
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Mijloace non-invazive de diagnostic și evaluare cardiovasculară, cu rol prognostic în populația neoplazică

Doctorand **Lucreția Avram**

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



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. TENDINȚE ȘI PREDICȚII ÎN PATOLOGIA ONCOLOGICĂ LA POPULAȚIA TÂNĂRĂ

- 1.1. CONSIDERAȚII GENERALE
- 1.2. CANCERUL - PROBLEMĂ DE PREDICȚIE
- 1.3. NEOPLAZIILE ÎN POPULAȚIA TÂNĂRĂ

2. INSTRUMENTE DE DIAGNOSTIC PENTRU DETECTAREA TOXICITĂȚII MIOCARDICE

- 2.1. ROLUL BIOMARKERILOR ÎN CARDIO-ONCOLOGIE
- 2.2. ROLUL ECOGRAFIEI CARDIACE ÎN CARDIO-ONCOLOGIE
- 2.3. AFECTAREA VASCULARĂ

3. NOI MIJLOACE DE EXPLORARE NONINVAZIVĂ SEROLOGICĂ A NEOPLASMELOR DIN SFERA UROLOGICĂ ȘI DIGESTIVĂ

- 3.1. ÎMPRĂȘTIEREA RAMAN AMPLIFICATĂ DE SUPRAFAȚĂ
- 3.2. METABOLOMICA

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. IPOTEZA DE LUCRU/OBIECTIVE

2. STUDIU 1. DETECȚIA CANCERULUI GASTROINTESTINAL PRIN BIOPSIE LICHIDĂ BAZATĂ PE TEHNICA SERS

- 2.1. INTRODUCERE
- 2.2. OBIECTIVE
- 2.3. PACIENȚI ȘI METODĂ
- 2.4. REZULTATE
- 2.5. DISCUȚII
- 2.6. CONCLUZII

3. STUDIUL 2. EVALUAREA RISCULUI CARDIOVASCULAR BAZAL, ANTERIOR TRATAMENTULUI ONCOLOGIC, LA PACIENȚII CU CANCER DE COLON

- 3.1. INTRODUCERE
- 3.2. OBIECTIVE
- 3.3. PACIENȚI ȘI METODE
- 3.4. REZULTATE
- 3.5. DISCUȚII
- 3.6. CONCLUZII

4. STUDIUL 3. EVALUAREA AFECTĂRII VASCULARE LA PACIENȚII CU PATOLOGIE ONCOLOGICĂ UROLOGICĂ ȘI DIGESTIVĂ, NAIVI PENTRU ORICE TIP DE TRATAMENT NEOPLAZIC

- 4.1. INTRODUCERE
- 4.2. IPOTEZA DE LUCRU
- 4.3. PACIENȚI ȘI METODĂ
- 4.4. REZULTATE
- 4.5. DISCUȚII
- 4.6. CONCLUZII

5. CONCLUZII GENERALE

6. ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

REFERINȚE

Cuvinte cheie: populația neoplazică, mijloace non-invasive, evaluare cardiovasculară, toxicitate cardiovasculară, Spectroscopia Ultrasenzitivă Raman

Introducere. Obiective generale

Cancerul reprezintă o problemă majoră de sănătate la nivel mondial. În fiecare an, zeci de milioane de oameni din întreaga lume sunt diagnosticați cu cancer, mai mult de jumătate având evoluție nefavorabilă. O caracteristică definitorie a cancerului este dezvoltarea rapidă a celulelor anormale care se multiplică dincolo de granițele lor obișnuite, invadează organe adiacente sau se răspândesc sistemic. Conform estimărilor GLOBOCAN 2020 furnizate de Agenția Internațională de Cercetare a Cancerului, privind incidența și mortalitatea neoplasmului, în întreaga lume sunt estimate 19,3 milioane de cazuri noi de cancer și aproape 10 milioane de decese anual. Cancerul pulmonar a rămas principala cauză de deces prin neoplasm, cu aproximativ 1,8 milioane de decese (18%), urmat de cancerul colorectal (9,4%), ficat (8,3%), stomac (7,7%) și cancerul de sân (6,9%), dar prevalența globală a cancerului se presupune că va crește la 28,4 milioane de cazuri în 2040, cu 47% mai mare față de 2020, mai accentuată în țările aflate în curs de dezvoltare.

În ultima decadă, a crescut numărul neoplaziilor la tineri și de asemenea, s-a observat o tendință de creștere în rândul cancerelor urologice și digestive. Identificarea timpurie a proceselor neoplazice reprezintă o importantă strategie de creștere a supraviețuirii, însă realizarea acestui deziderat necesită dezvoltarea unor metode eficiente de screening. Performanțele sub-optimale ale markerilor tumorali folosiți în prezent (e.g., antigen carcinoembrionar (ACE), alfa fetoproteina

(AFP), antigen prostatic specific (PSA), se traduc în costuri suplimentare și în efectuarea suplimentară a unor manevre invazive (ex. biopsia prostatică).

Tratamentul chirurgical al patologiei oncologice urologice și digestive asociază morbiditate crescută a procedurii și poate avea un impact negativ asupra calității vieții pacienților în cazul efectuării de colostome și urostome. Dezvoltarea unei chirurgii funcționale și trecerea de la un tratament maxim tolerat de către pacient la un tratament minim efektiv, devin obligatorii.

La nivelul actual al dezvoltării medicinei, accentul se pune pe detecția timpurie și rapidă a cancerului întrucât diagnosticul cancerului incipient crește speranța de viață printre pacienții diagnosticați cu diverse neoplazii. În acest context, este o nevoie urgentă de metode noi de detecție a cancerului care pot îmbunătăți acuratețea detecției, pot scădea timpul până la diagnostic, pot diminua costurile aferente și nu în ultimul rând, care pot scădea stresul psihologic la care un pacient este supus în timpul unei intervenții invazive.

Proiectul de cercetare abordat în cadrul acestei lucrări de doctorat, și-a propus într-un prim plan să vină în întâmpinarea necesității unor metode noi de diagnostic oncologic, neinvazive, necostisitoare în cancerele digestive și urologice.

În acest context, o metodă emergentă în ultimii ani descoperită și testată în diferite tipuri de patologie tumorală este Spectroscopia Ultrasenzitivă Raman, cunoscută în literatură ca Spectroscopia Raman Amplificată de Suprafață (Surface-Enhanced Raman Scattering - SERS), care se referă la amplificarea semnalului Raman folosind substraturi metalice nanometrice (ex. nanoparticule metalice). Spectroscopia Raman, aplicată pe diferite produse biologice (ser, plasmă, salivă, urină), cunoscută de altfel sub numele de biopsie lichidă, s-a dovedit a fi o alternativă promițătoare în ceea ce privește biopsia minim-invazivă, atât din punct de vedere al costului cât și al complexității metodei de diagnostic și al timpul necesar pentru detecția cancerului.

Un al doilea obiectiv al cercetării doctorale de față a fost evaluarea pacienților din punct de vedere al toxicității cardiovasculare determinate de neoplazia în sine, spre deosebire de alte studii care au relevat efectul cardiotoxic al diferitelor tipuri de tratament oncologic. Ne-am propus evaluarea afectării infraclinice prezentă anterior inițierii tratamentului neoplazic, identificată prin markeri serologici și evaluare ecocardiografică, considerând că aceste observații au impact asupra alegerii metodei terapeutice optime, dar aduc și valoare prognostică importantă.

Considerăm că atât cercetarea unor metode de diagnostic neinvazive cât și descrierea afectării cardiovasculare în patologia oncologică, reprezintă un pas înainte spre medicină personalizată, cu deschiderea de noi perspective de diagnostic și tratament molecular în cancerele digestive și urologice.

Contribuția personală

Lucrarea de față a avut ca scop identificarea unor metode diagnostice utile în abordarea cancerelor urologice și digestive și identificarea afectării cardiovasculare la același tip de tumori cu rol în evaluarea prognosticului și în adaptarea atitudinii terapeutice fiecărui pacient.

Obiectivele specifice au fost următoarele:

- evaluarea valorii diagnostice a spectroscopiei Raman (SERS) pentru evaluarea noninvazivă a cancerelor digestive și evaluarea posibilității ca aceasta să crească rata de detecție a cancerelor în stadii incipiente;
- identificarea unor instrumente de diagnostic în vederea detectării toxicității miocardice la pacienții neoplazici, înainte de inițierea tratamentului antineoplazic
- evaluarea biomarkerilor serologici și ecocardiografici sugestivi pentru toxicitatea cardiovasculară cu impact asupra indicațiilor terapeutice oncologice și cardiovasculare;
- evidențierea afectării vasculare la pacienții cu neoplazie urologică și digestivă anterior inițierii tratamentului oncologic.

Studiul 1. Detecția cancerului gastrointestinal prin biopsie lichidă bazată pe tehnica SERS

Introducere. Deși majoritatea instrumentelor de biopsie lichidă se bazează pe profilarea genomică, transcriptomică, proteomică sau metabolomică, s-a demonstrat că analiza biofluidelor Raman (SERS) cu suprafață îmbunătățită fără etichetă este o metodă promițătoare de identificare a pacienților cu cancer. Biopsia lichidă se referă la detectarea modificărilor moleculare și citologice asociate cu apariția și progresia cancerului în biofluide precum sânge, urină sau salivă, ocolind astfel necesitatea unei probe de țesut din tumoră. Spectroscopia Raman s-a dovedit a fi un instrument de diagnosticare a cancerului nedistructiv și extrem de precis, aplicat și pentru detectarea cancerelor gastrointestinale și urologice. Scopul acestui studiu a fost validarea profilului SERS ca strategie de diagnostic al cancerului în mediul spitalicesc relevant, utilizând un spectrometru portabil Raman, care a fost instalat într-un mediu de spital din viața reală.

Pacienți și metodă. Studiul a inclus o serie de 53 de pacienți cu cancer gastrointestinal (GCRC) dovedit prin biopsie, diagnosticați în Spitalul Clinic Municipal din Cluj-Napoca, România între 2017 și 2019. În plus, au fost incluși 25 de subiecți sănătoși (Ctrl), pentru comparație și analiza discriminării. Pacienții au fost incluși în studiu în momentul diagnosticului, înainte de începerea regimului de tratament. Analiza SERS s-a realizat în colaborare cu departamentul de Fizica Moleculară al Facultății de Fizică, UBB Cluj.

Rezultate. Acuratețea profilului SERS al serului în ceea ce privește discriminarea dintre pacienții GCRC și Ctrl a fost determinată prin construirea unui model analitic PCA – QDA pe baza spectrelor SERS procesate post achiziție ale serului sanguin. Clasificarea PCA – QDA oferă o sensibilitate de 66.03% în discriminarea GCRC/Ctrl pe profilului spectral SERS al serului sangvin, o specificitate de 100% și o acuratețe totală de 76.92%. Markerii inflamatori oferă informații despre dereglări ale funcțiilor normale ale organismului. De aceea, am testat acuratețile de discriminare între grupul GCRC și grupul Ctrl pe baza fiecărui parametru medical în parte din analiză univariată. Au fost construite curbele ROC pentru acești markeri inflamatori (CRP, număr neutrofile, concentrația de trombocite, nivelul hemoglobinei) și determinate suprafețele de sub curbă (AUC) care dau informații despre acuratețea discriminării grupurilor. A fost testat și un model multivariat bazat pe cei 4 markeri inflamatori; rezultatul arată o sensibilitate de 62.26% calculată pe baza modelului construit pe cei patru parametrii sangvini (CRP, număr neutrofile și trombocite, nivel hemoglobină), o specificitate de 96% și o acuratețe totală de 73.08%. Pentru a îmbunătăți discriminarea între grupul GCRC și grupul Ctrl am combinat informația spectrală cu valorile markerilor inflamatori. Astfel, am construit un model statistic PCA – QDA de discriminare între grupul GCRC și grupul Ctrl. Prin combinarea celor două tipuri de date, profilul spectral, respectiv analizele medicale ale sângelui pacienților s-a obținut o sensibilitate a modelului PCA-QDA de 75.47% și o specificitate de 100%. Acuratețea totală a diagnosticului a fost ridicată la 83.33%.

Concluzii. Studiul actual demonstrează aplicabilitatea spectroscopiei SERS în diagnosticul cancerului gastrointestinal folosind un instrument portabil într-un mediu clinic. Tehnica de diagnostic prezentată, reprezintă o biopsie lichidă, minim invazivă cu avantaje în ceea ce privește costul și timpul unei analize, comparativ cu biopsiile solide recoltate și analizate în cazul tumorilor gastrointestinale. Mai mult, această tehnică oferă un confort crescut pacienților, analiza realizându-se pe o simplă probă de sânge a pacientului.

Studiul 2. Evaluarea riscului cardiovascular bazal, anterior tratamentului oncologic, la pacienții cu cancer de colon

Introducere. Cordul poate fi afectat în cadrul tratamentelor oncologice, însă există dovezi care sugerează că neoplazia în sine poate fi responsabilă de un grad subclinic de injurie cardiacă, în anumite grupuri de pacienți. Recent, numeroase societăți medicale implicate în cardio-oncologie propun efectuarea unei evaluări cardiovasculare bazale, care include TnT și NT-proBNP și alte instrumente ușor de utilizat pentru medicii oncologi, pentru stratificarea riscului cardiovascular al pacienților neoplazici, anterior inițierii tratamentului. Studiul nostru și-a propus investigarea ipotezei conform căreia pacienții recent diagnosticați cu cancer de colon, anterior oricărei terapii oncologice, prezintă deja o afectare miocardică subclinică. În plus, am încercat să stabilim valori-prag pentru biomarkerii cardiovasculari, specifice acestei afectări de grad redus.

Pacienți și metode. Studiu prospectiv transversal efectuat în perioada 2016-2019, în care au fost incluși pacienți recent diagnosticați cu tumori de colon, anterior inițierii tratamentului oncologic. A fost înregistrat istoricul detaliat al acestora și au fost excluși toți pacienții cu antecedente cardiovasculare sau modificări ECG. Pentru definirea valorilor normale ale variabilelor, un grup de voluntari sănătoși din rândul personalului medical au fost de asemenea analizați, constituind grupul control.

Rezultate. Comparând grupul oncologic cu grupul control în ceea ce privește analiza biologică, injuria miocardică minimă a fost semnificativ mai frecvent întâlnită în grupul de studiu, cu valori sistematic mai crescute decât la subiecții sănătoși. Având în vedere faptul că biomarkerii cardiaci sunt asociați cu injuria miocardică minimă, am verificat de asemenea și acuratețea diagnostică a troponinei, CK-MB și NT-proBNP pentru detecția acestora în grupul oncologic. S-a evidențiat o arie de sub curbă (AUROC) pentru troponină de 0.791 și CK-MB de 0.804. Pentru NT-proBNP s-a decelat cea mai mică valoare AUROC, 0.721. Unul dintre obiectivele principale ale studiului a fost găsirea unor valori-prag specifice microinjuriei cardiace la pacienții oncologici. În acest sens, pacienții au fost împărțiți în două grupuri de vârstă, sub și peste 65 de ani. Nivelurile troponinei au variat semnificativ între aceste două grupuri: 5.36 (5.07-17.89) vs. 16.79 (11.14-22.07), $p < 0.001$; același lucru a fost valabil și pentru NT-proBNP: 75.69 (92.27-313.44) vs. 252.70 (249.23.29-1162.39), $p < 0.001$. Suplimentar, am calculat valoarea-prag a biomarkerilor pentru evidențierea injuriei cardiace la pacienții peste 65 de ani. Am obținut valori-prag de 8 ng/L pentru troponina, cu o AUROC de 0.865 și 220 pg/ml pentru NT-proBNP, cu o AUROC de 0.833.

Concluzii. S-a dovedit prezența unui grad semnificativ de afectare cardiovasculară la pacienții diagnosticați cu cancer de colon, anterior tratamentului oncologic, indiferent de vârstă sau comorbidități. Acest fapt a fost demonstrat prin prezența cavităților

drepte mărite la evaluarea ecocardiografică și de nivelurile crescute ale biomarkerilor cardiovasculari în lotul oncologic, comparativ cu lotul control.

Studiul 3. Evaluarea afectării vasculare la pacienții cu patologii oncologice urologice și digestive, naivi pentru orice tip de tratament neoplazic

Introducere. Rigiditatea arterială, expresia alterărilor proprietăților elastice ale arterelor, contribuie la afectarea cardiovasculară generală pe termen mediu și lung și este, în același timp, un factor predictor pentru mortalitatea prin evenimente cardiovasculare. Este unul dintre primele semne detectabile ale modificărilor structurale și funcționale în peretele vasului, secundare patologiei oncologice. Factorii de risc cardiovasculari care cauzează bolile cardiovasculare, au fost investigați din punct de vedere epidemiologic de la mijlocul secolului XX. Aceste studii au încercat, de asemenea, să determine puterea asocierii fiecărui factor cu o anumită boală. Pornind de la aceste studii, s-au dezvoltat modele care permit identificarea subiecților cu o probabilitate mai mare de a dezvolta în viitorul apropiat sau îndepărtat o afecțiune cardiovasculară. Cel mai utilizat model predictiv în vederea evaluării riscului cardiovascular este cunoscut sub numele de scorul Framingham. Vârsta vasculară este un concept nou, derivat tot din tabelele de risc Framingham, care poate fi calculată și cu alte scale de risc, cum ar fi scorul SCORE. Calculul vârstei vasculare cu formula SCORE a fost inclus în Ghidul European de prevenție cardiovasculară din 2012, ca instrument ce permite pacienților (în special celor tineri) să înțeleagă mai bine riscul cardiovascular, chiar dacă riscul lor absolut nu este mare. Scopul acestui studiu a fost validarea afectării vasculare la pacienții cu tumori urologice și digestive, afectare determinată de neoplazia în sine, în absența asocierii unor boli cardiovasculare, în vederea implementării unei strategii optime ulterioare de urmărire și tratament.

Pacienți și metodă. Studiul de față și-a propus o raportare precoce a datelor dintr-un studiu menit să caracterizeze funcția și afectarea vasculară, indiferent de riscul cardiovascular, într-un grup cu neoplasme digestive și non-digestive (urologice) recent diagnosticate, înainte de inițierea terapiei oncologice, la pacienți fără boli cardiovasculare cunoscute.

Rezultate. Analizând modificările vasculare în contextul afecțiunilor maligne urologice și gastroenterologice, am observat faptul că GIM carotidiană stângă în lotul de studiu a fost de 7 (6,48-7,14) mm vs 5 (4,34- 5,97)mm, în lotul martor, $p < 0.001$. Pe partea dreaptă, GIM a înregistrat valori asemănătoare. În ce privește rigiditatea arterială periferică determinată fotopletismografic, s-a observat că în lotul de studiu, valorile vârstei vasculare au fost semnificativ mai mari comparativ cu lotul martor 65 (58,77-68,72) vs 45 (38,96-52,48), $p < 0.001$. Vârsta arterială exprimată prin scorul Framingham a fost semnificativ mai mare la pacienții oncologici; în final, vârsta

vasculară calculată prin scorul SCORE, a fost de asemenea mai mare cu obținerea unui $p < 0,001$. În plus, vârsta vasculară a pacienților calculată prin scorurile menționate mai sus sau prin fotopletișmografie, s-a corelat semnificativ cu vârsta biologică a pacienților. Înțelegând că în accentuarea rigidității vasculare în cadrul patologiei oncologice un rol important îl are inflamația, am analizat valoarea unor markeri inflamatori de tip CRP, albumina, componente hematologice și, respectiv, scoruri inflamatoare formate prin combinații ale acestor markeri la pacienții cu neoplazii urologice și digestive. Astfel, pe lotul întreg de studiu, s-au observat valori semnificativ mai mari ale NLR, trombocitelor, neutrofilelor, albuminei, CRP și raportului lor. În lumina datelor obținute, având în vedere importanța inflamației asupra patogenezei rigidității arteriale, s-a analizat corelația între sindromul inflamator, reprezentat de PCR și valoarea vitezei undei de puls (PWV). Bilateral, s-au obținut rezultate semnificative statistic în favoarea asocierii inflamației, cu obținerea unui $p = 0.025$.

Concluzii. Studiul efectuat susține utilizarea existenței unor metode de determinare a rigidității arteriale la pacienții cu patologie oncologică, evaluată fie prin scoruri care exprimă vârsta vasculară, fie prin metoda fotopletișmografică, fie prin metoda ecografică (calculul vitezei undei de puls).

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Gradul de originalitate și inovație promovat în această teză constă în utilizarea unui spectrometru portabil Raman (un instrument mic și ușor de transportat) care a fost introdus în clinică și utilizat în practica clinică obișnuită, confirmând utilitatea, fiabilitatea și facilitatea metodei. Considerăm că prin această metodă sunt satisfăcute cerințele de diagnostic neinvaziv din zilele noastre în ceea ce privește rapiditatea, ușurința în utilizare și flexibilitatea unei metode. Asociat spectroscopiei, se pot utiliza markeri inflamatori de rutină care măresc valoarea diagnostică a metodei.

În ce privește consecințele pe plan cardiovascular secundare unei patologii oncologice, studiile incluse în această teză au confirmat impactul negativ al cancerelor digestive și urologice asupra cordului și vaselor. Elementul de noutate adus de cercetarea de față constă în demonstrarea afectării cardiovasculare la pacienții oncologici, înainte de inițierea oricărui tip de tratament antineoplazic. Într-o manieră similară, s-a demonstrat creșterea rigidității arteriale la pacienții oncologici cu patologie urologică și digestivă, evaluate prin grosimea intimă-medie, viteza unei de puls și prin calcularea vârstei arteriale prin diferite scoruri create inițial pentru evaluarea riscului cardiovascular la pacienții non-neoplazici. Utilizarea acestor metode neinvazive la pacienții neoplazici naivi pentru orice tip de tratament oncologic este, de asemenea un element de originalitate, marea majoritate a studiilor existente în literatură confirmă modificările vasculare apărute la pacienți post-chimioterapie.

PHD THESIS ABSTRACT

Non-invasive techniques of diagnosis
and cardiovascular evaluation, with a
prognostic role in the neoplastic
population

PhD Student **Lucreția Avram**

PhD Scientific Coordinator **Prof. dr. Ioan Coman**

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

1. TRENDS AND PREDICTIONS IN ONCOLOGICAL PATHOLOGY IN THE YOUNG POPULATION

- 1.1. GENERAL CONSIDERATIONS
- 1.2. CANCER - PREDICTION PROBLEM
- 1.3. NEOPLASMS IN THE YOUNG POPULATION

2. DIAGNOSTIC TOOLS FOR MYOCARDIAL TOXICITY DETECTION

- 2.1. THE ROLE OF BIOMARKERS IN CARDIO-ONCOLOGY
- 2.2. THE ROLE OF CARDIAC ULTRASOUND IN CARDIO-ONCOLOGY
- 2.3. VASCULAR DAMAGE

3. NEW MEANS OF NON-INVASIVE SEROLOGICAL EXPLORATION OF UROLOGICAL AND DIGESTIVE NEOPLASMS

- 3.1. SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING
- 3.2. METABOLOMICS

PERSONAL CONTRIBUTION

1. WORK HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

2. STUDY 1. DETECTION OF GASTROINTESTINAL CANCER BY LIQUID BIOPSY BASED ON SERS TECHNIQUE

- 2.1. INTRODUCTION
- 2.2. OBJECTIVES
- 2.3. PATIENTS AND METHOD
- 2.4. RESULTS
- 2.5. DISCUSSION
- 2.6. CONCLUSIONS

3. STUDY 2. BASIC CARDIOVASCULAR RISK ASSESSMENT, BEFORE ONCOLOGICAL TREATMENT, IN PATIENTS WITH COLON CANCER

- 3.1. INTRODUCTION
- 3.2. OBJECTIVES
- 3.3. PATIENTS AND METHOD
- 3.4. RESULTS
- 3.5. DISCUSSION
- 3.6. CONCLUSIONS

4. STUDY 3. EVALUATION OF VASCULAR DISEASE IN PATIENTS WITH UROLOGICAL AND DIGESTIVE ONCOLOGICAL PATHOLOGY, NAIVE FOR ANY KIND OF NEOPLASIC TREATMENT

- 4.1. INTRODUCTION
- 4.2. OBJECTIVES
- 4.3. PATIENTS AND METHOD
- 4.4. RESULTS
- 4.5. DISCUSSION
- 4.6. CONCLUSIONS

5. FINAL CONCLUSIONS

6. ORIGINALITY OF RESEARCH AND INNOVATIVE CONTRIBUTION

REFERENCES

Keywords: neoplastic population, non-invasive techniques, cardiovascular evaluation, cardiovascular toxicity, Raman Ultrasensitive Spectroscopy

Introduction. General objectives

Cancer is a major global health problem. Every year, tens of millions of people around the world are diagnosed with cancer, more than half of which are unfavorable. A defining feature of cancer is the rapid development of abnormal cells that multiply beyond their usual boundaries, invade adjacent organs, or spread systemically. According to GLOBOCAN 2020 estimates provided by the International Agency for Research on Cancer, on the incidence and mortality of neoplasms, there are an estimated 19.3 million new cases of cancer worldwide and almost 10 million deaths annually. Lung cancer remained the leading cause of neoplastic death, with approximately 1.8 million deaths (18%), followed by colorectal cancer (9.4%), liver (8.3%), stomach (7.7%) and breast cancer (6.9%), but the overall prevalence of cancer is expected to increase to 28.4 million cases in 2040, 47% higher than in 2020, more pronounced in developing countries.

In the last decade, the number of neoplasms in young people has increased and there has also been an increasing trend among urological and digestive cancers. Early identification of neoplastic processes is an important strategy to increase survival, but achieving this goal requires the development of effective screening methods. The sub-optimal performance of tumor markers currently used (eg, carcinoembryonic antigen (ACE), alpha fetoprotein (AFP), prostate-specific antigen (PSA) translates into additional costs and additional invasive maneuvers (eg prostate biopsy).).

Surgical treatment of urological and digestive oncological pathology associates increased morbidity of the procedure and can have a negative impact on the quality of life of patients in the case of performing colostomes and urostomes. The development

of a functional surgery and the transition from a maximum treatment tolerated by the patient to a minimum effective treatment, become mandatory.

At the current level of medicine development, the emphasis is on early and rapid detection of cancer as the diagnosis of early cancer increases life expectancy among patients diagnosed with various neoplasms. In this context, there is an urgent need for new methods of cancer detection that can improve the accuracy of detection, can reduce the time to diagnosis, can reduce the costs and last but not least, which can reduce the psychological stress that a patient is subjected to. during an invasive intervention.

The research project approached in this doctoral thesis, aimed in the first place to meet the need for new methods of oncological diagnosis, non-invasive, inexpensive in digestive and urological cancers.

In this context, an emerging method in recent years discovered and tested in various types of tumor pathology is Raman Ultrasensitive Spectroscopy, known in the literature as Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), which refers to the amplification of the Raman signal using nanometric metal substrates (eg metal nanoparticles). Raman spectroscopy, applied to various biological products (serum, plasma, saliva, urine), also known as liquid biopsy, has proven to be a promising alternative in terms of minimally invasive biopsy, both in terms of cost as well as the complexity of the diagnostic method and the time required for cancer detection.

A second objective of this doctoral research was to evaluate patients in terms of cardiovascular toxicity caused by the neoplasia itself, unlike other studies that revealed the cardiotoxic effect of different types of cancer treatment. We aimed to evaluate the subclinical impairment present prior to the initiation of neoplastic treatment, identified by serological markers and echocardiographic evaluation, considering that these observations have an impact on the choice of the optimal therapeutic method, but also bring important prognostic value.

We consider that both the research of non-invasive diagnostic methods and the description of cardiovascular damage in oncological pathology, represent a step towards personalized medicine, with the opening of new perspectives of diagnosis and molecular treatment in digestive and urological cancers.

Personal contribution

The present paper aimed to identify useful diagnostic methods in addressing urological and digestive cancers and to identify cardiovascular damage in the same type of tumors with a role in evaluating the prognosis and in adapting the therapeutic attitude to each patient.

The specific objectives were the following:

- evaluation of the diagnostic value of Raman spectroscopy (SERS) for the noninvasive evaluation of digestive cancers and the evaluation of the possibility that it may increase the detection rate of cancers in the early stages;
- identification of diagnostic tools to detect myocardial toxicity in neoplastic patients before initiating antineoplastic therapy
- evaluation of serological and echocardiographic biomarkers suggestive of cardiovascular toxicity with an impact on oncological and cardiovascular therapeutic indications;
- evidence of vascular damage in patients with urological and digestive neoplasia prior to initiating oncological treatment.

Study 1. Detection of gastrointestinal cancer by liquid biopsy based on the SERS technique

Introduction. Although most liquid biopsy instruments are based on genomic, transcriptomic, proteomic, or metabolomic profiling, the analysis of Raman biofluids (SERS) with improved labelless surface has been shown to be a promising method of identifying cancer patients. Liquid biopsy refers to the detection of molecular and cytological changes associated with the appearance and progression of cancer in biofluids such as blood, urine or saliva, thus bypassing the need for a sample of tumor tissue. Raman spectroscopy has proven to be a non-destructive and highly accurate cancer diagnostic tool, also applied to detect gastrointestinal and urological cancers. The aim of this study was to validate the SERS profile as a cancer diagnosis strategy in the relevant hospital setting, using a portable Raman spectrometer, which was installed in a real-life hospital setting.

Patients and method. The study included a series of 53 patients with gastrointestinal cancer (GCRC) proven by biopsy, diagnosed in the Municipal Clinical Hospital in Cluj-Napoca, Romania between 2017 and 2019. In addition, 25 healthy subjects (Ctrl) were included, for comparison and analysis of discrimination. Patients were included in the study at the time of diagnosis, before the start of treatment. The SERS analysis was performed in collaboration with the Molecular Physics department of the Faculty of Physics, UBB Cluj.

Results. The accuracy of the serum SERS profile in terms of discrimination between GCRC and Ctrl patients was determined by constructing a PCA-QDA analytical model based on post-acquisition blood serum SERS spectra. The PCA-QDA classification provides a sensitivity of 66.03% in GCRC / Ctrl discrimination on the SERS spectral profile of blood serum, a specificity of 100% and a total accuracy of 76.92%. Inflammatory markers provide information about disorders of normal body functions. Therefore, we tested the discrimination accuracies between the GCRC group and the Ctrl group based on each medical parameter in part from the univariate analysis. ROC curves were constructed for these inflammatory markers (CRP, neutrophil count, platelet concentration, hemoglobin level) and determined areas under the curve (AUC) that provide information on the accuracy of group discrimination. A multivariate model based on the 4 inflammatory markers was also tested; the result shows a sensitivity of 62.26% calculated based on the model built on the four blood parameters (CRP, neutrophil and platelet count, hemoglobin level), a specificity of 96% and a total accuracy of 73.08%. To improve the discrimination between the GCRC group and the Ctrl group we combined the spectral information with the values of the inflammatory markers. Thus, we constructed a PCA - QDA statistical model of discrimination between the GCRC group and the Ctrl group. By combining the two types of data, the spectral profile, respectively the medical analyzes of the patients' blood, a sensitivity of the PCA-QDA model of 75.47% and a specificity of 100% was obtained. The total accuracy of the diagnosis was raised to 83.33%.

Conclusions. The current study demonstrates the applicability of SERS spectroscopy in the diagnosis of gastrointestinal cancer using a portable instrument in a clinical setting. The diagnostic technique presented is a liquid biopsy, minimally invasive with advantages in terms of cost and time of an analysis, compared to solid biopsies collected and analyzed for gastrointestinal tumors. Moreover, this technique offers increased comfort to patients, the analysis being performed on a simple blood sample of the patient.

Study 2. Basal cardiovascular risk assessment, prior to oncological treatment, in patients with colon cancer

Introduction. The heart may be affected in oncology treatments, but there is evidence to suggest that the neoplasm itself may be responsible for a subclinical degree of cardiac injury in certain groups of patients. Recently, many medical companies involved in cardio-oncology propose performing a baseline cardiovascular assessment, which includes TnT and NT-proBNP and other easy-to-use tools for oncologists, to stratify the cardiovascular risk of neoplastic patients prior to initiating treatment. Our study aimed to investigate the hypothesis that patients recently diagnosed with colon cancer, prior to any oncological therapy, already have subclinical myocardial damage. In addition, we tried to establish threshold values for cardiovascular biomarkers, specific to this low-grade impairment.

Patients and methods. Prospective cross-sectional study conducted during 2016-2019, which included patients recently diagnosed with colon tumors, prior to initiating cancer treatment. Their detailed history was recorded and all patients with a history of cardiovascular disease or ECG changes were excluded. To define the normal values of the variables, a group of healthy volunteers from the medical staff were also analyzed, constituting the control group.

Results. Comparing the oncological group with the control group in terms of biological analysis, minimal myocardial injury was significantly more common in the study group, with systematically higher values than in healthy subjects. Given that cardiac biomarkers are associated with minimal myocardial injury, we also checked the diagnostic accuracy of troponin, CK-MB and NT-proBNP for its detection in the oncology group. An area under the curve (AUROC) for troponin of 0.791 and CK-MB of 0.804 was highlighted. For NT-proBNP, the lowest AUROC value was detected, 0.721. One of the main objectives of the study was to find threshold values specific to cardiac microinjury in cancer patients. In this regard, patients were divided into two age groups, under and over 65 years. Troponin levels varied significantly between these two groups: 5.36 (5.07-17.89) vs. 16.79 (11.14-22.07), $p < 0.001$; the same was true for NT-proBNP: 75.69 (92.27-313.44) vs. 252.70 (249.23.29-1162.39), $p < 0.001$. In addition, we calculated the threshold value of biomarkers for highlighting cardiac injury in patients over 65 years of age. We obtained threshold values of 8 ng / L for troponin, with an AUROC of 0.865 and 220 pg / ml for NT-proBNP, with an AUROC of 0.833.

Conclusions. It has been shown that there is a significant degree of cardiovascular damage in patients diagnosed with colon cancer, prior to cancer treatment, regardless of age or comorbidities. This fact was demonstrated by the presence of enlarged straight cavities in the echocardiographic evaluation and by the increased levels of cardiovascular biomarkers in the oncological group, compared to the control group.

Study 3. Evaluation of vascular damage in patients with urological and digestive oncological pathology, naive for any type of neoplastic treatment

Introduction. Arterial stiffness, the expression of alterations in the elastic properties of arteries, contributes to general cardiovascular damage in the medium and long term and is, at the same time, a predictor of mortality from cardiovascular events. It is one of the first detectable signs of structural and functional changes in the vessel wall, secondary to oncological pathology. Cardiovascular risk factors that cause cardiovascular disease have been investigated epidemiologically since the mid-twentieth century. These studies also attempted to determine the strength of the association of each factor with a particular disease. Based on these studies, models have been developed that allow the identification of subjects with a higher probability of developing a cardiovascular disease in the near or distant future. The most widely used predictive model for assessing cardiovascular risk is known as the Framingham score. Vascular age is a new concept, also derived from Framingham risk tables, which can be calculated with other risk scales, such as the SCORE score. The calculation of vascular age with the formula SCORE was included in the European Cardiovascular Prevention Guide of 2012, as a tool that allows patients (especially young people) to better understand the cardiovascular risk, even if their absolute risk is not high. The aim of this study was to validate vascular damage in patients with urological and digestive tumors, damage caused by the neoplasm itself, in the absence of the association of cardiovascular disease, in order to implement an optimal strategy for follow-up and treatment.

Patients and method. The present study proposed an early reporting of data from a study designed to characterize vascular function and impairment, regardless of cardiovascular risk, in a group with newly diagnosed digestive and non-digestive (urological) neoplasms before initiating therapy. oncological, in patients without known cardiovascular disease.

Results. Analyzing the vascular changes in the context of urological and gastroenterological malignancies, we observed that the left carotid GIM in the study group was 7 (6.48-7.14) mm vs. 5 (4.34-5.97) mm in the control group , $p < 0.001$. On the right, GIM recorded similar values. Regarding the peripheral arterial stiffness determined photoplethysmographically, it was observed that in the study group, the values of vascular age were significantly higher compared to the control group 65 (58.77-68.72) vs 45 (38.96-52.48) , $p < 0.001$. The arterial age expressed by the Framingham score was significantly higher in cancer patients; Finally, the vascular age calculated by the SCORE score was also higher with a $p < 0.001$. In addition, the vascular age of the patients, calculated by the scores mentioned above or by photoplethysmography, was significantly correlated with the biological age of the

patients. Understanding that inflammation has an important role in accentuating vascular rigidity in oncological pathology, we analyzed the value of inflammatory markers such as CRP, albumin, hematological components and, respectively, inflammatory scores formed by combinations of these markers in patients with urological and digestive neoplasms. . Thus, on the whole study group, significantly higher values of NLR, platelets, neutrophils, albumin, CRP and their ratio were observed. In the light of the obtained data, considering the importance of inflammation on the pathogenesis of arterial stiffness, the correlation between the inflammatory syndrome, represented by PCR and the value of the pulse wave velocity (PWV) was analyzed. Bilaterally, statistically significant results were obtained in favor of the association of inflammation, with a $p = 0.025$.

Conclusions. The study supports the use of methods to determine arterial stiffness in patients with oncological pathology, evaluated either by scores expressing vascular age, or by photoplethysmographic method, or by ultrasound method (pulse wave velocity calculation).

Originality and innovative contributions of the thesis

The degree of originality and innovation promoted in this thesis consists in the use of a portable Raman spectrometer (a small and easy to transport instrument) that was introduced in the clinic and used in regular clinical practice, confirming the usefulness, reliability and ease of the method. We believe that this method meets today's non-invasive diagnostic requirements in terms of speed, ease of use and flexibility of a method. Combined with spectroscopy, routine inflammatory markers can be used that increase the diagnostic value of the method.

Regarding the cardiovascular consequences secondary to an oncological pathology, the studies included in this thesis confirmed the negative impact of digestive and urological cancers on the heart and vessels. The novelty of this research is the demonstration of cardiovascular damage in cancer patients before initiating any type of antineoplastic treatment. In a similar manner, an increase in arterial stiffness has been demonstrated in oncological patients with urological and digestive pathology, assessed by intimate-average thickness, pulse rate and by calculating arterial age by various scores originally created to assess cardiovascular risk in non-neoplastic patients. . The use of these non-invasive methods in naive neoplastic patients for any type of oncological treatment is also an element of originality, the vast majority of existing studies in the literature confirm vascular changes in post-chemotherapy patients.