
TEZĂ DE DOCTORAT

Noi metode inovative de detecție a adenocarcinomului de prostată pe baza biopsiei lichide

Doctorand **Vlad-Cristian Munteanu**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Ioan Coman**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE

STADIUL ACTUAL AL CUNOASTERII

1. Stadializarea cancerului de prostată

- 1.1. Stadializarea anatomopatologică
- 1.2. Stadializarea clinică

2. Metodele tradiționale de diagnostic al cancerului de prostată

- 2.1. Tușeul rectal (TR)
- 2.2. PSA
- 2.3. *free*PSA
- 2.4. Densitatea PSA (PSAD)
- 2.5. Rezonanța magnetică multiparametrică (mpMRI)
- 2.6. Procesul clinic de diagnostic al cancerului

3. Biomarkeri sangvini non invazivi ai cancerului de prostată

- 3.1. Indicele de sănătate al prostatei (PHI) și densitatea indicelui de sănătate al prostatei (PHID)
- 3.2. Scorul 4K

4. Tehnici imagistice

- 4.1. RMNul multiparametric

5. Teste combinate

- 5.1. Alte teste diagnostice

6. Tehnica Raman

7. Tehnica SERS

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru / obiective (generale și specifice)

2. Metodologia generală a cercetării

- 2.1. Recoltarea, procesarea și stocarea probelor
- 2.2. Sinteza și pregătirea substratelor SERS
- 2.3. Măsurătorile SERS
- 2.4. Analiza datelor

3. Studiul 1: Determinarea modificărilor care apar la nivelul ARN-ului în cazul pacienților cu cancer de prostată, folosind tehnica spectroscopiei vibraționale SERS

- 3.1. Introducere
- 3.2. Ipoteza de lucru / Obiective
- 3.3. Materiale și metode
- 3.4. Rezultate
- 3.5. Discuții
- 3.6. Concluzii

4. Studiul 2: Utilizarea substratelor plasmonice solide SERS în cancerul de prostată ca o potențială metodă de diagnostic rapidă, facilă și non-invazivă

- 4.1. Introducere
- 4.2. Materiale și metode
 - 4.2.2. Prepararea substraturilor plasmonice solide
 - 4.2.3. Depunerea analitului pentru măsurătorile SERS
 - 4.2.4. Spectroscopia UV-Vis
 - 4.2.5. Microscopia electronică în transmisie (TEM)
 - 4.2.6. Microscopia de forță atomică (AFM)
- 4.3. Rezultate și discuții
 - 4.3.1. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor plasmonice și a substratelor SERS solide
 - 4.3.2. Determinarea amprentei moleculare a serului și plasmei integrale utilizând spectroscopia Raman
 - 4.3.3. Utilizarea tehnicii ultrasensibile SERS pentru discriminarea dintre pacienți cu cancer prostatic și donatori sănătoși utilizând probe de ser și plasmă.
 - 4.3.4. Comparație între spectrul SERS al serului și al plasmei în cazul donatorilor sănătoși
- 4.4. Concluzii

5. Studiul 3: Noi perspective asupra analizei multivariate a spectrelor SERS ale probelor de sânge pentru detecția precoce a cancerului de prostată

- 5.1. Introducere
- 5.2. Obiective
- 5.5. Rezultate și discuții
- 5.6. Concluzii

6. Discuții generale

7. Concluzii generale

8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale teze

9. Referințe bibliografice

Cuvinte cheie: adenocarcinom prostatic, diagnostic, ARN, SERS

INTRODUCERE

Conform datelor publicate de GLOBOCAN în anul 2020, cancerul de prostată este a doua cea mai frecventă boală la bărbați și a cincea cauză majoră de deces prin cancer în 2020, cu 1,4 milioane de cazuri noi și 375.000 de decese în întreaga lume

Întreg procesul diagnostic pornește de la valoarea PSA, o protează cu rol în lichefierea lichidului seminal. Aceasta este secretată de țesutul prostatic normal, de cel benign dar și de cel malign, ceea ce înseamnă că PSA-ul este element organ specific nu cancer specific.

În urma unei valori anormale a PSAului ($>4\text{ng/mL}$) și a lipsei simptomatologiei care să suspeceteze altă patologie cu origine prostatică, se continuă procesul diagnostic. Se efectuează RMNul pelvin multiparametric care poate descrie o suspiciune imagistică de prezență a unuia sau mai multor noduli suspecti maligni, suspiciune codificată prin sistemul PIRADS. Ulterior se efectuează puncția prostatică pentru confirmarea sau infirmarea diagnosticului de adenocarcinom prostatic.

Cancerul de prostată este diagnosticat prin examinarea microscopică a țesutului de prostată obținut prin biopsia cu ac. O biopsie sistematică de prostată este efectuată în mod tradițional utilizând ultrasonografia transrectală/transperineală pentru a colecta 10 până la 12 probe de țesut.

Așteptarea monitorizată, intervenția chirurgicală și radiațiile sunt cele trei alternative principale pentru bărbații cu cancer prostatic localizat (caracterizat prin lipsă de ganglioni limfatici regionali vizibili imagistic sau metastaze la distanță). așteptarea monitorizată (watchful waiting) și supravegherea activă sunt utilizate în managementul expectanței (observarea progresiei cancerului de prostată în timp, care nu presupune un tratament definitiv efectiv). Supravegherea activă implică o serie de teste PSA, examinări fizice, biopsii de prostată sau o combinație a acestora pentru a monitoriza progresia, cu scopul de a vindeca persoanele care prezintă progresie tumorală, în timp ce așteptarea atent monitorizată pune accent pe tratarea simptomelor cu scop paliativ. Tratamentele cu tentă curative sunt reprezentate de chirurgie (prostatectomia radicală cu limfadenectomie pelvină) și radioterapie. Acestea sunt recomandate în cazul în care pacientul prezintă cel puțin risc scăzut sau intermediar iar expectanța de viață este de cel puțin 10 ani.

Infecțiile bacteriene, hematospermia, hematuria, sângerarea rectală, prostatita/epididimita și retenția de urină sunt toate posibile complicații după biopsia de prostată. O biopsie negativă ar putea semnifica, de asemenea, că nu există o malignitate și că biopsia a fost în zadar și pacientul a fost supus unei proceduri invazive care nu a dat rezultate.

Pentru a îmbunătăți procesul diagnostic și pentru a evita morbiditățile menționate mai sus, noi metode de diagnostic al cancerului de prostată, neinvazive, bazate pe biopsia lichidă sunt în plină dezvoltare; printre acestea se numără și analiza bazată pe Spectroscopia Raman amplificată de suprafața nanoparticulelor (SERS).

Această teză de doctorat are scopul de a identifica potențiali biomarkeri alternativi de diagnostic al cancerului de prostată. Motivația a apărut din cauza faptului că la ora actuală, chiar dacă neoplasmul prostatic este foarte des întâlnit, încă nu există o metodă precisă de diagnostic. Acest fapt determină screeningul unei populații mari de persoane iar o parte dintre aceștia o parte vor fi supuși unor metode de diagnostic invazive care e posibil să nu identifice

patologia malignă și nu doar atât dar nici nu pot infirma boala cu certitudine, oferind uneori rezultate fals negative.

STADIUL ACTUAL AL CUNOASTERII

În prezent, procesul de depistare a cancerului de prostată începe cu evaluarea prin tușeul rectal, și PSA, ulterior RMN pelvin urmat de biopsia de prostată. PSAul adaptat vârstei, poate prezenta însă limitări chiar dacă are o valoare sub 4 ng/mL și astfel, biopsia prostatică este recomandată în cazul unor anomalii ale valorii PSAului sau ale rezultatului RMN. Raportul medicului anatomopatolog include un scor Gleason sau ISUP, care reprezintă agresivitatea cancerului.

Un rezultat negativ al biopsiei de prostată nu exclude totuși posibilitatea existenței unei boli maligne ci mai degrabă, indică faptul că nu a existat nicio malignitate în proba care a fost analizată, dar în același timp un rezultat negativ al biopsiei poate indica, de asemenea, că nu există malignitate și procedura a fost o risipă de timp și de resurse dar a și predispus pacientul la diferite comorbidități.

PHI este un marker sangvin bazat pe PSA care și-a dovedit utilitatea în cazul pacienților nebiopsiați în trecut, poate ajuta la evitarea biopsiilor inutile și implicit evitarea posibilelor complicații ulterioare. Poate face diferența între pacienții sănătoși și cei cu hiperplazie benignă de prostată. În cazurile în care RMNul este negativ, PHI ajută medicul urolog să decidă dacă să efectueze sau nu biopsia prostatică iar dacă este efectuat înaintea RMNului, poate ajuta la decizia de a-l evita sau nu, ceea ce inevitabil prezintă beneficii inclusiv economice. PHI este util și în supravegherea activă, caz în care poate ajuta medicul să decidă dacă va rebiopsia pacientul sau nu.

Scorul 4K a prezentat rezultate superioare față de PSA, freePSA, PSA+freePSA, tușeul rectal, în ceea ce privește diagnosticarea cancerelor de prostată indolente sau agresive sau în reclasificarea unui cancer deja diagnosticat. În plus, a prezentat superioritate diagnostică și față de unele simulatoare de risc, dar totuși cele 2 combinate au prezentat cele mai bune rezultate statistice în diagnosticarea cancerului de prostată.

RMNul multiparametric și-a stabilit rolul în procesul de diagnostic al cancerului de prostată, în supravegherea activă și a demonstrat superioritate față de alți biomarkeri (PSA, freePSA, PHI, PCA3). Studiile recente demonstrează că și RMNul biparametric prezintă rezultate similare dar cu un cost scăzut și timpi de investigație mai scurți.

Căile tradiționale de diagnostic includ PSAul, tușeul rectal, mp-MRI și biopsia prostatică. Cu adăugarea biomarkerilor înaintea biopsiei, s-ar putea efectua un triaj mai bun al pacienților eligibili pentru biopsie și ceilalți să evite această procedură invazivă. Același lucru este valid și pentru biopsiile negative efectuate în trecut sau pentru pacienții aflați sub supraveghere activă.

Substraturile SERS sunt suprafețe metalice plasmonice cu capacitatea de a amplifica semnalul Raman. Spectroscopia SERS este deosebit de eficientă în detectarea și identificarea compușilor în cantități și concentrații extrem de mici.

Mecanismul propriu-zis al SERS este un subiect care a primit multă atenție în ultimii ani. Există două mecanisme responsabile de amplificarea semnalului Raman, care sunt universal acceptate. Primul mecanism constă în amplificarea electromagnetică, în care moleculele de analit sunt adsorbite sau se află în proximitatea nanoparticulelor ce au proprietăți plasmonice, permițând grupurilor moleculare din compoziția analitului și plasmonilor să interacționeze. Cel de al doilea mecanism de amplificare a semnalului este amplificarea

chimică, rezultată din interacțiunea dintre molecule și nanoparticule metalice datorită formării de legături chimice între ele și a transferului de sarcină.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul 1:

Determinarea modificărilor care apar la nivelul ARN-ului în cazul pacienților cu cancer de prostată, folosind tehnica spectroscopiei vibraționale SERS

Scop: Cea mai răspândită tumoră solidă la bărbați la nivel global este cancerul de prostată (PCa) care poate avea o varietate de forme clinice, de la nesemnificativ la extrem de agresiv. Tușeul rectal (TR), valoarea PSA, biopsia de prostată-scorul Gleason și imagistica prin rezonanță magnetică nucleară de prostată (RMN) sunt în prezent metodele de investigare pentru diagnosticarea cancerului de prostată. Procentul de supraviețuire la cinci ani, pentru pacienții din grupul cu risc ridicat, este mai mic de 30%. Pentru pacienții cărora li s-a efectuat prostatectomia radicală de salvare, rata de continență la un an după operație a variat între 51 și 85%.

Cea mai comună tehnică de diagnosticare a cancerului de prostată este biopsia tisulară prin abord rectal sau perineal. Uneori apar consecințele postoperatorii (hematurie, infecție, sepsis), care sunt prezente și la această procedură invazivă și sunt direct legate de tehnica operatorului.

Pe de altă parte, biopsiile lichide sunt non-invazive, ceea ce le face substanțial mai puțin cauzatoare de morbiditate și permite evaluarea lor în orice etapă a procesului diagnostic. Baza biopsiei lichide este colectarea fluidelor corporale (sânge, salivă și urină) și examinarea ulterioară a anumitor biomarkeri. În detrimentul ADN-ului, ARN-ul oferă o serie de avantaje cum ar fi expresia lui la nivel de țesut, o specificitate mai bună și caracteristicile specifice ale bolii.

Tehnologia SERS este utilizată pe scară largă pentru a detecta cancerul de prostată în fluidele corporale. Nanoparticulele de argint și nanoparticulele de aur, care vizează diverse molecule circulante (ARN necodificant, PSA, MUC4, IgG), membranele polimerice și dispozitivele microfluidice, sunt cele mai utilizate substraturi SERS.

Materiale și metode: Din 103 pacienți cu adenocarcinom prostatic, confirmat prin biopsie de prostată, spitalizați în Institutul Oncologic "Prof. Dr. Ion Chiricuță" Cluj - Napoca (IOCN), în perioada septembrie 2019 - martie 2020, în urma aplicării criteriilor de includere și excludere, am selectat un număr de 8 pacienți, care au fost incluși în prezentul studiu, și 4 donatori sănătoși.

Stadializarea pacienților a fost realizată și revizuită în conformitate cu ghidurile europene de diagnostic și tratament al cancerului de prostată. De asemenea, toți pacienții au prezentat boală locală dar nu local avansată și nici metastatică. Atât pacienții incluși în studiu cât și donatorii sănătoși au avut consimțământ informal semnat, și toate datele personale au fost codificate.

Așadar, în studiul de față am utilizat tehnica spectroscopiei SERS pentru a evidenția modificările care apar la nivelul ARN-ului, în cazul pacienților cu cancer de prostată. Pentru a ne atinge scopul propus, am utilizat 4 probe control provenite de la donatori sănătoși și 8 probe provenite de la pacienți cu cancer de prostată.

Rezultate: Probele au fost centrifugate și ulterior au fost citite prin tehnica NanoDrop pentru confirmarea calității ARNului prezent. În continuare pentru o confirmare a calității probei și purității acesteia, se efectuează un raport între valorile aferente ARNului și proteinelor (260/280). Aceste detalii sunt reprezentate prin tabele și grafice.

Graficul evidențiază absorbția luminii la diferite lungimi de undă. Lungimea de undă 260 nm este reprezentativă pentru ARN, 230 nm pentru compuși chimici cu grupări OH (alcooli) iar 280 nm reprezintă proteinele (aminoacizii cu nucleu aromatic). După cum se observă în figură, se formează un semnal sub forma de clopot, aproximativ simetric în jurul valorii de 260 nm, fapt care confirmă că probele conțin ARN pentru a efectua determinări ulterioare SERS.

Ulterior, se efectuează tehnica SERS. Sunt reprezentate prin figuri spectrele SERS individuale provenite de la donatorii sănătoși, spectrele pacienților, iar apoi aceste spectre sunt comparate prin suprapunere.

Peak-ul de la 453 cm⁻¹ atribuit vibrației structurii centrale de susținere a deoxiribozei fosfatice este mult crescut în cazul controalelor iar peak-ul de la 788 cm⁻¹ care este specific citozinei este mult crescut în cazul pacienților față de controale, indicând existența acesteia în cantități crescute în sânge în cazul pacienților cu cancer prostatic. Banda spectrală de la 1465 cm⁻¹ este specifică adeninei, citozinei și guaninei și, la fel, avem de-a face o intensitate mai mare a acesteia, indicând cantități crescute de ADN și ARN circulant în cazul pacienților față de sănătoși. Peak-ul dominant al acestor spectre este cel de la 2093 cm⁻¹ care sunt specifice unor legături triple de tip cian care ar putea proveni din kiturile de extracție ale ARN-ului și care nu au putut fi îndepărtate în procesul de extracție și purificare a ARN.

Concluzii: Utilizarea tehnicii SERS se pare că poate oferi rezultate rapide. Este o metodă neinvazivă iar rezultatele sunt ușor de integrat în practica clinică, dacă sunt incluse în detalierea informațiilor despre biopsiile lichide. Datele din studiile care utilizează teste pe biofluide arată că această procedură este repetabilă în orice moment al supravegherii pacientului. După ce probele de sânge sunt analizate, se colectează o cantitate mare de date, inclusiv se pot extrage analiți cum ar fi ARN, ADN fără celule și CTC cu indicii de modificări specifice cancerului. Este de dorit să se ia în considerare abordarea terapiei personalizate rapid și în timp real, prin utilizarea biopsiilor lichide în screening-uri pentru detectarea timpurie a cazurilor de cancer

Studiul 2:

Utilizarea substratelor plasmonice solide SERS în cancerul de prostată ca o potențială metodă de diagnostic rapidă, facilă și non-invazivă

Scop: Obiectivul principal al acestui studiu a fost utilizarea unui substrat plasmonic solid SERS pentru detecția eficientă a cancerului prostatic folosind spectroscopia vibrațională ultrasensibilă SERS și în plus de a utiliza această tehnică pentru a determina care este tipul de biofluid, plasmă sau ser sangvin, care ne oferă spectrul cel mai relevant și mai bogat în informație specifică, și care ar putea fi folosit cel mai eficient pe viitor în astfel de investigații.

Materiale și metode: Din cohorta inițială de 103 pacienți, am decis să includem în studiul actual un număr de 29 de pacienți cu adenocarcinom prostatic și 14 donatori sănătoși, după aplicarea criteriilor de excludere precum și eligibilitatea tehnică a eșantionului. Toți compușii utilizați în acest studiu au fost de puritate analitică și au fost utilizați exact așa cum au fost furnizați de companiile producătoare, fără alte purificări ulterioare.

Pașii efectuați pentru furnizarea rezultatelor au fost următorii (în ordine): sinteza coloizilor de argint, prepararea substraturilor plasmonice solide, depunerea analitului pentru măsurătorile SERS, spectroscopia UV-Vis, microscopia electronică de transmisie, microscopia de forță atomică.

Rezultate: Scopul principal al acestui studiu a fost utilizarea unor substraturi plasmonice solide pe bază de NPs de argint, dezvoltate în cadrul grupului nostru de cercetare, pentru analiza SERS a biofluidelor. Sintetic, s-au obținut soluțiile coloidale care ulterior au fost purificate și concentrate folosind metoda TFF, iar în final s-au sintetizat substratele solide prin autoasamblarea NPs concentrate pe port probe de sticlă de CaF₂, la temperatura de 40°C. Acest tip de substraturi ne-a ajutat să obținem cu succes amprente moleculare și spectrale ale ARN-ului, serului și plasmei sanguine.

Substratele SERS solide, dezvoltate în cadrul grupului nostru de cercetare, au capacitatea de a amplifica semnalul SERS și de a detecta semnal de la molecule mici și foarte mici. Drept consecință, acestea au fost utilizate și în cadrul tezei pentru a discrimina între pacienții cu cancer de prostată respectiv subiecții sănătoși.

Așadar, cu ajutorul spectroscopiei SERS am reușit să finalizăm cu succes primul obiectiv major al tezei, și anume, acela de face diferența spectrală clară între pacienții cu cancer prostatic și donatorii sănătoși și analizarea metodei ca potențial aplicativă în practica clinică.

Concluzii: În acest studiu, am prezentat metoda de analiză SERS a biofluidelor ser și plasmă, bazată pe utilizarea substraturilor plasmonice solide și care este foarte ușoară, facilă și eficientă. În plus, în acest mod de lucru, am reușit să obținem spectre SERS foarte reproductibile pentru bioanalizi extrem de complecși, cum sunt serul și plasma sanguină.

De asemenea, utilizând această tehnică am reușit să evidențiem, biofluidul ser, ca fiind mai propice pentru analiza SERS față de plasmă, serul fiind mult mai discriminatoriu în cazul studiului comparativ între pacienții cu cancer prostatic față de donatorii sănătoși, diferențele spectrale fiind unele de natură optică. Totuși putem afirma că diferențele observate între spectre nu pot distinge extrem de clar între pacienții cu cancer prostatic de donatorii sănătoși, de aceea, acest studiu amplu este doar cu un punct de plecare excelent pentru analiza multivariată, complementară, care va fi dezbătută în capitoul următor al tezei

Studiul 3:

Noi perspective asupra analizei multivariate a spectrelor SERS ale probelor de sânge pentru detecția precoce a cancerului de prostată

Scop: În studiul de față, obiectivul primar a fost să analizăm intensitatea peak-urilor în cazul pacienților diagnosticați cu adenocarcinom prostatic și mai apoi să le comparăm cu cele ale donatorilor sănătoși. Scopul principal a fost obținerea discriminării între cele două grupuri utilizându-se analiza multivariată și univariată.

Materiale și metode: Pentru o mai bună înțelegere în ceea ce privește rolul speciilor moleculare distincte în discriminarea cancerului utilizând analiza SERS-MVA propusă, am folosit o abordare în două direcții. Într-o primă fază, am înregistrat spectrele SERS pe probe de ser și plasmă prelevate de la donatori sănătoși (Controale) și de la donatori de cancer de prostată (Pacienți) folosind substraturi plasmonice solide, care au fost ulterior comparate și analizate folosind metoda MVA. În al doilea rând, au fost efectuate studii complete MVA pe întregul spectru, precum și pe regiuni spectrale specifice, în care cele mai multe benzi vibraționale au fost atribuite proteinelor și/sau altor biomolecule. În final, pentru separarea celor două seturi de date au fost utilizate două tehnici de discriminare diferite: Analiza discriminantă prin cele

mai mici pătrate principale (PLSDA) și Analiza componentelor principale – Metoda vectorială computațională (PCA-135 SVM). În literatura actuală, s-au publicat puține date științifice utilizând metoda combinată SERS-MVA pentru discriminarea subiecților în cazul cancerului de prostată.

Rezultate: Studiul nostru de analiză multivariată, care a acoperit întreg domeniul spectral (350-2200 cm⁻¹), susține ipoteza că utilizarea probelor de ser poate ajuta mai bine decât plasma sangvină la discriminarea pacienților cu cancer de prostată de donatorii sănătoși. În comparație cu rezultatele obținute pe probele de plasmă, rezultatele obținute pe probele de ser au avut acuratețe mai mare (97,7% vs. 87,8%), precizie (100% vs. 86,7%), sensibilitate (96,6% vs. 96,3%) și specificitate (100% față de 71,4%).

Am folosit un test t pentru a testa ipoteza separabilității la fiecare număr de undă înregistrat în analiza noastră univariată. Am folosit, de asemenea, o corecție BH cu un FDR de 5% pentru a ajusta în cazul testelor multiple. Cu alte cuvinte, am evaluat ipoteza că intensitatea medie a celor două grupuri (control și pacienți) este semnificativ diferită la fiecare număr de undă. Deoarece nu există nici o interacțiune între variabilele multiple (numere de undă) din analiză, analiza este univariată. Am prezentat constatările noastre sub formă de diagrame ale spectrului mediu (atât în funcție de clasă, cât și grupate), subliniind porțiunile numerelor de undă care au fost determinate ca fiind mai importante în ceea ce privește testul t corectat cu BH. Spectrele SERS ale probelor de plasmă au evidențiat șase zone semnificative corespunzătoare benzilor 350-400, 740-870, 990-1030, 1220-1300, 1390-1410 și 1750-1760 cm⁻¹, cu o valoare AUROC de 0,9 sau mai mare.

Concluzii: Rezultatele noastre sugerează că probele de ser sunt mai utile în diagnostic decât probele de plasmă. La efectuarea unei analize multivariate a spectrului complet precum și a celor două intervale spectrale 825- 1050 și 1506-1750 cm⁻¹, s-au obținut cele mai bune rezultate. Un beneficiu direct al acestui design experimental-matematic este invazivitatea minimă a tehnicii, care este susținut de ușurința sa de utilizare și de generarea rapidă a rezultatelor. În același timp, sunt încă necesare studii de cohorte mai mari de subiecți pentru a determina necesitatea biopsiei cu ac și a inspecției histologice.

Spectrele SER înregistrate din cele două grupuri clinic diferite au fost diferențiate statistic folosind o analiză PCA-LDA. Acest lucru a permis o sensibilitate ridicată și o diferență de specificitate între donatorii sănătoși și pacienții (sensibilitate de 90% și specificitate de 89%). Utilizarea măsurătorilor SERS direct pe probele de plasmă sanguină a furnizat o acuratețe a diagnosticului de 89 la sută, fără pași suplimentari de purificare sau deproteinizare a biofluidelor.

Concluzii generale

Biopsiile lichide pot fi interpretate foarte ușor prin tehnica SERS, oferă rezultate interpretabile și reproductibile. Aceasta poate identifica analiți precum ARN, ADN sau celule tumorale circulante. Prin utilizarea acestei metode de analiză, am reușit să obținem spectre SERS reproductibile pentru diferiți compuși din plasmă și ser.

Diferențele spectrale de natură optică sunt mult mai evidente în cazul utilizării serului decât a plasmă pentru discriminarea dintre pacienți și controale, evidențiate prin utilizarea analizei SERS.

Combinarea analizei SERS cu metode analitice univariate și multivariante prezintă potențial de a îmbunătăți procesul de diagnosticare al adenocarcinomului prostatic.

PhD THESIS SUMMARY

New innovative methods of prostate adenocarcinoma detection based on liquid biopsy

PhD student **Vlad-Cristian Munteanu**

PhD Supervisor **Prof. Dr. Ioan Coman**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
19	
1. Prostate cancer staging	21
1.1. Anatomopathological staging	21
1.2. Clinical staging	22
2. Traditional methods of prostate cancer diagnosis	24
2.1. Trans rectal exam	24
2.2. PSA	24
2.3. freePSA	26
2.4. PSA density (PSAD)	27
2.5. Multiparametric magnetic resonance (mpMRI)	27
2.6. The clinical process of cancer diagnosis	27
3. Non-invasive blood biomarkers of prostate cancer	29
3.1. Prostate Health Index (PHI) and Prostate Health Index Density (PHID)	29
3.2. 4K score	30
4. Imaging techniques	32
4.1. Multiparametric MRI	32
5. Combined tests	35
5.1. Other diagnostic tests	37
6. Raman technique	39
7. SERS 40 technique	
PERSONAL CONTRIBUTION	
43	
1. Working hypothesis / objectives (general and specific)	
45	
2. General research methodology	47
2.1. Sample collection, processing and storage	47
2.2. Synthesis and preparation of SERS substrates	48
2.3. SERS measurements	48
2.4. Data analysis	48

3. Study 1: Determination of the changes that occur at the level of RNA in prostate cancer patients, using the SERS vibrational spectroscopy technique	
51	
3.1. Introduction	51
3.2. Working hypothesis / Objectives	53
3.3. Materials and methods	53
3.4. Results	56
3.5. Discussions	61
3.6. Conclusions	61
4. Study 2: Use of solid plasmonic SERS substrates in prostate cancer as a potential fast, easy and non-invasive diagnostic method	
63	
4.1. Introduction	63
4.2. Materials and methods	64
4.2.2. Preparation of solid plasmonic substrates	65
4.2.3. Analyte deposition for SERS measurements	65
4.2.4. UV-Vis spectroscopy	66
4.2.5. Transmission electron microscopy (TEM)	66
4.2.6. Atomic force microscopy (AFM)	66
4.3. Results and Discussion	66
4.3.1. Synthesis and characterization of plasmonic nanoparticles and solid SERS substrates	67
4.3.2. Molecular fingerprinting of serum and whole plasma using Raman spectroscopy	72
4.3.3. Use of the ultrasensitive SERS technique to discriminate between prostate cancer patients and healthy donors using serum and plasma samples.	74
4.3.4. Comparison of SERS spectra of serum and plasma in healthy donors	81
4.4. Conclusions	82
5. Study 3: New insights into multivariate analysis of SERS spectra of blood samples for early detection of prostate cancer	
85	
5.1. Introduction	85
5.2. Objectives	86
5.5. Results and Discussion	88
5.6. Conclusions	92
6. General discussions	95
7. General conclusions	99
8. The originality and innovative contributions of thesis	101
9. Bibliographic references	103

Keywords: prostate adenocarcinoma, diagnosis, RNA, SERS

INTRODUCTION

According to data published by GLOBOCAN in 2020, prostate cancer is the second most common disease in men and the fifth leading cause of cancer death in 2020, with 1.4 million new cases and 375,000 deaths worldwide

The whole diagnostic process starts from the PSA value, it plays a role in the liquefaction of the seminal fluid. It is secreted by normal, benign and malignant prostate tissue, which means that PSA is organ-specific, not cancer-specific.

Following an abnormal PSA value ($>4\text{ng/mL}$) and the absence of symptoms to suspect another pathology of prostatic origin, the diagnostic process continues. The multiparametric pelvic MRI is performed which can describe an imaging suspicion of the presence of one or more suspected malignant nodules, a suspicion coded by the PIRADS system. Subsequently, prostatic puncture is performed to confirm or deny the diagnosis of prostatic adenocarcinoma.

Prostate cancer is diagnosed by microscopic examination of prostate tissue obtained by needle biopsy. A routine prostate biopsy is traditionally performed using transrectal/transperineal ultrasonography to collect 10 to 12 tissue samples.

Watchful waiting, surgery, and radiation are the three main alternatives for men with localized prostate cancer (characterized by a lack of regional lymph nodes visible on imaging or distant metastases). watchful waiting and active surveillance are used in expectant management (observation of prostate cancer progression over time, which does not involve effective definitive treatment). Active surveillance involves a series of PSA tests, physical examinations, prostate biopsies, or a combination of these to monitor progression with the goal of curing people with tumor progression, while watchful waiting focuses on treating symptoms with a palliative goal . Curative treatments are represented by surgery (radical prostatectomy with pelvic lymphadenectomy) and radiotherapy. They are recommended if the patient presents at least low or intermediate risk and the life expectancy is at least 10 years.

Bacterial infections, hematospermia, hematuria, rectal bleeding, prostatitis/epididymitis, and urinary retention are all possible complications after prostate biopsy. A negative biopsy could also mean that there is no malignancy and that the biopsy was in vain and the patient underwent an invasive procedure that did not yield results.

In order to improve the diagnostic process and to avoid the morbidities mentioned above, new methods of prostate cancer diagnosis, non-invasive, based on liquid biopsy are in full development; among these is the analysis based on Nanoparticle Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS).

This PhD thesis aims to identify potential alternative diagnostic biomarkers for prostate cancer. The motivation arose from the fact that at present, even if prostate neoplasm is very common, there is still no precise method of diagnosis. This fact determines the screening of a large population of people and some of them will be subjected to invasive diagnostic methods that may not identify the malignant pathology and not only that but they cannot deny the disease with certainty, sometimes giving false negative results .

THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Currently, the process of detecting prostate cancer begins with rectal examination, and PSA, then pelvic MRI followed by prostate biopsy. The age-adjusted PSA, however, can present limitations even if it has a value below 4 ng/mL and thus, prostate biopsy is recommended in case of abnormalities in the PSA value or the MRI result. The pathologist's report includes a Gleason score, or ISUP, which represents the aggressiveness of the cancer.

A negative prostate biopsy result does not, however, rule out the possibility of malignancy but rather indicates that there was no malignancy in the sample that was analyzed, but at the same time a negative biopsy result may also indicate that there is no malignancy and the procedure was a waste of time and resources but predisposed the patient to various comorbidities.

PHI is a PSA-based blood marker that has proven useful in patients not biopsied in the past, can help avoid unnecessary biopsies, and implicitly avoid possible further complications. It can differentiate between healthy patients and those with benign prostatic hyperplasia. In cases where the MRI is negative, the PHI helps the urologist to decide whether or not to perform the prostate biopsy and if it is performed before the MRI, it can help the decision to avoid it or not, which inevitably presents economic benefits as well. PHI is also useful in active surveillance, in which case it can help the physician decide whether or not to rebiopsy the patient.

The 4K score showed superior results to PSA, freePSA, PSA+freePSA, rectal examination, in diagnosing indolent or aggressive prostate cancers or in reclassifying an already diagnosed cancer. In addition, it also showed diagnostic superiority over some risk simulators, but still the 2 combined showed the best statistical results in diagnosing prostate cancer.

Multiparametric MRI has established its role in the diagnostic process of prostate cancer, in active surveillance and demonstrated superiority over other biomarkers (PSA, freePSA, PHI, PCA3). Recent studies demonstrate that biparametric MRI also shows similar results but with a low cost and shorter investigation times.

Traditional diagnostic routes include PSA, rectal exam, mp-MRI and prostate biopsy. With the addition of biomarkers before biopsy, better triage of patients eligible for biopsy could be performed and others avoid this invasive procedure. The same is true for negative biopsies performed in the past or for patients under active surveillance.

SERS substrates are plasmonic metal surfaces with the ability to amplify the Raman signal. SERS spectroscopy is particularly effective in detecting and identifying compounds in extremely small quantities and concentrations.

The actual mechanism of SERS is a topic that has received much attention in recent years. There are two mechanisms responsible for Raman signal amplification that are universally accepted. The first mechanism consists of electromagnetic amplification, in which analyte molecules are adsorbed or are in the vicinity of nanoparticles that have plasmonic properties, allowing the molecular groups of the analyte composition and plasmons to interact. The second signal amplification mechanism is chemical amplification, resulting from the

interaction between molecules and metal nanoparticles due to the formation of chemical bonds between them and charge transfer.

PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1:

Determining the changes that occur at the RNA level in prostate cancer patients, using the SERS vibrational spectroscopy technique

Purpose: The most prevalent solid tumor in men globally is prostate cancer (PCa) which can have a variety of clinical forms, from insignificant to highly aggressive. Rectal palpation (RCT), PSA value, prostate biopsy-Gleason score, and prostate nuclear magnetic resonance imaging (MRI) are currently the investigative methods for diagnosing prostate cancer. The five-year survival rate for patients in the high-risk group is less than 30%. For patients who underwent salvage radical prostatectomy, the continence rate one year after surgery ranged from 51 to 85%.

The most common technique for diagnosing prostate cancer is tissue biopsy through the rectal or perineal approach. Postoperative consequences sometimes occur (hematuria, infection, sepsis), which are also present in this invasive procedure and are directly related to the operator's technique.

On the other hand, liquid biopsies are non-invasive, which makes them substantially less morbid and allows their evaluation at any stage of the diagnostic process. The basis of liquid biopsy is the collection of body fluids (blood, saliva and urine) and the subsequent examination of certain biomarkers. Over DNA, RNA offers a number of advantages such as its tissue-level expression, better specificity and specific disease characteristics.

SERS technology is widely used to detect prostate cancer in body fluids. Silver nanoparticles and gold nanoparticles, which target various circulating molecules (noncoding RNA, PSA, MUC4, IgG), polymeric membranes, and microfluidic devices, are the most widely used SERS substrates.

Materials and methods: From 103 patients with prostate adenocarcinoma, confirmed by prostate biopsy, hospitalized in the Oncological Institute "Prof. Dr. Ion Chiricuță" Cluj-Napoca (IOCN), between September 2019 and March 2020, following the application of the inclusion criteria and exclusion, we selected a number of 8 patients, who were included in the present study, and 4 healthy donors.

Staging of patients was performed and reviewed according to the European guidelines for the diagnosis and treatment of prostate cancer. Also, all patients presented with local but not locally advanced or metastatic disease. Both the patients included in the study and the healthy donors had signed informal consent, and all personal data were coded.

So, in the present study, we used the SERS spectroscopy technique to highlight the changes that occur at the RNA level, in the case of prostate cancer patients. To achieve our aim, we used 4 control samples from healthy donors and 8 samples from prostate cancer patients.

Results: The samples were centrifuged and later read by the NanoDrop technique to confirm the quality of the RNA present. Next, to confirm the quality of the sample and its purity, a ratio is made between the values related to RNA and proteins (260/280). These details are represented by tables and graphs.

The graph highlights the absorption of light at different wavelengths. The wavelength 260 nm is representative for RNA, 230 nm for chemical compounds with OH groups (alcohols) and 280 nm represents proteins (amino acids with an aromatic nucleus). As seen in the figure, a roughly symmetrical bell-shaped signal forms around 260 nm, confirming that the samples contain RNA for further SERS determinations.

Afterwards, the SERS technique is performed. Individual SERS spectra from healthy donors, patient spectra are plotted, and then these spectra are compared by overlay.

The peak at 453 cm⁻¹ attributed to the vibration of the central support structure of deoxyribose phosphate is greatly increased in the case of controls and the peak at 788 cm⁻¹ which is specific to cytosine is greatly increased in the case of patients compared to controls, indicating the existence of it in increased amounts in the blood in patients with prostate cancer. The spectral band at 1465 cm⁻¹ is specific to adenine, cytosine and guanine and, likewise, we are dealing with a greater intensity of it, indicating increased amounts of circulating DNA and RNA in patients compared to healthy ones. The dominant peak of these spectra is the one at 2093 cm⁻¹ which is specific to cyano-type triple bonds that could come from the RNA extraction kits and which could not be removed in the extraction and purification process of RNA.

Conclusions: The use of the SERS technique appears to be able to provide rapid results. It is a non-invasive method and the results are easy to integrate into clinical practice, if they are included in detailing information about liquid biopsies. Data from studies using biofluid assays show that this procedure is repeatable at any point in the patient's follow-up. After blood samples are analyzed, a large amount of data is collected, including analytes such as RNA, cell-free DNA, and CTCs indicative of cancer-specific changes can be extracted. It is desirable to consider the approach of rapid and real-time personalized therapy by using liquid biopsies in screenings for early detection of cancer cases.

Study 2:

The use of solid plasmonic SERS substrates in prostate cancer as a potential fast, easy and non-invasive diagnostic method

Purpose: The main objective of this study was to use a solid plasmonic SERS substrate for the effective detection of prostate cancer using ultrasensitive vibrational SERS spectroscopy and in addition to use this technique to determine what type of biofluid, plasma or blood serum, we provides the spectrum most relevant and rich in specific information, and which could be used most effectively in the future in such investigations.

Materials and methods: From the initial cohort of 103 patients, we decided to include in the current study a number of 29 patients with prostatic adenocarcinoma and 14 healthy donors, after applying the exclusion criteria as well as the technical eligibility of the sample. All compounds used in this study were of analytical grade and were used exactly as supplied by the manufacturing companies without further purification.

The steps performed to provide the results were as follows (in order): synthesis of silver colloids, preparation of solid plasmonic substrates, analyte deposition for SERS measurements, UV-Vis spectroscopy, transmission electron microscopy, atomic force microscopy.

Results: The main goal of this study was to use solid plasmonic substrates based on silver NPs, developed in our research group, for SERS analysis of biofluids. Synthetically, the colloidal solutions were obtained which were later purified and concentrated using the TFF method, and finally the solid substrates were synthesized by the self-assembly of concentrated NPs on CaF₂ glass sample carriers, at a temperature of 40°C. This type of substrate helped us to successfully obtain molecular and spectral fingerprints of RNA, serum and blood plasma.

The solid SERS substrates developed in our research group have the ability to amplify the SERS signal and detect signal from small and very small molecules. As a consequence, they were also used in the thesis to discriminate between prostate cancer patients and healthy subjects.

So, with the help of SERS spectroscopy, we were able to successfully complete the first major objective of the thesis, namely, that of making a clear spectral difference between prostate cancer patients and healthy donors and analyzing the method as potentially applicable in clinical practice.

Conclusions: In this study, we presented the method of SERS analysis of biofluids serum and plasma, based on the use of solid plasmonic substrates and which is very light, easy and efficient. Furthermore, in this mode of operation, we were able to obtain highly reproducible SERS spectra for highly complex bioanalytes such as serum and blood plasma.

Also, using this technique, we were able to highlight the biofluid serum, as being more suitable for SERS analysis compared to plasma, serum being much more discriminatory in the case of the comparative study between patients with prostate cancer and healthy donors, the spectral differences being some of nature optics. However, we can state that the differences observed between the spectra cannot distinguish extremely clearly between prostate cancer patients and healthy donors, therefore this large study is only an excellent starting point for the multivariate, complementary analysis that will be discussed in the next chapter of the thesis.

Study 3:

New insights into multivariate analysis of SERS spectra of blood samples for early detection of prostate cancer

Purpose: In the present study, the primary objective was to analyze the intensity of the peaks in the case of patients diagnosed with prostatic adenocarcinoma and then to compare them with those of healthy donors. The primary aim was to obtain discrimination between the two groups using multivariate and univariate analysis.

Materials and Methods: To better understand the role of distinct molecular species in cancer discrimination using the proposed SERS-MVA assay, we used a two-pronged approach. In a first phase, we recorded SERS spectra on serum and plasma samples taken from healthy donors (Controls) and from prostate cancer donors (Patients) using solid plasmonic substrates, which were later compared and analyzed using the MVA method. Second, full MVA studies were performed on the entire spectrum as well as on specific spectral regions where most vibrational bands were assigned to proteins and/or other biomolecules. Finally, two different discrimination techniques were used to separate the two data sets: Principal Least Squares Discriminant Analysis (PLSDA) and Principal Component Analysis – Computational Vector Method (PCA-135 SVM). In the current literature, few scientific data have been published using the combined SERS-MVA method to discriminate subjects in prostate cancer.

Results: Our multivariate analysis study, which covered the entire spectral range (350-2200 cm⁻¹), supports the hypothesis that the use of serum samples can help better than blood

plasma in discriminating prostate cancer patients from healthy donors. Compared to results obtained from plasma samples, results obtained from serum samples had higher accuracy (97.7% vs. 87.8%), precision (100% vs. 86.7%), sensitivity (96, 6% vs. 96.3%) and specificity (100% vs. 71.4%).

We used a t test to test the separability hypothesis at each recorded wavenumber in our univariate analysis. We also used a BH correction with a 5% FDR to adjust for multiple testing. In other words, we evaluated the hypothesis that the mean intensity of the two groups (control and patients) is significantly different at each wavenumber. Since there is no interaction between the multiple variables (wavenumbers) in the analysis, the analysis is univariate. We presented our findings as plots of the mean spectrum (both by class and grouped), highlighting the portions of wavenumbers that were determined to be more important in terms of the BH-corrected t-test. The SERS spectra of the plasma samples revealed six significant areas corresponding to the bands 350-400, 740-870, 990-1030, 1220-1300, 1390-1410 and 1750-1760 cm^{-1} , with an AUROC value of 0.9 or more big.

Conclusions: Our results suggest that serum samples are more diagnostically useful than plasma samples. When performing a multivariate analysis of the complete spectrum as well as the two spectral intervals 825-1050 and 1506-1750 cm^{-1} , the best results were obtained. A direct benefit of this experimental-mathematical design is the minimal invasiveness of the technique, which is supported by its ease of use and rapid generation of results. At the same time, studies of larger cohorts of subjects are still needed to determine the need for needle biopsy and histological inspection.

The SER spectra recorded from the two clinically different groups were statistically differentiated using a PCA-LDA analysis. This allowed for high sensitivity and a difference in specificity between healthy donors and patients (90% sensitivity and 89% specificity). Using SERS measurements directly on blood plasma samples provided a diagnostic accuracy of 89 percent without additional purification or deproteinization steps of the biofluids.

General conclusions

Liquid biopsies can be interpreted very easily by the SERS technique, it provides interpretable and reproducible results. This can identify analytes such as RNA, DNA or circulating tumor cells. By using this analysis method, we were able to obtain reproducible SERS spectra for different compounds in plasma and serum.

Spectral differences of an optical nature are much more evident when using serum than plasma to discriminate between patients and controls, as evidenced using SERS analysis.

Combining SERS analysis with univariate and multivariate analytical methods has the potential to improve the diagnostic process of prostate adenocarcinoma.