Mediu/ inferior -Rectal	Jos - Rectal	Colon Sigmoid	Colon mucinos de grad scăzut	Jos - Rectal	Colorec- tal moderat diferen- țiat	Rectal moderat diferențiat	colo- rectal	Colo- rectal moderat diferen- țiat	Colon diferen- țiat
PET-CT/CT	PET- CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT
Tratament neoadjuvant	RCT	RCT	RCT	NU	RCT	NU	RCT	NU	NU	NU
Fumat	NU	DA	DA	NU	NU	DA	NU	NU	DA	DA
Categorii IMC	Greutate normală	Greutate scăzută	Greutate scăzută	Greutate scăzută	Greutate normală	Greutate normală	Greutate scăzută	Greutate normală	Greutate scăzută	Greutate scăzută
Histologie	G2	G1	G2	G2	G2	G2	G2	G1	G2	G1
Stadiul diagnosticu- lui după operație	I	II	IV	III	0	III	I	I	III	III
Pierdere a poftei de mâncare	DA	DA	DA	DA	NU	DA	DA	NU	DA	DA
Pierdere în greu- tate	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA
Febră	NU	NU	NU	DA	NU	NU	NU	NU	NU	NU
Sângerare rectală	DA	DA	NU	NU	DA	DA	DA	DA	DA	DA

Tulburări de tranzit intestinal	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA
Consumul de alcool	NU	RAR	DA	NU	RAR	RAR	NU	RAR	RAR	RAR
Diabet	dz tip II	NU	NU	dz tip II	NU	dz tip II	NU	NU	NU	NU
Anemie	NU	NU	DA	NU	DA	NU	NU	NU	DA	da
Hemoroizi	interni	NU	NU	NU	interni	interni	interni & externi	interni	NU	interni
Sideremie ($\mu\text{g/dL}$)	82	113	25	30	40	60	67	33	10	8
Hg preoperator (g/dL)	13.5	15.9	10.5	13.3	10.2	13.0	12.5	13.4	8.9	7.9
Hg 7 days (g/dL) postoperator (fL)	12.5	13.5	10.2	12.2	9.9	12.9	10.5	11.3	11.6	10.7
RDW-SD preoperator (fL)	49.9	45.8	48.4	53.2	46.8	45.4	48.3	54	79.3	44.1
RDW-SD at 7 days postoperator	47	43.1	53.8	51.1	45.6	45.5	47.3	53.2	89.9	66.4
Scor Rayan	1	3	-	-	0	-	3	-	-	-

5.2 Analiza comparativă a plasmei native din sânge prin metode de relaxometrie RMN

Distribuțiile timpului de relaxare transversal, T_2 măsurate pentru plasma sanguină nativă colectată de la pacienții P1 până la P5 cu cancer colorectal prezentați ca o pereche de preoperatorii (roșu) și postoperatoriu la 7 zile de la operație (verde) sunt prezentate în Fig. 5.1; în timp ce distribuțiile lui T_2 măsurate pentru pacienții de la P6 până la P10 sunt prezentate în figura 5.2. Măsurătorile au fost efectuate cu doi timpi de apariție a ecoului ($TE = 70 \mu\text{s}$ – stânga și $TE = 500 \mu\text{s}$ – dreapta). Valorile experimentale au fost astfel alese pentru a observa *peak*-urile care apar la un timp mic de relaxare T_2 (TE mic) și pentru a clarifica *peak*-urile care apar la valori mari ale lui T_2 (TE mare). Un timp mic de ecou, TE va lărgi artificial *peak*-urile care apar la valori T_2 mari, în timp ce o valoare TE mare va filtra componentele semnalului RMN care cade rapid (valori T_2 mici). Ca o remarcă generală se pot observa patru *peak*-uri: i) trei dintre ele situate la valori ale lui T_2 sub 20 ms (pentru $TE = 0.07 \text{ ms}$) și ii) unul, *peak*-ul principal, situat la valori ale lui T_2 mai mari de 600 ms (vezi figurile din dreapta cu $TE = 0.5 \text{ ms}$). De la stânga la dreapta (adică de la valori T_2 mai mici la valori mai mari), *peak*-urile descriu componente ale plasmei sanguine native (care conțin ^1H) cu mobilitate crescătoare. Se poate face referire la aceste componente ca rigide, semirigide, intermediare și mobile. După cum era de așteptat, cea mai mare cantitate de ^1H este localizată în cele mai mobile componente, cel mai probabil apă din plasma sanguină. Apa distilată prezintă un *peak*, în distribuția T_2 situată la aproximativ 3 s. Dacă în apă sunt prezente unele fracții dizolvate, atunci *peak*-ul corespunzător este deplasat către valori ale lui T_2 mai mici [33].



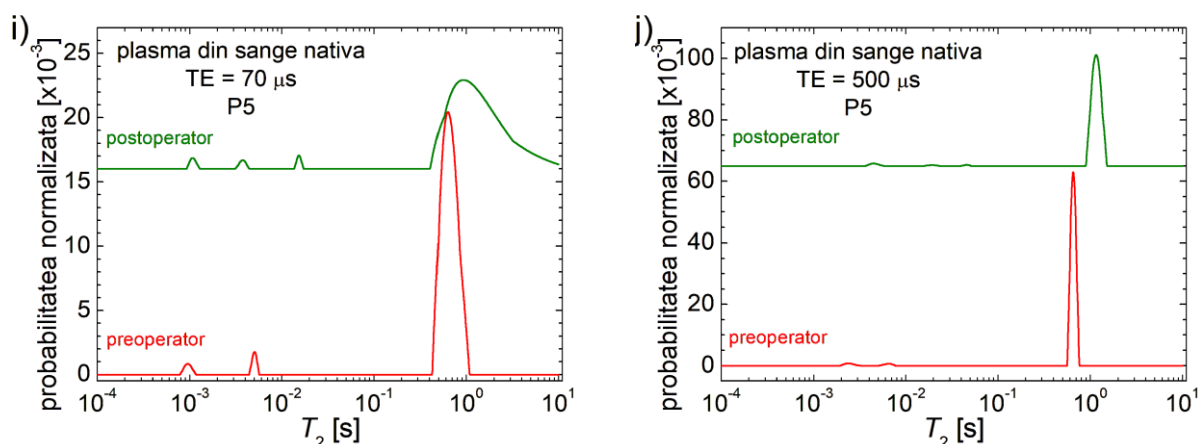
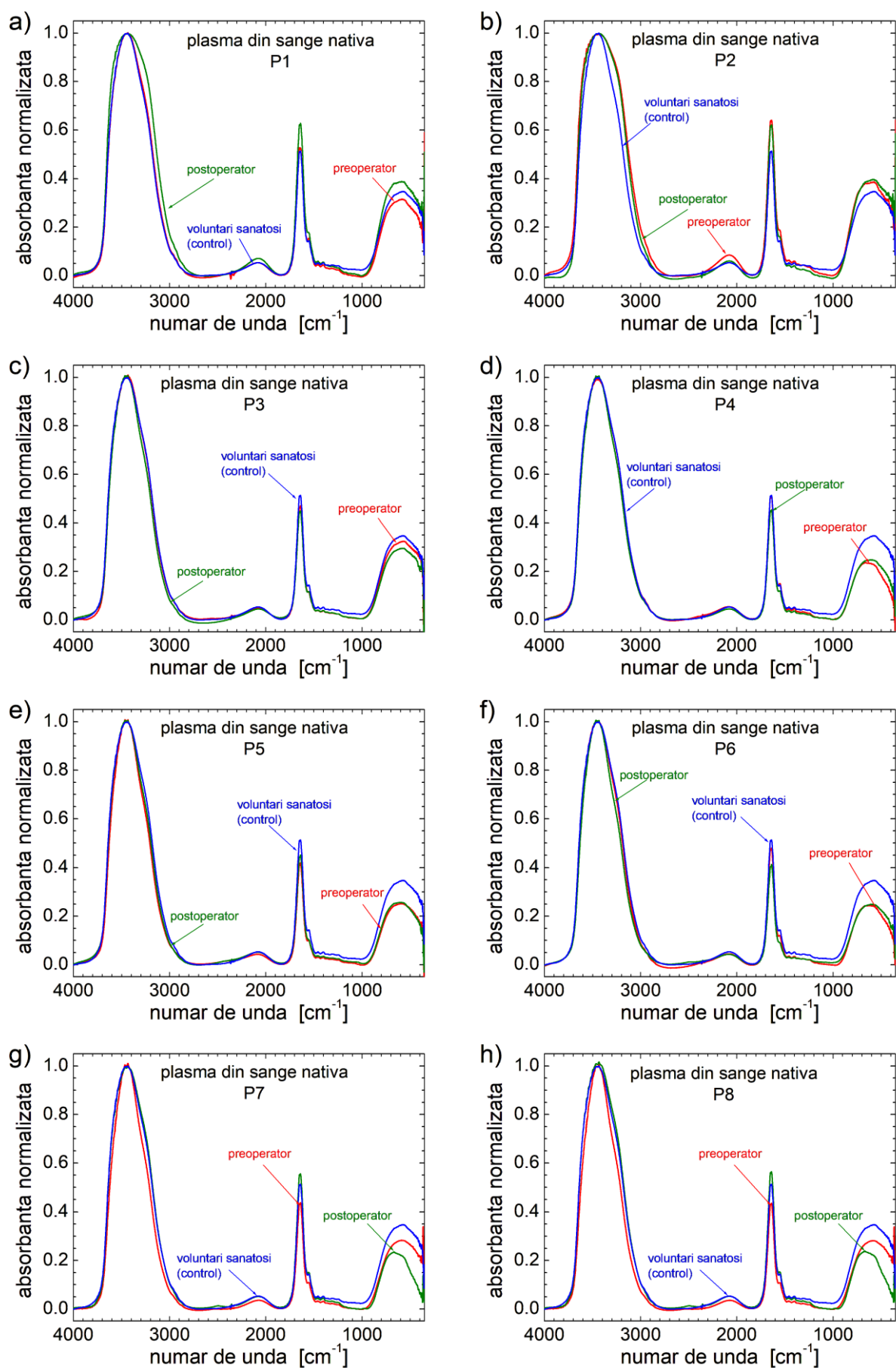


Figura 5.1 Distribuții lui T_2 măsurate cu două valori a timpului de apariție a ecourilor, $TE = 70 \mu s$ și $500 \mu s$ pentru plasma sanguină nativă colectată de la pacienții a) și b) P1; c) și d) P2; e) și f) P3; g) și h) P4; i) și j) P5; cu cancer colorectal preoperator (roșu) și postoperator la 7 zile de la operație (verde).

5.3 Analiza comparativă a plasmei din sânge prin metode de spectroscopie FT-IR

Spre deosebire de relaxometria RMN a 1H , unde spectrele de tip Laplace (distribuțiile lui T_2) sunt interpretate în funcție de poziția *peak*-urilor corelate cu dinamica moleculară influențată de componente (fracțiuni solubile și insolubile), în cazul spectroscopiei în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR), concentrația unei componente specifice (vibrația legăturii moleculare care apare la un număr de undă bine definit) este direct proporțională cu amplitudinea *peak*-ului măsurat. În această situație, spectrele FT-IR măsurate pentru plasma sanguină nativă și deproteinizată colectată de la 20 de voluntari sănătoși au putut fi mediate. Aceste spectre FT-IR sunt prezentate în Figura 5.2 pentru plasma sanguină nativă, și pentru plasma deproteinizată (linia albastră), împreună cu spectrele FT-IR măsurate pentru plasma deproteinizată colectată preoperator (roșu) și postoperator (verde). În comparație cu spectrele FT-IR măsurate pentru plasma deproteinizată, cele măsurate pentru plasma nativă sunt mai simple (vezi Fig. 5.2). Se pot remarca un număr de 5 regiuni distincte [247]: i) un *peak* larg între aprox. $350 - 1000 \text{ cm}^{-1}$; ii) o regiune cu absorbanță mică între aproximativ $1000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$; iii) un *peak* îngust cu umărul drept între aprox. $1500 - 1800 \text{ cm}^{-1}$; iv) un *peak* larg cu amplitudine mică între aproximativ $1850 - 2500 \text{ cm}^{-1}$ și v) un *peak* major între aproximativ $2700 - 3800 \text{ cm}^{-1}$.



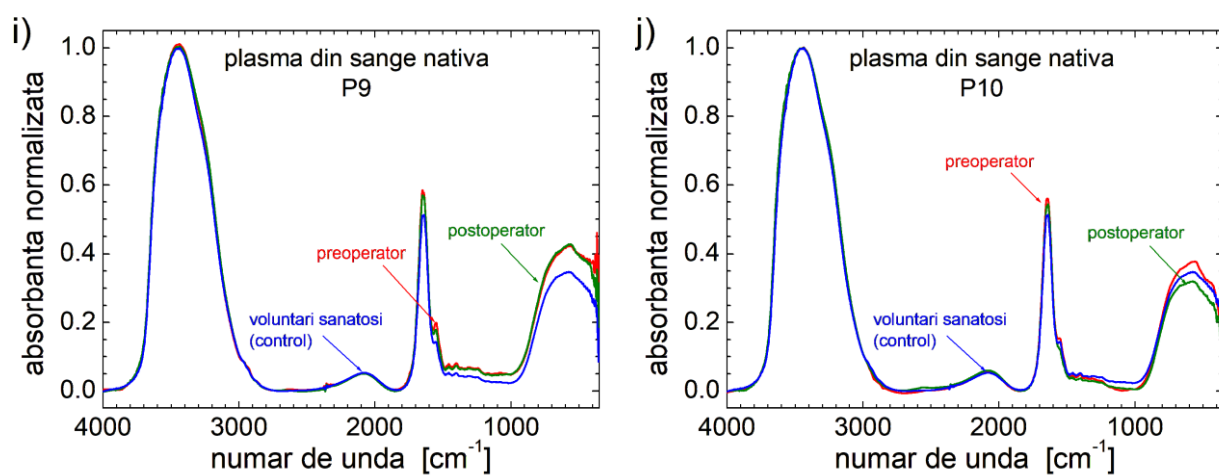


Figura 5.2 Spectrele FT-IR măsurate pentru plasma sanguină nativă colectată de la pacienții a) P1, b) P2; c) P3, d) P4; e) P5, f) P6; g) P7, h) P8; i) P9 și j) P10; cu cancer colorectal preoperator (roșu) și postoperator la 7 zile de la operație (verde) comparativ cu spectrele FT-IR mediate pentru 20 de voluntari sănătoși.

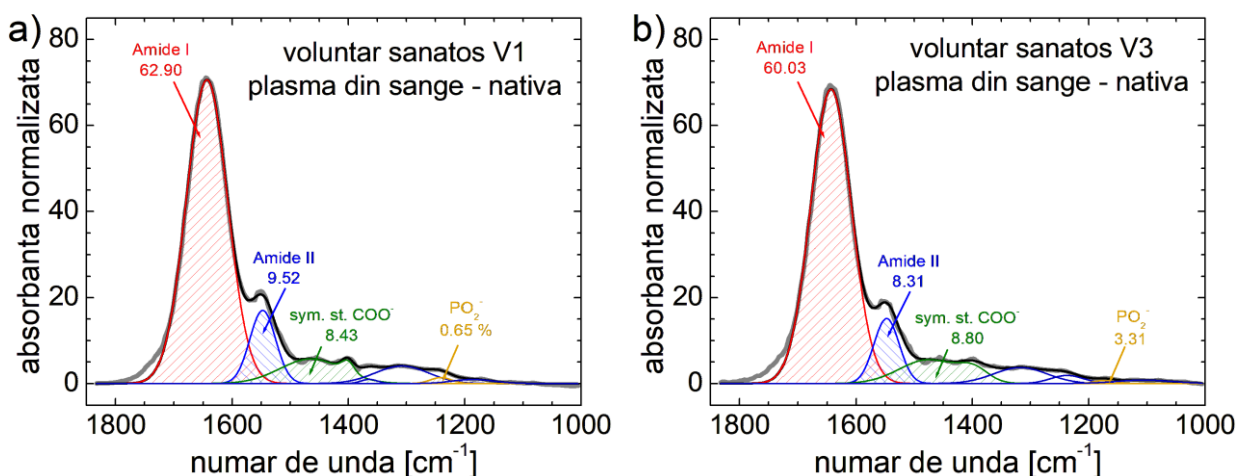
CAPITOLUL 6 ANALIZA STATISTICĂ ÎN COMPONENTE PRINCIPALE A PARAMETRILOR SPECIFICI PENTRU IDENTIFICAREA METABOLITILOR DIN PLASMA SANGUINĂ ȘI INTELIGENȚA ARTIFICIALĂ

6.1 Analiza PCA utilizată pentru identificarea cancerului colorectal în plasma sanguină folosind măsurători de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) și relaxometrie și difuziometrie prin rezonanță magnetică nucleară a ^1H

6.1.1 Parametrii specifici analizei PCA

Din punct de vedere practic, distribuțiile generate prin RMN a timpului de relaxare transversal T_2 și a coeficientului de autodifuzie D , dar în speciale spectrele FT-IR, prezintă unele trăsături caracteristice care nu sunt atât de ușor de cuantificat pentru o clasificare definitivă în categoria voluntarilor sănătoși sau a pacienților cu cancer colorectal. Într-adevăr, în studiul pilot prezentat în capitolele 3 și 4 a fost posibilă identificarea unor astfel de trăsături cum ar fi apariția unui mic *peak* pentru toți pacienții cu cancer colorectal în distribuțiile lui T_2 măsurate pentru plasma sanguină deproteinizată, sau valoarea principală a coeficientului de autodifuzie, D_{main} care s-a găsit într-un interval (sub $2.95 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$) pentru pacienții cu cancer colorectal și într-un alt interval (peste $3.9 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$) pentru voluntarii sănătoși, dar aceasta sunt, în general cazuri particulare. Astfel ca pentru o analiză statistică de cele mai multe ori este necesar ca datele măsurate să fie pregătite cu acest scop.

În afară de vârstă și valoarea principală a coeficientului de autodifuzie, D_{main} o procedură de deconvoluție numerică aplicată asupra spectrelor FT-IR poate duce la un alt set de parametri cuantificabili. Astfel, pentru exemplificare, în figura 6.1 sunt prezentate spectre FT-IR măsurate pentru doi voluntari sănătoși (vezi Figurile 6.1a și 6.1b) și doi pacienți cu cancer colorectal (vezi



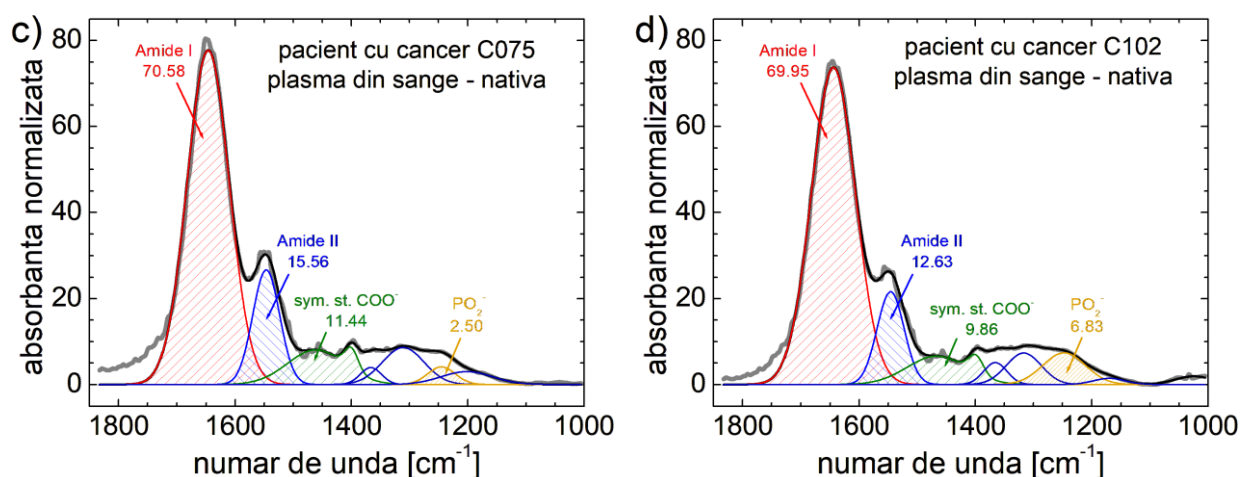


Figura 6.1 Deconvoluția spectrelor FT-IR măsurate pentru plasma nativă colectată de la voluntari sănătoși a) V1 și b) V3 și pentru pacienții cu cancer colorectal c) C075 și d) C102. Sunt prezentate de asemenea ariile integrale corespunzătoare amidei I, Amida II se întinde simetrică a COO^- și PO_2^- .

Figurile 6.1c și 6.1d) în intervalul numerelor de undă de la 1850 cm^{-1} la 1000 cm^{-1} . Împreună cu spectrul măsurat (spectre de culoare gri reprezentate cu linie mai groasă), sunt prezentate rezultatele deconvoluției constând într-o sumă de opt funcții Gaussiene (spectrele reprezentate cu linii negre) precum și fiecare funcție Gaussiană individuală (reprezentată cu culori diferite în Figura 6.1).

Tabel 6.1 Parametrii relevanți pentru analiza componentelor principale, inclusiv vârsta, coeficientul de autodifuzie principal, valorile medii (calculate folosind ecuația (6.14)) ale distribuției T_2 pentru proteinele din plasma sanguină și pentru plasma sanguină nativă și deproteinizată din relaxometria RMN a ^1H cu timpii de apariție a ecoului (TE) de 70 ms, 500 ms și 1000 ms și aria integrată calculată din absorbanta normalizată a spectrelor FT-IR pentru amida I și amida II și vibrațiile de întindere simetrică a legăturilor chimice din grupările funcționale COO^- și PO_2^- evaluate pentru voluntarii sănătoși (V1-V3) și pacienții cu cancer colorectal (C075-C103) [34].

Sample	Age [years]	D_{main} [$10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$]	$T_{2,\text{av}}^{(\text{prot})}$ [ms]	$T_{2,\text{av}}^{(\text{nat. TE=70})}$ [ms]	$T_{2,\text{av}}^{(\text{nat. TE=500})}$ [ms]	$T_{2,\text{av}}^{(\text{DP TE=70})}$ [ms]	$T_{2,\text{av}}^{(\text{DP TE=1000})}$ [ms]	Amide I	Amide II	Sym. St. COO^-	PO_2^-
V1	52	4.28	3.72	493	588	2971	2807	62.90	9.52	8.43	0.65
V2	57	4.32	3.385	575	615	2779	2685	57.56	7.28	7.18	1.06
V3	47	3.94	1.202	554	578	2712	2679	60.03	8.31	8.80	3.31
C075	70	2.55	1.387	610	665	2473	2476	70.58	15.56	11.44	2.50
C081	43	2.51	0.519	499	610	2561	2530	70.69	11.33	11.12	0.37
C098	73	2.89	0.2091	482	541	2496	2658	61.84	9.18	7.83	1.04
C100	73	2.92	0.1816	687	716	2622	2543	63.73	9.68	15.05	1.96
C101	54	2.95	0.5019	611	694	2643	2578	72.68	9.47	11.34	3.10
C102	66	2.53	0.6587	683	709	2705	2640	69.95	12.63	9.86	6.83
C103	66	2.57	1.469	518	598	2658	2719	61.35	8.40	13.14	2.79

Distribuțiile timpului de relaxare T_2 măsurate prin RMN a ^1H prezintă un număr variabil de *peak*-uri în funcție de condițiile experimentale sau de starea de sănătate a pacienților/voluntarilor. Astfel că s-a decis să se simplifice procedura analitică și să se elimine acest inconvenient. Prin urmare, pentru a cuantifica cu un singur număr fiecare distribuție a timpului de relaxare

transversală, T_2 care ar trebui utilizat într-o analiză PCA a fost calculată media ($T_{2,av}$) folosind relația [34],

$$T_{2,av} = \frac{\int_0^\infty f(T_2)T_2 dT_2}{\int_0^\infty f(T_2) dT_2}. \quad (6.14)$$

Valorile calculate ale $T_{2,av}$ sunt prezentate în Tabelul 6.1, pentru toți voluntarii și pacienții cu cancer colorectal pentru distribuțiile lui T_2 măsurate pentru plasma sanguină nativă și deproteinizată și proteinele din plasma sanguină. Acestea sunt, de asemenea, utilizate ca valori de intrare pentru analiza statistică în componentele principale. Vârsta voluntarilor/pacienților cu cancer colorectal, parametrii RMN și parametrii FT-IR, care sunt prezentați în Tabelul 6.1 sunt utilizați împreună pentru analiză statistică în componentele principale [29].

6.1.2 Rezultatele analizei PCA

Rezultatul principal al analizei statistice de tipul PCA, un grafic de dispersie al valorilor PC1 versus PC2 este prezentat în Figura 6.2. Așa cum s-a menționat anterior, analiza PCA presupune un tip special de reprezentare grafică în care mai multe tipuri de parametri (de obicei cu unități de măsură diferite) pot fi reprezentați împreună cu scopul de a separa datele aparținând diferitelor grupuri (clase), dar, în același timp, dacă parametrii aleși sunt relevanți, să conducă la o coagulare (grupare) pentru puncte de date aparținând aceluiași grup [29].

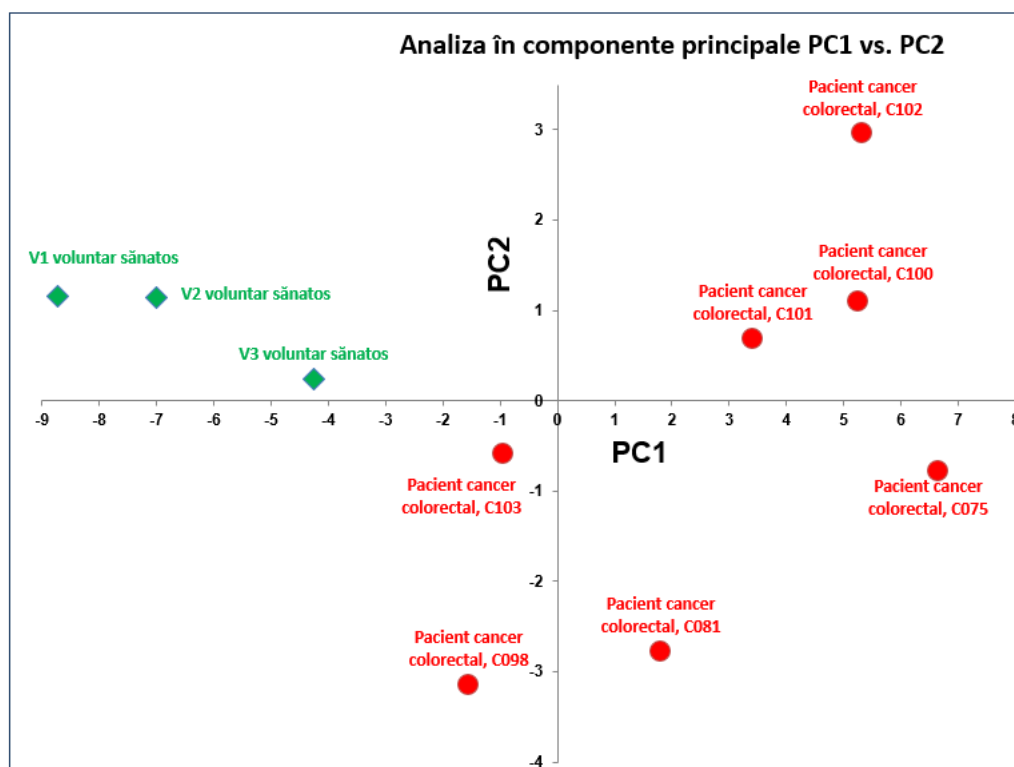


Figura 6.2 Graficul PC1 versus PC2 din analiza componentelor principale.

6.2 Analiza PCA, valorile ROC și AUC utilizate pentru evaluarea vindecării după intervenții chirurgicale la pacienții cu cancer colorectal

6.2.1 Analiza PCA

Așa cum s-a arătat în subcapitolul anterior, pentru a analiza PCA eficientă, de o mare importanță, în plus față de poziția de *peak*-uri este aria integrală de *peak*-uri. O astfel de analiza PCA (corelată cu valorile ROC și AUC) aplicată direct asupra spectrelor FT-IR este utilizată pentru evaluarea vindecării după intervenții chirurgicale la pacienții cu cancer colorectal. Pentru a cuantifica intensitatea spectrelor FT-IR a fost adoptată o strategie diferită față de cea descrisă anterior. S-a observat că procedura de deconvoluție și cuantificarea fiecărui *peak* particular necesită mult timp. Alternativ, se poate aplica o analiză statistică în componente principale (PCA) direct asupra spectrelor FT-IR care presupune doar o transpunere a datelor originale înregistrate ca două coloane (prima cu valorile numerelor de undă și a doua cu absorbanta) într-o singură linie care reprezintă valoarea măsurată a absorbantei spectrului FT-IR iar numerele de undă reprezintă parametrii măsurati. Se creează astfel o matrice care are numărul de coloane egal cu numărul de valori măsurate pentru numerele de undă, iar numărul de linii este egal cu numărul de spectre FT-IR măsurate.

În Figura 6.3a, evoluția de la preoperator la postoperator este marcată cu o săgeată punctată pentru fiecare pacient. Săgeata este neagră dacă evoluția trece de la valori mici PC1 la valori mari PC1 și roșie dacă merge în direcția opusă. Cuantificarea diferitelor comportamente din plasma sanguină nativă (Fig. 6.3a) arată: i) o mică evoluție ca în cazul P9 care rămâne izolat la PC1 și PC2 negativ; ii) o evoluție către clusterul de clusterie sănătoase ca în cazul P10 și P8; iii) evoluția către o nouă stare (la PC1 și PC2 pozitive) reprezentată de mulți indivizi postoperator ca în cazul P1, P2, P3, P4, P5 și P6; și iv) evoluție mică spre o zonă de incertitudine ca în cazul P7, care (din punct de vedere al spectrelor FT-IR măsurate pentru plasma sanguină nativă) postoperator în prima aproximare este similar cu voluntarii sănătoși V16 și V17 și în a doua aproximare cu P8 și P2 preoperator.

În Figura 6.3b se poate observa faptul că un grup mare de simboluri este localizat la valori ale lui PC1 negative este format din voluntari sănătoși, și cazuri preoperatorii și postoperatorii. Se poate observa o altă zonă la numere PC1 pozitive unde avem doar două simboluri preoperatorii aparținând pacienților mai discutați P5 și cei de mai sus identificați ca pacient izolat P9. Componenta PC2 nu pare să fie capabilă să inducă o separare. În PC1, poziția în spectrele FT-IR cu influență mai mare de 90 % se găsește în intervalele de: i) de la ~ 500 până la $\sim 850\text{ cm}^{-1}$; ii) de la ~ 1000 până la 1050 și ~ 1080 până la 2020 cm^{-1} (aparținând întinderii C-O); iii) de la ~ 1350 până la $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ (întinderea simetrică a P-O-C, întinderea simetrică a grupurilor funcționale COO^- și Amidei II); iv) de la ~ 2000 până la $\sim 2300\text{ cm}^{-1}$ (de multe ori neobservat sau observat ca o

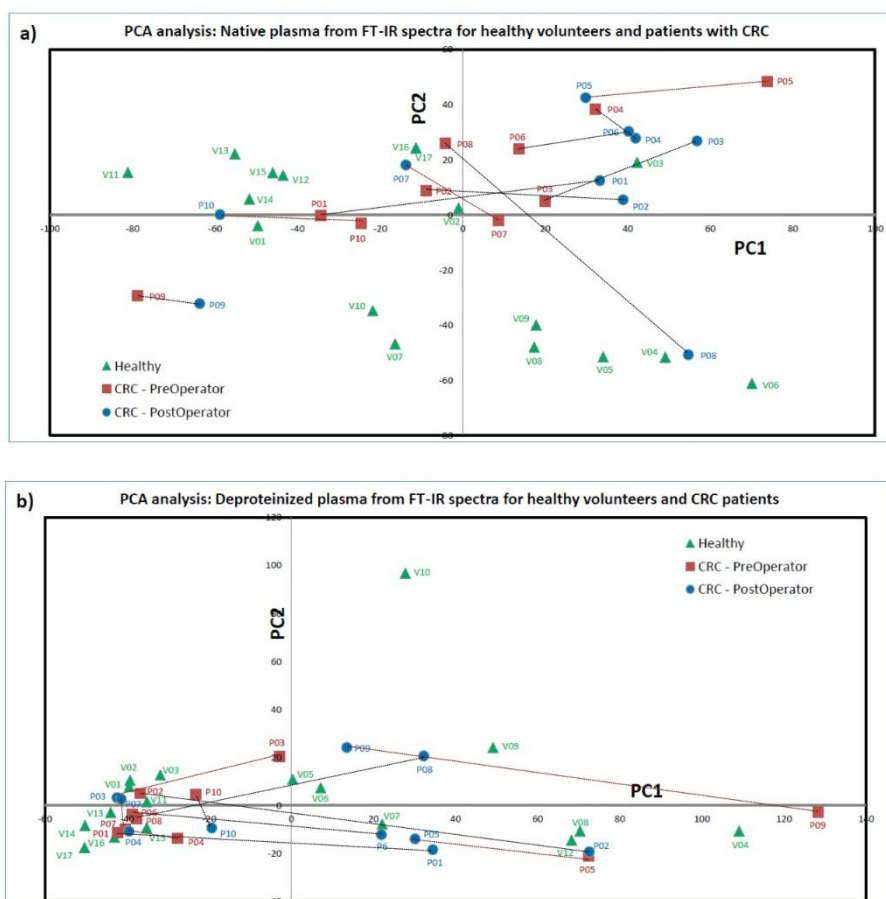


Figura 6.3 Analiza PCA a spectrelor FT-IR măsurate pentru plasmă sanguină a) nativă și b) deproteinizată.

combinație de rotație restrânsă și îndoire a legăturii O-H (din apă) [248]); și v) de la ~ 2400 până la $\sim 3700 \text{ cm}^{-1}$. Practic, PC1 a fost influențat de întregul spectru FT-IR relevant. În acest caz, se pot observa mai multe tipuri de evoluții: i) evoluții mici în interiorul zonei nediscriminatorii ca în cazul P4, P7 și P10; ii) evoluții medii ca în cazul P3 care merge în clusterul nediscriminatoriu sau P5 care intră într-o zonă populată de voluntari sănătoși și pacienți postoperator; și iii) evoluții mari ca în cazul P2, P1, P6 și P8 care trec de la cluster nediscriminatoriu la zona sănătoasă pentru vindecare și P9 care trece de la zona extremă din dreapta la zona sănătoasă pentru vindecare.

6.2.2 Curbele ROC și valorile AUC

Comparativ cu analizele PCA efectuate pe plasma sanguină deproteinizată, curbele ROC arată că analiza PCA efectuată pentru plasma sanguină nativă separă mult mai bine cele patru grupuri formate *ad-hoc*. Acest lucru se observă din AUC corespunzătoare, unde pentru PC1 obținute pentru plasma sanguină nativă (vezi Figura 6.4a) s-au găsit valori aflate între 0.576 (nativ

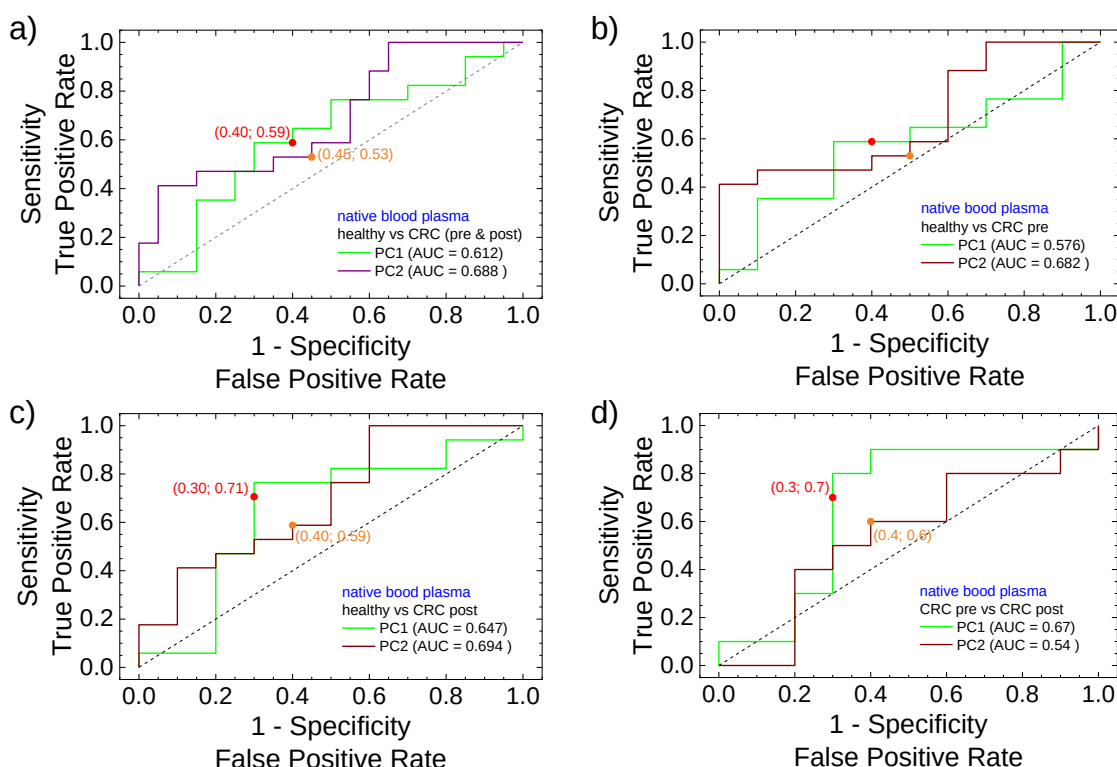
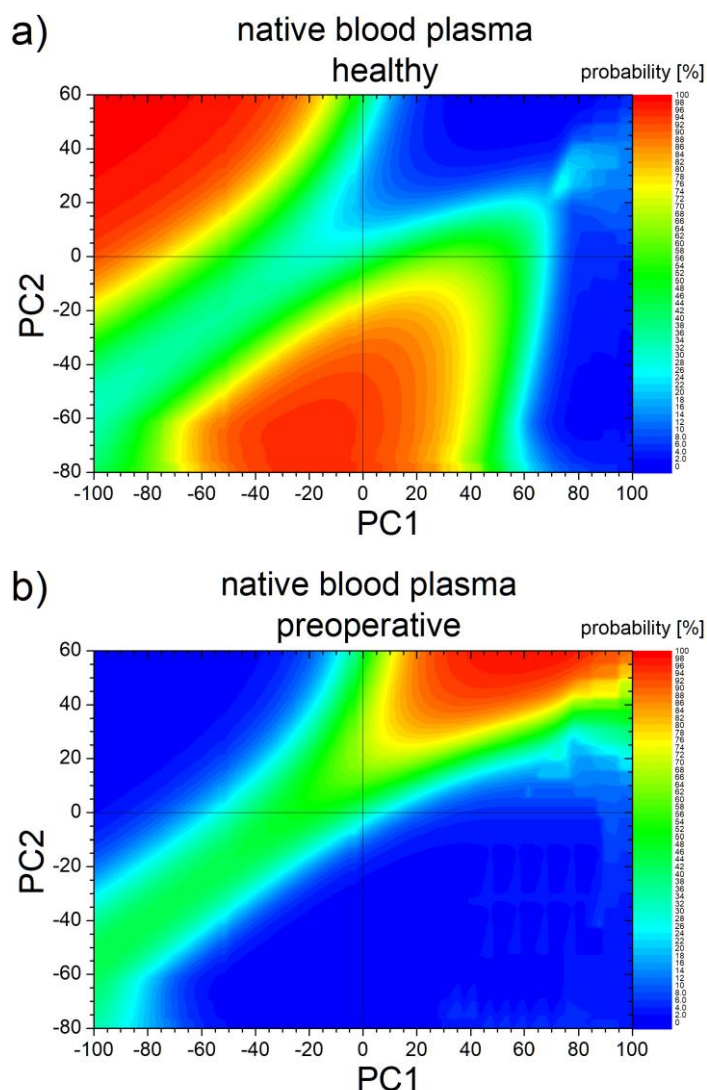


Figura 6.4 Curbele ROC calculate din datele de analiză PCA ale spectrelor FT-IR măsurate pentru probele de sânge nativ pentru PC1 (curba verde) și PC2 (curba maro) luând în considerare perechile analizate a) sănătos (pozitiv) versus CRC (preoperator – preoperator și postoperator – post); b) sănătos (pozitiv) versus CRC (preoperator – pre) c) sănătos (pozitiv) versus CRC (postoperator – post) și d) CRC (preoperator – pre) (pozitiv) versus CRC (postoperator – post). Punctele *de tăiere* optime sunt indicate atât pentru parametrii PC1 și PC2. Mai sunt indicate valorile ariile de sub curbă (AUC).

versus cancer colorectal pre – înainte de operație) și 0.67 (cancer colorectal - pre versus cancer colorectal – post operație). Faptul că PC1 (cu cea mai mare relevanță) prezintă o valoare a AUC ridicată, comparând plasma sanguină nativă colectată de la pacienții cu cancer colorectal preoperator și postoperator indică faptul că se observă o anumită evoluție după operație (aici, *punctul de tăiere* optim a fost situat la 0.7 sensibilitate și 0.3 specificitate). Predicția așteptată a fost ca cea mai clară separare să fie observată între grupul de voluntari sănătoși și grupul de pacienți cu cancer colorectal preoperator (cu specificitate/sensibilitate 1 de 0.4 / 0.6). Cea mai mare valoare a AUC (0.694) a fost obținută pentru componenta PC2 în evaluarea voluntarilor sănătoși versus pacienții cu cancer colorectal postoperator. Acesta este un indiciu clar că procesul de vindecare nu este orientat către o stare descrisă de voluntari sănătoși și, în acest fel, susține, încă o dată, existența unei *stări post-operator* distincte. Cu excepția cazului în care se compară analiza probelor de sânge nativ prelevate de la pacienții cu cancer colorectal preoperator și postoperatorii, pentru restul cazurilor, valoarea AUC măsurată pentru PC2 este mai mare decât cea măsurată pentru PC1.

6.3 Analiza statistică PCA și predicția prin învățare automată

Comparând cele două reprezentări PC1 versus PC2 pe baza spectrelor FT-IR măsurate pentru plasma sanguină nativă și deproteinizată (Figurile 6.5), pentru predicție, s-a ales doar unul, și anume acela care a rezultat din analiza plasmei sanguine native. Datele măsurate (coordonatele PC1 și PC2) împreună cu eticheta corespunzătoare (voluntari sănătoși, pacienți CRC preoperator, pacienți CRC postoperator) au constituit datele de intrare cu care a fost antrenat mașina virtuală. După antrenarea unei rețele neuronale artificiale constituită virtual utilizând un soft scris în acest scop în JavaScript la care s-au adăugat librării specifice. Fiecare punct din zona dreptunghiulară a fost considerat un punct în spațiul imagine (ecran) și s-a cerut rețelei neuronale artificiale antrenate să prezică starea: sănătos, cancer colorectal preoperator sau cancer colorectal postoperator. Această clasificare este normalizată, astfel încât rezultatele pentru fiecare clasă vin ca o probabilitate. Hărțile de probabilitate pentru toate cele trei clase sunt prezentate în Figurile 6.5.



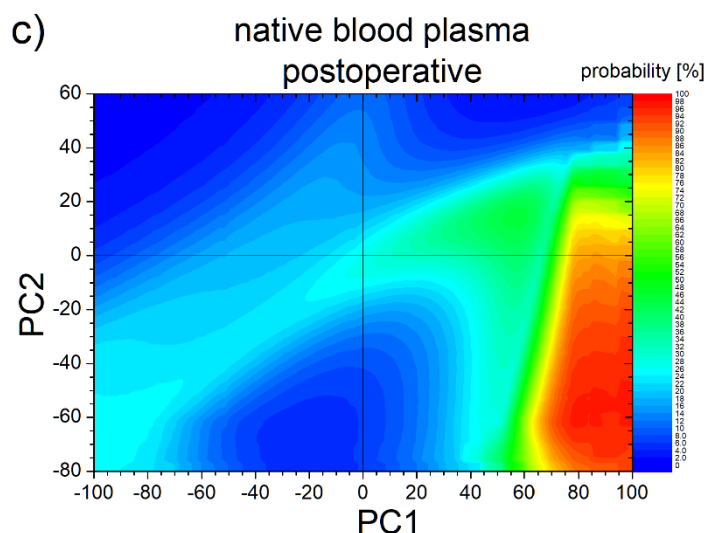


Figura 6.5 Învățarea automată utilizată pentru a prezice starea a) sănătății; și probabilitatea CRC b) preoperatorie și c) postoperatorie din analiza PCA 2D a spectrelor FT-IR măsurate pentru plasma sanguină nativă.

Probabilitățile medii (30 – 70 %) înconjoară zonele cu probabilitate mare (vezi culoarea verde), iar probabilitatea scăzută (culoare albastră) se găsește la valori mari ale PC1 (zona I) și valori pozitive ale PC1 și PC2 (zona II). Se poate observa o probabilitate crescută (~ 25 %), comparativ cu punctele înconjurătoare, și se regăsește pentru valori de aproximativ 70 – 80 pentru PC1 și de 20 – 30 pentru PC2 datorită prezenței V3. Ne așteptăm la o probabilitate medie de-a lungul întregii zone cvasi-diagonale. Algoritmul de învățare automată a prezis o probabilitate crescută pentru valori pozitive ale lui PC1 și valori mari (> 30) ale lui PC2.

De un interes real a fost harta prezisă și asociată măsurării spectrelor FT-IR pe plasma sanguină nativă colectată de la pacienții cu cancer colorectal la 7 zile după operație. Acest lucru se datorează faptului că în graficul PC1 versus PC2 (vezi Fig. 6.3a) punctele asociate cu această categorie nu formează un cluster separat. Dar aceste puncte sunt în vecinătatea punctelor asociate cu unul sau două din cealaltă categorie. În mod surprinzător, se poate găsi o zonă izolată care este caracterizată de o probabilitate ridicată pentru a localiza pacienții postoperator. Aceasta poate fi găsită la valori mari PC1 și valori PC2 negative. Este surprinzător, deoarece în acest domeniu avem un singur punct, aparținând P8 postoperator. Mai mult, V6 este mai aproape de acea zonă decât P8. Acest artefact se datorează mai probabil unui antrenament incomplet. Restul hărții este credibil și se poate găsi o probabilitate ridicată (~ 40 – 70 % - culori verzi) pentru valori pozitive PC1 și valori pozitive (până la ~ 30) pentru PC2 care acoperă zona numită de *vindecare*. După cum s-a menționat anterior, la valori PC1 pozitive (25 – 60) și valori PC2 negative, avem și o probabilitate crescută (albastru deschis la verde) datorită prezenței P8 postoperator.

CAPITOLUL 7 IDENTIFICAREA COMPONENTELOR CANCEROASE DIN PLASMA SANGUINA PRIN SPECTROSCOPIE RMN DE ÎNALTA REZOLUȚIE

7.1 Analiza spectrelor folosind interfața Processing și cuantificarea metaboliților

Ultimul pas pentru cuantificarea metaboliților din fiecare spectru RMN a ^1H înregistrat pentru plasma din sânge este citirea acestuia (utilizând un soft scris în ProcessingTM) sub formă de text, așa cum se obține în urma exportului folosind softul jMRUITM. Acest soft este dezvoltat de către un grup de cercetători de la Universitatea Tehnică din Cluj-Napoca, în ultimii 10 ani, și este special dedicat analizei și cuantificării spectrelor RMN a ^1H înregistrate pentru țesuturi (*in vivo*)

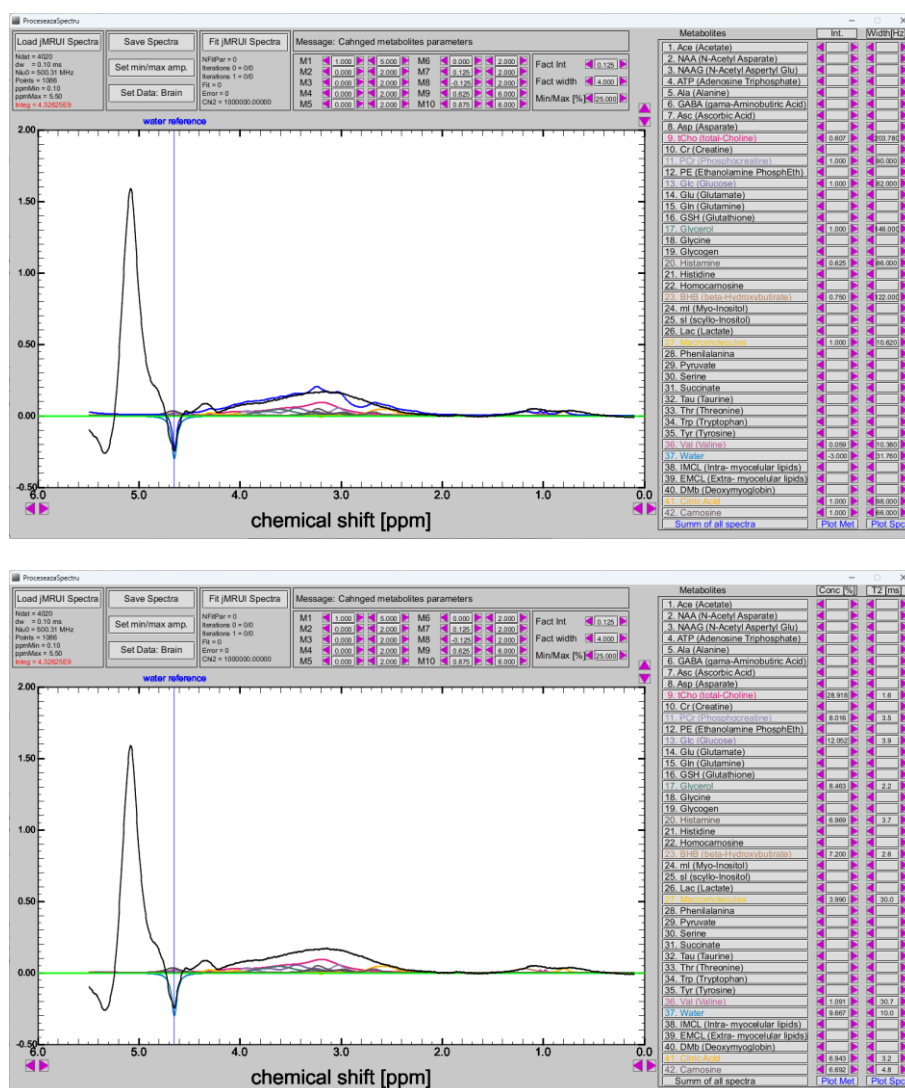


Figura 7.1. Captura de ecran cu fereastra softului Processing care prezintă spectrele RMN a ^1H înregistrate pentru plasma din sânge nativă, colectată de la pacienții P105 cu cancer colorectal și contribuția câtorva metaboliți identificați a) intensitate și lărgime de linie și b) concentrație și timpul de relaxare T_2 .

sau *ex-vivo*) sau a materialelor biologice (cum este sângele sau plasma din sânge) și care implică prezența unui număr mare de metaboliți. Spectrele RMN a ^1H pentru un număr de 41 de

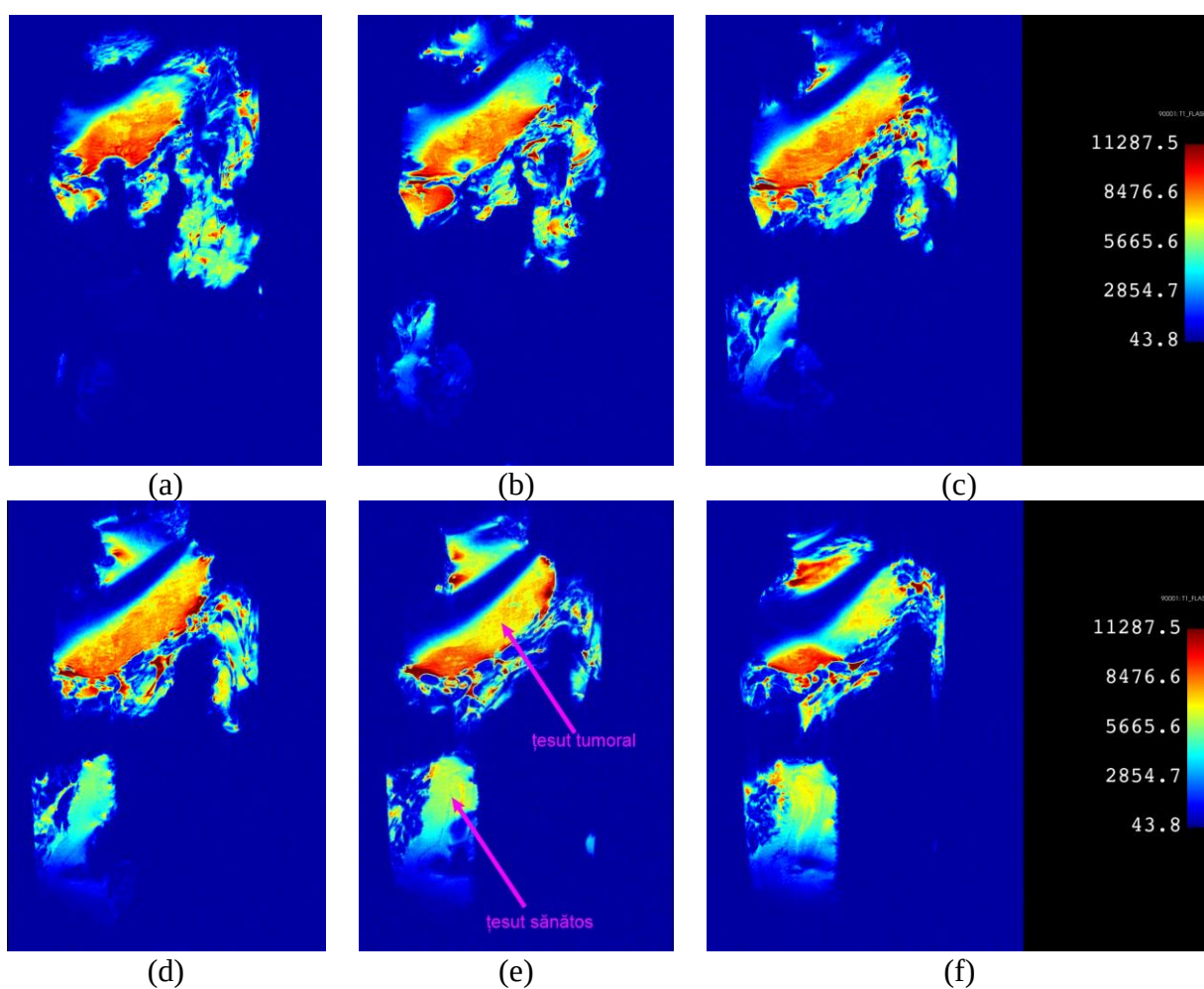
metaboliții și apă pot să fie simulate ținând cont de numărul total de linii de absorbție și de cuplajele scalare (J) dintre spinii nucleari. Intensitatea fiecărui metabolit poate să fie ușor modificată, precum și lărgimea de linie, parametru care este legat de câmpul magnetic care a fost utilizat experimental (intensitatea acestuia și omogenitatea). Efectul omogenității (deci a lărgimii de linie) a fost explorat în subcapitolul 2.1.4, unde pentru o serie de metaboliții s-au prezentat spectrele pentru o lărgime de linie la semînălțime $\Delta\nu = 0.5, 1.0, 2.0$ și 4.0 Hz. Prin apăsarea unui buton (*load jMRUI Spectra*) spectrul RMN a ^1H este citit din fișierul corespunzător (exportat din jMRUI și localizat în directorul Input al programului de bază), și reprezentat grafic cu o curbă neagră (vezi Figurile 7.1). În următorul pas se aleg limitele de reprezentare a spectrului (în amplitudine și în deplasarea chimică). Softul permite aproximarea datelor cu o sumă de spectre individuale ale metaboliților folosind algoritmul Levenberg–Marquardt. Pentru această se apasă butonul *Fit jMRUI Spectra*. Eroarea și abaterea pătratică medie (χ^2) sunt parametrii de evaluare a gradului de aproximare. Acest algoritm implica că pentru valorile parametrilor de aproximat să se ofere câte o valoare inițială. Iar convergența aproximării (rata de succes) este de cele mai multe ori condiționată de alegerea unui set de valori a parametrilor (aproximația inițială) cât mai buni. Numărul de parametri de aproximat este mare, pentru fiecare metabolit se ține cont de amplitudinea (sau intensitatea) semnalului precum și de lărgimea de linie. O alegere neinspirată de cele mai multe ori duce la o neconvergență a spectrului simulat către cel măsurat, dar în anumite cazuri poate să ducă la o divergență care să implice valori non-fizice pentru anumiți parametri de aproximat. Astfel ca, pentru *protecția* datelor, s-a implementat o procedură care să permită variația parametrilor numai cu un anumit procent în jurul aproximației inițiale. Astfel, primul pas pentru inițierea aproximării spectrelor este să se aleagă, din lista prezentată în meniul din dreapta (vezi Figurile 7.1) pe rând fiecare metabolit și să se observe dacă ar putea fi prezent în spectrul măsurat. Sunt eliminați metaboliții pentru care amplitudinea spectrului măsurat, la valorile deplasărilor chimice pentru care sunt definiți (pentru toate aceste valori), este zero sau neglijabilă. Acesta trăsătură, care permite observarea spectrului RMN al fiecărui metabolit pentru întreg domeniul de definiție, este esențială și nu este implementată în nici unul dintre softurile descrise anterior (ParaVision™ 360 v3.5, Bruker-TopSpin™ sau jMRUI™), motiv pentru care nu au fost utilizate pentru cuantificarea metaboliților. Astfel, nu se poate afirma prezența unui metabolit din spectrele RMN măsurate, dacă spectrul caracteristic metabolitului nu poate să fie prezentat ca o deconvoluție pentru întreg domeniul de definiție (vezi Figura 7.7) și nu numai pentru valori specifice unice, așa cum sunt prezentate de către, de exemplu, softul ParaVision™ 360 v3.5.

CAPITOLUL 8 METODE AVANSATE DE RMN ÎN CÂMPURI ÎNALTE PENTRU ANALIZA BIOPSIILOR RECOLTATE DE LA PACIENȚII CU CANCER COLORECTAL

8.1 Imagistică RMN pentru evaluarea biopsiilor recoltate din zona colonului și rectului

8.1.1 Imagini RMN codate cu T_1

Imaginile RMN ale unor biopsii nu sunt la fel de spectaculoase precum cele înregistrate pentru organe întregi. În Figura 8.2 sunt prezentate o serie de astfel de imagini RMN achiziționate ca o serie de 9 felii în secțiune sagitală, folosind protocolul T_1 -FLASH, la tomografului RMN 11.7 T măsurate la 24 de ore după biopsie pentru două țesuturi din același colon în zona cu cancer – sus



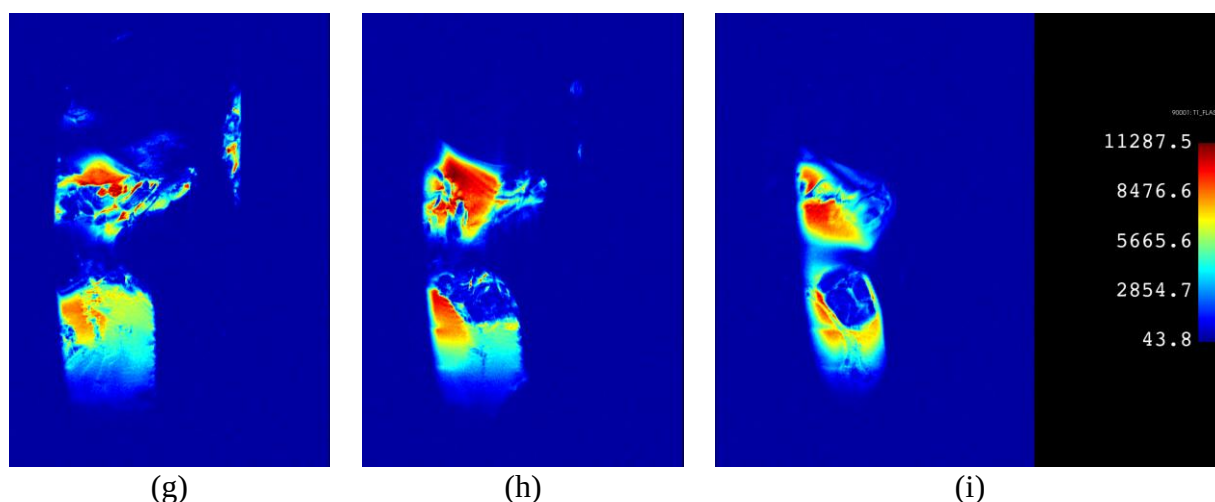


Figura 8.1. Imaginile a 9 felii codate cu timpul de relaxare longitudinal T_1 achiziționate folosind protocolul T_1 -FLASH la tomografului RMN BioSpec 11.7 T pentru două țesuturi (cu cancer – sus și sănătos – jos) colectate de la un pacient cu cancer măsurate la 24 de ore după biopsie.

și sănătos – jos, colectate de la un pacient cu cancer. Pentru o interpretare mai profundă a imaginilor, este necesară cunoașterea componentelor anatomice care compun colonul și care pot să fie observate în secțiune axială. Astfel, pentru o secțiune completă a unui colon sigmoid (zona colonului apropiată de rect) s-ar putea observa lumenul, care este spațiul gol din interior prin care trec *in vivo* materiile fecale. Această componentă nu este vizibilă în imaginile prezentate în acest capitol deoarece în urma biopsiei nu s-a recoltat întreg colonul. Ceea ce se poate observa în Figura 8.1 este peretele colonului sigmoid. Acesta este compus din patru straturi principale: i) stratul interior (care secretă un mucus cu scopul de a facilita trecerea materiilor fecale) se numește mucoasă; ii) următorul strat este format dintr-un țesut conjunctiv (care conține vasele de sânge, vase limfatice și nervi) și care se numește submucoasă; iii) mucoasa și submucoasa sunt separate de un strat de musculatură a mucoasei; iv) mai există și o musculatură proprie și care presupune existența a cate unui strat muscular responsabil de peristaltism (care reprezintă ansamblul mișcărilor colonului care duc la deplasarea deșeurilor – materiile fecale – spre rect, și care, la nivelul intestinului gros, apare cu o frecvență redusă de doar câteva ori pe zi), și care are câte o componentă circulară (internă) și una longitudinală (externă); v) stratul exterior care apare ca o membrană seroasă care acoperă colonul sigmoid se numește seroasă; vi) aceasta este înconjurată de peritoneu; vii) la exterior există un țesut adipos mezenteric: înconjoară colonul sigmoid și conține vase de sânge și limfatice care alimentează colonul. Dacă ar fi să descriem mecanismul invaziei canceroase atunci se poate spune că inițial, cancerul colorectal rămâne limitat la zona internă a mucoasei. Ulterior acesta poate să invadeze submucoasa și stratul muscular. În acest moment riscul de metastază prin vasele limfatice și de sânge este crescut. În stadii avansate cancerul colorectal, poate să invadeze seroasa și peritoneul ajungând la vasele mezenterice și de aici la structurile adiacente care pot fi, vezica urinară și uretere sau uterul la femei.

8.1.2 Imagini RMN codate cu T_2

Cele mai cunoscute timpuri de imagini RMN sunt cele codate cu timpul de relaxare spin-spin T_2 . De cele mai multe ori un timp de relaxare spin-rețea T_1 mic este asociat cu un timp de relaxare spin-spin T_2 mic (dar acest lucru nu este o regulă, mai ales ca în cazul real unde nu avem o singură valoare pentru acești doi timpuri de relaxare, T_1 și T_2 , ci o distribuție de valori, indicând prezența unor componente cu dinamică moleculară complexă). Astfel că, în imaginile RMN codate cu timpul de relaxare spin-spin T_2 , așa cum este cazul celor prezentate în Figura 8.2 și care au fost înregistrate folosind protocolul T2-TurboRARE la tomografului RMN BioSpec de 11.7 T, zonele mai intens colorate vor fi descrise de o valoare mare a timpului de relaxare spin-spin T_2 și/sau de o valoare mare a densității de spin. În imaginile 8.2a până la 8.2f se poate observa astfel că zona țesutului tumoral este reprezentată cu culori de nuanțe albastrii și care pot să fie asociate cu valori ale semnalului RMN aflate cam până la 25 % din valorile maxime obținute (în aceste imagini – valorile sunt reprezentate ca numere în sistemul intern al spectrometrului fără a se putea indica o unitate de măsură mai concretă) și care înseamnă că atât timpul de relaxare spin-spin T_2 , este mic cât și densitatea de spin este relativ (la alte zone din imagine) redusă. În schimb, zonele periferice, care au fost asociate cu seroasa, țesutul adipos și vasele de sânge și limfatice sunt caracterizate de către un timp de relaxare spin-spin T_2 mare cât și de o densitate mare de hidrogen. Acesta are sursa cea mai probabilă în apa, care poate să fie găsită în abundență în aceste straturi ale colonului sigmoid. În același timp, din figurile 8.2c până la 8.2f, se poate observa că și țesutul sănătos este caracterizat de semnalele RMN aflate cam până la 20-25 % din valorile maxime obținute și care la fel poate să fie asociate cu un timp de relaxare spin-spin T_2 mic cât și cu o densitate de spini (^1H) relativ redusă. Acest lucru face mai dificilă identificarea cancerului colorectal direct din astfel de imagini codate, cu timpul de relaxare spin-spin T_2 . Pentru aceasta ar fi necesară ignorarea (din punct de vedere practic, saturarea imaginilor în zonele periferice: seroasa, țesutul adipos și vasele de sânge și limfatice) și obținerea unui contrast îmbunătățit pentru zonele de 15-25 % din semnal. Din acest punct de vedere se poate spune că imaginile codate cu timpul de relaxare spin-rețea T_1 , (așa cum sunt cele prezentate în Figura 8.1 înregistrate cu protocolul T_1 -FLASH) prezintă un contrast natural (obținut fără a folosi agenți de contrast) mai bun decât imaginile codate cu timpul relaxare spin-spin T_2 (așa cum sunt cele prezentate în Figura 8.3 și care au fost înregistrate folosind protocolul T2-TurboRARE). Altfel, din ambele tipuri de imagini se pot observa anumite trăsături care indică textura țesuturilor în special din zona internă a colonului cum este cea a mucoasei și a țesutului conjunctiv. Un avantaj net al tehnicilor de imagistica RMN este acela că, odată identificată zona tumorală, aceasta poate să fie foarte bine delimitată, și deci, cuantificată ca întindere spațială.

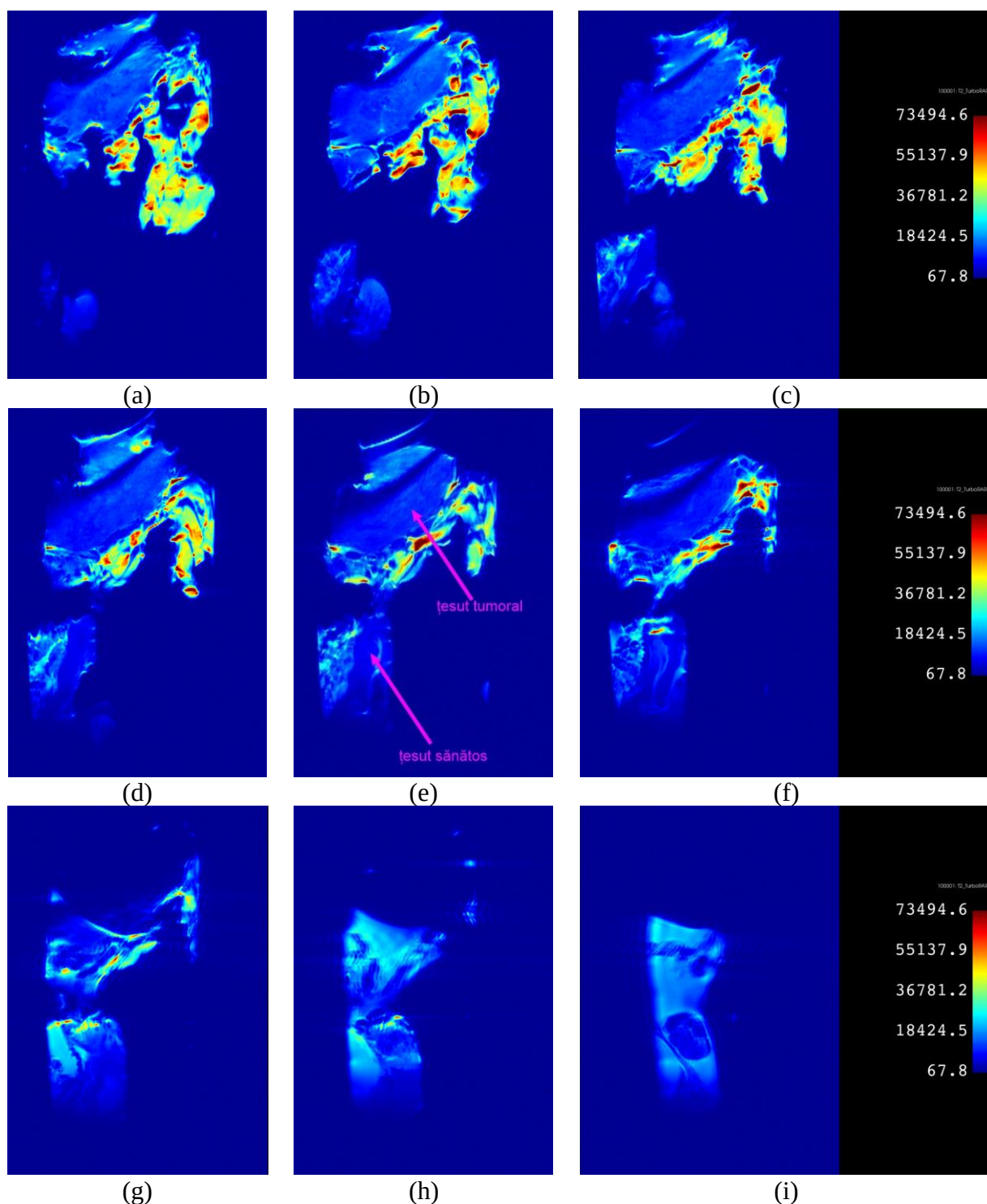


Figura 8.2. Imaginile a 9 felii codate cu timpul de relaxare longitudinal T_2 achiziționate folosind protocolul T2-TurboRARE la tomografului RMN BioSpec 11.7 T pentru două țesuturi (cu cancer – sus și sănătos - jos) colectate de la un pacient cu cancer, măsurate la 24 de ore după biopsie.

8.2. Spectroscopie RMN a biopsiei țesutului tumoral

În spectrul RMN a ^1H de înaltă rezoluție înregistrat în câmpuri înalte (11.7 T) pentru țesutul tumoral, se observă prezența, în plus, față de spectrul înregistrat pentru țesutul sănătos a mai multor metaboliți. În primul rând, se observa *peak*-urii cu amplitudini (relativ) mari, localizați la ~ 1.1 ppm și ~ 0.67 ppm precum și seria de *peak*-uri cu amplitudine mai mică, localizați în domeniul de

la ~ 1.7 ppm până la ~ 3.3 ppm. În al doilea rând, se observa faptul că în urma cuantificării se obține un număr mai mare de metaboliți (la care se adaugă macromolecule și apă), care evident duc la modificarea concentrației astfel: i) apă ($\sim 41.4\%$ ↓); ii) adenosin trifosfat (ATP) ($\sim 11.38\%$ ↓); iii) macromolecule, în special M1, M2 și M9 ($\sim 8.86\%$ ↑); iv) alanină (0% ↓); v) valină ($\sim 14.83\%$ ↑); vi) lipide intracelulare (0% ↓); vii) acid ascorbic ($\sim 1.28\%$ ↑); viii) glucoza (0% ↓); ix) lactat ($\sim 1.91\%$ ↑); la care se adaugă o serie de noi metaboliți.

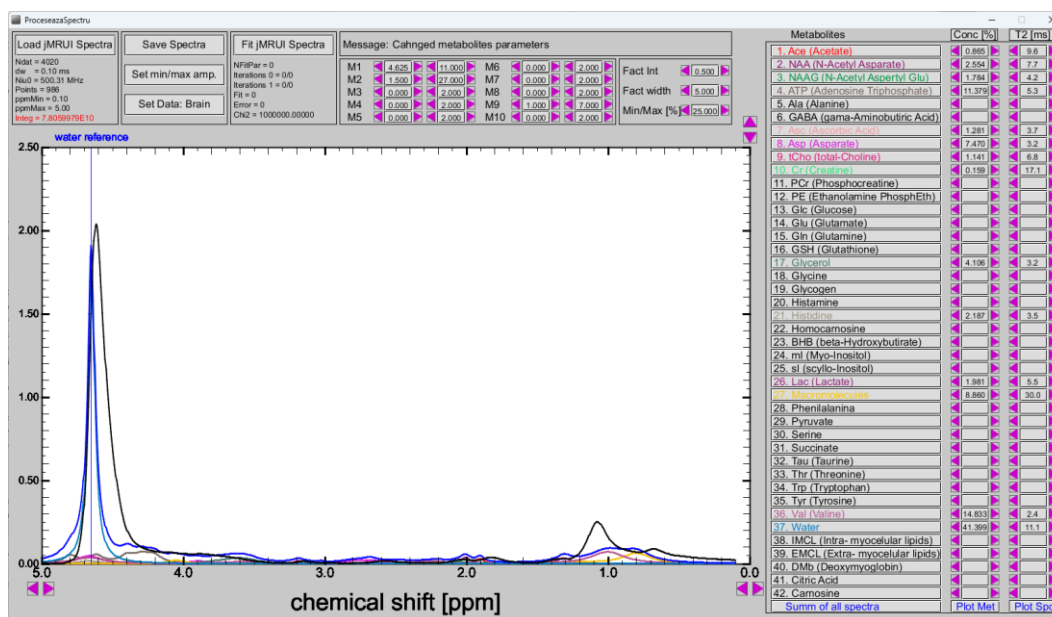


Figura 8.3. Captura de ecran cu fereastra softului Processing care prezintă spectrele RMN a ^1H înregistrate pentru țesutul tumoral colectat de la un pacient cu cancer colorectal și contribuția câtorva metaboliți identificați, concentrațiile și timpul de relaxare T_2 ale acestora.

x) asparat ($\sim 7.47\%$ ↑); xi) glicerol ($\sim 4.11\%$ ↑); xii) NAA (N-acetil asparat) ($\sim 2.55\%$ ↑); xiii) histidină ($\sim 2.19\%$ ↑); xiv) NAAG (N-acetil aspartil glutamat) ($\sim 1.78\%$ ↑); xv) colină totală ($\sim 1.14\%$ ↑); xvi) acetat ($\sim 0.87\%$ ↑) și xvii) creatinina ($\sim 0.16\%$ ↑). Timpul de relaxare T_2 estimat pentru macromolecule a rămas același (30 ms), dar a crescut pentru apă (11.1 ms). Altfel, în general, valorile timpului de relaxare T_2 are valori între 2.4 ms (valină) și 9.6 ms (acetat), indicând o ușoară îngustare a liniilor de absorbție în spectrul RMN a ^1H de înaltă rezoluție înregistrat pentru biopsia țesutului tumoral.

8.3 Relaxometrie RMN în câmpuri înalte

8.3.1 Distribuțiile lui T_2 obținute pentru biopsii ale țesutului tumoral și sănătos

În jumătatea inferioară-dreapta sunt prezentate căderile CPMG obținute utilizând softul Bruker ParaVision 360 v3.5 care operează spectrometrul RMN BioSpec 11.7 T. Acestea au fost obținute din secvența de 64 de imagini înregistrate pentru o biopsie a unui țesut (afectat de cancer colorectal și o margine de rezecție) localizat în zona colonului. Împreună cu datele experimentale sunt prezentate și erorile statistice (valori medii și abaterea pătratică medie obținută statistic pentru

toți voxelii care compun fiecare zonă de interes), dar și aproximarea cu o funcție mono-exponențială (singura disponibilă pentru softul Bruker ParaVision 360 v3.5). Se observă valorile unice ale timpilor de relaxare T_2 , măsurați pentru țesutul tumoral ($T_2^{\text{tumoare}} = 17.70 \text{ ms}$) și pentru țesutul sănătos ($T_2^{\text{sănătos}} = 19.99 \text{ ms}$). În partea inferior-centrală se observă o hartă (mapă) obținută ca valoare a timpilor de relaxare T_2 , măsurați în fiecare voxel.

Din analiza curbelor de aproximare (fitare) a datelor experimentale se observă că acestea aproximare poate fi caracterizată ca deficitară. Astfel, este necesar a fi implementată o altă metodă de aproximare a datelor experimentale și care a mai fost prezentată în cadrul programului experimental al prezentei teze, și anume analiza curbelor CPMG utilizând transformata Laplace inversă. Distribuțiile timpilor de relaxare spin-spin (transversală) a celor 2 curbe CPMG prezentate sunt reprezentate comparativ în Figura 8.4. Se observă că țesuturile (atât cel tumoral cât și cel sănătos) sunt caracterizate, nu de o componentă dinamică (așa cum ar rezulta din analiza primară Bruker ParaVision) ci de 4 componente cu dinamică moleculară diferită.

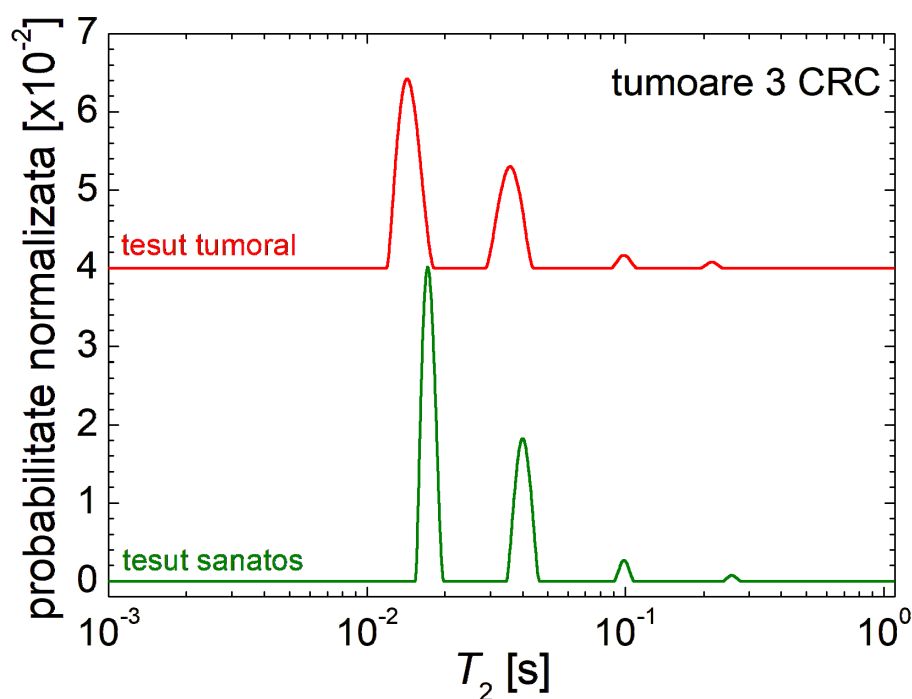


Figura 8.4. Distribuțiile timpului de relaxare T_2 măsurate prin RMN a ^1H înregistrate în câmpuri magnetice înalte (*ex-vivo*) pentru biopsia unui țesutul tumoral (roșu) și un țesut marginal sănătos (verde), ambele colectate de la un pacient cu cancer colorectal.

8.3.2 Mape parametrice de T_2 obținute pentru biopsii ale țesutului tumoral și sănătos

Scopul ultim al studiilor de relaxometrie RMN utilizând imagini înregistrate în câmpuri înalte este acela de a obține mape parametrice care să conțină informații despre localizarea în spațiu

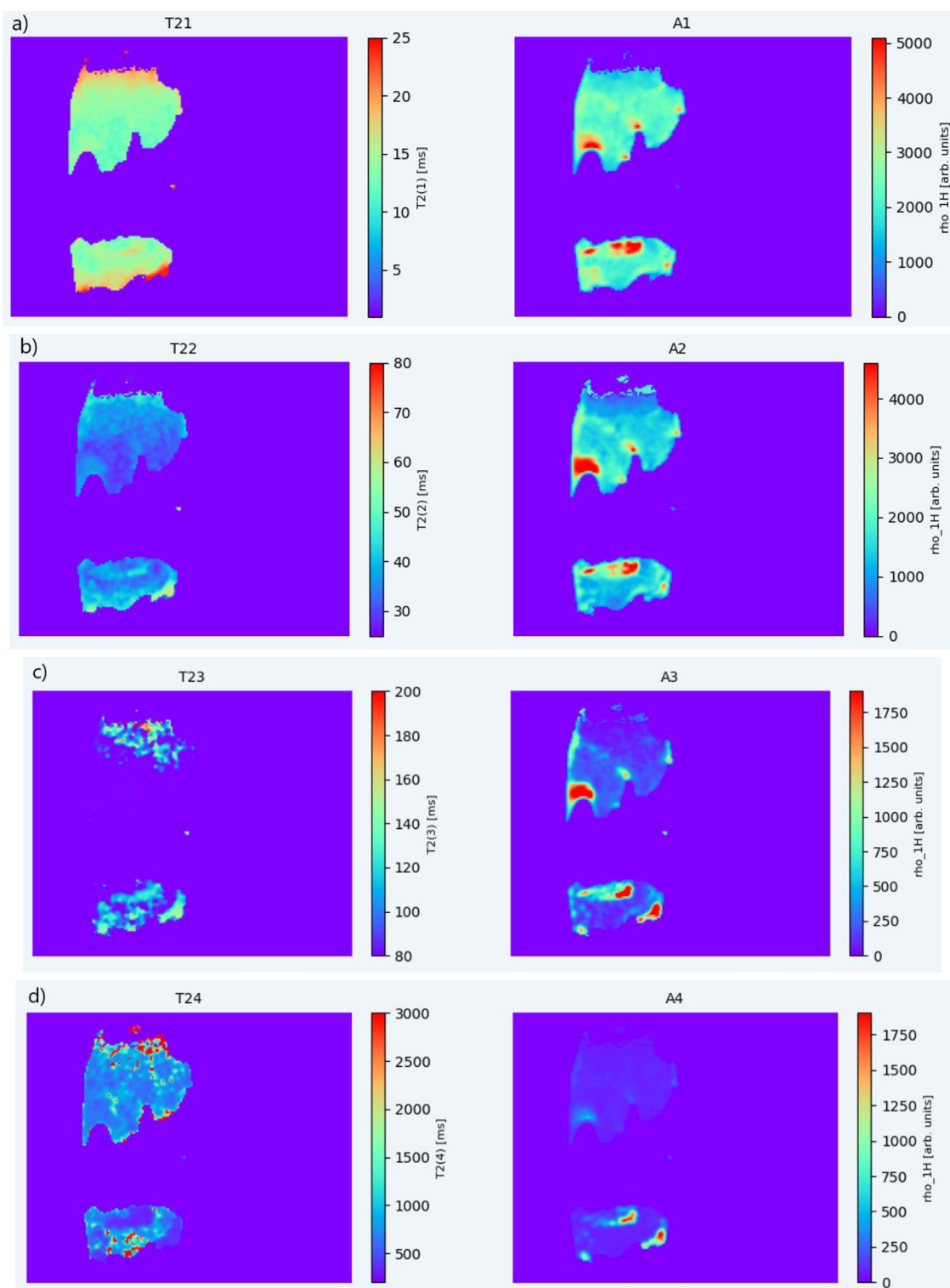


Figura 8.5. Mape parametrice care reprezintă distribuțiile spațiale ale timpului de relaxare T_2 și ale densității de spini (1H) măsurate prin RMN a 1H înregistrate în câmpuri magnetice înalte (*ex-vivo*) din căderea trenului de ecouri prezentat în Figura 8.7 pentru biopsia unui țesut tumoral și un țesut marginal sănătos, ambele colectate de la un pacient cu cancer colorectal.

a diverselor *părți componente* (țesuturi, subsecțiuni de țesuturi, țesuturi cu diverse caracteristici – de exemplu tumorale) prin obținerea unui contrast cat mai relevant dintre zona de interes si zonele adiacente.

CONCLUZII

1. A fost elaborat un plan de cercetare cu scopul de a efectua o caracterizare complexă unor materiale cu origini biologice cum sunt fluidele (plasma din sânge) și țesuturilor umane, atât de la pacienți diagnosticați cu cancer colorectal cât și de la subiecți sănătoși din grupul de control.
2. A fost definit cu rigurozitate criteriul de selecție al pacienților cu cancer colorectal și a voluntarilor sănătoși incluși în studiu, pentru care s-au avut în vedere atât aspecte clinice și biologice relevante, cât și compatibilitatea acestora cu obiectivele cercetării. Procesul de recrutare a implicat evaluarea detaliată a istoricului medical, a parametrilor biologici și a criteriilor de incluziune și excludere, asigurând astfel validitatea și relevanța rezultatelor obținute.
3. Metode moderne de relaxometrie și difuziometrie RMN a ^1H în câmpuri magnetice joase au fost utilizate cu succes pentru caracterizarea plasmă sanguină (native, deproteinizate precum și a proteinelor din plasmă), fiind inițial aplicate pe un lot mic de probe în cadrul unui studiu pilot, iar ulterior extinse la un lot mai mare de probe, pentru a obține rezultate mai robuste și reprezentative într-un studiu extins.
4. S-a demonstrat că valorile principale ale coeficientului de autodifuzie, D poate să fie utilizat cu succes pentru a diferenția probele biologice de tipul plasmă nativă care provin de la pacienții cu cancer colorectal față de cele care provin de la voluntarii sănătoși.
5. Spectroscopia FT-IR s-a dovedit a fi o metodă eficientă pentru caracterizarea complexă a acelorași elemente componente ale plasmă sanguină, fiind aplicată inițial pe același lot mic de probe din cadrul studiului pilot, iar ulterior extinsă la un lot mai mare, pentru a valida și consolida rezultatele obținute.
6. S-a demonstrat că metode moderne de relaxometrie RMN a ^1H și spectroscopie FT-IR aplicate asupra unor seturi de probe de plasmă sanguină provenite de la pacienți cu cancer colorectal pot fi utilizate cu succes pentru evaluarea gradului de vindecare la 7 zile după intervenția chirurgicală și dacă sunt corelate cu metode statistice și de învățare automată pot fi utilizate ca metode de predicție a vindecării după chirurgie.
7. Analiza complexă a datelor a fost o procedură detaliată care a presupus implementarea mai multor etape, începând de la procesarea primară a datelor brute obținute prin măsurători de

spectroscopie FT-IR și relaxometrie și difuziometrie RMN a ^1H , urmată transformata Fourier și transformata Laplace inversă pentru a obține spectrele Fourier sau Laplace (distribuțiile timpilor de relaxare spin-spin, T_2 sau a coeficientului de autodifuzie, D) precum și deconvoluțiile acestora. În etapa de analiză cantitativă s-au utilizat instrumente statistice pentru a evalua și interpreta valorile parametrice și spectrele obținute. În final, procesul a fost completat cu analiza statistică avansată, folosind tehnica de analize prin componente principale (PCA), care a fost îmbunătățită prin integrarea algoritmilor de inteligență artificială. Aceasta a inclus utilizarea rețelelor neuronale artificiale și a tehnicilor de învățare automată (machine learning), pentru a identifica modele și a extrage informații semnificative din seturile de date complexe.

8. Analiza PCA aplicată pe plasma sanguină nativă oferă o separare semnificativ mai clară a celor patru grupuri formate *ad-hoc*, în comparație cu analiza similară realizată pe plasma sanguină deproteinizată, așa cum este indicat de curbele ROC. Această idee a mai fost exprimată și măsurătorile de difuziometrie RMN a ^1H arătând ca pentru diferențierea caracteristicilor specifice cancerului colorectal, nu este nevoie de a se utiliza plasma deproteinizată care necesită un timp mai îndelungat de pregătire, tehnică adițională, și reactivi care pot duce la creșterea complexității spectrelor măsurate corelată cu creșterea dificultății de interpretare.
9. S-a propus utilizarea spectroscopiei RMN a ^1H în câmpuri înalte (7 T și 11.7 T) pentru identificarea componentelor asociate cu cancerul în plasma sanguină, permițând o analiză detaliată și precisă a metaboliților prezenți. Această metodă avansată a oferit informații valoroase despre modificările metabolice specifice asociate cu prezența celulelor canceroase.
10. Imagistica, spectroscopia și relaxometria RMN a ^1H în câmpuri înalte a fost utilizată cu succes pentru analiza biopsiilor recoltate de la pacienții cu cancer colorectal, permițând identificarea și caracterizarea compușilor metabolici din țesuturile tumorale și țesut sănătos, contribuind astfel la diagnosticarea precisă și la înțelegerea mai profundă a proceselor patologice asociate cu această boală.

BIBLIOGRAFIE

1. Z. Guleken, H. Bulut, G. I. Gültekin, S. Arıkan, I. Yaylım, M. T. Hakan, D. Sonmez, N. Tarhan, and J. Depciuch, "Assessment of structural protein expression by FT-IR and biochemical assays as biomarkers of metabolites response in gastric and colon cancer," *Talanta*, vol. 231, p. 122353, 2021..
2. E. Morgan, M. Arnold, A. Gini, V. Lorenzoni, C. J. Cabasag, M. Laversanne, J. Vignat, J. Ferlay, N. Murphy, and F. Bray, "Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN," *Gut*, vol. 72, no. 2, pp. 338–344, 2023, doi: 10.1136/gutjnl-2022-327736.
3. F. Islami, A. Goding Sauer, K. D. Miller, R. L. Siegel, S. A. Fedewa, E. J. Jacobs, M. L. McCullough, A. V. Patel, J. Ma, I. Soerjomataram, W. D. Flanders, O. W. Brawley, S. M. Gapstur, and A. Jemal, "Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States," *CA Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 1, pp. 31–54, 2018, doi: 10.3322/caac.21440.
4. M. Bretthauer, M. Løberg, P. Wieszczy, M. Kalager, L. Emilsson, K. Garborg, M. Rupinski, E. Dekker, M. Spaander, M. Bugajski, Ø. Holme, A. G. Zauber, N. D. Pilonis, A. Mroz, E. J. Kuipers, J. Shi, M. A. Hernán, H. O. Adami, J. Regula, G. Hoff, M. F. Kaminski, and the NordICC Study Group, "Effect of colonoscopy screening on risks of colorectal cancer and related death," *N. Engl. J. Med.*, vol. 387, no. 17, pp. 1547–1556, 2022, doi: 10.1056/NEJMoa2208375
5. N. H. Kim, M. Y. Lee, J. H. Park, D. I. Park, C. I. Sohn, K. Choi, and Y. S. Jung, "Serum CEA and CA 19-9 levels are associated with the presence and severity of colorectal neoplasia," *Yonsei Med. J.*, vol. 58, no. 5, pp. 918–924, 2017, doi: 10.3349/ymj.2017.58.5.918
6. Shaukat and T. R. Levin, "Current and future colorectal cancer screening strategies," *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 19, no. 8, pp. 521–531, 2022, doi: 10.1038/s41575-022-00612-y
7. K. Rogers, *Blood; Physiology and Circulation (The Human Body)*, Britannica Educational Publishing, New York, NY, USA: 29 East 21st Street, 2010.
8. J. Schaller, S. Gerber, U. Kaempfer, S. Lejon, și C. Trachsel, *Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function*. Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd, 2008.
9. K. Saladin, *Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function*. New York, NY, USA: McGraw-Hill Science/Engineering/Math, 2003

10. J. E. Hall, *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology: Enhanced E-book*. Saunders, 2010
11. J. D. Potter și D. Hunter, *Genetics of Colorectal Cancer*, N. M. Lindor și J. D. Potter, Eds. 1st ed. New York, NY, USA: Springer-Verlag, 2009.
12. H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal și F. Bray, "Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, 2021, doi: 10.3322/caac.21660
13. A. Jemal, T. Murray, E. Ward, A. Samuels, R. C. Tiwari, A. Ghafoor, E. J. Feuer și M. J. Thun, "Cancer statistics, 2005," *CA Cancer J. Clin.*, vol. 55, no. 1, pp. 10–30, Jan.–Feb. 2005, doi: 10.3322/canjclin.55.1.10.
14. C. Dervenis și E. Xynos, *Colorectal Cancer: Special Issue: Digestive Diseases 2007*. Basel, Switzerland: S. Karger Pub, 2007
15. B. Vogelstein, E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits și J. L. Bos, "Genetic alterations during colorectal-tumor development," *N. Engl. J. Med.*, vol. 319, no. 9, pp. 525–532, Sep. 1988, doi: 10.1056/NEJM198809013190901.
16. D. A. Wirtzfeld, N. J. Petrelli și M. A. Rodriguez-Bigas, "Hamartomatous polyposis syndromes: Molecular genetics, neoplastic risk, and surveillance recommendations," *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 8, pp. 319–327, 2001.
17. H. T. Lynch și C. A. de la Chapelle, "Hereditary colorectal cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 348, pp. 919–932, 2003.
18. G. Xie, X. Ma, A. Zhao, C. Wang, Y. Zhang, D. Nieman, și J. K. Nicholson, "Metabolic profiling of human plasma by ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry," *J. Chromatogr. B*, vol. 927, pp. 15–20, 2013. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.03.007
19. R. A. de Graaf, *In Vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques*, 3rd ed. Chichester, U.K.: Wiley, Dec. 2018.
20. R. I. Chelcea, R. Fechete, E. Culea, D. E. Demco, și B. Blümich, "Distributions of transverse relaxation times for soft-solids measured in strongly inhomogeneous magnetic fields," *J. Magn. Reson.*, vol. 196, no. 2, pp. 178–190, 2009, doi: 10.1016/j.jmr.2008.11.004.
21. L. Venkataramanan, Y. Q. Song, și M. D. Hürlimann, "Solving Fredholm integrals of the first kind with tensor product structure in 2 and 2.5 dimensions," *IEEE Trans. Signal Process.*, vol. 50, pp. 1017–1026, 2002.

22. M. D. Hürlimann și L. Venkataramanan, "Quantitative measurement of two-dimensional distribution functions of diffusion and relaxation in grossly inhomogeneous fields," *J. Magn. Reson.*, vol. 157, pp. 31–42, 2002.
23. Y. Q. Song, L. Venkataramanan, M. D. Hürlimann, M. Flaum, P. Frulla, și C. Straley, " T_1 – T_2 correlation spectra obtained using a fast two-dimensional Laplace inversion," *J. Magn. Reson.*, vol. 154, pp. 261–268, 2002.
24. K. E. Washburn și P. T. Callaghan, "Propagator resolved transverse relaxation exchange spectroscopy," *J. Magn. Reson.*, vol. 186, pp. 337–340, 2007.
25. G. C. Borgia, R. J. S. Brown, și P. Fantazzini, "Uniform-penalty inversion of multiexponential decay data," *J. Magn. Reson.*, vol. 132, pp. 65–77, 1998.
26. M. D. Hürlimann, M. Flaum, L. Venkataramanan, C. Flaum, R. Freedman, și G. J. Hirasaki, "Diffusion-relaxation distribution functions of sedimentary rocks in different saturation ratios," *Magn. Reson. Imaging*, vol. 21, pp. 305–310, 2003.
27. M. Hürlimann, L. Burcaw, și Y. Q. Song, "Quantitative characterization of food products by two-dimensional D – T_2 and T_1 – T_2 distribution functions in a static gradient," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 297, pp. 303–311, 2006.
28. S. Godefroy și P. T. Callaghan, "2D relaxation/diffusion correlations in porous media," *Magn. Reson. Imaging*, vol. 21, pp. 337–340, 2003.
29. R. Fechet, I. A. Morar, D. Moldovan, R. I. Chelcea, R. Crainic, and S. C. Nicoară, "Fourier and Laplace-like low-field NMR spectroscopy: The perspectives of multivariate and artificial neural networks analyses," *J. Magn. Reson.*, vol. 324, p. 106915, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2021.106915>.
30. S. K. Sharma, D. S. Verma, L. U. Khan, S. Kumar, and S. B. Khan, Eds., *Handbook of Materials Characterization*. Cham, Switzerland: Springer, 2018.
31. S. Aștilean, *Metode și tehnici moderne de spectroscopie optică*, Vol. 1: Spectroscopia IR și Raman, Cluj-Napoca, România: Editura Casa Cărții de Știință, 2002.
32. U. Barlev, O. Zelig, C. Bar, S. Segev, S. Mordechai, J. Kapelushnik, I. Nathan, F. Flomen, H. Kashtan, R. Dickman, O. Madhala-Givon, and N. Wasserberg, "A novel method for screening colorectal cancer by infrared spectroscopy of peripheral blood mononuclear cells and plasma," *J. Gastroenterol.*, vol. 51, pp. 214–221, 2016.
33. **L. R. Șaitiș**, D. Andras, I. A. Pop, C. Șaitiș, R. Crainic, and R. Fechet, "Spectroscopic nuclear magnetic resonance and Fourier transform-infrared approach used for the evaluation of healing after surgical interventions for patients with colorectal cancer: A pilot study," *Cancers (Basel)*, vol. 17, no. 5, p. 887, Mar. 2025. doi: 10.3390/cancers17050887.

-
34. **L. R. Drăgan**, D. Andras, and R. Fechete, "Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy and Proton Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR) Relaxometry and Diffusometry for the Identification of Colorectal Cancer in Blood Plasma," *Anal. Lett.*, vol. 56, no. 2, pp. 286–302, 2023, doi: 10.1080/00032719.2022.2065497.

LISTA PUBLICATIILOR DIN DOMENIUL TEZEI

Lucrări publicate în reviste cotate ISI

1. **Lavinia Raluca Dragan**, David Andras, Radu Fechete, Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy and Proton Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR) Relaxometry and Diffusometry for the Identification of Colorectal Cancer in Blood Plasma, *Analytical Letters*, 56 (2), 286-302, (2023) <https://doi.org/10.1080/00032719.2022.2065497> (IF: 1.6, AIS: 0.267).
2. Ramona Crainic, A. S.Farcașanu, P. Pășcuță, **L. R. Șaitiș**, F. Popa, Radu Fechete, Complex Characterization of Nanofiber Biomaterials Based on Chitosan, Collagen and Fish Gelatine Produced by Electrospinning." *Analytical Letters* (2024): 1-29: <https://doi.org/10.1080/00032719.2024.2372348> (IF: 1.6, AIS: 0.267).
3. **Lavinia Raluca Șaitiș**, David Andras, Ioana-Alina Pop, Cătălin Șaitiș, Ramona Crainic and Radu Fechete, Spectroscopic Nuclear Magnetic Resonance and Fourier Transform – InfraRed approach used for the evaluation of healing after surgical interventions for patients with Colorectal Cancer. A pilot study, *Cancers* 2025, 17, 887. <https://doi.org/10.3390/cancers17050887> (IF: 4.5, AIS: 1.148).
4. **Lavinia Raluca Șaitiș**, Ovidiu Susu, Brigitta Lőrincz, David Andras, Remus Sebastian Sipos, Simion Simon and Radu Fechete, 11.7 T High field Magnetic Resonance Imaging, Spectroscopy and Relaxometry used for the assessment of colorectal tumor biopsy, (*Cancers*, in preparation).
5. **Lavinia Raluca Șaitiș**, Brigitta Lőrincz, David Andras, and Radu Fechete, High field NMR spectroscopy of blood plasma for the assessment of colorectal cancer, (in preparation).
6. **Lavinia Raluca Șaitiș**, Brigitta Lőrincz, David Andras, and Radu Fechete, Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy and Proton Nuclear Magnetic Resonance Relaxometry, Principal Component Analysis and Machine Learning used for the evaluation of colorectal cancer from blood plasma, (in preparation).

Lucrări prezentate la conferințe internaționale

1. **Lavinia Raluca Saitis**, David Andras, Alexandru Stefan Farcasanu, Cătălin Saitis, Ramona Crainic, and Radu Fechete, Integrating Spectroscopic and Imaging Approaches for Improved Biological Fluids and Tissues Biopsy Analysis in Colorectal Cancer

Detection., 33th Annual Conference of the European Society for Biomaterials ESB, 4-8 September 2023, Davos, Switzerland. – Poster.

2. **L R Dragan**, D Andras, Ioana A. Pop, A Farcasanu, C. Saitis, R. Crainic and R Fechete, Spectroscopic NMR and FT-IR approach used for the evaluation of healing after surgical interventions for patients with Colorectal Cancer, 13th biennial International Conference on Processes in Isotopes and Molecules PIM-INCDTIM, 19-22 September 2023, Cluj-Napoca, Romania - Poster.

LISTA PUBLICAȚIILOR DIN AFARA DOMENIULUI TEZEI

Lucrări publicate în reviste indexate ISI

1. **L. R. Dragan**, E. Jumate, C. Aciu, D. L. Manea, R. Fechete, Advanced characterization of plastering mortars with glass waste additives, AIP Conference Proceedings 2206 (1), 030005, (2020).
2. Catalin Saitis, Daniela Lucia Manea, Monica Luminita Plesa; **Raluca Lavinia Saitis**, Recycling, Plaster Waste as a Substitute for Aggregates in Obtaining Plastering, Mortars. Buildings 2023, 13, 491. <https://doi.org/10.3390/buildings13020491>.

Lucrări publicate în reviste non-ISI

1. **Lavinia R. Dragan**, Ramona Crainic, Radu Fechete, A comparative study for natural degradation of three local anesthetic drugs for human use by ^1H nmr relaxometry and ft-ir spectroscopy. Studia Universitatis Babes-Bolyai, Physica 63, 61-73 (2018).
2. Ramona Crainic, **Lavinia R. Dragan**, Radu Fechete, ^1H NMR relaxometry and ATR-FT-IR spectroscopy used for the assesment of wastewater treatment in slaughterhouse, studia universitatis babes-bolyai, physica 63, 49-60 (2018).

Lucrări prezentate la conferințe internaționale

1. **L. R. Dragan**, E. Jumate, C. Aciu, D. L. Manea and R Fechete, Advanced characterization of plastering mortars with glass waste additives, 12th biennial International Conference on Processes in Isotopes and Molecules PIM-INCDTIM, 25-27 September 2019, Cluj-Napoca, Romania - Poster.
2. R. Fechete, R. Crainic, **L. R. Dragan**, D. Moldovan, R. I. Chelcea, The perspectives of numerical neuroevolution of artificial neural networks with applications to Fourier and Laplace-like spectroscopy, 14th biennial International Conference on Processes in Isotopes and Molecules PIM-INCDTIM, 19-22 September 2023, Cluj-Napoca, Romania - Poster.
3. Ramona Crainic, Alexandru Stefan Farcasanu, Petru Pascuta, **Lavinia Raluca Saitis**, and Radu Fechete, Advanced experimental and numeric simulation method used for the characterization of nanofibers biomaterials produced by electrospinning. 33th Anual

Conference of the European Society for Biomaterials ESB2023, 4-8 September 2023,
Davos, Switzerland - Poster.

