
Rezumatul tezei de doctorat

Aplicații ale spectroscopiei Raman și spectrometriei de masă în evaluarea artrozei

Doctorand **Delia-Corina Hosu (Bocșa)**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Daniela Fodor**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	17
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Artroza	23
1.1. Introducere	23
1.2. Fiziopatologie	23
1.3. Diagnostic	26
1.4. Tratament	27
2. Spectroscopia Raman în evaluarea artrozei	31
2.1. Introducere	31
2.2. Spectroscopia Raman	33
2.3. Amplificarea semnalului Raman	35
2.4. Aplicații ale spectroscopiei Raman în evaluarea structurilor articulare	36
2.4.1. Semnalul Raman al oaselor și calcificărilor patologice	37
2.4.2. Semnalul Raman al cartilajului articular	38
2.4.3. Analiza lichidului sinovial prin spectroscopie Raman	38
2.4.4. Concluzie și perspective	39
3. Aplicarea cromatografiei lichide de înaltă performanță cuplată cu detecția prin spectrometria de masă în analiza profilului metabolic din artroză	41
3.1. Introducere	41
3.2. Analiza metabolomică	42
3.2.1. Cromatografia lichidă de înaltă performanță	42
3.2.2. Spectrometria de masă	43
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	47
2. Metodologie generală	49
3. Studiul 1. Stadializarea gonartrozei prin analiza lichidului sinovial utilizând spectroscopia Raman și spectroscopia Raman amplificată la suprafață (SERS)	53
3.1. Introducere	53
3.2. Obiective	57
3.3. Material și metodă	58
3.3.1. Selectarea pacienților și recoltarea probelor	58
3.3.2. Obținerea spectrelor Raman	59
3.3.3. Prepararea nanoparticulelor de argint și obținerea spectrelor SERS	59
3.3.4. Analiza datelor	60

3.4. Rezultate	61
3.4.1. Date demografice	61
3.4.2. Măsurători SERS	61
3.4.3. Măsurători Raman	64
3.4.4. Măsurători SERS și Raman	66
3.5. Discuții	66
3.5.1. Spectroscopia SERS în stadializarea gonartrozei	66
3.5.2. Spectroscopia Raman în stadializarea gonartrozei	68
3.5.3. SERS și spectroscopia Raman în stadializarea gonartrozei	70
3.6. Concluzii	70
4. Studiul 2. Profilul metabolic al lichidului sinovial la pacienți cu gonartroză incipientă și avansată: biomarkeri potențiali determinați prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă (UPLC-QTOF-ESI+MS)	71
4.1. Introducere	71
4.2. Obiective	76
4.3. Material și metodă	76
4.3.1. Criterii de includere și excludere	76
4.3.2. Prelucrarea probelor	77
4.3.3. Analiza UPLC-QTOF-ESI+MS	77
4.3.4. Analiza statistică	78
4.4. Rezultate	78
4.4.1. Date clinice și demografice	78
4.4.2. Identificarea metaboliților din lichidul sinovial la pacienți cu gonartroză incipientă și avansată prin UPLC-QTOF-ESI+MS	79
4.4.3. Analiza multivariată	80
4.5. Discuții	83
4.6. Concluzii	86
5. Studiul 3. Prevalența cristalelor de urat monosodic, pirofosfat de calciu dihidrat și fosfat bazic de calciu la nivelul lichidului sinovial la pacienții cu episod acut de gonartroză	87
5.1. Introducere	87
5.2. Obiective	91
5.3. Material și metodă	91
5.3.1. Selectarea pacienților	91
5.3.2. Analiza lichidului sinovial prin microscopie cu lumină polarizată	93
5.3.3. Analiza metabolomică a lichidului sinovial	93
5.3.4. Analiza SERS a lichidului sinovial	94

5.3.5. Determinarea concentrației de acid uric la nivelul lichidului sinovial	94
5.3.6. Analiza statistică	94
5.4. Rezultate	95
5.4.1. Rezultate demografice	95
5.4.2. Rezultate microscopie cu lumină polarizată	96
5.4.3. Rezultate metabolomică	98
5.4.4. Rezultate SERSomică	104
5.5. Discuții	106
5.6. Concluzii	111
6. Concluzii generale	113
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	115
REFERINȚE	117

Cuvinte cheie: gonartroză, lichid sinovial, spectroscopie Raman, spectrometrie de masă, metabolomică

INTRODUCERE

Artroza este cea mai frecventă artropatie și principala cauză de durere și dizabilitate la adulții de vârstă medie și avansată. Până nu demult, artroza a fost considerată o boală degenerativă, apărută ca urmare a uzurii cartilajului articular. În ultima perioadă s-a dovedit că artroza este un proces complex care implică factori mecanici, metabolici și inflamatori, dar patogeniza bolii este încă incomplet cunoscută. Având în vedere că artroza este o afecțiune cu multiple fenotipuri și care implică alterarea mai multor componente articulare, identificarea unor biomarkeri specifici poate reflecta mai exact starea patogenică, evitându-se rezultatele false și putându-se determina cu precizie severitatea bolii.

Dificultatea realizării diagnosticului precoce de artroză, înainte de apariția modificărilor structurale ireversibile, posibilitatea stadializării afecțiunii doar prin metode imagistice, lipsa unei terapii curative au deschis calea unor noi metode analitice, care ar putea contribui la elucidarea problemelor amintite.

Astfel, utilizând spectroscopia Raman, spectroscopia Raman îmbogățită la suprafață, cromatografia lichidă de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă, dar și microscopia cu lumină polarizată ne-am propus analiza lichidului sinovial provenit de la pacienți cu gonartroză, în scopul înțelegerii mai bune a fiziopatologiei bolii, a stadializării sale și a identificării unor biomarkeri specifici.

CONTRIBUȚIE PERSONALĂ

Partea de contribuție personală cuprinde 3 studii observaționale transversale în care au fost incluși pacienți adulți cu gonartroză în diferite stadii și de la care s-a recoltat lichid sinovial (LS). Toate studiile au fost aprobate de către comisia de etică a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca (37/25.02.2019), în conformitate cu principiile Declarației de la Helsinki și toți participanții și-au dat acordul scris pentru includerea în aceste studii. În urma cercetării, au rezultat două articole publicate în reviste ISI: *Lasers in Medical Science* și *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, respectiv un articol indexat BDI în *Medicine and Pharmacy Reports*.

STUDIUL 1. Stadializarea gonartrozei prin analiza lichidului sinovial utilizând spectroscopia Raman și spectroscopia Raman amplificată la suprafață (SERS)

Introducere. LS este un filtrat plasmatic îmbogățit cu acid hialuronic, care funcționează ca un lubrifiant și un absorbant al șocurilor mecanice în interiorul articulației și care contribuie la nutriția cartilajului, transportând glucoza și alți nutrienți. În momentul afectării articulare, LS suferă modificări chimice variate: creșterea concentrației de citokine inflamatorii, acid hialuronic depolimerizat,

fragmente de colagen, cristale anorganice etc. Având în vedere că aspirația LS se face în mod regulat în scop diagnostic și terapeutic, există o oportunitate excelentă de a utiliza LS ca substrat în analiza lui prin spectroscopie Raman, obținând astfel informații suplimentare despre modificările patologice ale articulațiilor.

Stresul oxidativ, ca urmare a dezechilibrului moleculelor pro- și antioxidante, a fost recunoscut ca având rol în patogeneza artrozei. Carotenoizii sunt o clasă de compuși cu proprietăți antioxidante importante, însă datele privind efectul protector al carotenoizilor în artroză sunt contradictorii. Spectroscopia Raman este o metodă ideală pentru studiul carotenoizilor, deoarece aceste molecule au coeficient de rezonanță crescut.

Obiective. Studiul își propune ca obiectiv principal analiza LS provenit de la pacienți cu gonartroză în stadii diferite utilizând spectroscopia Raman și SERS și diagnosticarea pe baza rezultatelor spectrale a stadiului incipient, respectiv avansat de gonartroză. Un prim obiectiv secundar este detectarea prezenței carotenoizilor în LS al pacienților cu gonartroză și evaluarea diferențelor dintre stadiul incipient și avansat de boală. Al doilea obiectiv secundar este de a aprecia dacă și în ce măsură combinarea celor două modele analitice aduce date suplimentare în stadializarea gonartrozei.

Material și metodă. În acest studiu au fost incluși 23 de pacienți adulți diagnosticați cu gonartroză și revărsat articular, consultați în serviciul Clinicii Medicale II Cluj-Napoca, în perioada martie-decembrie 2018. Pacienții au fost împărțiți pe baza criteriilor radiologice Kellgren/Lawrence în două grupe: pacienți cu gonartroză incipientă (iOA) (stadiile 1 și 2) și pacienți cu gonartroză avansată (aOA) (stadiile 3 și 4). LS recoltat prin artrocenteză ecoghidată a fost analizat prin metode macroscopice și microscopice de rutină. LS rămas a fost centrifugat la 2000 rotații/minut și apoi depozitat la -20°C până la analiza sa prin spectroscopie Raman și SERS. Eșantioanele au fost anonimizate, singurele informații disponibile fiind gradul gonartrozei, sexul, vârsta și greutatea pacienților.

Analiza spectroscopică Raman și SERS s-a realizat în colaborare cu departamentul de Fizică Moleculară al Facultății de Fizică, UBB Cluj, folosind un spectrometru InVia (Renishaw) echipat cu un microscop vertical (Leica). Pentru obținerea spectrelor Raman s-a utilizat un laser cu lungime de undă de 532 nm. Pentru obținerea spectrelor SERS s-au utilizat nanoparticule de argint (AgNP) modificate cu iod, care au dovedit capacitatea de amplificare selectivă a spectrelor proteinelor și un laser He-Ne care emite la 633 nm.

Analiza datelor a fost efectuată folosind programul The Unscrambler X versiunea 10.1. Spectrele Raman și SERS au fost pre-procesate individual prin îndepărtarea și normalizarea fundalului, apoi au fost folosite pentru a construi un clasificator bazat pe analiza componentelor principale – analiză liniară discriminativă (PCA-LDA). În plus, pentru a combina cele două strategii de achiziție spectrală într-un singur model, spectrul Raman prelucrat al fiecărui eșantion a fost atașat la spectrul SERS corespunzător, astfel încât între cele două să existe o secvență continuă de numere de undă.

Rezultate. Grupul iOA a inclus 4 bărbați și 7 femei cu vârstă medie de 60 ± 8 ani și greutate de 74 ± 8 kg, iar grupul aOA a inclus 5 bărbați și 7 femei, cu vârsta medie de 70 ± 7 ani și greutate de 81 ± 9 kg.

Spectrele SERS ale LS au arătat mai multe benzi intense care au fost atribuite proteinelor; pe baza modelului PCA-LDA au fost clasificate cu succes 90% din probele din grupul iOA și 92% din eșantioanele grupului aOA, iar precizia globală a fost de 91%.

Spectrele Raman ale LS sunt dominate de benzile Raman de la 1003 cm^{-1} , 1155 cm^{-1} și 1512 cm^{-1} , care sunt specifice carotenoizilor. Spectrele medii Raman ale LS arată intensități mai reduse ale benzilor atribuite carotenoizilor în grupul aOA, indicând un nivel mai scăzut de carotenoizi comparativ cu grupul iOA. Modelul PCA-LDA construit din spectre Raman a clasificat cu succes 81% din eșantioanele cu stadiu incipient și 66% din cele cu stadiu avansat și a avut o precizie generală de 74%. Suprapunerea spectrelor SERS și Raman ale LS a corespuns unei specificități, sensibilități și precizii generale de 100%.

Concluzii. Spectroscopia Raman și SERS pot surprinde modificările moleculare care au loc în LS al pacienților cu iOA și aOA, fiind utile în diagnosticul bolii.

Spectrele SERS ale LS obținute folosind AgNP modificate cu iodură prezintă mai multe benzi asociate proteinelor. Acuratețea globală a modelului PCA-LDA construit din spectre SERS a fost de 91%.

Intensitățile Raman ale benzilor asociate carotenoizilor au fost mai mari în grupul iOA, permițând discriminarea între iOA și aOA cu o precizie globală de 74%.

Prin extinderea analizei PCA-LDA pentru a include atât informațiile Raman, cât și SERS din LS, se poate îmbunătăți acuratețea de discriminare între grupurile iOA și aOA. Astfel, deși spectroscopia Raman a avut o acuratețe redusă în ceea ce privește discriminarea între cele două grupe, informațiile referitoare la carotenoizi au fost importante pentru eșantioanele incorect clasificate pe baza spectrelor SERS.

STUDIUL 2. Profilul metabolic al lichidului sinovial la pacienți cu gonartroză incipientă și avansată: biomarkeri potențiali determinați prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă

Introducere. Cercetările actuale în OA sunt direcționate spre prevenție, diagnostic precoce, înțelegerea etiologiei și a progresiei și identificarea de terapii eficiente. În aceste scopuri, metabolomica, prin identificarea directă a biomarkerilor specifici și posibilitatea studierii perturbărilor de bază ale căilor metabolice implicate în patogeneza OA, s-a dovedit o tehnică valoroasă.

Lipidele endogene sunt mediatori importanți implicați în toate fazele inflamației, de la inițierea, reglarea evoluției, până la stoparea procesului iar studierea profilului lipidic al pacienților cu OA este o reală provocare.

Obiective. Principalul obiectiv este investigarea și identificarea stadiilor incipiente și avansate de gonartroză pe baza profilului metabolic nețintit al LS, utilizând spectrometria de masă cuplată cu cromatografia lichidiană de înaltă performanță (UPLC-QTOF-ES⁺MS). Obiectivul secundar este identificarea unor biomarkeri specifici potențiali pentru stadiul incipient și avansat de gonartroză.

Material și metodă. În acest studiu au fost incluși 31 de pacienți adulți consecutivi consultați în serviciul Clinicii Medicale 2, Cluj-Napoca, în intervalul martie 2019-martie 2020 și diagnosticați cu gonartroză și revărsat articular. Tuturor pacienților li s-a efectuat examen clinic al genunchilor, s-au înregistrat datele demografice, indicele de masă corporală (BMI) și s-a calculat scorul VAS (*visual analogous scale for pain*) și WOMAC (*Western Ontario and McMaster University OA Index*). Pe baza scorurilor radiologice Kellgren/Lawrence s-a realizat împărțirea pacienților în două grupe: iOA și aOA. LS recoltat prin artrocenteză ecoghidată a fost evaluat pentru pH, utilizând stickuri indicatoare de pH (Cytiva), iar restul a fost stocat la -80°C până la efectuarea analizei metabolomice. Înainte de începerea analizei propriu zise, LS a fost amestecat cu acetonă și acetonitril în scopul precipitării proteinelor.

UPLC-QTOF-ES⁺MS a fost realizată utilizând un echipament Bruker Daltonics MaXis Impact (Bruker GmbH, Bremen, Germany) care a inclus un sistem Thermo Scientific HPLC UltiMate 3000 cu pompă cuaternară Dionex Ultimate și sistem ESI⁺ de fragmentare moleculară în spectrometrul de masă QTOF-MS.

Aceste studii au fost efectuate la Centrul de Cercetare-Dezvoltare în Biotehnologii Aplicate în Diagnostic și Terapii Moleculare BIODIATECH Cluj-Napoca.

Datele demografice și clinice au fost exprimate ca medie și deviație standard. S-au efectuat testul t Student pentru date parametrice și testul U Wilcoxon-Mann-Whitney pentru date neparametrice folosind *software*-ul Prism 9 (GraphPad La Jolla, California, USA).

Datele metabolomice au fost preprocesate folosind *software*-ul Data Analysis 4.2. S-au înregistrat cromatogramele ionice totale pentru fiecare probă, care apoi s-au transformat în cromatograme de tip *base-peak*, iar spectrele rezultate și matricile rezultatelor au fost obținute prin funcția *Find molecular features* (FMF). Matricea FMF a cuprins timpul de retenție, ariile și intensitățile semnalelor, raportul semnal/zgomot pentru fiecare componentă împreună cu raportul masă/sarcină electrică (m/z). Media valorilor intensității și abaterea standard pentru fiecare valoare m/z au fost utilizate pentru identificarea metaboliților folosind bazele de date internaționale *Human Metabolome* și *Lipid Maps Databases*.

Pentru analiza statistică au fost utilizați doar metaboliții identificați la cel puțin 25% dintre pacienții din fiecare grup. PCA a fost efectuată cu metaboliții rămași pentru a reduce dimensiunea setului de date și pentru a permite vizualizarea grupării nesupravegheate a categoriilor iOA și aOA. Pentru a selecta PC relevante, care au permis discriminarea între grupurile iOA și aOA, a fost folosit testul t Student. Cele mai bune 3 PC în ceea ce privește valorile p au fost utilizate pentru analize ulterioare. PC-urile selectate au fost utilizate ca intrări pentru doi algoritmi de învățare automată (*random forest* și *naïve Bayes*), care au fost selectați să diferențieze între grupurile iOA

și aOA. Algoritmii de învățare automată au fost validați utilizând validarea încrucișată *leave one out*.

Analiza statistică a fost efectuată folosind *software*-ul Quasar-Orange și biblioteca Orange-Spectroscopy a Laboratorului de Bioinformatică al Universității din Ljubljana.

Rezultate. Din cei 31 de pacienți, 12 au fost cu iOA și 19 cu aOA. Au existat diferențe semnificative între cele două grupuri în ceea ce privește vârsta și BMI, pacienții cu aOA fiind semnificativ mai în vârstă și cu BMI mai mare. Nu au existat diferențe semnificative statistic în ceea ce privește scorurile VAS și WOMAC între cele două grupuri. Valorile medii ale pH-ului LS au fost $8,3 \pm 0,4$ pentru pacienții cu iOA și, respectiv, $8,2 \pm 0,5$ pentru cei cu aOA, fără diferențe semnificative statistic între cele două grupuri.

În urma analizei LS prin UPLC-QTOF-ESI*MS la pacienți cu iOA și aOA au fost obținuți 43 de metaboliți, dintre care doar 9 au fost prezenți la cel puțin 25% dintre pacienți. Dintre cei 9 metaboliți, 4 aparțin fosfolipidelor (fosfatidilcolină 20:0/18:2 și 18:0/20:2, sfingomielină și ceramidă), 3 au fost reprezentați de metaboliți purinici (inozină 5'-fosfat, adenzin-tiamin-difosfat, diadenozină 5',5'-difosfat), un metabolit a fost un hormon steroid gonadic (estrona 3-sulfat) și un metabolit a fost reprezentat de hem. Toți acești metaboliți, cu excepția ceramidei (d18:1/20:0), au prezentat intensități mai crescute în grupul cu aOA.

În urma analizei PCA pe cei 9 metaboliți am selectat PC2, PC8 și PC9 pentru analize ulterioare. Am observat ca PC2 și PC8 au prezentat niveluri mai mari de sfingomielină (d18:1/16:1), inozină 5'-fosfat, fosfatidilcolină (20:0/18:2), diadenozină 5',5'-difosfat și fosfatidilcolină (18:0/20:2) la pacienții cu aOA comparativ cu iOA, în timp ce molecula de hem a avut un nivel mai mare la cei cu iOA comparativ cu aOA. Pe baza valorilor scorului PC2 și PC8, iOA și aOA au prezentat o grupare nesupervizată bună, demonstrând profilul metabolomic distinct al acestor două grupuri.

Folosind valorile scorurilor PC2, PC8 și PC9 drept caracteristici pentru algoritmi de învățare automată, grupurile iOA și aOA au fost clasificate cu un AUC de 0,81 prin *random forest* și 0,78 prin algoritmul *Naïve Bayes*.

Concluzii. Analiza UPLC-QTOF-ESI*MS a LS poate oferi informații valoroase cu privire la diagnosticul și progresia OA și poate indica moleculele care pot acționa ca biomarkeri potențiali cu valoare prognostică ridicată.

STUDIUL 3. Prevalența cristalelor de urat monosodic, pirofosfat de calciu dihidrat și fosfat bazic de calciu la nivelul lichidului sinovial la pacienții cu episod acut de gonartroză

Introducere. Prezența cristalelor cu conținut de calciu este o posibilă legătură între inflamație și OA. Dacă implicarea cristalelor de pirofosfat de calciu dihidrat (CPP) și fosfat bazic de calciu (BCP) în patogeneza OA este un subiect mult discutat și acceptat, despre legătura cristalelor de urat monosodic (MSU) cu OA se cunoaște mult

mai puțin. Studiile privind prevalența cristalelor patologice în LS la pacienții cu OA au rezultate diferite, iar despre posibilele efecte pe care cristalele patologice le-ar putea avea asupra profilului metabolic al LS din articulațiile artrozice nu am găsit date publicate.

Obiective. Principalul obiectiv constă în investigarea prevalenței cristalelor de CPP, BCP și MSU din LS la pacienții cu episod acut de gonartroză, utilizând microscopia optică convențională și microscopia cu lumină polarizată (CPLM). Ca prim obiectiv secundar ne-am propus să evaluăm în ce măsură prezența cristalelor se corelează cu datele demografice ale pacienților, cu BMI, cu accentuarea simptomatologiei, utilizând scorurile VAS și WOMAC, cu gradul radiologic al gonartrozei, respectiv cu pH-ul LS. Al doilea obiectiv secundar a fost analizarea efectului cristalelor patologice asupra compoziției moleculare a LS, prin utilizarea UPLC-QTOF-ESI+MS și a SERS.

Material și metodă. Au fost incluși în studiu 38 de pacienți adulți cu episod acut de gonartroză și revărsat articular care s-au prezentat în serviciul Clinicii Medicale 2 din Cluj-Napoca, în perioada februarie 2019-martie 2020. Toți pacienții au fost examinați clinic și li s-au înregistrat datele demografice, BMI, scorurile VAS și WOMAC. Prin artrocenteză ecoghidată s-a recoltat LS care a fost centrifugat la o viteză de 700 rotații/minut timp de 10 minute pentru a înlătura resturile celulare și a crește sensibilitatea metodei în evidențierea cristalelor. Pentru identificarea cristalelor de CPP și MSU s-a utilizat CPLM (40X) (Leica DM 1000 LED; Leica) în primele ore după recoltare, iar pentru cristalele de BCP s-a utilizat microscopul optic convențional (Leica DM 1000 LED; Leica) după colorarea cu roșu de alizarină.

Pentru realizarea analizei metabolomice prin utilizarea UPLC-QTOF-ESI+MS s-a utilizat același protocol ca și cel descris în studiul anterior.

Pentru analiza SERS, LS a fost deproteinizat cu metanol (Sigma), ulterior probele au fost centrifugate la 5200 g timp de 15 min. și supernatantul a fost amestecat cu AgNP activate cu Ca (NO₃)₂. Pentru analiza SERS a LS s-a utilizat un spectrometru InVia Raman (Renishaw), echipat cu un laser care emite la o lungime de undă de 532 nm. Spectrele SERS normalizate au fost analizate folosind analiza PCA. Concentrația de acid uric pe baza spectrelor SERS a fost evaluată folosind metoda celor mai mici pătrate (PLS). În final, datele normalizate obținute în urma UPLC-QTOF-ESI+MS și SERS au fost introduse în aceeași matrice, iar analiza PCA și PLS s-a efectuat utilizând Quasar (Orange). Analiza biomarkerilor, conform protocolului Metaboanalyst 5,0, s-a realizat pe baza curbilor ROC și a ariilor de sub curbele ROC (AUC).

Pentru măsurarea concentrației de acid uric din LS s-a utilizat metoda uricăză-peroxidază, folosind un analizor automat Mindray BS-480 (Mindray, Shenzhen, China).

Rezultate. Prezența conglomeratelor de cristale de BCP în 97,77% din cazuri, a determinat introducerea un filtru adițional: includerea în studiu numai a pacienților care au prezentat conglomerate de BCP.

Datele demografice arată că în studiu au fost incluși 17 bărbați (45%) și 21 de femei (55%), cu o vârstă medie de 67,7±9,6 ani și cu BMI de 28,4±4,6 kg/m².

Au fost identificate cristale ocazionale de MSU la 3 pacienți (8%), cristale ocazionale de CPP la 17 pacienți (45%), prezența concomitentă de cristale ocazionale de MSU și CPP la 4 pacienți (10%); restul de 14 pacienți nu au prezentat cristale de

MSU sau CPP (37%). Proporția pacienților cu aOA a fost mai mare la pacienții la care s-au detectat cristale de MSU. Rezultatele au arătat că pH-ul LS în grupul CPP a fost mai mare comparativ cu grupul martor (8,4 versus 8,1; testul Mann-Whitney U; $p < 0,05$).

În urma analizei metabolomice a LS, utilizând analiza PLSDA am obținut o discriminare cu valoare predictibilă pentru grupurile MSU; CPP; MSU+CPP și grupul de control. Analiza *random forest* a indicat valoarea predictivă a unor molecule care pot fi considerate biomarkeri de diferențiere între cele trei grupuri. Cele mai mari valori ale parametrului *Mean Decrease Accuracy* (MDA) au fost observate pentru moleculele cu $m/z=798,6162$; $m/z=594,5095$; $m/z=675,0371$; $m/z=616,2157$; $m/z=681,03$; $m/z=677,0342$; $m/z=353,279$; $m/z=679,0318$; $m/z=350,9995$; $m/z=349,0022$, care pot fi considerate biomarkeri de diferențiere între grupul MSU și grupul control; moleculele cu $m/z=534,3233$; $m/z=496,364$; $m/z=572,4038$, care diferențiază între grupul MSU și grupul CPP și molecula cu $m/z=701,5544$, care diferențiază între grupul CPP și control. Se poate vedea o diferențiere mai bună între grupul MSU+CPP și grupul control pentru moleculele cu $m/z=798,6162$; $m/z=616,2157$; $m/z=594,5095$; $m/z=675,0371$; $m/z=701,5544$; $m/z=349,0022$.

Analiza SERS a LS pentru grupul MSU și control a permis elaborarea spectrelor SERS, cele mai multe benzi SERS fiind atribuite metaboliților purinici. Utilizând PCA, valorile scorului PC4 și PC7 au fost semnificativ diferite între grupurile MSU și control. Analiza PC4 arată că acesta a fost dominat de benzi pozitive atribuite acidului uric, sugerând că acest metabolit are o concentrație mai mare în grupul MSU. Pentru a testa această ipoteză am măsurat concentrația de acid uric din probele de LS, utilizând metoda uricăză-peroxidază. Rezultatele au arătat concentrația mai mare a acidului uric în grupul MSU comparativ cu grupul control (5,55 cu IQR 4,36-6,82; 4,56 cu IQR 2,95-5.67, test Mann-Whitney U, $p=0.05$), date care arată o corelație semnificativă statistic între concentrația de acid uric și valorile scorului PC4.

Concluzii. Cristalele de MSU și CPP sunt prezente la o proporție semnificativă de pacienți cu episoade acute de gonartroză la care nu s-au putut documenta dovezi de inflamație, iar prezența cristalelor de MSU se corelează cu severitatea radiologică a gonartrozei. De asemenea, prezența cristalelor MSU din LS este asociată cu perturbarea metabolismului purinelor și cu expresia diferită a unor metaboliți aparținând claselor de glicerofosfolipide, sfingolipide, prostenoizi, steroli, nucleotide și porfirine. Prezența cristalelor de CPP este asociată cu existența unui pH mai bazic al LS, nu se corelează cu spectrele SERS ale LS, dar se corelează cu modificarea unei molecule aparținând clasei sfingomielinelor. Rezultatele obținute au nevoie de studii suplimentare, pe un număr mai mare de pacienți, la care să existe o mai bună potrivire între grupe în ceea ce privește stadiul de OA.

Concluzii generale

1. Utilizarea spectroscopiei Raman și a SERS în analiza LS provenit de la pacienți cu gonartroză poate surprinde modificări moleculare care apar în această afecțiune.
2. Folosirea AgNP modificate cu iodură a permis identificarea selectivă de benzi asociate proteinelor de la nivelul spectrelor SERS ale LS.
3. Pe baza spectrelor SERS ale proteinelor din LS au putut fi clasificate stadiile avansate și incipiente de boală cu o precizie globală de 91%.
4. Utilizarea spectroscopiei Raman a permis identificarea la nivelul LS a benzilor specifice pentru carotenoizi la 1003 cm^{-1} , 1155 cm^{-1} și 1512 cm^{-1} , iar intensitățile Raman ale acestor benzi au fost mai mari în grupul cu iOA.
5. Pe baza spectrelor Raman ale carotenoizilor din LS s-au putut clasifica stadiile de aOA și iOA cu o precizie generală de 74%.
6. Utilizarea modelului mixt Raman/SERS de clasificare a gradelor de gonartroză a crescut specificitatea, sensibilitatea și precizia generală la 100%.
7. Analiza UPLC-QTOF-ESI+MS a LS de la pacienți cu iOA și aOA arată diferențe semnificative privind profilul metaboliților, dependente de stadiul bolii.
8. Metabolomica nețintită realizată prin UPLC-QTOF-ESI+MS la nivelul LS a arătat o diversitate de molecule comune în stadiul iOA și aOA, fiind identificați 43 de metaboliți, în principal lipide polare. Analiza statistică s-a realizat doar la 9 dintre aceste molecule, care au fost identificate la cel puțin 25% dintre pacienți.
9. Moleculele de hem, fosfatidilcolină (20:0/18:2), fosfatidilcolină (18:0/20:2), sfingomielină (d18:1/16:1), 5'-fosfat de inozină, 5',5'-diadenozin-difosfat, 3-sulfat de estronă și adenzin-tiamin-difosfat au avut intensități mai mari la grupul cu aOA, iar ceramida (18:1/20:0) a avut niveluri semnificativ crescute la grupul cu iOA. Aceste specii moleculare pot fi considerate biomarkeri potențiali în diferențierea stadiului avansat de cel incipient de boală.
10. Utilizarea algoritmilor de învățare automată *random forest* și *naïve Bayes* a permis discriminarea între grupurile cu iOA și aOA, obținându-se o acuratețe de clasificare de 0,80 pentru *random forest* și 0,64 pentru *naïve Bayes*.
11. Analiza prin CPLM a LS a sugerat prevalența semnificativă a cristalelor ocazionale de CPP și MSU la pacienții cu episod acut de gonartroză care nu au prezentat semne sistemice sau locale de inflamație.
12. Prezența cristalelor de MSU s-a corelat cu severitatea radiologică a gonartrozei, cu perturbarea metabolismului purinic (așa cum era de așteptat), evidențiată prin analiza spectrelor SERS, dar și cu expresia diferită a unor metaboliți aparținând claselor de glicerofosfolipide, sfingolipide, prostenoizi, steroli, nucleotide și porfirine. Aceste molecule ar putea fi considerate biomarkeri de diferențiere între grupa pacienților cu cristale de MSU și grupa pacienților fără cristale.

13. Prezența cristalelor de CPP este asociată cu existența unui pH mai bazic al LS, nu se corelează cu spectrele SERS ale LS, dar se corelează cu modificarea unei molecule aparținând clasei sfigomielinelor.
14. Rezultatele obținute au nevoie de studii suplimentare, pe un număr mai mare de pacienți, la care să existe o mai bună potrivire între grupe, în ceea ce privește datele demografice și clinice ale pacienților, inclusiv prezența comorbidităților, medicația utilizată, regimul de viață.
15. Posibilitatea stadializării unor clase moleculare de OA ar putea deschide noi perspective în înțelegerea fiziopatologiei bolii, dezvoltarea unor terapii specifice și îmbunătățirea calității vieții acestei categorii de pacienți.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Prezenta lucrare prezintă o abordare nouă în România, de utilizare a unor tehnici analitice moderne (spectroscopie Raman, SERS și UPLC-QTOF-ESI⁺MS) în evaluarea LS al pacienților cu gonartroză în scopul de a contribui la înțelegerea aprofundată a fiziopatologiei bolii și la identificarea stadiilor diferite de boală.

Studiile realizate sunt originale și prezintă câteva aspecte de inovație, dintre care putem enumera:

- adaptarea și implementarea spectroscopiei Raman și a SERS ca procedură rapidă, sensibilă și reproductibilă de identificare pe baza spectrelor LS specifice proteinelor și carotenoizilor a stadiilor incipiente, respectiv avansate de gonartroză;
- conceperea și utilizarea unui model de clasificare de mare acuratețe a stadiilor de gonartroză prin combinarea spectrelor Raman și SERS și includerea lor într-un model PCA-LDA;
- implementarea UPLC-QTOF-ESI⁺MS ca tehnică analitică sensibilă în investigarea LS de la pacienți cu gonartroză și identificarea pe baza profilului metabolic a stadiilor evolutive ale bolii;
- identificarea unor molecule care pot reprezenta biomarkeri predictibili pentru progresia gonartrozei;
- identificarea unor fenotipuri noi de gonartroză la pacienți cu cristale ocazionale de MSU și CPP la nivelul LS, pe baza expresiei diferite a unor metaboliți, care pot reprezenta biomarkeri potențiali.

PhD thesis summary

Applications of Raman spectroscopy and mass spectrometry in the evaluation of osteoarthritis

PhD student: **Delia-Corina Hosu (Bocşa)**

PhD Scientific Coordinator: **prof. dr. Daniela Fodor**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	17
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Osteoarthritis	23
1.1. Introduction	23
1.2. Pathophysiology	23
1.3. Diagnostics	26
1.4. Treatment	27
2. Raman spectroscopy in the evaluation of osteoarthritis	31
2.1. Introduction	31
2.2. Raman spectroscopy	33
2.3. Amplification of the Raman signal	35
2.4. Applications of Raman spectroscopy in the evaluation of joint structures	36
2.4.1. Raman signal of bones and pathological calcifications	37
2.4.2. Raman signal of the joint cartilage	38
2.4.3. Raman spectroscopy analysis of the synovial fluid	38
2.4.4. Conclusion and perspectives	39
3. Use of high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection in the analysis of the metabolic profile in osteoarthritis patients	41
3.1. Introduction	41
3.2. Metabolomic analysis	42
3.2.1. High-performance liquid chromatography	42
3.2.2. Mass spectrometry	43
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Work hypothesis/objectives	47
2. General methodology	49
3. Staging of knee osteoarthritis by means of Raman spectroscopy and surface-enhanced Raman scattering (SERS) analysis of the synovial fluid	53
3.1. Introduction	53
3.2. Objectives	57
3.3. Material and method	58
3.3.1. Patient selection and sampling procedure	58
3.3.2. Recording of Raman spectra	59
3.3.3. Preparation of silver nanoparticles and recording of SERS spectra	59
3.3.4. Data analysis	60

3.4. Results	61
3.4.1. Demographic data	61
3.4.2. SERS measurements	61
3.4.3. Raman measurements	64
3.4.4. SERS and Raman measurements	66
3.5. Discussions	66
3.5.1. SERS spectroscopy in the staging of knee osteoarthritis	66
3.5.2. Raman spectroscopy in the staging of knee osteoarthritis	68
3.5.3. SERS and Raman spectroscopy in the staging of knee osteoarthritis	70
3.6. Conclusions	70
4. The synovial fluid metabolic profile in patients with incipient and advanced knee osteoarthritis: potential biomarkers determined by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection (UPLC-QTOF-ESI⁺MS)	71
4.1. Introduction	71
4.2. Objectives	76
4.3. Material and methods	76
4.3.1. Inclusion and exclusion criteria	76
4.3.2. Sample workup	77
4.3.3. UPLC-QTOF-ESI ⁺ MS analysis	77
4.3.4. Statistical work	78
4.4. Results	78
4.4.1. Clinical and demographic data	78
4.4.2. UPLC-QTOF-ESI ⁺ MS identification of metabolites in the synovial fluid of patients with incipient and advanced knee osteoarthritis	79
4.4.3. Multivariate analysis	80
4.5. Discussions	83
4.6. Conclusions	86
5. Prevalence of monosodium urate, calcium pyrophosphate dihydrate and basic calcium phosphate crystals in the synovial fluid of knee osteoarthritis patients during an acute flare	87
5.1. Introduction	87
5.2. Objectives	91
5.3. Material and method	91
5.3.1. Patient selection	91
5.3.2. Polarised light microscopy analysis of the synovial fluid	93
5.3.3. Metabolomic analysis of the synovial fluid	31
5.3.4. SERS analysis of the synovial fluid	94
5.3.5. Uric acid determination in the synovial fluid	94
5.3.6. Statistical analysis	94

5.4. Results	95
5.4.1. Demographics	95
5.4.2. Polarized light microscopy	96
5.4.3. Metabolomics	98
5.4.4. SERSomics	104
5.5. Discussions	106
5.6. Conclusions	111
6. General conclusions	113
7. Originality and innovative contributions of the thesis	115
References	117

Key words: knee osteoarthritis, synovial fluid, Raman spectroscopy, SERS, mass spectrometry, metabolomics

INTRODUCTION

Osteoarthritis (OA) is the most frequent form of arthropathy and the main cause of pain and disability in adults of medium and advanced age. Until quite recently, OA was considered a degenerative disease, occurring as a consequence of the joint cartilage wear and tear. Lately it was shown that OA is a complex process involving mechanical, metabolic and inflammatory factors, yet the pathogenesis of this conditions is still not fully known. Considering that OA is a multiphenotypic condition which implies affliction of several joint components, identification of specific biomarkers may offer a better image of the stage of the disease, avoiding false results and allowing a more precise determination of the condition's severity.

Facts such as the difficulty to establish an early diagnose, before the onset of irreversible structural changes; the only possibility to stage the condition by imagistic means; the lack of a curative therapy, have opened the way for new analytic methods that might contribute to solving the above-mentioned problems.

We proceeded to analyse synovial fluid from patients with knee osteoarthritis by means of high-end investigation methods such as Raman spectroscopy, surface-enhanced Raman scattering (SERS), high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection, and polarized light microscopy, aiming to reach a better understanding of the pathophysiology and staging of OA and to identify specific biomarkers of this condition.

PERSONAL CONTRIBUTION

The personal contribution part of the thesis comprises three transversal observational studies, including adult patients diagnosed with knee OA in various stages, from which synovial fluid (SF) was collected. All three studies were approved by the Ethics Committee of "Iuliu Hatieganu" Medicine and Pharmacy University in Cluj-Napoca (37/25.02.2019), according to the principles of the Declaration of Helsinki, and all participants gave their written consent to be enrolled in these studies. The research resulted in two papers published in ISI journals: *Lasers in Medical Science* and *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, respectively a BDI-indexed paper in *Medicine and Pharmacy Reports*.

STUDY no. 1. Staging of knee osteoarthritis by means of Raman and surface-enhanced Raman (SERS) spectroscopy

Introduction. The synovial fluid (SF) is a hyaluronic acid-rich plasma filtrate inside joints that acts as a lubricant and as a cushioning, absorbing mechanic shocks. The SF also plays a role in the cartilage's nutrition, carrying glucose and other nutrients. Once the joint is affected, the SF undergoes a number of chemical changes, notably an increase in the concentration of pro-inflammatory cytokines,

depolymerized hyaluronic acid, collagen fragments, inorganic crystals, etc. Given that SF aspiration is a routine procedure carried out for diagnostic and therapeutical purposes, there is an excellent opportunity to use the SF as a substrate for Raman spectroscopy, hoping to gain in-depth information regarding the pathologic changes of the affected joint.

Oxidative stress caused by an imbalance of pro- and antioxidant molecules was recognized as playing a role in the pathogenesis of OA. Carotenoids are a class of compounds with important antioxidant properties; however, data regarding their protective effects in OA are contradictory. Raman spectroscopy is an ideal method for the study of carotenoids, since these molecules have a high resonance coefficient.

Objectives. The main objective of the study was to analyse SF collected from patients with knee OA in different stages by using Raman spectroscopy and SERS and to diagnose the stage of the condition – incipient or advanced – based on the spectral results. A first secondary objective was to detect the presence of carotenoids in the SF of patients with knee OA and to evaluate the differences between the incipient and the advanced condition. Another aim was to establish whether, and to what extent, a combination between the two analytical methods would bring more pertinent information regarding the disease's staging.

Material and method. The study included 23 adult patients diagnosed with knee OA and joint effusion, seen in the out-patient service of the Medical Clinic II in Cluj-Napoca from March to December 2018. Patients were allocated to two groups, according to the Kellgren/Lawrence radiologic criteria: patients with incipient OA (iOA) (grades 1 and 2) and patients with advanced OA (aOA) (grades 3 and 4). SF collected by ultrasound-guided knee arthrocentesis was submitted to routine macroscopic and microscopic tests. The remaining SF was centrifuged at 2000 rpm and stored away at -20°C, in order to be analysed by Raman spectroscopy and SERS. Samples were anonymized, the only available informations being the OA grade, gender, age and weight of the patient.

The Raman and SERS spectrometric analyses were performed in collaboration with the Molecular Physics Department of the Faculty of Physics, Babes-Bolyai University in Cluj-Napoca, using an InVia (Renishaw) spectrometer equipped with a vertical Leica microscope. A 532 nm wavelength laser was used to raise the Raman spectres. Iodine-modified silver nanoparticles (AgNP) were employed, together with a 633 nm He-Ne laser, for SERS spectres. Iodine-modified AgNP have a proven capacity towards selective amplification of protein spectra.

Data analysis was done with The Unscrambler X version 10.1 software. Raman and SERS spectra were pre-processed individually by removing and normalizing the background; they were then used to build a classifier based on principal component analysis – linear discriminant analysis (PCA-LDA). Moreover, in order to combine the two spectral acquisition strategies into a single model, the processed Raman spectrum of each sample was attached to the corresponding SERS spectrum, such as to obtain an uninterrupted wavelength number sequence between the two spectra.

Results. The iOA group included 4 male and 7 female patients, average age 60 ± 8 yrs., average weight 74 ± 8 kg; the aOA group included 5 male patients and 7 female patients, average age 70 ± 7 yrs., average weight 81 ± 9 kg.

SERS spectra of the SF showed several high intensity bands that were attributed to proteins; based on the PCA-LDA model, 90% of the samples in the iOA group and 92% of the samples in the aOA group were successfully classified; global precision was 91%.

Raman spectra of the SF are dominated by bands at 1003 cm^{-1} , 1155 cm^{-1} , and 1512 cm^{-1} , which are carotenoid-specific bands. The Raman spectra of SF in the aOA group showed on average a lower intensity of the carotenoids-specific bands, suggesting that the SF from aOA patients has a lower carotenoid concentration than that of iOA patients. The PCA-LDA model built based on the Raman spectra managed to classify successfully 81% of the iOA samples and 66% of the aOA ones (general precision 74%). Superimposition of the SERS and Raman spectra offered a general specificity, sensitivity and precision of 100%.

Conclusions. Raman spectroscopy and SERS is able to reflect molecular changes occurring in the SF of patients with both iOA and aOA, being thus able to assist the physician in diagnosing the condition.

SERS spectra obtained with iodine-modified AgNP showed several bands attributable to proteins. Global accuracy of the PCA-LDA model build from SERS spectra was of 91%.

Raman intensities of carotenoid-associated bands were higher in the iOA group, thus allowing a discrimination between iOA and aOA with a global precision of 74%.

Extending the PCA-LDA analysis as to include both Raman and SERS data can enhance the accuracy of discrimination between the iOA and aOA groups. So, although Raman spectroscopy showed a reduced accuracy as to discriminate between the two groups, data regarding carotenoids were of importance for those samples that could not be classified correctly based on SERS spectra.

STUDY no. 2: Metabolic profile of synovial fluid in patients with incipient and advanced knee osteoarthritis: potential biomarkers determined by high-performance chromatography coupled with mass spectrometry detection

Introduction. Current research in OA is targeted towards prevention, early diagnosis, understanding of the etiology and progression of the disease and identification of effective therapies. To this end, metabolomics proved a valuable technique, allowing direct identification of specific biomarkers and the possibility to study fundamental alterations of the metabolic pathways involved in the pathogenesis of this condition.

Endogenous lipids are important mediators, involved in every step of the inflammation process – onset, regulation and resolution –, and studying the lipid profile of OA patients presents itself as a real challenge.

Objectives. The main objective was to investigate and identify the early and advanced stages, respectively, of knee OA by means of the untargeted metabolic profile of the SF, employing high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection (UPLC-QTOF-ES⁺MS). The secondary objective was to identify potential specific biomarkers for the incipient and advanced stage of knee OA.

Material and method. The study included 31 consecutive adult patients seen in the outpatient service of the Medical Clinic II in Cluj-Napoca, between March 2019 and March 2020 and diagnosed with knee OA and joint effusion. All patients underwent a clinical examination of the knees; demographics and body mass index (BMI) were recorded and VAS (*visual analogous scale for pain*) and WOMAC (*Western Ontario and McMaster University OA Index*) scores were calculated. Based on the radiologic Kellgren/ Lawrence criteria, patients were allocated to two groups: iOA and aOA, respectively. SF was collected by ultrasound-guided knee arthrocentesis, pH was determined with pH indicator strips (Cytiva) and the rest of each sample was stored at -80°C until submitted to metabolomics tests. Prior to testing, the SF samples were treated with acetone and acetonitrile to achieve protein precipitation.

UPLC-QTOF-ES⁺MS was carried out on a Bruker Daltonics MaXis Impact equipment (Bruker GmbH, Bremen, Germany) including a Thermo Scientific HPLC UltiMate 3000 system with a Dionex Ultimate quaternary pump and an ESI⁺ molecular fragmentation system in the QTOF-MS mass spectrometer.

This part of the study was carried out at the Cluj-Napoca BIODIATECH Center for Research and Development in Biotechnologies Applied in Diagnostics and Molecular Therapies.

Demographic and clinical data were expressed as average \pm standard deviation. Student t-test was applied for parametric data and the Wilcoxon-Mann-Whitney U-test for nonparametric data, both carried out by means of the Prism 9 software (GraphPad La Jolla, California, USA).

Metabolomics data were pre-processed with the Data Analysis 4.2 software. Total ionic chromatograms were recorded for each sample and were then transformed into base-peak chromatograms. Spectra and matrices of the results were obtained with the find molecular features (FMF) feature. The FMF matrix included retention time, signal areas and intensities, signal-to-noise ratio, together with the mass-to-charge ratio (m/z) of each component. The average and standard deviation for each m/z value were used for the identification of metabolites using the Human Metabolome and Lipid Maps international databases.

Statistical tests included only metabolites identified in at least 25% of the patients in each group. Principal component analysis (PCA) was performed on the selected metabolites in order to reduce the dataset and to allow visualisation of unsupervised grouping of the iOA and aOA categories. Student t-test was used to select the relevant principal components (PC), those which allowed discrimination between the iOA and aOA groups. The three PCs with the highest p values were subjected to further tests. The selected PCs were used as entries for two machine learning

algorithms (random forest and naïve Bayes), which were instructed to differentiate between the iOA and aOA groups. The machine learning algorithms were validated by means of the cross-validation method leave one out.

Statistics was performed with help of the Quasar-Orange software and the Orange-Spectroscopy library of the Bioinformatics Laboratory, University of Ljubljana, Slovenia.

Results. From the 31 patients, 12 were diagnosed with iOA and 19 with aOA. There were significant differences between the two groups in terms of age and BMI, the aOA patients being significantly older and with higher BMIs. There were no statistically significant differences between the VAS and WOMAC scores of the two groups. Average pH values of the SF of OA patients were 8.3 ± 0.4 for the iOA group and 8.2 ± 0.5 for the aOA group (no statistically significant difference).

Following the UPLC-QTOF-ESI*MS analysis of the SF of OA patients in the two groups, 43 metabolites were identified, of which only 9 were present in at least 25% of the total number of patients. Of these 9 metabolites, 4 are phospholipids (phosphatidylcholine 20:0/18:2 and 18:0/20:2, sphingomyelin and ceramide), 3 were purine metabolites (inosine 5'-phosphate, adenosine thiamine diphosphate, diadenosine 5',5'-diphosphate), one molecule was a gonadal steroid hormone (estrone 3-sulphate) and one last metabolite was heme. All of these metabolites, with the exception of ceramide (d18:1/20:0), showed higher intensities in the aOA group.

Following the PCA analysis on the 9 metabolites, PC2, PC8, and PC9 were selected for further tests. PC2 and PC8 displayed higher levels of sphingomyelin (d18:1/16:1), inosine 5'-phosphate, phosphatidylcholine (20:0/18:2), diadenosine 5',5'-diphosphate and phosphatidylcholine (18:0/20:2) in the aOA group as compared to the iOA group, while heme was present in higher concentrations in iOA patients. Based on the PC2 and PC8 scores, iOA and aOA showed a good unsupervised grouping, highlighting the distinct metabolomic profile of the two groups.

Using the values of the PC2, PC8 and PC9 scores as characteristics for machine learning algorithms, the iOA and aOA groups were classified as having an AUC of 0,81 with random forest and of 0,78 with naïve Bayes.

Conclusions. The UPLC-QTOF-ESI*MS analysis of the SF in knee OA patients is able to offer a valuable input towards diagnosis and progression of the disease and can pinpoint molecules that may serve as biomarkers with high prognostic value.

STUDY no. 3. Prevalence of monosodium urate, calcium pyrophosphate dihydrate, and basic calcium phosphate crystals in the SF of patients during an acute flare of knee OA

Introduction. The presence of calcium-containing crystals represents a possible link between inflammation and OA. If the involvement of calcium pyrophosphate dihydrate (CPP) and basic calcium phosphate crystals (BCP) in the pathogenesis of OA is a widely discussed and accepted theory, much less is known about the link between

monosodium urate (MSU) crystals and OA. Studies regarding the prevalence of pathologic crystals in the SF of OA patients had varying results and we found no published data regarding the possible effects of pathologic crystals upon the metabolic profile of SF in OA-affected joints.

Objectives. The main objective of the present study was to investigate the prevalence of CPP, BCP, and MSU crystals in the SF of patients during an acute flare of knee OA, using conventional light microscopy and circular polarized light microscopy (CPLM). As a first secondary objective, we attempted to evaluate to what extent the presence of the crystals correlates with other patient-related data: demographics, BMI, symptom exacerbation according to VAS and WOMAC scores, radiologic grade of OA and pH of the SF. A further secondary objective was to assess the effect of the pathologic crystals on the molecular composition of the SF by means of UPLC-QTOF-ESI+MS and SERS.

Material and method. The study included 38 adult patients with knee OA presenting in the outpatient service of the Medical Clinic II in Cluj Napoca with an acute flare-up and joint effusion, from February 2019 to March 2020. All patients underwent clinical examination of their knees and demographic data, BMI, VAS and WOMAC scores were recorded. SF was collected by ultrasound-guided arthrocentesis and centrifuged for 10 mins. at 700 rpm in order to remove cell debris and to enhance the sensitivity of the method, allowing a better visualization and identification of crystals. CPP and MSU crystals were visualized by means of CPLM (40x) (Leica DM 1000 LED; Leica), in the first hours after the samples was collected. BCP crystals were identified by conventional light microscopy (Leica DM 1000 LED; Leica), after staining with alizarin red.

For metabolomics studies employing UPLC-QTOF-ESI+MS, the same protocol was used as described for the previous study.

For SERS, the SF was first depleted of proteins with methanol (Sigma); further on, samples were centrifuged at 5200 g for 15 min and the supernatant was treated with calcium nitrate- activated AgNP. SERS spectra were obtained with an InVia Raman (Renishaw) spectrometer equipped with a 532 nm laser. Normalized SERS spectra were analysed by means of the PCA method. The uric acid concentration was assessed based on the partial least squares method (PLS). Finally, normalized data obtained with UPLC-QTOF-ESI+MS and SERS were introduced in the same matrix and PCA and PLS tests were done with Quasar (Orange). Biomarker analysis, done according to the Metaboanalyst 5,0 protocol, was carried out based on ROC curves and the areas under the ROC curves (AUC).

Uric acid in the SF was assessed by means of the uricase-peroxidase method, on a Mindray BS-480 analyzer (Mindray, Shenzhen, China).

Results. The presence of BCP crystal conglomerates in 97.77% of the cases required an additional filter: only patients with BCP conglomerates were included in the study.

Demographics: the study included 17 male (45%) and 21 female (55%) patients, average age 67.7 ± 9.6 yrs., average BMI 28.4 ± 4.6 kg/m².

Occasional MSU crystals were identified in 3 patients (8%), occasional CPP crystals in 17 patients (45%), concomitant occasional MSU and CPP crystals in 4 patients (10%). The other 14 patients (37%) showed no MSU, nor CPP crystals. The ratio of aOA patients was higher within the group where MSU crystals were detected. The results showed that the pH of the SF in patients with CPP crystals was significantly higher compared to the control group (8.4 vs. 8.1; Mann-Whitney U test, $p < 0.05$).

Metabolomic analysis of the SF (PLSDA test) generated a discrimination with predictable value for the following groups: MSU; CPP; MSU+CPP and control group. Random forest indicated the predictive value of molecules that can be considered discrimination biomarkers for the three groups. The highest values of the mean decrease accuracy (MDA) parameter were recorded for the following molecules, which can be considered discrimination biomarkers between the MSU and the control group: $m/z=798.6162$; $m/z=594.5095$; $m/z=675.0371$; $m/z=616.2157$; $m/z=681.03$; $m/z=677.0342$; $m/z=353.279$; $m/z=679.0318$; $m/z=350.9995$; $m/z=349.0022$. Molecules with $m/z=534.3233$; $m/z=496.364$; $m/z=572.4038$ discriminate between the MSU and the CPP group, and the molecule with $m/z=701.5544$ discriminates between the CPP and the control group. A better discrimination can be seen between the MSU+CPP and the control group for the following molecules: $m/z=798.6162$; $m/z=616.2157$; $m/z=594.5095$; $m/z=675.0371$; $m/z=701.5544$; $m/z=349.0022$.

SERS spectra of the SF were raised for the MSU and in the control group. The majority of SERS bands were attributable to purine metabolites. The PCA method showed that values for the PC4 and PC7 scores were significantly different between the MSU and the control group. Analysis of PC4 showed that the spectrum was dominated by positive bands attributable to the uric acid, suggesting that this metabolite has a higher concentration in the MSU group. In order to test this hypothesis, uric acid concentrations in SF samples were measured by means of the uricase-peroxidase method. Results showed that the MSU group had higher uric acid concentrations as compared to the control group (5.55 with IQR 4.36-6.82; 4.56 with IQR 2.95-5.67, Mann-Whitney U-test, $p=0.05$). Results show a statistically significant correlation between uric acid concentrations and values of the PC 4 score.

Conclusion. MSU and CPP crystals are present in a significant proportion of patients with an acute flare of knee OA for which no inflammation signs could be documented. The presence of MSU crystals correlates with the radiologic severity of the disease. Also, the presence of MSU crystals in the SF is associated with perturbation of the purine metabolism and with a different expression of a number of metabolites pertaining to glycerophospholipid, sphingolipid, prostenoid, sterol, nucleotide and porphyrin classes. The presence of CPP crystals is associated with a higher (more basic) pH of the SF, does not correlate with SERS spectra of the SF, but does correlate with changes of a molecule pertaining to the sphingomyelin class. The results require further studies employing a larger number of patients and also a better match between groups regarding the stage of OA.

General conclusions

1. Raman spectroscopy and SERS applied to the assessment of SF collected from patients with knee OA is able to pinpoint molecular changes accompanying this condition.
2. The use of iodide-modified AgNP allowed selective identification of protein-associated bands within SERS spectra of the SF.
3. SERS spectra of proteins in the SF allowed classification of incipient and advanced stages of knee OA, respectively, with a global precision of 91%.
4. Use of Raman spectroscopy on the SF allowed identification of specific carotenoid bands at 1003 cm^{-1} , 1155 cm^{-1} , and 1512 cm^{-1} . Raman intensities of these bands were higher in the iOA group.
5. Based on the Raman spectra of the carotenoids in the SF, OA stages (aOA, respectively iOA) could be determined with a general precision of 74%.
6. The combined Raman/SERS model of discrimination between knee OA stages increased the specificity, sensitivity and general precision to 100%.
7. The UPLC-QTOF-ESI⁺MS analysis of the SF in iOA and aOA patients shows significant differences in the metabolic profile, depending on the stage of the condition.
8. Untargeted metabolomics of the SF by means of UPLC-QTOF-ESI⁺MS showed a high diversity of molecules that are present in both iOA and aOA. 43 such metabolites were identified, mainly polar lipids. A statistical analysis was carried out only on 9 of them, namely those that were identified in at least 25% of the patients.
9. The following molecules: heme, phosphatidylcholine (20:0/18:2), phosphatidylcholine (18:0/20:2), sphingomyelin (d18:1/16:1), inosine 5'-phosphate, 5',5'-diadenosine diphosphate, estrone 3-sulphate and adenosine thiamine diphosphate showed higher intensities in the aOA group, while ceramide (18:1/20:0) was significantly higher in the iOA group. These molecular species may serve as potential biomarkers in differentiating between the early and advanced stage of the disease.
10. The use of machine learning algorithms random forest and naïve Bayes allowed discrimination between the iOA and aOA groups, with a classification accuracy of 0.80 for random forest and 0.64 for naïve Bayes.
11. CPLM analysis of the SF suggested that occasional CPP and MSU crystals have a significantly higher prevalence in patients with an acute flare of knee OA showing no sign of either systemic or local inflammation.
12. The presence of MSU crystals correlated with the radiologic severity of knee OA, with alterations of the purine metabolism (as was expected), highlighted by the analysis of SERS spectra, but also with the different expression of metabolites pertaining to the classes of glycerophospholipids, sphingolipids, prostenoids, sterols, nucleotides and porphyrins. These molecules may serve

as biomarkers for the discrimination between the groups of patients with and without MSU crystals.

13. The presence of CPP crystals is associated with a higher pH of the SF, does not correlate with SERS spectra of the SF, but does correlate with the change of a molecule pertaining to the sphingomyelin class.
14. The obtained results require further studies, on a larger number of patients with a better match between groups regarding demographic and clinical data of the patients, including comorbidities, medication used, and life style.
15. The possibility to stage molecular classes of OA opens new perspectives in understanding the pathophysiology of the disease, developing specific therapies and enhancing the quality of life of OA patients.

Originality and innovative contributions of the thesis

The present thesis represents a new approach in Romania, by involving modern analytical methods (Raman spectroscopy, SERS, and UPLC-QTOF-ESI⁺MS) in the assessment of the SF of patients with knee OA, in order to gain a deeper insight into the disease's pathophysiology and staging.

The studies described herein are original and bring along a number of innovative aspects, of which we may state:

- adaptation and use of Raman spectroscopy and SERS as fast, sensitive and reproducible methods allowing identification of OA stages (early and advanced, respectively), based on protein and carotenoid-specific bands in the SF spectra;
- designing and employing of a highly accurate classification model for the staging of knee OA by combining Raman and SERS spectra and including them into a single PCA-LDA model;
- implementation of UPLC-QTOF-ESI⁺MS as a sensitive analytic technique in the assessment of SF from knee OA patients and identification of the disease's evolutive stages based on the metabolic profile of the SF;
- identification of several molecules that may represent predictable biomarkers for the progression of knee OA;
- identification of new phenotypes of knee OA in patients with occasional crystals