



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00532

(22) Data de depozit: 24/08/2020

(41) Data publicării cererii:
30/03/2022 BOPI nr. 3/2022

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" DIN
CLUJ-NAPOCA (UMF-IH),
STR. VICTOR BABEȘ NR. 8,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• PAVEL IOANA-EMILIA,
STR.ALEEA MEZIAD, NR.1, BL.L2, SC.2,
ET.3, AP.18, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• TOMA VALENTIN, STR.ROVINE NR.8,
AP.8, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• LUCACIU CONSTANTIN MIHAI,
STR.ROMULUS VUIA NR.76,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• ȘTIUFUIC RAREȘ IONUȚ,
STR.SIGHIȘOAREI NR.29, CLUJ-NAPOCA,
CJ, RO

(54) **METODĂ DE ANALIZĂ MULTIVARIATĂ PE PROBE
COMBinate DE PLASMĂ SANGUINĂ FILTRATĂ
ȘI NEFILTRATĂ PRIN SPECTROSCOPIE RAMAN
AMPLIFICATĂ DE SUPRAFAȚĂ CU APLICAȚII ÎN
SPECTROSCOPIA CLINICĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de analiză multivariată a semnalelor SERS (Spectroscopie Raman Amplificată de Suprafață) ale plasmăi sanguine, utilizată în spectroscopia clinică a lichidelor biologice pentru detecția unor boli. Metoda, conform invenției, constă în etapele de: filtrare centrifugală cu filtre de 3 kDa a probelor de plasmă sanguină provenită de la pacienți cu cancer mamar, înregistrarea spectrelor SERS ale probelor de plasmă sanguină filtrate și nefiltrate, prin iradiere, pe un substrat SERS solid, combinarea/fuzionarea semnalelor SERS ale probelor prin translatarea numerelor de undă

ale probelor filtrate cu 1800 cm^{-1} și cocatenarea spectrelor probelor nefiltrate cu cele filtrate, pentru evitarea suprapunerii lor și aplicarea pe spectrele fuzionate a analizei multivariante discriminante combinată cu analiza pe componente principale, care conduce la creșterea semnificativă a sensibilității de detecție a cancerului mamar.

Revendicări: 2

Figuri: 5

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <i>a 2020 ep 532</i>
Data depozit <i>24-08-2020</i>

1

60

**METODĂ DE ANALIZĂ MULTIVARIATĂ PE PROBE COMBINATE DE PLASMĂ
SANGUINĂ FILTRATĂ ȘI NEFILTRATĂ PRIN SPECTROSCOPIE RAMAN
AMPLIFICATĂ DE SUPRAFAȚĂ CU APLICAȚII ÎN SPECTROSCOPIA CLINICĂ**

Domeniul tehnic de care aparține invenția

Prezenta invenție se referă la o nouă metodă de analiză multivariată aplicată asupra datelor spectrale obținute prin Spectroscopia Raman Amplificată de Suprafață (Surface Enhanced Raman Spectroscopy - SERS) prin combinarea obținute pe probe de plasmă sanguină filtrate și nefiltrate. Invenția are aplicații în spectroscopia clinică a lichidelor biologice pentru detecția unor boli.

Stadiul actual

Metodele spectrale de investigare a lichidelor biologice (sânge, urină, salivă, lacrimi) au căpătat o largă dezvoltare în ultimele două decenii datorită potențialului imens pe care îl oferă informațiile spectrale în identificarea și cuantificarea moleculelor din mediile biologice. Spectroscopia vibrațională (Infraroșu, Raman și Raman amplificată de suprafață - SERS) aduce informații legate de modurile de vibrație a moleculelor existente în speciile chimice, spectrele de vibrație fiind unice pentru fiecare structură moleculară. Ele sunt considerate o „amprentă moleculară”, fiind extrem de sensibile la modificarea compoziției chimice a probei. Spectroscopia Raman Amplificată de Suprafață sau SERS este o tehnică de spectroscopie vibrațională cu o sensibilitate extrem de ridicată (fiind capabilă chiar și de detecție unimoleculară). Intensitatea semnalului SERS este influențată de natura fluidului biologic investigat, de natura substratului SERS utilizat și de lungimea de undă a radiației laser

utilizate pentru excitare. În aplicațiile medicale ale SERS trebuie luat în considerare tipul de informație care se dorește despre analit și anume detecția ultrasensibilă a unui analit și/sau cuantificarea acestuia. Determinarea directă a analiților poate fi efectuată prin înregistrarea semnalului caracteristic al acestora care au o afinitate mare față de nanoparticule (NP) plasmonice și care prezintă un semnal SERS specific. Deși, în unele cazuri, simpla prezență a unei specii chimice într-un biofluid este o indicație a bolii, în medicina modernă este esențial să se realizeze cuantificarea nivelurilor anumitor parametri atât pentru a asigura un diagnostic adecvat, cât și pentru a înțelege efectul unui tratament efectuat după diagnosticarea bolii. Deși tehnica SERS poate fi aplicată cu succes pentru diagnosticul bolilor degenerative (de exemplu, prezența proteinelor amiloide în sindromul Creutzfeldt-Jakob sau în boala Alzheimer), a bolilor infecțioase (de exemplu prezența virusurilor, a unor bacterii sau a ciupercilor) sau al bolilor genetice (de exemplu, prezența mutațiilor în ADN), punerea în evidență a stărilor de malignitate este complexă, pe de o parte din cauza numărului mare de molecule prezente în lichidele biologice și pe de altă parte, a numărului mare de vibrații moleculare care sunt înregistrate [1].

În absența unor biomarkeri specifici pentru a identifica o maladie malignă (situație în care identificarea markerului se poate realiza folosind nanoparticule plasmonice biofuncționalizate având afinitate și specificitate crescute pentru acel biomarker [2]), tehnica SERS a fost propusă pentru analiza fluidelor biologice în conjuncție cu analiza statistică multivariată. În acest din urmă caz discriminarea se face prin compararea intensității relative a diferitelor benzi de vibrație (fără a fi necesară o atribuire concretă a acestor benzi de vibrație unor grupări funcționale sau unor molecule specifice prezente în probă).

În cazul fluidelor biologice, obținerea de semnale SERS intense și complexe ca rezultat al interacțiunii nanoparticulelor cu toate tipurile de molecule prezente în fluid este dificilă, pe de o parte din cauza heterogenității compoziției lor iar, pe de altă parte, semnalul SERS poate fi diferit chiar pentru aceeași probă biologică în funcție de natura substratului SERS utilizat, precum și de lungimea de undă a radiației laser excitatoare. Experimental s-a observat faptul că în cazul coloizilor de aur sau argint, nanoparticulele amestecate cu lichide biologice sunt acoperite de un strat de proteine, numite opsonine, care împiedică apropierea de suprafața metalică a altor molecule și, în acest fel, conduc la un semnal SERS de intensitate redusă, caracteristic în principal proteinelor. Din această cauză metoda SERS a fost puțin aplicată pe lichide biologice, iar aplicațiile relevante au implicat tehnici destul de complexe de deproteinizare a lichidelor biologice (fie prin metode fizice de ultrafiltrare, fie prin metode chimice de precipitare a proteinelor) [3].

Tehnica SERS aplicată pe lichide biologice combinată cu analiza statistică multivariată a fost propusă pentru discriminarea mai multor tipuri de cancere de mai multe grupuri de cercetare, o trecere în revistă a celor mai recente rezultate pe diferite tipuri de maladii maligne putând fi accesate în referința [4].

Recent, în cadrul grupului nostru de cercetare a fost dezvoltat un substrat SERS original, care face obiectul cererii de brevet de invenție nr. A 2019 00392 din 27.06.2019, înregistrată la OSIM, pe care s-au obținut semnale SERS caracteristice atât proteinelor, cât și moleculelor de masă moleculară mai mică. Pe baza acestui substrat am publicat un studiu preliminar [5] care demonstrează discriminarea probelor provenite de la cancerul de sân în comparație cu donatorii, care nu necesită folosirea unei etape suplimentare de separare a proteinelor.

Răspunsul cu valoare de diagnostic al datelor spectrale este generat de algoritmi de învățare automată, care discriminează diferențele de semnături SERS care sunt specifice și exclusive pentru cancer. Succesul în utilizarea tehnicii SERS ca metodă de diagnostic în cancerul mamar (și nu numai) constă în mare parte în reglajul fin al tehnicilor de analiză multivariată care trebuie să permită, pe de o parte, discriminarea probelor de la pacienții cu cancer mamar de cele de la donatorii aparent sănătoși iar, pe de altă parte, să discrimineze cancerul mamar de alte forme de cancer sau de alte boli, acute sau cronice.

În cercetarea medicală, metodele de detecție ale unei maladii sunt caracterizate de câțiva parametri uzuali:

$$\text{Specificitate} = \text{RN} / (\text{RN} + \text{FP})$$

$$\text{Sensibilitate} = \text{RP} / (\text{RP} + \text{FN})$$

$$\text{Acuratețe} = (\text{RP} + \text{RN}) / (\text{RP} + \text{RN} + \text{FP} + \text{FN})$$

unde

RN = Real Negativ

FP = Fals Pozitiv

RP = Real Pozitiv

FN = Fals Negativ

Este evident faptul că scopul cercetării constă în evitarea cazurilor Fals Negative și Fals Pozitive pentru a maximiza toți acești parametri. Din punct de vedere biomedical, cel mai important este evitarea cazurilor Fals Negative, adică evitarea încadrării unui bolnav în categoria celor sănătoși. Cazurile Fals Pozitive implică teste adiționale care pot să confirme dacă subiectul este într-adevăr bolnav sau sănătos. De aceea, o sensibilitate cât mai

ridicată este cel mai reprezentativ parametru în caracterizarea unei metode de analiză și clasificare a subiecților.

În articolul mai sus menționat [5], discriminarea între probele provenite de la pacienții diagnosticați cu cancer de sân și cele provenite de la donatori aparent sănătoși s-a făcut cu o acuratețe de 89%, o sensibilitate de 90% și o specificitate de 89%.

Una din cele mai mari critici aduse tehnicilor vibraționale, atunci când sunt utilizate ca metode de diagnostic este că ele pot detecta cancerul bazându-se pe răspunsul proteinelor de faza acută, răspuns care este unul nespecific maladiilor maligne. În orice fază acută, fie ea canceroasă sau necanceroasă, crește, de exemplu, raportul între imunoglobuline și albumină, raport care ar fi de fapt cel detectat prin tehnicile de spectroscopie vibrațională.

Prin invenția de față demonstrăm o nouă metodă de analiză multivariată a semnalelor SERS ale probelor de plasmă sanguină filtrate (cu ajutorul unor filtre de 3kDa), respectiv nefiltrate. Metoda se bazează pe analiza SERS atât a componentelor proteice, cu masă moleculară mare, cât și a componentelor plasmatică cu masă moleculară mai mică de 3 kDa. Spectrele sunt înregistrate folosind un substrat plasmonic original (cerere de brevet de invenție nr. A 2019 00392 din 27.06.2019) utilizând o radiație laser de 785 nm pentru excitare.

Metoda este capabilă să conducă la o creștere semnificativă a sensibilității de discriminare între probele de plasmă provenite de la pacienți cu cancer de sân în raport cu donatorii aparent sănătoși. Discriminarea este determinată de folosirea combinației obținute prin combinarea utilizării substratului SERS original, a excitației la 785 nm și multiplexarea semnalului SERS, prin fuzionarea spectrelor SERS obținute pe probele de plasmă filtrate cu cele nefiltrate. **Subliniem faptul că metoda nu își propune să identifice un nou marker al cancerului de sân și că prin identificarea acestui markerului se poate discrimina cancerul de**

sân. Este evident că probele de plasmă provenite de la bolnavii cu cancer de sân au o compoziție biochimică diferită de cele provenite de la donatori aparent sănătoși. Originalitatea și utilitatea invenției constă în această combinație a substratului SERS solid, cu excitarea în infraroșu apropiat și multiplexarea semnalului SERS prin analiza probelor filtrate și nefiltrate, care poate să discrimineze între cele două tipuri de probe cu o sensibilitate semnificativ mai ridicată decât metodele tradiționale.

Demonstrăm de asemenea că informațiile obținute pe cele două tipuri de probe - filtrate și nefiltrate - sunt complementare și, din această cauză, analiza combinată permite discriminarea probelor provenite de la pacienți cu cancer de sân de cele provenite de la donatori cu o sensibilitate și specificitate de peste 95%. Această multiplexare a semnalului SERS, obținută prin măsurarea probelor filtrate și nefiltrate urmată de fuzionarea lor, poate fi aplicată cu succes și în alte cancere sau în alte maladii pentru creșterea sensibilității, specificității și a acurateții de discriminare.

Prezentăm în continuare un exemplu concret, nelimitativ al noii metode de analiză propuse.

Noua metodă a fost testată pe un număr de 36 de probe de sânge provenite de la donatori aparent sănătoși și 106 cazuri de pacienți diagnosticați cu cancer de sân în diferite stadii, conform normelor medicale ale Institutului Oncologic „Prof. dr. Ion Chiricuță” din Cluj-Napoca. Probele de sânge au fost obținute după ce participanții la studiu și-au dat consimțământul informat, în conformitate cu aprobarea obținută din partea Comisiei de Etică a Cercetării Științifice a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca.

Recoltarea și prepararea probelor:

- cca. 10 ml de sânge au fost obținuți prin puncție venoasă în vacutainere cu citrat de sodiu;

- sângele a fost centrifugat imediat după recoltare la cca. 2000g timp de 10 minute;
- după separarea celulelor, plasma rezultată a fost recoltată din partea superioară a vacutainerului și introdusă în eprubete închise, urmând a fi prelucrată și măsurată imediat sau conservată la -80°C .

Filtrarea plasmei sanguine:

- filtrarea plasmei s-a realizat folosind filtre centrifugale de 3 kDa cu ajutorul unei centrifuge, la cca. 5000g timp de 40 de minute;
- eficiența filtrării a fost determinată prin măsurarea concentrației proteice în filtrat folosind metoda Bradford, iar valoarea obținută a fost zero;
- de asemenea, s-a înregistrat spectrul UV-Vis al filtratului unde se observă apariția unui maxim de absorbție la cca. 292 nm, caracteristic acidului uric (este cunoscut faptul că produsul final al metabolismului purinelor este acidul uric, iar date din literatură prezintă pentru acesta un maxim de absorbție la 292 nm; mai mult, masa moleculară a acidului uric este una foarte mică - 169 Da, prin urmare este justificată trecerea lui prin filtru, respectiv prezența lui în probă; drept referință s-a înregistrat un spectru pentru acidul uric nativ, folosind un stoc preparat la o concentrație din domeniul fiziologic ($250\ \mu\text{M}$), care a confirmat observațiile anterioare).

Depunerea probelor pe substrat și înregistrarea spectrelor SERS

- un microlitru de plasmă nefiltrată și un microlitru de plasmă filtrată la 3 kDa se depun pe substratul SERS care face obiectul cererii de brevet nr. A 2019 00392 din 27.06.2019;
- spectrele SERS au fost înregistrate după uscarea probelor pe substrat în cel puțin 45 de puncte, cu ajutorul unui spectrometru inVia Renishaw, folosind un fascicul laser cu o lungime de undă de

785 nm; această lungime de undă reduce apariția semnalului de fluorescență;

- linia de bază a spectrelor a fost corectată folosind software-ul spectrometrului;
- toate probele au fost înregistrate folosind aceleași setări ale spectrometrului (putere laser, timp de achiziție, rețea de difracție, lărgime fantă etc.)

Prelucrarea spectrelor și analiza multivariată combinată

Analiza multivariată a datelor spectrale a fost efectuată cu ajutorul unui software specializat (Unscrambler X 10.5.1). Spectrele obținute de la probele filtrate și nefiltrate sunt prezentate în figura 1. Cu toate că, aparent, spectrele celor două categorii de probe sunt similare, se poate observa, în primul rând, faptul că vibrațiile moleculare provenite de la probele filtrate domină la numerele de undă mici, în schimb cele de la probele nefiltrate au intensitate mai mare la numere de undă mai mari, caracteristice vibrațiilor proteice. Se poate constata astfel faptul că probele nefiltrate prezintă benzi de vibrație mai intense în zona numerelor de undă mari [peste 1600 cm^{-1} , caracteristice vibrațiilor proteice (vibrațiile amid I și amid III)], zonă caracteristică proteinelor și la 480 cm^{-1} , în schimb probele filtrate prezintă benzi mai intense la 720 cm^{-1} (caracteristic nucleotidelor) și la cca. 1000 cm^{-1} , zonă caracteristică unor aminoacizi (fenilalanină). Nu în ultimul rând, observăm faptul că în cazul probelor filtrate este pus clar în evidență peak-ul de la cca. 2100 cm^{-1} , caracteristic tiocianatului care are o intensitate extrem de mică în cazul probelor nefiltrate.

Am procedat la o primă metodă de analiză multivariată, și anume analiza pe componente principale sau PCA (Principal Component Analysis). Această tehnică este una nesupervizată, în sensul că toate probele filtrate și nefiltrate sunt analizate împreună, fără a face distincție între cele două categorii de probe, căutându-se

combinații ale lungimii de undă care explică cel mai bine variațiile spectrale. Acest tip de analiză este utilizată din cauza numărului mare de date spectrale (807 numere de undă înregistrate pentru fiecare spectru). Prin PCA se procedează practic la o reducere a dimensionalității problemei prin identificarea numărului minim de componente spectrale (componentele principale) care pot separa probele după clasă.

Analiza pe componente principale (PCA) relevă faptul că primele două componente principale sunt capabile să discrimineze cele două tipuri de probe. După cum se poate observa cu ușurință din inspectarea figurii 2, o dreaptă care trece prin cadranele 2 și 4 ale acestui grafic este capabilă să separe complet cele două tipuri de probe.

Faptul că cele două categorii de probe sunt separate prin **doar două componente principale este o indicație clară că ele conțin informații complementare** și că analiza doar a uneia sau a celeilalte categorii conduce la eliminarea din datele spectrale a unor informații care pot fi relevante în analiza supervizată (Analiza Discriminantă Liniară sau LDA - Linear Discriminant Analysis) care urmează a se efectua pentru discriminarea cazurilor de cancer de cazurile donatorilor aparent sănătoși.

Din analiza curbei loadings pentru prima componentă principală, care arată contribuția vibrațiilor de la fiecare număr de undă la prima componentă principală (figura 3), se observă că principalele benzi care discriminează sunt cele aferente proteinelor în cazul probelor nefiltrate (cca 1651 cm^{-1} vibrația amid I) și, respectiv, tiocianatul (2100 cm^{-1}) și vibrațiilor metaboliților purinici (642 cm^{-1} , 723 cm^{-1}) în cazul probelor filtrate.

În continuare s-a procedat la o analiză supervizată, respectiv Analiza Discriminantă Liniară sau LDA (Linear Discrimination Analysis). Această analiză se realizează în conjuncție cu PCA (care

reduce dimensionalitatea) și presupune discriminarea probelor în categorii. Validarea se face prin diferite metode, cea mai uzuală fiind validarea încrucișată totală (full cross validation) sau LOO (Leave One Out), în sensul că o probă este clasificată într-o categorie prin compararea cu toate celelalte probe, a căror clasificare se presupune cunoscută. Funcția de separare poate fi liniară (ceea ce semnifică un hiperplan în hiperspațiul generat de numărul de componente principale luate în calcul), pătratică sau o altă funcție specială (Mahalanobis), în ultimele două cazuri discriminarea producându-se printr-o hipersuprafață care nu este neapărat plană. Funcțiile neliniare conduc, în general, la discriminări cu grade de acuratețe mai ridicate.

Pentru a găsi tipul de prelucrare a probei care conduce la cea mai bună discriminare, au fost înregistrate spectrele SERS pentru probele filtrate și nefiltrate. În continuare, pentru a realiza analiza combinată, am „fuzionat” cele două tipuri de spectre. În acest scop, numerele de undă ale spectrelor SERS ale probelor filtrate au fost translatate cu 1800 cm^{-1} la numere de undă mai mari. Această translație permite obținerea unui spectru virtual fuzionat (figura 4) care conține informațiile spectrale atât pentru probele filtrate, cât și pentru cele nefiltrate. Translatarea numerelor de undă se face identic pentru toate probele, astfel încât se face o comparație între diferite probe, deoarece pentru aceleași grupări funcționale vibrațiile se vor produce la aceleași numere de undă, chiar dacă acestea fiind translatate la alte valori ale numerelor de undă (translația poate fi asimilată cu o schimbare a unității de măsură).

Rezultatele acestei analize au demonstrat că discriminarea între probele de plasmă provenite de la pacienți față de cele obținute de la donatori aparent sănătoși este cea mai mare (sensibilitate de 97% pentru 13 componente principale luate în

calcul) în cazul analizei combinate pe probele filtrate și nefiltrate.

Un exemplu tipic de LDA obținut pe probe nefiltrate în care se obține o discriminare cu acuratețe de 100% luând în considerare 19 componente principale este dat în figura 5. În continuare, pentru a compara eficiența discriminării între cele 3 seturi de date (filtrate, nefiltrate și fuzionate), s-a procedat la analiza LDA pentru toate seturile de probe, pentru un număr variabil de componente luate în considerare, datele obținute fiind prezentate în Tabelele 1-3.

Tabelul 1 LDA probe Filtrate							
Nr. comp.	RP	RN	FP	FN	Sensibilitate	Specificitate	Accuratețe
3	99	13	7	23	0.81	0.65	0.79
5	97	19	9	17	0.85	0.68	0.82
7	99	27	7	9	0.92	0.79	0.89
8	99	28	7	8	0.93	0.80	0.89
9	104	32	2	4	0.96	0.94	0.96
10	105	32	1	4	0.96	0.97	0.96
11	105	31	1	5	0.95	0.97	0.96
12	104	31	2	5	0.95	0.94	0.95
13	104	31	2	5	0.95	0.94	0.95
14	105	31	1	5	0.95	0.97	0.96
15	105	33	1	3	0.97	0.97	0.97
16	104	33	2	3	0.97	0.94	0.96
17	104	33	2	3	0.97	0.94	0.96
18	104	33	2	3	0.97	0.94	0.96
19	103	33	3	3	0.97	0.92	0.96
20	105	33	1	3	0.97	0.97	0.97

Tabelul 2 LDA probe Nefiltrate							
Nr.	RP	RN	FP	FN	Sensibilitate	Specificitate	Accuratețe

comp.								
3	105	9	27	1	0.99	0.25	0.80	
5	88	22	14	18	0.83	0.61	0.77	
7	94	24	12	12	0.89	0.67	0.83	
8	95	26	10	11	0.90	0.72	0.85	
9	92	27	9	14	0.87	0.75	0.84	
10	92	28	8	14	0.87	0.78	0.85	
11	92	30	6	14	0.87	0.83	0.86	
12	94	32	4	12	0.89	0.89	0.89	
13	101	34	2	5	0.95	0.94	0.95	
14	104	35	1	2	0.98	0.97	0.98	
15	104	36	0	2	0.98	1.00	0.99	
16	102	36	0	4	0.96	1.00	0.97	
17	104	36	0	2	0.98	1.00	0.99	
18	104	36	0	2	0.98	1.00	0.99	
19	106	36	0	0	1.00	1.00	1.00	
20	106	36	0	0	1.00	1.00	1.00	

Tabelul 3 LDA probe Fuzionate

Nr. comp.	TP	TN	FP	FN	Sensibilitate	Specificitate	Accuratețe
3	103	11	25	3	0.97	0.31	0.80
5	99	17	19	7	0.93	0.47	0.82
7	97	21	15	9	0.92	0.58	0.83
8	96	25	11	10	0.91	0.69	0.85
9	98	29	7	8	0.92	0.81	0.89
10	96	28	8	10	0.91	0.78	0.87
11	95	27	9	11	0.90	0.75	0.86
12	99	28	8	7	0.93	0.78	0.89
13	103	32	4	3	0.97	0.89	0.95
14	103	33	3	3	0.97	0.92	0.96

15	104	33	3	2	0.98	0.92	0.96
16	104	34	2	2	0.98	0.94	0.97
17	106	33	3	0	1.00	0.92	0.98
18	106	34	2	0	1.00	0.94	0.99
19	106	35	1	0	1.00	0.97	0.99
20	106	36	0	0	1.00	1.00	1.00

Din inspectarea datelor din cele trei tabele, se poate observa cu ușurință că, în cazul probelor fuzionate, numărul de probe clasificate fals negative este cel mai mic. La 17 componente principale se obține o sensibilitate de 100%, ceea ce înseamnă că toate cazurile de cancer de sân sunt clasificate în această categorie (la probele filtrate sensibilitatea maximă este de cca 97%, pentru 20 de componente principale luate în calcul, în timp ce la cele nefiltrate o sensibilitate de 100% se obține doar dacă se iau în considerare minimum 19 componente principale). Așa cum am menționat mai sus, în domeniul medical, în scopul identificării prezenței unei maladii, cel mai important este să se identifice toți potențialii pacienți, respectiv să nu existe cazuri fals negative. Se constată de asemenea că probele nefiltrate, cele care conțin doar componente plasmatică cu masa moleculară mai mică de 3 kDa conduc la discriminarea cu sensibilitatea cea mai mică, probele nefiltrate care conțin și proteine având o sensibilitate crescută, iar combinarea celor două tipuri de spectre conduce la o creștere semnificativă a sensibilității.

În cazul probelor nefiltrate specificitatea este cea mai ridicată, în sensul că începând de la 15 componente principale nu mai există niciun caz fals pozitiv. Cazurile fals pozitive în practica medicală pot fi identificate pentru că, în mod uzual, aceste persoane sunt supuse la teste ulterioare suplimentare și/sau complementare care pot, în cele din urmă, să clasifice corect subiectul. În cazul unui fals negativ însă subiectul este

clasificat ca fiind sănătos și de aceea nu mai este supus la alte teste decât, eventual, după o perioadă de timp când se manifestă simptomele bolii și apare necesitatea unor noi investigații. În bolile maligne însă depistarea bolii într-o stare incipientă este esențială, altfel șansele de salvare ale pacientului pot fi compromise. **Din aceste considerente apreciem că metoda analizei spectrelor combinate care conduce la cea mai mare sensibilitate de detecție pentru un număr dat de componente luat în calcul este cea mai performantă în detecția bolii.**

Analiza multiplexată a spectrelor utilizând substratul SERS solid poate fi aplicată cu succes și în detecția altor tipuri de cancere sau boli cu parametri de discriminare semnificativ îmbunătățiți față de metodele clasice.

Descrierea figurilor:

Figura 1. Spectre SERS ale probelor de plasmă sanguină filtrate la 3kDa (albastru) și nefiltrate (roșu).

Figura 2. Analiza prin PCA a probelor de plasmă filtrate (F-pătrate) și nefiltrate (NF-cercuri) provenite la donatori aparent sănătoși, scorurile pentru primele două componente principale.

Figura 3. Curba Loadings pentru prima componentă principală care arată contribuția pozitivă la numere de undă mari, caracteristică vibrațiilor proteice și contribuția negativă la numerele de undă mai mici și la cca. 2100 cm^{-1} (tiocianatul, vizibil mai ales la probele filtrate).

Figura 4. Spectrele SERS fuzionate pentru probe filtrate și nefiltrate, pentru probe control (C-roșu) și pentru probe de cancer de sân (BC-albastru).

Figura 5. Scoruri LDA pentru probe de sânge nefiltrate care arată o discriminare cu acuratețe de 100% între probele obținute de la donatorii aparent sănătoși (cercuri) și cele care provin de la pacienți cu cancer de sân (pătrate).

Bibliografie

1. Langer J. et al., Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering, *CS Nano* 2020, 14, 1, 28-117.

2. Maria Blanco-Formoso and Ramon A. Alvarez-Puebla, Cancer Diagnosis through SERS and Other Related Techniques, *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 2253; doi:10.3390/ijms21062253.

3. Bonifacio, A.; Dalla Marta, S.; Spizzo, R.; Cervo, S.; Steffan, A.; Colombatti, A.; Sergo, V., Surface-enhanced Raman spectroscopy of blood plasma and serum using Ag and Au nanoparticles: a systematic study. *Anal Bioanal Chem* **2014**, 406 (9-10), 2355-65.

4. Zhang Y, Mi X, Tan X, Xiang R, Recent Progress on Liquid Biopsy Analysis using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Theranostics* 2019, Vol. 9, Issue 2, 491-525.

5. Știufiuc GF, Toma V., Buse M, Mărginean R, Morar-Bolba G, Culic B, Tetean R, Leopold N, Pavel I, Lucaciu CM, Știufiuc RI, Solid plasmonic substrates for breast cancer detection by means of SERS analysis of blood plasma, *Nanomaterials* 2020, 10, 1212; doi:10.3390/nano10061212.

Revendicări

1.Procedeu de analiză multivariată a semnalelor SERS (Spectroscopie Raman Amplificată de Suprafață) a plasmei sanguine utilizat în spectroscopia clinică, **caracterizat prin aceea că:**

- probele de plasmă sanguină sunt filtrate centrifugal cu filtre de 3 kDa;
- spectrele SERS ale probelor de plasmă sanguină filtrate și nefiltrate sunt înregistrate pe un substrat SERS solid format prin depunerea de nanoparticule de argint pe o sticla Raman de CaF_2 ;
- Semnalele SERS ale probelor sunt combinate/fuzionate prin translatarea numerelor de undă ale probelor filtrate cu circa 1800 cm^{-1} și concatenarea spectrelor probelor nefiltrate cu cele filtrate, pentru evitarea suprapunerii lor;
- analiza multivariată discriminantă combinată cu analiza pe componente principale este aplicată pe spectrele fuzionate.

2.Metodă de analiză multivariată, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că,** aplicat la probe de plasma sanguină provenită de la pacienți cu cancer de sân mărește semnificativ sensibilitatea de detecție ca cancerului de sân prin SERS combinată cu analiza multivariată.

44

Figuri

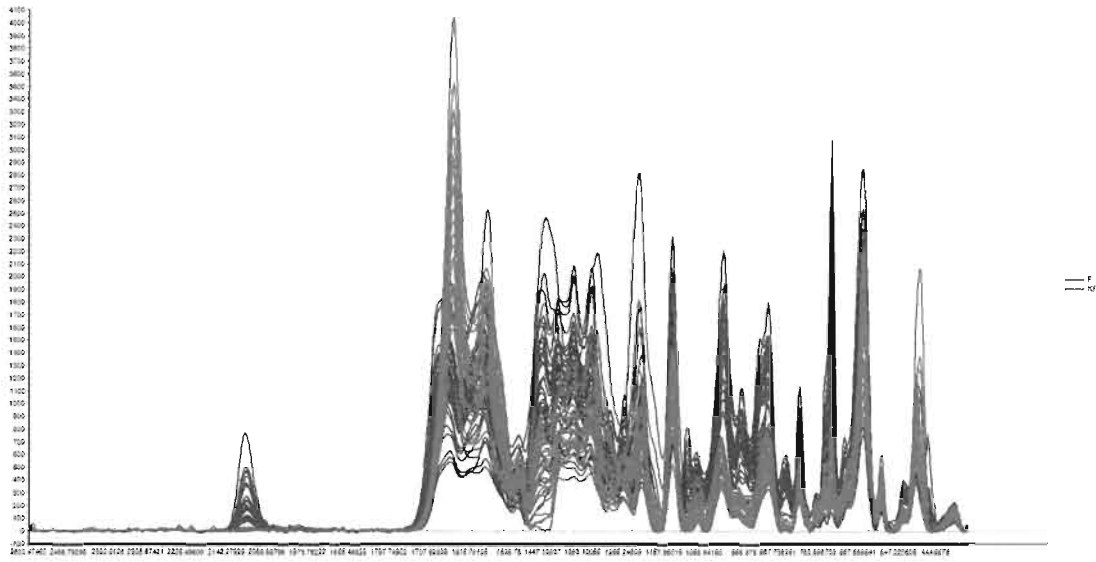
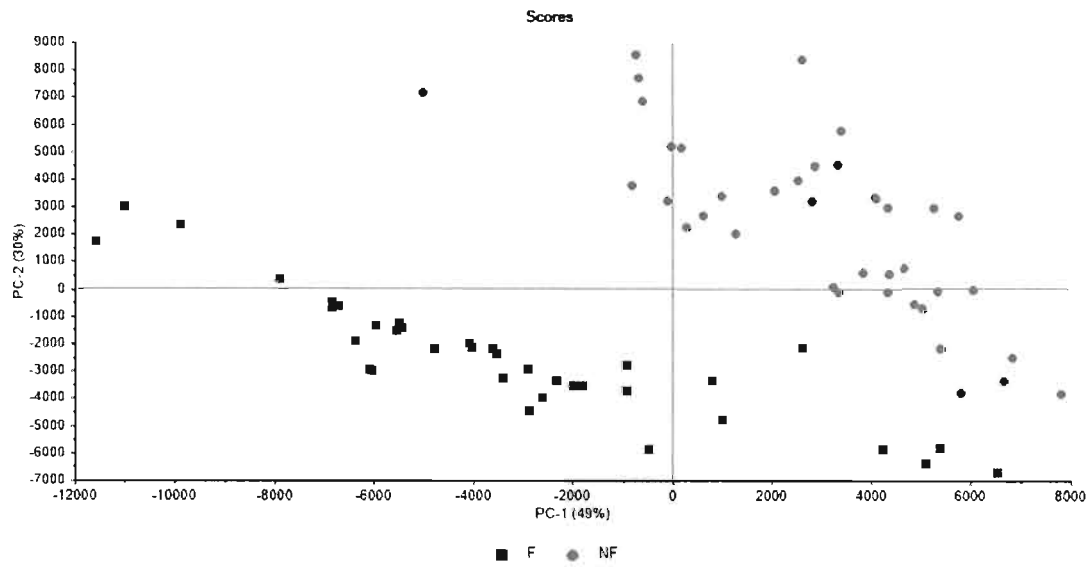


Figura 1.



Figura

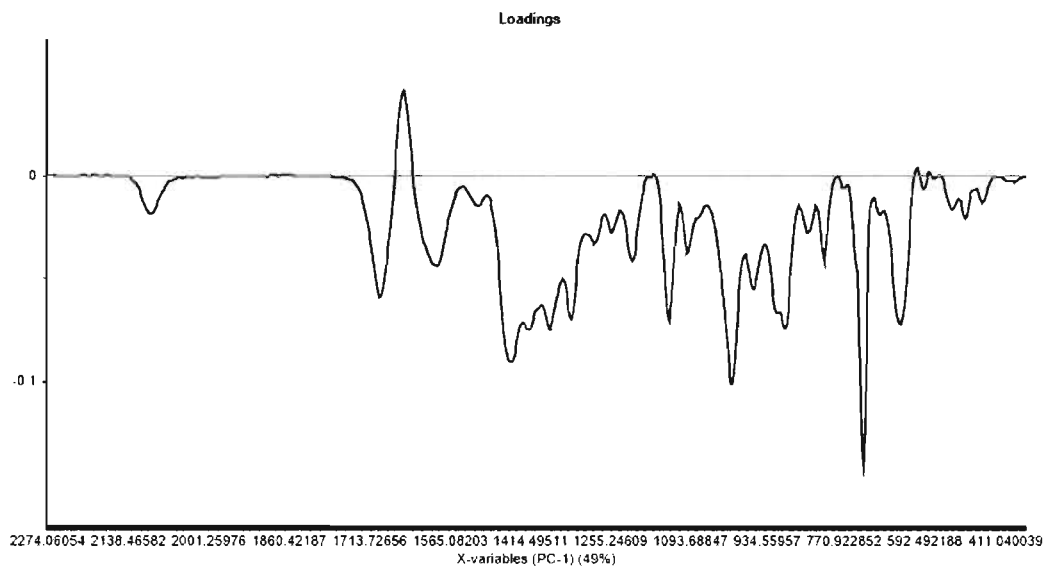


Figura 3.

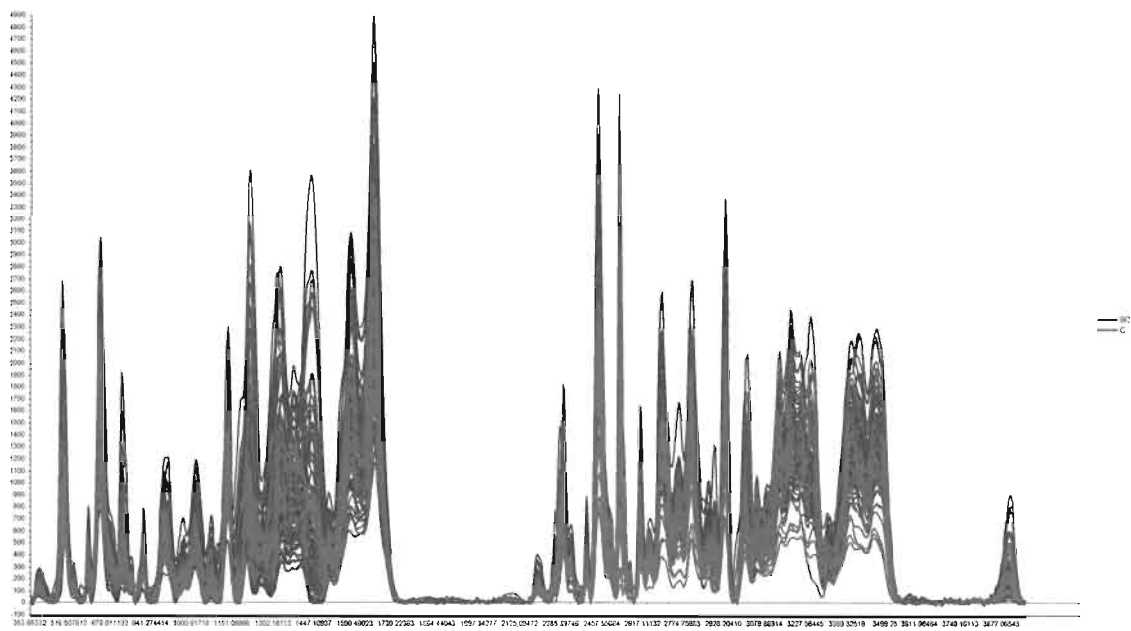


Figura 4.

42

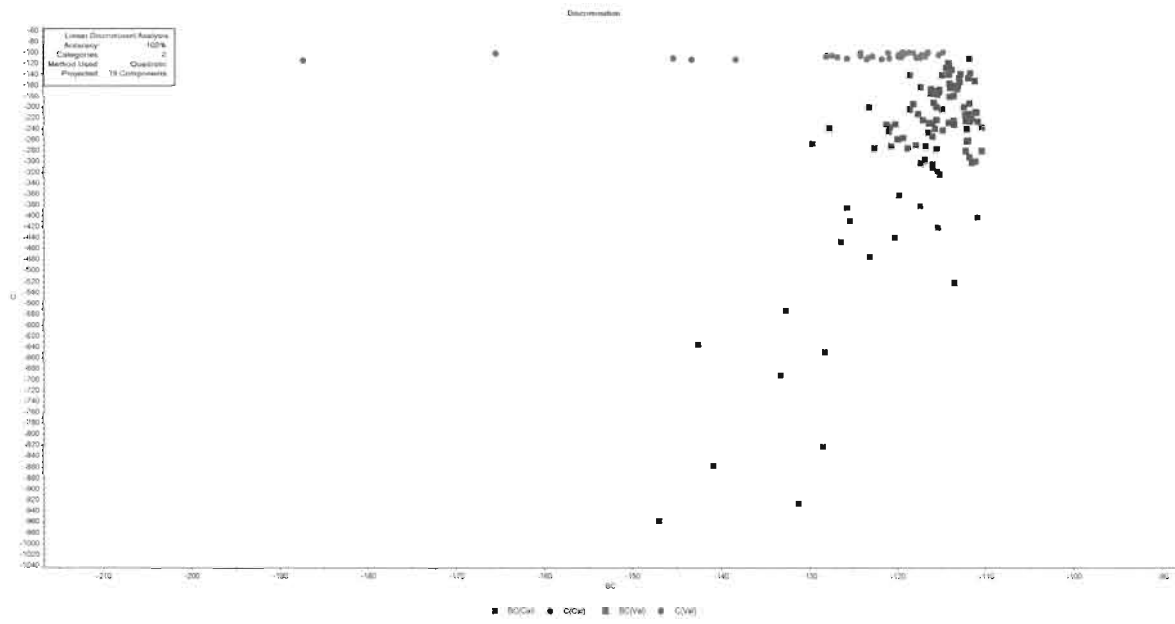


Figura 5.