
TEZĂ DE DOCTORAT

Metode de îmbunătățire a diagnosticului și monitorizării bolilor inflamatorii intestinale

Doctorand **Tefas Cristian Radu**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Tanțău Vasile Marcel**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	11
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
Capitolul 1. Bolile inflamatorii intestinale	15
1.1 Epidemiologie	15
1.2 Etiopatogeneza	15
1.3 Tablou clinic	17
1.4 Diagnostic pozitiv	18
1.4.1 Diagnosticul clinic	18
1.4.2 Diagnosticul serologic	18
1.4.3 Diagnosticul endoscopic	20
1.4.4 Diagnosticul imagistic	20
1.4.5 Diagnosticul histologic	21
1.5 Sisteme de clasificare a bolilor inflamatorii intestinale	21
1.6 Diagnostic diferențial	22
1.7 Tratament	23
1.8 Evoluție și complicații	25
1.9 Prognostic	25
Capitolul 2. Spectroscopia Raman	27
2.1 Introducere	27
2.2 Principiile tehnicii	27
2.3 Caracteristici ale metodei	28
2.4 Tipuri de sisteme spectroscopice Raman	28
2.5 Microspectroscopia Raman și aplicații clinice	29
Capitolul 3. Metabolomica	33
3.1 Introducere	33
3.2 Principiile tehnicii	33
3.3 Aplicabilitatea metabolomicii în bolile inflamatorii intestinale	35
3.4 Lipidomica	36
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
Capitolul 1. Ipoteza de lucru/obiective	39
Capitolul 2. Studiu 1. Caracterizarea metabolomică a bolilor inflamatorii intestinale	41
2.1 Introducere	41
2.2 Obiective	41
2.3 Material și metodă	41
2.3.1 Datele pacienților	41
2.3.2 Protocolul de colectare a probelor și extracție	42
2.3.3 Analiza UHPLC-QTOF-ESI+ MS	42
2.3.4 Prelucrarea datelor și analiza statistică	42
2.4 Rezultate	43
2.4.1 Datele subiecților	43
2.4.2 Amprenta cromatografică	44

2.4.3	Analiza statistică pentru diferențierea dintre grupul de pacienți și cel de subiecți sănătoși	47
2.4.4	Analiza statistică pentru a face diferența între grupurile cu boala Crohn și colită ulcerativă	55
2.4.5	Analiza căilor metabolice	58
2.5	Discuții	59
2.6	Concluzii	61
Capitolul 3. Studiu 2. Caracterizarea lipidomică a bolilor inflamatorii intestinale		63
3.1	Introducere	63
3.2	Obiective	63
3.3	Material și metode	63
3.3.1	Datele pacienților	63
3.3.2	Colectarea și protocolul de extracție	64
3.3.3	Analiza UHPLC-QTOF-ESI+ MS	64
3.3.4	Prelucrarea datelor și analiza statistică	64
3.4	Rezultate	65
3.4.1	Datele subiecților	65
3.4.2	Amprenta cromatografică	66
3.4.3	Analiza statistică a profilării lipidomice neșintite a pacienților și a subiecților sănătoși	70
3.4.4	Discriminarea între BC și CU prin profiluri lipidomice	76
3.5	Discuții	81
3.6	Concluzii	84
Capitolul 4. Studiu 3. Caracterizarea serologică a colitei ulcerative prin spectroscopie Raman amplificată de suprafață (SERS)		85
4.1.	Introducere	85
4.2	Obiective	85
4.3	Material și metodă	86
4.3.1	Datele pacienților	86
4.3.2	Prelevarea de probe și protocolul de preparare	86
4.3.3	Sinteza nanoparticulelor de argint	86
4.3.4	Efectuarea măsurătorilor microscopice	86
4.3.5	Prepararea substratelor SERS solide	88
4.3.6	Efectuarea măsurătorilor Raman	89
4.3.7	Analiza statistică multivariată	90
4.4	Rezultate	91
4.5	Discuții	93
4.6	Concluzii	96
Capitolul 5. Concluzii generale		97
Capitolul 6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei		99
REFERINȚE		101

Cuvinte cheie: boli inflamatorii intestinale, colită ulcerativă, boală Crohn, lipidomică, metabolomică, spectroscopie Raman

Introducere

Bolile inflamatorii intestinale (BII) sunt definite ca un grup de afecțiuni mediate imun de etiologie necunoscută, caracterizate prin inflamația cronică heterogenă și recurentă a tractului digestiv, asociind numeroase complicații gastrointestinale și sistemice. În acest grup sunt incluse colita ulcerativă (CU) și boala Crohn (BC). BII prezintă o geneză complexă, ele apărând ca urmare a interacțiunilor factorilor de mediu și genetici, acestea conducând la răspunsuri imunologice aberante și procese inflamatorii locale și generale. Alterarea echilibrului bacterian intestinal, dieta sau factorii genetici au fost incriminate ca elemente declanșatoare, dezvoltarea BII fiind mai degrabă rezultatul cumulativ al acestora.

Diagnosticul BII se bazează pe combinația dintre caracteristicile clinice, endoscopice, histopatologice, serologice și radiologice, însă distincția exactă între CU și BC rămâne dificilă în multe cazuri. Diagnosticul pozitiv e în continuare problematic în unele situații, cu atât mai mult cu cât acesta presupune o suită de examinări endoscopice ce pot fi uneori neplăcute sau chiar periculoase. Pe parcursul anilor, o serie de tehnici imagistice au încercat să preia această sarcină, astfel încât enterografia CT sau RMN au fost validate în diagnosticul și urmărirea pacienților cu patologie inflamatorie intestinală. Sigur, și acestea au limitele lor, referitor la costuri ridicate, expunerea la radiații în cazul CT, sau chiar și accesibilitatea redusă, mult mai des întâlnită în cazul RMN. Un alt element ce trebuie luat în calcul se referă la evoluția recurentă a BII, cu puseuri ce trebuie cuantificate pentru a se stabili strategia terapeutică optimă. În astfel de situații, explorările endoscopice și imagistice încep să devină într-adevăr costisitoare și să imprime pacientului stări de anxietate.

Stadiul actual al cunoașterii

„Stadiul actual al cunoașterii” este prima parte a acestei teze și aduce în prim plan cele mai importante date din literatură în ceea ce privește epidemiologia, etiologia, diagnosticul, tratamentul și evoluția BII. Tot în această primă parte sunt expuse și tehnicile de metabolomică, lipidomică și spectroscopie Raman, utilizate în cadrul studiilor prezentate.

Contribuția personală

Contribuția personală este cuprinsă în cele trei studii ce evaluează biomarkeri serologici noi în ideea simplificării și eficientizării diagnosticului pozitiv și diferențial al BII. Se discută, de asemenea, despre perspectivele dezvoltării acestora privind aplicarea unor noi abordări moleculare și a unor noi tehnologii spectroscopice în diagnosticul și monitorizarea BII. Studiile descrise au fost transversale, observaționale și au inclus câte două grupuri de subiecți: unul de martori sănătoși și unul de pacienți cu BII.

Obiectivele generale ale studiilor au fost:

1. Evaluarea eficacității diagnostice a analizei metabolomice a serului pacienților cu BII.
2. Evaluarea eficacității analizei metabolomice serice în diagnosticul diferențial între diferitele forme de BII.
3. Evaluarea eficacității diagnostice a analizei lipidomice a serului pacienților cu BII.

4. Evaluarea eficacității analizei lipidomice serice în diagnosticul diferențial între diferitele forme de BII.

5. Evaluarea eficacității analizei spectroscopice serice în diagnosticul pozitiv al colitei ulcerative.

Teza cuprinde 3 studii clinice și de laborator efectuate în:

1. Departamentele de Gastroenterologie, Endoscopie și Morfopatologie ale Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie Prof. Dr. Octavian Fodor, Cluj-Napoca, România.

2. Centrul de cercetare pentru biotehnologii aplicate BIODIATECH, SC Proplanta, Cluj-Napoca, Romania.

3. Departamentul MedFuture – Centrul de cercetare pentru medicină avansată. Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca

Studiile au fost efectuate în perioada 2015-2018.

Studiul 1

Caracterizarea metabolomică a bolilor inflamatorii intestinale

Obiectivul studiului a fost de a evalua performanța diagnostică a tehnicii de metabolomică neșintită pe probe serologice recoltate de la pacienți cu BII.

Material și metodă. Probele de sânge au fost recoltate de la pacienți cu BII consecutiv internați într-un centru medical terțiar din Cluj-Napoca, România. Aceștia au fost diagnosticați utilizându-se date clinice, serologice, radiologice, endoscopice și histopatologice ca având CU stângă sau extinsă sau BC de colon. Toți au avut boală activă, confirmată prin ileocolonoscopie cu biopsii țintite. Evaluarea clinică a fost făcută utilizându-se scorul UCDAI pentru CU și CDAI pentru BC. Scorul endoscopic Mayo pentru CU și scorul SES-CD pentru BC au fost utilizate pentru a cuantifica severitatea endoscopică.

După centrifugarea probelor de sânge, serul rezultat a fost filtrat. Separarea moleculelor extrase a fost efectuată într-un sistem de cromatografie de lichide de înaltă performanță (UHPLC) utilizând un program de gradient cu două faze mobile (A-H₂O + 0,1% acid formic și B-acetonitril + 0,1% acid formic). Fragmentarea moleculară a fost făcută utilizând Quadrupole Time of Flight – Electrospray Ionization Mass Spectrometry (QTOF-ESI+ MS).

Cromatogramele de bază au fost prelucrate cu Compass DataAnalysis 4.2, folosind metoda Find Molecular Feature (FMF). Principal Component Analysis (PCA) a fost folosită mai întâi pentru a evalua gradul de discriminare dintre grupurile experimentale și pentru a detecta și elimina valorile extreme. Apoi a fost efectuată analiza Partial Least Squares – Discriminant Analysis (PLS-DA). Relevanța fiecărui metabolit a fost cuantificată prin scorul de importanță variabilă în proiecție (VIP). Ulterior, acest scor a fost folosit pentru a identifica biomarkerii presupuși a fi utilizabili. Validarea încrucișată prin metoda Leave One Out Cross Validation (LOOCV) a fost efectuată pe modelul PLS-DA pentru a găsi și minimiza riscul de suprapunere și pentru a valida rezultatele.

Același software online a fost folosit pentru analiza univariată cu scopul de a calcula valorile *p*, care definesc semnificația statistică a diferențelor dintre subiecții sănătoși și cei cu BII, BC versus CU și pentru a genera curbele ROC (Receiver Operating Characteristic).

Identificarea moleculelor a fost făcută în conformitate cu baza de date a metaboliților umani (<http://www.hmdb.ca/>).

Rezultate. Au fost incluși 22 de subiecți cu BII, dintre care 59% bărbați, cu o vârstă medie de 39 de ani. Toți pacienții incluși au fost diagnosticați fie cu BC colonică ($n = 5$) fie cu CU stângă sau extinsă ($n = 17$). Grupul de control a inclus 24 de subiecți.

După prelucrarea cromatogramelor s-au obținut 3000-3800 vârfuri în cadrul timpului de separare de 20 de minute. După aplicarea testelor pe matricea finală au fost obținute aproximativ 800 de molecule utile în compararea tuturor probelor. După separarea componentelor utilizând UHPLC, spectrometria de masă (MS) a identificat 33 de vârfuri principale în probele de control și 27 vârfuri principale în probele pacienților.

Analiza căilor metabolice a arătat că metabolismele glicerofosfolipidelor și sfingolipidelor par a fi țintele principale ale BII.

După aplicarea testelor statistice univariate și multivariate, șapte molecule s-au dovedit a fi semnificative din punct de vedere statistic în diferențierea pacienților de subiecții sănătoși, respectându-se următoarele condiții: $p < 0,05$ și $AUC > 0,6$. Astfel, lizofosfatidiletanolamina (LPE) (24:6), LPE (22:6) și lizofosfatidilcolina (LPC) (18:2) prezentau valori mai reduse la pacienți decât la subiecții sănătoși, pe când LPC (22:6), LPC (20:4), trigliceridele (TG) și acidul hidroperoxilinoleic valori mai mari.

Compuși cu cele mai apropiate valori acceptabile pentru a discrimina CU de BC au fost TG (58:12)), LPC (22:6)/Cer (d18:0/18:0) (18:2)), heptanoil carnitina și PE (22:1 (13Z) / 15:0) / PC (18:1 (9Z) / 16:0). Cu toate acestea, doar (TG (58:12)), a fost semnificativ statistic mai crescut la pacienții cu CU ($p < 0,05$).

Concluzii. Rezultatele prezentate în acest studiu sunt interesante și promițătoare. Pe măsură ce dezvoltăm studii mai ample, vom putea exploata capacitatea de diagnosticare a acestor molecule la potențialul lor maxim, înlocuind o procedură endoscopică dificilă și uneori periculoasă cu o simplă înțepătură de ac.

Studiul 2

Caracterizarea lipidomică a bolilor inflamatorii intestinale

Obiectivul studiului a fost de a evalua performanța diagnostică a tehnicii de lipidomică nețintită pe probe serologice recoltate de la pacienți cu BII.

Material și metodă. Probele de sânge au fost recoltate de la pacienți consecutivi cu CU stângă sau extinsă sau cu BC colică internați într-un centru medical terțiar din Cluj-Napoca, România. Aceștia au fost diagnosticați utilizându-se date clinice, serologice, radiologice, endoscopice și histopatologice. Toți au avut boală activă, confirmată prin ileocolonoscopie cu biopsii țintite. Evaluarea clinică a fost făcută utilizându-se scorul UCDAI pentru CU și CDAI pentru BC. Scorul endoscopic Mayo pentru CU și scorul SES-CD pentru BC au fost utilizate pentru a cuantifica severitatea endoscopică.

După centrifugarea probelor, serul rezultat a fost filtrat. Separarea moleculelor extrase a fost efectuată într-un sistem UHPLC utilizând un program de gradient cu două faze mobile (A-acetonitril:H₂O (60:40) + 0,1% acid formic + 10 mM format de amoniu și B-izopropanol:acetonitril (90:10) + 0,1% acid formic + 10 mM format de amoniu). Fragmentarea moleculară a fost făcută utilizând QTOF-ESI+ MS.

PCA a fost utilizată mai întâi pentru a evalua diferența dintre grupurile experimentale (prin scoruri și încărcări) și pentru a detecta valorile extreme, eliminate ulterior din analiză. Au fost apoi efectuate analize discriminatorii parțiale (PLS-DA). Relevanța fiecărei specii de lipide a fost cuantificată folosind scorul VIP, identificând astfel presupușii biomarkeri lipidici. Validarea încrucișată prin metoda LOOCV a fost efectuată pe modelul PLS-DA pentru a găsi cel mai potrivit număr de componente PLS,

pentru a minimiza riscul de suprapunere și pentru validarea rezultatelor găsite. Analiza univariată utilizând testul t a fost efectuată pentru a determina semnificația diferențelor dintre subiecții sănătoși și pacienții cu BII, precum și între BC și CU.

Rezultate. Au fost incluși 22 de subiecți cu BII, dintre care 59% bărbați, cu o vârstă medie de 39 de ani. Toți pacienții incluși au fost diagnosticați fie cu BC colonică ($n = 5$) fie cu CU stângă sau extinsă ($n = 17$). Grupul de control a inclus 24 de subiecți.

După separarea componentelor utilizând UHPLC și obținerea cromatogramelor corespunzătoare, MS a permis identificarea a 34 de peakuri principale în probele de control și 36 de peakuri principale în eșantioanele pacienților.

Analiza pe cale metabolică a serului a sugerat că cele mai implicate căi în mecanismele patologice ale pacienților cu BII sunt cele ale glicerofosfolipidelor, acidului linoleic și sfingolipidelor.

După aplicarea testelor statistice univariate și multivariate, șase molecule s-au dovedit a fi semnificative din punct de vedere statistic în diferențierea pacienților de subiecții sănătoși, respectându-se următoarele condiții: $p < 0,005$, False Discovery Rate (FDR) $< 0,05$ și AUC $> 0,8$. Astfel, acidul tetracosanoic, fosfatidilcolina (PC), LPC, sfingomielină (SM) și diacilglicerolul au prezentat valori semnificativ mai mici la pacienți decât la subiecții sănătoși, în timp ce colesterolul esterii (18:3) valori semnificativ mai mari.

Considerându-se un scor VIP $> 1,5$, $p < 0,005$ și AUC $> 0,8$, analiza statistică a pacienților cu BC și CU a identificat șapte molecule semnificativ diferite între cele două grupuri. Astfel, nivelurile de linoleamidă, palmitoilamidă, palmitoleamidă, esteri grași ramificați ai acizilor grași hidroxicili, precum și trei izomeri ai acidului hexadecanoic (steril palmitoleat, palmitoleil stearat, oleil palmitat) au fost mai mari la pacienții cu BC decât la cei cu CU.

Concluzii. Acest studiu preliminar a confirmat faptul că profilarea lipidomică serică are un potențial bun de a fi utilizat ca instrument de diagnostic pentru identificarea neinvazivă a pacienților cu BII, precum și pentru a diferenția între cele două subclase de BII. Aceste rezultate contribuie, de asemenea, la îmbunătățirea înțelegerii noastre asupra mecanismelor fiziopatologice ale BC și CU.

Studiul 3

Caracterizarea serologică a colitei ulcerative prin spectroscopie Raman amplificată de suprafață (SERS)

Obiectivul studiului a fost evaluarea prin analiză multivariată a performanței diagnostice a SERS pe probe serologice recoltate de la pacienți cu CU.

Material și metodă. Probele de sânge au fost recoltate de la pacienți consecutivi cu CU stângă sau extinsă activă, internați la un spital terțiar de referință din Cluj-Napoca, România. Diagnosticul CU a fost stabilit folosindu-se date clinice, serologice, endoscopice și histologice. Severitatea clinică a fost evaluată folosindu-se indicele UCDAI, în timp ce severitatea endoscopică a fost evaluată folosindu-se scorul Mayo.

După sinteza nanoparticulelor de argint, efectuarea măsurătorilor microscopice specifice și prepararea substratelor SERS solide, au fost realizate măsurătorile Raman cu ajutorul unui microscop confocal. Spectrele au fost obținute cu ajutorul laserului de 785 nm, cu o putere de 65 mW pe probă și un obiectiv de 100x. Pentru măsurătorile SERS s-au realizat hărți spectrale folosindu-se obiectivul de 50x și o putere a laserului

pe probă de 0,22 mW. Timpul de achiziție a fost de 10 secunde în modul extended al aparatului. Spectrograful a fost echipat cu o cameră de tip CCD cu o gradație de 1200 linii/mm. Platforma software dedicată Wire 4.2 a fost folosită pentru comanda, controlul și achiziția de spectre, într-o primă fază, dar și pentru a pre-procesa datele prin eliminarea peak-urilor provenite de la radiația ambientală și pentru eliminarea influenței spectrale a fenomenului de fluorescență. Pentru fiecare probă s-au efectuat 48 de măsurători care ulterior au fost mediate și procesate folosind Wire 4.2 respectiv Origin 2019.

Separarea celor două grupuri, pacienți și subiecți sănătoși, pe baza spectrelor SERS a fost obținută prin aplicarea PCA-LDA. O validare a modelului PCA-LDA, folosindu-se LOOCV a produs un tabel de confuzie din care au fost calculate sensibilitatea, specificitatea și acuratețea.

Rezultate. Au fost incluși un număr de 32 de subiecți cu CU, 62,5% dintre ei fiind bărbați, cu o vârstă medie de 37,7 ani. Toți pacienții incluși au fost diagnosticați fie cu colită stângă ($n = 18$), fie cu colită extinsă ($n = 14$). Grupul de control a cuprins 35 de subiecți.

Analiza Raman a arătat că deși spectrele se suprapun în mai multe puncte, există diferențe semnificative între ele. Ca atare, există creșteri ale peakurilor la 725 cm^{-1} (hipoxantină), $890\text{-}910\text{ cm}^{-1}$ (glutacion și glucoză) și 1100 cm^{-1} (hipoxantină) la pacienți. În plus, există scăderi ale vârfurilor la 485 cm^{-1} (glicogen), 690 cm^{-1} (tirozină), 1250 cm^{-1} , 1584 cm^{-1} și 1665 cm^{-1} (proteine) la eșantioanele din grupul CU, spre deosebire de cele din grupul martor.

După aplicarea modelului PCA-LDA, probele de la pacienții cu CU au putut fi diferențiate de cele ale subiecților sănătoși cu o sensibilitate de 81,3%, o specificitate de 80,0%, o precizie generală de 80,6% și o acuratețe de 78,8%. Valoarea predictivă a tehnicii a fost evaluată folosindu-se analiza ROC, calculând ariile de sub curbă (AUC). În studiul nostru, valoarea AUC calculată a fost de 0,9.

Concluzii. Datele noastre sugerează că SERS în combinație cu analiza multivariată este o abordare promițătoare în discriminarea subiecților sănătoși de cei cu CU cu rate de sensibilitate și specificitate ridicate. Trebuie remarcat faptul că SERS are avantajul de a fi minim invaziv, ușor de utilizat, rapid și portabil, toate fiind caracteristici care ar trebui să recomande implementarea sa ulterioară în diagnosticul CU.

Concluzii generale

Lucrarea de față reprezintă o formalizare a contribuțiilor teoretice și practice în domeniul diagnosticării BII. Prin intermediul acesteia, am rezumat munca depusă în ultimii 4 ani, în perioada de formare științifică a studiilor doctorale.

În cadrul acestei lucrări am abordat mai multe tehnici biochimice și fizice cu scopul îmbunătățirii principiilor de diagnostic și monitorizare ale BII. Ca atare, am propus atât metode diagnostice recent descoperite, dar insuficient explorate, cât și metode noi. Sumarizând lucrarea, concluziile generale sunt următoarele:

1. Metabolomica serică neîntită prezintă un potențial diagnostic de neignorată, prin prisma acurateței înalte dovedite. Rezultatele prezentate în această lucrare sunt interesante și promițătoare. Pe măsură ce dezvoltăm studii mai ample, vom putea exploata capacitatea de diagnosticare a acestor molecule la potențialul lor maxim, înlocuind o procedură endoscopică dificilă și uneori.

2. Determinarea profilurilor lipidomice serice are un potențial bun ca instrument de diagnostic pentru identificarea neinvazivă a pacienților cu BII, precum și pentru a diferenția între cele două subclase de BII. Rezultatele prezentate în această lucrare contribuie, de asemenea, la îmbunătățirea înțelegerii noastre asupra mecanismelor fiziopatologice ale BC și CU.

3. SERS în combinație cu analiza multivariată este o abordare promițătoare în discriminarea subiecților sănătoși de cei cu CU cu rate de sensibilitate și specificitate ridicate. Trebuie remarcat faptul că SERS are avantajul de a fi minim invaziv, ușor de utilizat, rapid și portabil, toate fiind caracteristici care ar trebui să recomande implementarea sa ulterioară în diagnosticul CU.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Din punct de vedere științific, contribuțiile originale din perioada de cercetare a lucrării de doctorat sunt după cum urmează:

- S-a efectuat primul studiu raportat la nivel mondial în care s-a evaluat performanța diagnostică a tehnicii SERS la pacienții cu CU. Studiul a demonstrat rate înalte de sensibilitate, specificitate și acuratețe, recomandându-se studii ulterioare pentru validarea tehnicii. Totodată, pentru a putea efectua SERS, au fost aduse îmbunătățiri calitative semnificative substratelor utilizate pentru determinări, aspecte care fac tehnica mai precisă.

- Celelalte două studii au identificat o serie de metaboliți serologici cu performanțe discriminante înalte, atât între subiecții sănătoși și cei cu BII, cât și între cei cu BC colonică sau CU. Acestea au fost primele două studii de metabolomică/lipidomică din România, în care au fost studiate moleculele implicate în BII.

- În studiul de lipidomică, am arătat de asemenea în premieră raportată la nivel mondial, utilitatea acizilor grași în diferențierea celor două subtipuri de BII.

PhD THESIS

Methods of Improving the Diagnosis and Monitoring of Inflammatory Bowel Diseases

PhD Student **Tefas Cristian Radu**

PhD Coordinator Prof.dr. **Tanțău Vasile Marcel**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	11
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
Chapter 1. Inflammatory bowel diseases	15
1.1 Epidemiology	15
1.2 Etiopathogenesis	15
1.3 Clinical Presentation	17
1.4 Positive Diagnosis	18
1.4.1 Clinical Diagnosis	18
1.4.2 Serological Diagnosis	18
1.4.3 Endoscopic Diagnosis	20
1.4.4 Imaging	20
1.4.5 Histopathological Diagnosis	21
1.5 Classification of Inflammatory Bowel Diseases	21
1.6 Differential Diagnosis	22
1.7 Treatment	23
1.8 Evolution and Complications	25
1.9 Prognosis	25
Chapter 2. Raman Spectroscopy	27
2.1 Introduction	27
2.2 The Principles of the Technique	27
2.3 Characteristics	28
2.4 Types of Raman Spectroscopic Systems	28
2.5 Raman Microscopy and Clinical Applications	29
Chapter 3. Metabolomics	33
3.1 Introduction	33
3.2 The Principles of the Technique	33
3.3 The Applicability of Metabolomics in Inflammatory Bowel Diseases	35
3.4 Lipidomica	36
PERSONAL CONTRIBUTION	
Chapter 1. Work Hypothesis/Objectives	39
Chapter 2. Study 1. Metabolic Characterization of Inflammatory Bowel Diseases	41
2.1 Introduction	41
2.2 Objectives	41
2.3 Material and Methods	41
2.3.1 Patient Data	41
2.3.2 Collection and Extraction Protocol	42
2.3.3 UHPLC-QTOF-ESI+ MS Analysis	42
2.3.4 Statistical Analysis	42
2.4 Results	43
2.4.1 Subject Data	43
2.4.2 Chromatographic Fingerprinting	44
2.4.3 Statistical Analysis to Discriminate Patients from Healthy Subjects	47

2.4.4 Statistical Analysis to Distinguish between Crohn's Disease and Ulcerative Colitis	55
2.4.5 Metabolic Pathway Analysis	58
2.5 Discussions	59
2.6 Conclusion	61
Chapter 3. Study 2. Lipidomic Characterization of Inflammatory Bowel Diseases	63
3.1 Introduction	63
3.2 Objectives	63
3.3 Material and Methods	63
3.3.1 Patient Data	63
3.3.2 Collection and Extraction Protocol	64
3.3.3 UHPLC-QTOF-ESI+ MS Analysis	64
3.3.4 Statistical Analysis	64
3.4 Results	65
3.4.1 Subject Data	65
3.4.2 Chromatographic Fingerprinting	66
3.4.3 Statistical Analysis to Discriminate Patients from Healthy Subjects	70
3.4.4 Statistical Analysis to Distinguish between Crohn's Disease and Ulcerative Colitis	76
3.5 Discussions	81
3.6 Conclusion	84
Chapter 4. Study 3. Serological Characterization of Ulcerative Colitis by Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)	85
4.1. Introduction	85
4.2 Objectives	85
4.3 Material and Methods	86
4.3.1 Patient Data	86
4.3.2 Collection and Preparation Protocol	86
4.3.3 Silver Nanoparticle Synthesis	86
4.3.4 Microscopic Measurements	86
4.3.5 Solid SERS Substrate Preparation	88
4.3.6 Raman Measurements	89
4.3.7 Multivariate Statistical Analysis	90
4.4 Results	91
4.5 Discussions	93
4.6 Conclusion	96
Chapter 5. General Conclusions	97
Chapter 6. Originality and Innovative Contributions of the thesis	99
REFERENCES	101

Keywords: inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, Crohn's disease, lipidomics, metabolomics, Raman spectroscopy

Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) are a group of immune-mediated disorders of unknown etiology, characterized by chronic heterogeneous and recurrent inflammation of the digestive tract, associated with numerous gastrointestinal and systemic complications. This group includes ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD).

IBD have a complex genesis, appearing because of the interaction of environmental and genetic factors, which lead to aberrant immunological responses and local and general inflammatory processes. Alterations of the intestinal microbiota, diet or genetic factors were incriminated as triggers. However, the development of IBD is most likely a cumulative result of these factors.

The diagnosis of IBD is based on the combination of clinical, endoscopic, histopathological, serological and radiological features, but the exact distinction between UC and CD remains difficult in many cases. A positive diagnosis is still problematic in some situations, even more so since it involves a series of endoscopic examinations that can sometimes be unpleasant or even dangerous. Over the years, a number of imaging techniques have tried to take on this task. CT or MRI enterography have been validated in the diagnosis and follow-up of IBD patients. Of course, they also have their limitations, with regard to high costs, radiation exposure in the case of CT, or even reduced accessibility, much more commonly encountered in the case of MRI. Another element to consider is the recurrent evolution of IBD, with flares that need to be quantified in order to establish the optimal therapeutic strategy. In such situations, endoscopic and imaging explorations begin to become really expensive and give the patient anxiety.

Current state of knowledge

"The current state of knowledge" is the first part of this thesis and brings to the fore the most important data gathered from the literature regarding the epidemiology, etiology, diagnosis, treatment and evolution of IBD. Also in this first part, the techniques of metabolomics, lipidomics and Raman spectroscopy are presented, as they are subsequently used in the presented studies.

Personal contribution

The personal contribution consists of three studies evaluating new serological biomarkers in order to simplify and make more efficient the positive and differential diagnosis of IBD. It also discusses the prospects of their development regarding the application of new molecular approaches and new spectroscopic technologies in the diagnosis and monitoring of IBD. The studies described were cross-sectional, observational and included two groups of subjects: one of healthy controls and one of patients with IBD.

The general objectives of the studies were:

1. Evaluation of the diagnostic efficacy of untargeted serum metabolomic analysis of patients with IBD.
2. Evaluation of the efficacy of serum metabolomic analysis in the differential diagnosis between different forms of IBD.
3. Evaluation of the diagnostic efficacy of serum untargeted lipidomic analysis of patients with IBD.

4. Evaluation of the efficacy of the serum lipidomic analysis in the differential diagnosis between the different forms of IBD.

5. Evaluation of the efficacy of serum Raman spectroscopic analysis in the positive diagnosis of ulcerative colitis.

The thesis comprises 3 clinical and laboratory studies performed in:

1. The Departments of Gastroenterology, Endoscopy and Morphopathology of the Prof. Dr. Octavian Fodor Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology, Cluj-Napoca, Romania.

2. Research Center for Applied Biotechnologies BIODIATECH, SC Proplanta, Cluj-Napoca, Romania.

3. MedFuture Department - Research Center for Advanced Medicine. "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca

The studies were conducted between 2015 and 2018.

Study 1

Metabolic Characterization of Inflammatory Bowel Diseases

Objective. The objective of the study was to evaluate the diagnostic performance of untargeted metabolomics on serological samples collected from patients with IBD.

Material and methods. Blood samples were collected from consecutive patients with IBD admitted to a tertiary medical center in Cluj-Napoca, Romania. The diagnosis was made using clinical, serological, radiological, endoscopic and histopathological data with patients having left-sided UC, extensive UC or colonic CD. All had active disease, confirmed by ileocolonoscopy with targeted biopsies. Clinical evaluation was performed using the UCDAI score for UC and the CDAI score for CD. The Mayo endoscopic score and SES-CD score were used to quantify the endoscopic severity for UC and CD, respectively.

After centrifugation of blood samples, the resulting serum was filtered. The separation of the extracted molecules was performed in an ultra high performance liquid chromatography system (UHPLC) using a two-phase mobile gradient program (A-H₂O + 0.1% formic acid and B-acetonitrile + 0.1% formic acid). Molecular fragmentation was done using Quadrupole Time of Flight - Electrospray Ionization Mass Spectrometry (QTOF-ESI+ MS).

Basic chromatograms were processed with Compass DataAnalysis 4.2, using the Find Molecular Feature (FMF) method. Principal Component Analysis (PCA) was first used to assess the degree of discrimination between experimental groups and to detect and eliminate outliers. Then the Partial Least Squares - Discriminant Analysis (PLS-DA) analysis was performed. The relevance of each metabolite was quantified by the variable importance in projection score (VIP). Subsequently, this score was used to identify the biomarkers presumed to be usable. Cross-validation using the Leave One Out Cross Validation (LOOCV) method was performed on the PLS-DA model to find and minimize the risk of overlapping and to validate the results.

The same online software was used for univariate analysis in order to calculate the *p* values, which defined the statistical significance of the differences between healthy subjects and those with IBD, CD versus UC and to generate the ROC (Receiver Operating Characteristic) curves.

Molecule identification was done using the human metabolites database (<http://www.hmdb.ca/>)

Results. Twenty-two subjects with IBD were included, of which 59% were men, with an average age of 39 years. All included patients were diagnosed with either colonic BC ($n = 5$), left-sided UC or extensive UC ($n = 17$). The control group included 24 subjects.

After processing the chromatograms, 3000-3800 peaks were obtained within the 20-minute separation time. After applying the tests on the final matrix, approximately 800 useful molecules were obtained. After separating the components using UHPLC, mass spectrometry (MS) identified 33 main peaks in the control samples and 27 main peaks in the patient samples.

Metabolic pathway analysis showed that the glycerophospholipid and sphingolipid metabolisms appear to be the main targets of IBD.

After applying the univariate and multivariate statistical tests, seven molecules were found to be statistically significant in differentiating patients from healthy subjects, with the following conditions: $p < 0.05$ and $AUC > 0.6$. Thus, lysophosphatidylethanolamine (LPE) (24:6), LPE (22:6) and lysophosphatidylcholine (LPC) (18:2) had lower values in patients than in healthy subjects, whereas LPC (22:6), LPC (20:4), triglycerides (TG) and hydroperoxylinoleic acid higher values.

Compounds that had the closest acceptable values to discriminate UC from CD were TG (58:12), LPC (22:6) / Cer (d18:0/18:0) (18:2), heptanoyl carnitine and PE (22:1 (13Z) / 15:0) / PC (18:1 (9Z) / 16:0). However, only (TG (58:12)) was statistically significantly higher in patients with UC ($p < 0.05$).

Conclusions. The results presented in this study are interesting and promising. As we develop larger studies, we will be able to exploit the diagnostic potential of these molecules to their full potential, replacing a difficult and sometimes dangerous endoscopic procedure with a simple pinch of a needle.

Study 2

Lipidomic Characterization of Inflammatory Bowel Diseases

Objective. The objective of the study was to evaluate the diagnostic performance of untargeted lipidomics on serological samples collected from patients with IBD.

Material and methods. Blood samples were collected from consecutive patients with left-sided UC, extensive UC or colonic CD admitted to a tertiary medical center in Cluj-Napoca, Romania. The patients were diagnosed using clinical, serological, radiological, endoscopic and histopathological data. All had active disease, confirmed by ileocolonoscopy with targeted biopsies. Clinical evaluation was done using the UCDAI score for UC and CDAI score for CD. The Mayo endoscopic score and SES-CD score were used to quantify the endoscopic severity for UC and CD, respectively.

After centrifugation, the resulting serum was filtered. Separation of the extracted molecules was performed in an UHPLC system using a two-phase gradient program (A-acetonitrile: H₂O (60:40) + 0.1% formic acid + 10 mM ammonium formate and B-isopropanol: acetonitrile (90:10) + 0.1% formic acid + 10 mM ammonium formate). Molecular fragmentation was performed using QTOF-ESI+ MS.

PCA was first used to evaluate the difference between the experimental groups (through scores and loadings) and to detect the outliers, which were subsequently removed from the analysis. Then PLS-DA were performed. The relevance of each lipid species was quantified using the VIP score, thus identifying the presumed lipid biomarkers. Cross-validation using the LOOCV method was performed on the PLS-DA model to find the most suitable number of PLS components, to minimize the risk of

overlapping and to validate the results. The univariate analysis using the t test was performed to determine the significance of differences between healthy subjects and patients with IBD, as well as between CD and UC.

Results. Twenty-two subjects with IBD were included, 59% of which were men, with an average age of 39 years. All included patients were diagnosed with either colonic CD (n = 5) left-sided UC or extensive UC (n = 17). The control group included 24 subjects.

After separating the components using UHPLC and obtaining the appropriate chromatograms, MS allowed the identification of 34 main peaks in the control samples and 36 main peaks in the patient samples.

Serum metabolic analysis suggested that the most involved pathways in the mechanisms of IBD are those of glycerophospholipids, linoleic acid and sphingolipids.

After applying the univariate and multivariate statistical tests, six molecules proved to be statistically significant in differentiating patients from healthy subjects, respecting the following conditions: $p < 0.005$, False Discovery Rate (FDR) < 0.05 and AUC > 0.8 . Thus, tetracosanoic acid, phosphatidylcholine (PC), LPC, sphingomyelin (SM) and diacylglycerol had significantly lower values in patients than in healthy subjects, while cholesterol esters (18: 3) significantly higher.

Considering a VIP score > 1.5 , $p < 0.005$ and an AUC > 0.8 , the statistical analysis of patients with CD and UC identified seven significantly different molecules between the two groups. Thus, the levels of linoleamide, palmitoileamide, palmitoleamide, branched fatty esters of hydroxyl fatty acids, as well as three isomers of hexadecanoic acid (sterile palmitoleate, palmitoleil stearate, oleyl palmitate) were higher in patients with CD than in those with UC.

Conclusions. This preliminary study confirmed that serum lipidomic profiling has the potential to be used as a diagnostic tool for non-invasive identification of patients with IBD, as well as to differentiate between the two subclasses of IBD. These results also contribute to improving our understanding of the pathophysiological mechanisms of CD and UC.

Study 3

Serological Characterization of Ulcerative Colitis by Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)

Objective. The objective of the study was the evaluation by multivariate analysis of the diagnostic performance of SERS on serological samples collected from patients with UC.

Material and methods. Blood samples were collected from consecutive patients with active left-sided or extensive UC, admitted to a tertiary reference hospital in Cluj-Napoca, Romania. The diagnosis of UC was established using clinical, serological, endoscopic and histological data. Clinical severity was assessed using the UCDAI index, while endoscopic severity was assessed using the Mayo score.

After the synthesis of silver nanoparticles, specific microscopic measurements and preparation of solid SERS substrates, Raman measurements were performed using a confocal microscope. The spectra were obtained with a 785 nm laser, with a power of 65 mW per sample and a 100x objective. For the SERS measurements, spectral maps were made using the 50x objective and a laser power of 0.22 mW. The acquisition time was 10 seconds in the extended mode of the device. The spectrograph was equipped

with a CCD-type camera with a gradation of 1200 lines / mm. The dedicated software platform Wire 4.2 was used for the command, control and acquisition of spectra. The same software was used for data pre-processing by eliminating the peaks resulted from environmental radiation and fluorescence. For each sample, 48 measurements were performed which were subsequently mediated and processed using Wire 4.2 and Origin 2019.

The separation of the two groups based on the SERS spectra was obtained by applying PCA-LDA. A validation of the PCA-LDA model, using LOOCV, produced a confusion table from which sensitivity, specificity and accuracy were calculated.

Results. Thirty-two subjects with UC were included, 62.5% of them being men, with an average age of 37.7 years. All included patients were diagnosed with either left-sided ($n = 18$) or extensive colitis ($n = 14$). The control group consisted of 35 subjects.

Raman analysis showed that although the spectra overlapped at several points, there were significant differences between them. As such, there were peak increases at 725 cm^{-1} (hypoxanthine), $890\text{--}910\text{ cm}^{-1}$ (glutathione and glucose) and 1100 cm^{-1} (hypoxanthine) in patients. In addition, there were decreases in peaks at 485 cm^{-1} (glycogen), 690 cm^{-1} (tyrosine), 1250 cm^{-1} , 1584 cm^{-1} and 1665 cm^{-1} (protein) in the samples from the UC group, as opposed to those in the control group.

After applying the PCA-LDA model, the samples from patients with UC could be differentiated from those of healthy subjects with a sensitivity of 81.3%, a specificity of 80.0%, an overall precision of 80.6% and an accuracy of 78.8%. The predictive value of the technique was evaluated using the ROC analysis, calculating the areas under the curve (AUC). In our study, the calculated AUC value was 0.9.

Conclusions. Our data suggest that SERS in combination with multivariate analysis is a promising approach in discriminating healthy subjects from those with UC with high sensitivity and specificity rates. It should be noted that SERS has the advantage of being minimally invasive, easy to use, fast and portable, all of which are features that should recommend its subsequent implementation in the diagnosis of UC.

General conclusions

The present paper represents a formalization of the theoretical and practical contributions in the field of IBD diagnosis. Through it, we summarized the work done in the last four years, during the period of PhD scientific training.

In this paper we have addressed several biochemical and physical techniques in order to improve the diagnosis and monitoring of IBD. As such, we have proposed both newly discovered but insufficiently explored diagnostic methods as well as new ones. Summarizing the paper, the general conclusions are as follows:

1. The untargeted serum metabolomic essay has an unignorable diagnostic potential, in light of the the high demonstrated accuracy. The results presented in this paper are interesting and promising. As we develop larger studies, we will be able to exploit the diagnostic potential of these molecules to their full potential, replacing a difficult and sometimes dangerous endoscopic procedure.

2. Determination of serum lipidomic profiles has the potential of becoming a diagnostic tool for the non-invasive identification of patients with IBD, as well as for differentiating between the two subclasses of IBD. The results presented in this paper also contribute to improving our understanding of the pathophysiological mechanisms of CD and UC.

3. SERS in combination with multivariate analysis is a promising approach in discriminating healthy subjects from those with UC with high sensitivity and specificity rates. It should be noted that SERS has the advantage of being minimally invasive, easy to use, fast and portable, all of which are features that should recommend its subsequent implementation in the diagnosis of UC.

Originality and innovative contributions of the thesis

From a scientific point of view, the original contributions from the research are as follows:

- We reported the first study in which the diagnostic performance of SERS was evaluated in patients with UC. The study demonstrated high rates of sensitivity, specificity and accuracy, recommending further studies to validate the technique. At the same time, to be able to carry out SERS, significant qualitative improvements were made to the substrates used for determinations, improvements that make the technique more precise.

- The other two studies identified a series of serological metabolites with high discriminant performances, both between healthy subjects and those with IBD, as well as between those with colonic CD and UC. These were the first two metabolomics / lipidomics studies in Romania in which molecules involved in IBD were studied.

- In the lipidomics study, we also showed for the first time the usefulness of fatty acids in differentiating the two subtypes of IBD.