
TEZĂ DE DOCTORAT

Aplicațiile biotehnologiei în diagnosticul și prognosticul limfoamelor non-Hodgkin

Doctorand **Desmirean Minodora Silvia**

Conducător de doctorat Șef Lucr. dr. **Ciprian Tomuleasa**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Limfoamele non-Hodgkin	19
1.1. Introducere	19
1.2. Epidemiologia limfoamelor Non-Hodgkin	20
1.3. Etiologia limfoamelor Non-Hodgkin	20
1.3.1. Disfuncții imune	20
1.3.1.1. Imunosupresia	20
1.3.1.2. Autoimunitatea	20
1.3.1.3. Statusul atopic	20
1.3.2. Agenții infecțioși	21
1.3.3. Factorii de mediu	21
1.3.4. Factorii genetici	21
1.4. Histopatologia limfoamelor non-Hodgkin	22
1.5. Diagnosticul și evaluarea limfoamelor Non-Hodgkin	22
1.6. Stadializarea limfoamelor Non-Hodgkin	23
1.7. Prognosticul limfoamelor Non-Hodgkin	23
2. Micromediul tumoral al limfoamelor non-Hodgkin	25
2.1. Introducere	25
2.2. Celulele imune	26
2.2.1. Tregs	26
2.2.2. Limfocitele T citotoxice	27
2.2.3. Limfocitele NK	27
2.2.4. Celulele T foliculare helper (T _{FH})	28
2.2.5. Limfocitele B de tip bystander	28
2.3. Celulele stromale	28
2.3.1. Macrofagele asociate limfomului	29
2.3.2. Celulele stem mezenchimale	29
2.3.3. Celule supresoare mieloide	29
2.3.4. Celulele dendritice	30
2.4. Angiogeneza	30
2.5. Componente extracelulare	31
3. Rolul flow-FNA în diagnosticul diferențial al limfoamelor maligne	33
3.1. Introducere	33
3.2. Avantajele și dezavantajele metodei	34
3.3. Indicațiile FNA în cazul limfadenopatiilor	35
3.4. Aspecte tehnice ale FNA	35
3.5. Evaluarea unei probe cu diagnosticul prezumptiv de limfom	36
3.6. Citometria în flux	37
3.7. Importanța și utilitatea FNA-FC	38
4. Rolul spectroscopiei RAMAN în hematologie	39
4.1. Introducere	39
4.2. Principii generale	39

4.2.1. Laserele	40
4.2.2. Fibra optică	41
4.2.3. Spectografe și detectoare	42
4.3. Structuri SERS avansate și principii fundamentale	43
4.4. Tehnici de fabricare a nanoparticulelor și substratelor SERS	43
4.5. Analiza datelor	44
4.6. Aplicații clinice	44
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru	49
2. Studiul 1 – Asocierea alcoolului cu potențiala creștere a incidenței limfoamelor	
2.1. Introducere	53
2.2. Ipoteza de lucru	53
2.3. Material și metodă	54
2.3.1. Cohortă	54
2.3.2. Analiză statistică	55
2.4. Rezultate	55
2.5. Discuții	61
2.6. Concluzii	64
3. Studiul 2 – Corelarea citometriei în flux a FNA cu rezultatul morfopatologic în hemopatiile maligne	65
3.1. Introducere	65
3.2. Ipoteza de lucru	65
3.3. Material și metodă	66
3.3.1. Selectarea pacienților	66
3.3.2. Pregătirea probei de citometrie în flux	67
3.3.3. Imunofenotiparea	67
3.3.4. Histopatologie	69
3.3.5. Analiza datelor	69
3.4. Rezultate	69
3.5. Discuții	77
3.6. Concluzii	79
4. Studiul 3 – Modelul de metilare a ADN-ului bazat pe SERS permite diagnosticul diferențial inițial al unei limfadenopatii maligne. Evaluarea inițială prin compararea unor limfadenopatii reactive, limfoame foliculare cu celule B, limfoame cu celule T periferice NOS și metastaze limfoganglionare de melanom malign	81
4.1. Introducere	81
4.2. Ipoteza de lucru	83
4.3. Material și metodă	84
4.3.1. Pacienții	84
4.3.2. Extracția ADN-ului	85
4.3.3. Analiza SERS	85
4.3.4. Analiza statistică	85
4.4. Rezultate	86
4.5. Discuții	95
4.6. Concluzii	99

5. Concluzii generale	101
6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	103
REFERINȚE	105

INTRODUCERE

Cercetarea medicală are rolul de a oferi soluții eficiente la problemele medicale actuale, care pun în pericol societatea și care nu pot fi manageriate corespunzător. Prin efectuarea studiilor, fie ele descriptive, fundamentale sau clinice, ne dorim identificarea unor soluții de prevenție și profilaxie a unor maladii, de a realiza diagnostice rapide, minim invazive și cât mai corecte, în vederea instituirii unor terapii cât mai eficiente și țintite. Din punct de vedere al impactului pe care îl are asupra societății, cercetarea este o armă puternică de dezvoltare, referindu-ne inclusiv la dezvoltarea economică. Este un domeniu care implică timp, răbdare și totodată resurse vaste pentru atingerea obiectivelor dorite. De asemenea, este un domeniu al performanței și al inovației. Cu alte cuvinte, sistemul medical al unei țări este radiografia situației din prezent, pe când cercetarea medicală arată potențialul de a inova și totodată de a evolua. În ceea ce privește cercetarea și inovarea, pe primele locuri la nivel mondial rămân marile puteri internaționale precum: Statele Unite ale Americii, Japonia, Germania, China și Coreea de Sud. Acest lucru se datorează faptului că aceste națiuni fac eforturi remarcabile în dezvoltarea și implementarea unor strategii naționale de susținere și reglementare a tuturor activităților de cercetare medicală. În România, cercetarea din domeniul medical a fost foarte mult timp neglijată, însă în ultimii ani multe centre din țară au fost dotate cu infrastructură performantă, care permite desfășurarea de studii de cercetare cu mare importanță clinică. De asemenea, granturile de cercetare reprezintă un suport real în vederea aplicării și îndeplinirii obiectivelor propuse. Această teză doctorală a fost realizată cu ajutorul unor astfel de granturi de cercetare, coordonate de domnul dr. Ciprian Tomuleasa, medic specialist hematolog, care este și coordonatorul acestei lucrări științifice. Atingerea obiectivelor din cadrul acestei teze doctorale nu ar fost posibilă fără infrastructura din cadrul departamentului de cercetare MEDFuture și a echipei multidisciplinare din această instituție.

Hematopatiile solide maligne (limfoamele), în ciuda progreselor făcute în ultimul deceniu, rămân o reală problemă de sănătate, atât în ceea ce privește diagnosticul, cât și tratamentul acestora. Limfoamele se împart în două mari categorii: limfoame Hodgkin și limfoame non-Hodgkin. Preocuparea noastră în această lucrare sunt limfoamele non-Hodgkin, care la rândul lor se împart în două subcategorii principale, în funcție de originea lor: limfoame non-Hodgkin mature cu celule B, respectiv limfoame cu origine la nivelul celulelor T/NK. Standardul de aur pentru diagnosticul unei hematopatii maligne este reprezentat în continuare de examenul histopatologic, care implică biopsierea țesutului afectat, care este inclus în parafină, urmând să fie secționat, etalat și colorat în colorația uzuală hematoxilina-eozină. Elaborarea unui diagnostic corect este dependentă de experiența patologului care face analiza microscopică, de calitatea și cantitatea materialului, dar și de colorațiile imunohistochimice, respectiv de tehnicile genetice și citogenetice pe care le are la dispoziție. Această metodă este operator-dependentă, iar printre dezavantaje se enumeră timpul prelungit pentru elaborarea unui diagnostic și costurile relativ crescute. După cum știm din literatura de specialitate, în majoritatea patologiilor neoplazice timpul reprezintă cel mai mare inamic în ceea ce privește managementul și succesul terapeutic la acești pacienți. Astfel, cu cât diagnosticul este întârziat, iar perioada de la debutul simptomatologiei și semnelor clinice este mai mare, cu atât rata succesului terapeutic este mai mică.

Subiectele principale de cercetare ale acestei teze doctorale sunt definite prin impactul nefavorabil ai factorilor exogeni care au posibilitatea de a fi evitați, referindu-ne aici la consumul cronic de alcool și totodată maximizarea resurselor în vederea tranșării unui diagnostic parțial sau definitiv timp-cost eficient, folosindu-ne de platforme și tehnici precum spectroscopia RAMAN, respectiv citometria în flux.

Ca atare, rezultatele prezentate în studiile noastre sunt extrem de promițătoare, raportându-se rate înalte de sensibilitate, specificitate și acuratețe ale tehnicilor evaluate. Trebuie remarcat faptul că metodele investigate au avantajele de a fi minim invazive, rapide și facil de implementat în practica medicală clinică.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ipoteza de lucru

Limfoamele non-Hodgkin (LNH) sunt un grup heterogen de cancere ale țesutului limfatic. Acest grup cuprinde diferite subtipuri, fiecare cu variabilități epidemiologice, etiologice, cu trăsături imunofenotipice și genetice distincte dar și cu tablouri clinice variate. LNH pot fi împărțite în 2 mari

categorii din punct de vedere a prognosticului și evoluției acestora, fiind grupate din punct de vedere clinic în două categorii: agresive sau indolente.

Organizația Mondială a Sănătății (OMS) a identificat consumul cronic de alcool ca fiind unul din primii zece factori de risc în ceea ce privește anii de viață pierduți din cauza mortalității premature. Unul dintre cei mai importanți factori de risc este reprezentat de consumul cronic de alcool, care poate duce la apariția leziunilor maligne.

Puncția aspirativă cu ac fin (FNA) este deseori una dintre primele investigații non-invazive folosite în majoritatea protocoalelor de diagnostic în cazul unui pacient cu limfadenopatie de etiologie neprecizată. Însă în prezent există o controversă privind acuratețea unui diagnostic bazat doar pe FNA, deoarece s-a dovedit faptul că aceasta oferă ocazional rezultate fals negative. Astfel, histologia clasică, în combinație cu citometria de flux (FC), ar crește rata de acuratețe diagnostică, respectiv ar scădea incidența de rezultate fals negative.

Această teză de doctorat cuprinde 3 studii clinice care s-au desfășurat în perioada 2018-2021 în cadrul Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" din Cluj-Napoca, în colaborare cu alte centre internaționale de specialitate.

STUDIUL I: Luând în considerare faptul că alcoolul este implicat atât în etapa de inițiere, cât și în cea de diseminare a cancerului, obiectivul acestei cercetări este dedicat corelării consumului cronic de alcool cu riscul de apariție al limfoamelor cu celule T. Acest studiu pilot de epidemiologie este realizat ca urmare a unei colaborări între "Sixth Medical Center of People's Liberation Army Navy General Hospital" din Beijing, China și Catedra de Hematologie a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" din Cluj-Napoca, România.

STUDIUL II: Obiectivul acestui studiu este reprezentat de eficientizarea diagnosticului LNH folosindu-ne de tehnica minim invazivă - puncție aspirativă cu ac fin (FNA), în combinație cu citometria de flux (FC). Acest studiu este realizat ca urmare a unei colaborări cu Spitalul "Tygerberg" din Cape Town, Africa de Sud și Catedra de Hematologie a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" din Cluj-Napoca, România.

STUDIUL III: Principalul obiectiv al acestui studiu este reprezentat de aplicabilitatea clinică și potențialul spectroscopiei RAMAN-SERS de a diferenția limfadenopatiile benigne de cele maligne, dar nu în ultimul rând de a demonstra potențialul acestei metode în a diferenția principalele două subtipuri de limfoame B și T de metastaze limfoganglionare. Acest studiu a fost realizat la Centrul de Cercetare în Medicină Avansată "MEDFuture" din cadrul Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" din Cluj-Napoca, în colaborare cu Universitatea "Babes-Bolyai" din Cluj-Napoca, România.

Studiu 1. Asocierea alcoolului cu potențiala creștere a incidenței limfoamelor

Ipoteza de lucru

Luând în considerare faptul că alcoolul este implicat atât în etapa de inițiere, cât și în cea de diseminare a cancerului, obiectivul acestei cercetări este dedicat corelării consumului cronic de alcool cu riscul de apariție al limfoamelor cu celule T. Astfel, prezentăm rezultatele unui studiu pilot de epidemiologie realizat ca urmare a unei colaborări între România și China.

Material și metode

În acest studiu au fost incluși pacienți de la „Sixth Medical Center of People's Liberation Army Navy General Hospital” din Beijing, China, sub coordonarea dr. Liren Qian. Colectarea datelor a fost realizată folosindu-se informațiile din foile de observație ale pacienților cu limfoame cu celule T de toate

subtipurile, diagnosticate prin examen histopatologic. Au fost incluși pacienți indiferent de vârstă, sex, regiune geografică, comorbidități sau factori de risc asociați. Incluziunea în acest studiu nu a fost posibilă pentru cazurile în care datele referitoare la consumul de alcool din trecut sau din prezent nu au fost disponibile. Datele din foile de observație ale pacienților au fost introduse într-un fișier Excel, ținându-se cont de caracteristicile demografice și clinice importante alese anterior. Aceste variabile au fost alese în concordanță cu obiectivul studiat, cu scopul de a oferi o imagine completă a subiecților și a caracteristicilor legate de eventualele comorbidități.

Rezultate și concluzii

Pacienții care consumă alcool în mod constant prezintă o tendință de a dezvolta mai frecvent limfoame angioimunoblastice cu celule T (AITL), în timp ce persoanele care nu consumă alcool sunt diagnosticate mai frecvent cu leucemie / limfom cu celule T adulte (ATLL).

Deoarece aceste subtipuri de leziuni maligne sunt entități patologice foarte rar întâlnite în practica medicală, cercetările ar trebui realizate prin studii epidemiologice la scară largă, cu scopul de a obține informații valoroase. Aceste studii cu cohorte mici, cum este și studiul nostru pot reprezenta un prim pas spre realizarea de studii globale, de mare avengură. Din cauza numărului redus de subiecți din studiul nostru, nu a fost posibilă stabilirea unei corelații clare între consumul de alcool și apariția limfoamelor cu celule T.

Toate aceste descoperiri realizate în cadrul cercetării noastre ar trebui puse în evidență în contextul unor cercetări suplimentare.

Studiu 2. Corelarea citometriei în flux a FNA cu rezultatul morfopatologic în hemopatiile maligne

Ipoteza de lucru

În prezent, FC-FNA nu este considerată a fi o procedură de diagnostic fezabilă în cazul apariției unei limfadenopatii, însă reprezintă un pas inițial în procedura de diagnostic. Deși la nivel mondial există multe date disponibile cu privire la utilitatea FC-FNA, în contextul continentului sud-african datele sunt relativ puține. Astfel, prezentul studiu s-a axat pe evaluarea utilității de diagnostic a Flow-FNA la spitalul Tygerberg (TBH) din Cape Town, Africa de Sud.

Material și metodă

În acest studiu am inclus pacienți cu limfadenopatii pentru care s-a practicat FC-FNA la Spitalul Tygerberg din Cape Town, Africa de Sud, în perioada ianuarie 2011 și decembrie 2016. FC-FNA și diagnosticele histologice au reprezentat principalele variabile incluse, pe lângă care au fost adăugate sexul și vârsta pacientului.

Rezultatele citometriei în flux au inclus și caracterizarea populațiilor limfoide atipice sau clonale. Apoi s-a întocmit un raport, care ulterior a fost inclus în diagnosticul citologic final. Pentru fiecare caz în parte s-au folosit panouri standardizate de antigeni.

Fragmentele de țesut prelevate au fost fixate în soluție de formol - 10% formaldehidă. Ulterior, proba a fost inclusă în parafină, obținându-se un bloc de parafină. S-au realizat secțiuni la parafină cu grosimea de 2-3 μm, care mai apoi au fost colorate cu hematoxilină-eozină. Lamele astfel obținute au fost evaluate de medici anatomopatologi, întocmindu-se pentru fiecare probă câte un raport diagnostic, care a inclus și colorațiile imunohistochemice solicitate la fiecare caz în parte.

Rezultate și concluzii

Tehnica FC-FNA utilizând citometrie în flux cu patru culori, așa cum a fost cazul în acest studiu, a reprezentat un instrument de diagnostic util în diagnosticarea limfomelor cu celule B. Cu toate acestea, excluderea completă a unei adenopatii reactive este dificil de realizat, mai ales în cazurile cu înaltă suspiciune de malignitate. De asemenea, este dificilă diagnosticarea cazurilor de limfoame Hodgkin și limfoame cu celule T. Totuși, în țările mai puțin dezvoltate, această tehnică este de mare ajutor în cazul diagnosticării limfoamelor cu celule B, mai ales atunci când prezentarea clinică implică decizii terapeutice imediate sau în cazul unor localizări anatomice dificile.

Studiu 3. Modelul de metilare a ADN-ului bazat pe SERS permite diagnosticul diferențial inițial al unei limfadenopatii maligne. Evaluarea inițială prin compararea unor limfadenopatii reactive, limfoame foliculare cu celule B, limfoame periferice cu celule T - NOS și metastaze limfoganglionare de melanom malign

Ipoteza de lucru

În acest studiu, prin intermediul SERS am analizat ADN-ul extras de la pacienți diagnosticați cu limfoame foliculare cu celule B, limfoame cu celule T periferice - NOS, metastaze limfoganglionare de melanom malign și limfoganglioni cu modificări reactive nespecifice, cu scopul de a demonstra potențialul SERS în diagnosticul rapid al diferitelor tipuri de limfoame Non-Hodgkin.

Material și metodă

Au fost selectate probe tisulare de la pacienți diagnosticați cu limfoame foliculare cu celule B (n=9), limfoame cu celule T periferice NOS (n=9), metastaze limfoganglionare de melanom malign (n=9) și pacienți cu limfadenopatii reactive (n=10). Fragmentele de țesut au fost prelucrate și mai apoi încălzite la 90°C, etapă în care are loc legarea ADN-ului de membrană. ADN-ul pur a fost apoi detașat de pe membrană prin eluare. Pentru achiziția spectrelor SERS din probele tisulare s-a utilizat un spectrometru InVia RAMAN (Renishaw). Toate spectrele SERS au fost obținute prin utilizarea de nanoparticule aparținând aceluiași lot, cu scopul de a evita orice interferențe cauzate de diferențele de substrat SERS.

Rezultate și concluzii

Rezultatele acestui studiu preliminar arată că analiza SERS a ADN-ului extras din probe de țesut limfoganglionar FFPE este capabilă să capteze modificările de metilare asociate cancerului, permițând totodată un diagnostic diferențial rapid între limfoamele foliculare cu celule B și limfoamele cu celule T periferice - NOS.

Am reușit să demonstrăm nu numai faptul că modificările din cele două benzi SERS de la 730 cm⁻¹ și 1005 cm⁻¹ permit diferențierea ADN-ului martor de ADN-ul malign, dar și faptul că pe baza analizei benzii SERS de la 730 cm⁻¹ a fost posibilă diferențierea limfoamelor foliculare cu celule B de limfoamele cu celule T periferice - NOS.

Comparată cu alte metode de analiză a metilării ADN-ului, cum ar fi ELISA sau secvențierea ADN-ului, SERS se remarcă prin faptul că este mai rapidă, având un interval de analiză de câteva minute. Atât rapiditatea, cât și precizia crescută a metodei de diagnostic SERS, fac din aceasta o metodă ideală de diagnostic, care ar trebui luată în considerare în studii ulterioare, având ca scop implementarea acesteia în practica medicală uzuală.

Concluzii generale

Limfoamele cu celule T reprezintă un subtip de leziuni maligne rar întâlnite în practica medicală uzuală, ceea ce de multe ori se traduce prin imposibilitatea de a realiza studii pe cohorte mari de pacienți, toate aceste impedimente reflectându-se asupra datelor statistice obținute. Studiul realizat de noi face parte din categoria studiilor pilot, astfel că unele date obținute nu au reușit să atingă pragul semnificativ statistic din cauza numărului redus de pacienți. Cu toate acestea, am reușit să lansăm ipoteze valide, care în viitor merită testate pe cohorte mai mari.

În ceea ce privește cel de-al doilea studiu realizat de noi, s-a observat faptul că tehnica FC-FNA utilizând citometria în flux cu patru culori, a reprezentat un instrument de diagnostic util în diagnosticarea limfomelor cu celule B, însă în cazul hiperplaziilor reactive, limfoamelor Hodgkin sau a limfoamelor cu celule T, specificitatea și sensibilitatea metodei au fost mult mai reduse. Cu toate acestea, această tehnică și-ar putea dovedi eficiența în țările mai puțin dezvoltate, pentru diagnosticarea limfoamelor cu celule B, mai ales atunci când prezentarea clinică implică un management deosebit sau în cazul unor leziuni cu localizări dificile.

Rezultatele celui de-al treilea studiu arată că analiza SERS a ADN-ului extras din probe de țesut limfoganglionar FFPE reprezintă o tehnică de diagnostic puternică, fiind capabilă să detecteze modificările de metilare asociate leziunilor maligne, permițând în același timp formularea unui diagnostic diferențial rapid între diferite tipuri de limfoame (limfoame foliculare cu celule B și limfoame cu celule T periferice – NOS).

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Originalitatea tezei de doctorat este conferită în mare parte de faptul că în studiile noastre am reușit includerea mai multor pacienți din centre medicale diferite, atât de la nivel național, cât și din alte țări, cum ar fi: Africa de Sud sau chiar China, ceea ce aduce un plus de inovativitate acestei lucrări.

Această lucrare conține unul din primele studii care analizează impactul consumului de alcool asupra riscului de dezvoltare a limfoamelor cu celule T, iar rezultatele obținute sunt promițătoare și pot reprezenta începutul realizării de studii cu cohorte mai mari.

În momentul de față, această lucrare de cercetare este prima care realizează o analiză a metodei SERS ca posibilă metodă de diagnostic a limfoproliferărilor cu celule T. Pentru prima dată în literatura de specialitate am reușit să obținem un diagnostic diferențial al limfoamelor cu celule T, atunci când sunt comparate cu limfoame cu celule B, metastaze limfoganglionare sau limfadenopatii reactive.

Un alt aport important în cercetarea metodelor diagnostice ale limfoproliferărilor maligne îl regăsim în lucrarea noastră, prin implementarea tehnicii FC-FNA, utilizând citometria în flux cu patru culori. S-a demonstrat astfel faptul că această tehnică diagnostică este un instrument util în diagnosticarea limfoamelor cu celule B, aspect care deschide calea unor noi cercetări în ceea ce privește îmbunătățirea metodei, cu scopul de a-i crește sensibilitatea și specificitatea în diagnosticarea limfoamelor cu celule T și limfoamelor Hodgkin.

PhD THESIS

Applications of biotechnology in the diagnosis and prognosis of non-Hodgkin's lymphomas

PhD student **Desmirean Minodora Silvia**

PhD Supervisor: Senior **Lecturer Ph.D. Ciprian Tomuleasa**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Non-Hodgkin's lymphomas	19
1.1. Introduction	19
1.2. Epidemiology of Non-Hodgkin's lymphomas	20
1.3. Etiology of Non-Hodgkin's lymphomas	20
1.3.1. Immune dysfunctions	20
1.3.1.1. Immunosuppression	20
1.3.1.2. Autoimmunity	20
1.3.1.3. Atopic status	20
1.3.2. Infectious agents	21
1.3.3. Environmental factors	21
1.3.4. Genetic factors	21
1.4. Histopathology of non-Hodgkin's lymphomas	22
1.5. Diagnosis and evaluation of Non-Hodgkin's lymphomas	22
1.6. Staging of Non-Hodgkin's lymphomas	23
1.7. Prognosis of Non-Hodgkin's lymphomas	23
2. Tumor microenvironment of non-Hodgkin's lymphomas	25
2.1. Introduction	25
2.2. Immune cells	26
2.2.1. Tregs	26
2.2.2. Cytotoxic T lymphocytes	27
2.2.3. NK lymphocytes	27
2.2.4. T helper follicular cells (T _{FH})	28
2.2.5. Bystander B lymphocytes	28
2.3. Stromal cells	28
2.3.1. Macrophages associated with lymphoma	29
2.3.2. Mesenchymal stem cells	29
2.3.3. Myeloid suppressor cells	29
2.3.4. Dendritic cells	30
2.4. Angiogenesis	30
2.5. Extracellular components	31
3. The role of flow-FNA in the differential diagnosis of malignant lymphomas	33
3.1. Introduction	33
3.2. Advantages and disadvantages of the method	34
3.3. Indications for FNA in lymphadenopathy	35
3.4. Technical aspects of FNA	35
3.5. Evaluation of a sample with a presumptive diagnosis of lymphoma	36
3.6. Flow cytometry	37
3.7. The importance and usefulness of FNA-FC	38
4. The role of RAMAN spectroscopy in hematology	39
4.1. Introduction	39
4.2. General principles	39

4.2.1. Lasers	40
4.2.2. Optical fiber	41
4.2.3. Spectographs and detectors	42
4.3. Advanced SERS structures and fundamental principles	43
4.4. SERS nanoparticle and substrate manufacturing techniques	43
4.5. Data analysis	44
4.6. Clinical applications	44
PERSONA CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis	49
2. Study 1 - The association of alcohol with the potential increase in the incidence of lymphomas	
2.1. Introduction	53
2.2. Working hypothesis	53
2.3. Material and method	54
2.3.1. Cohort	54
2.3.2. Statistical analysis	55
2.4. Results	55
2.5. Discussions	61
2.6. Conclusions	64
3. Study 2 - Correlation of flow cytometry of FNA with the morphopathological result in malignant hematological diseases	65
3.1. Introduction	65
3.2. Working hypothesis	65
3.3. Material and method	66
3.3.1. Patient selection	66
3.3.2. Preparation of the flow cytometry sample	67
3.3.3. Immunophenotyping	67
3.3.4. Histopathology	69
3.3.5. Data analysis	69
3.4. Results	69
3.5. Discussions	77
3.6. Conclusions	79
4. Study 3 - The SERS-based DNA methylation model allows the initial differential diagnosis of malignant lymphadenopathy. Initial evaluation by comparing reactive lymphadenopathy, follicular B-cell lymphomas, peripheral NOS T-cell lymphomas and lymph node metastases of malignant melanoma	81
4.1. Introduction	81
4.2. Working hypothesis	83
4.3. Material and method	84
4.3.1. Patients	84
4.3.2. DNA extraction	85
4.3.3. SERS analysis	85
4.3.4. Statistical analysis	85
4.4. Results	86
4.5. Discussions	95
4.6. Conclusions	99

5. General conclusions	101
6. Originality and innovative contributions of the PhD thesis	103
REFERENCES	105

INTRODUCTION

Medical research aims to provide effective solutions to current medical problems, which endanger society and cannot be properly managed. By conducting studies, whether descriptive, fundamental or clinical, we want to identify solutions for the prevention and prophylaxis of diseases, to make rapid diagnoses, minimally invasive and as accurate as possible, in order to establish the most effective and targeted therapies. In terms of the impact it has on society, research is a powerful weapon of development, including economic development. It is an area that involves time, patience and at the same time vast resources to achieve the desired goals. It is also an area of performance and innovation. In other words, a country's medical system is an x-ray of the current situation, while medical research shows the potential to innovate and evolve. In terms of research and innovation, the world's leading international powers such as the United States, Japan, Germany, China and South Korea remain at the top of the world. This is due to the fact that these nations are making remarkable efforts in developing and implementing national strategies to support and regulate all medical research activities. In Romania, medical research has long been neglected, but in recent years many centers in the country have been equipped with high-performance infrastructure, which has led to the conduct of research studies of great clinical importance. Research grants are also a real support for the implementation and achievement of the proposed objectives. This PhD thesis was carried out with the help of such research grants, coordinated by Dr. Ciprian Tomuleasa, hematologist, who is also the supervisor of this scientific paper. Achieving the objectives of this PhD thesis would not have been possible without the infrastructure of the MEDFuture research department and the multidisciplinary team of this institution.

Malignant solid hematopathies (lymphomas), despite the progress made in the last decade, remain a real health problem, both in terms of their diagnosis and treatment. Lymphomas fall into two broad categories: Hodgkin's lymphomas and non-Hodgkin's lymphomas. Our concern in this paper are non-Hodgkin's lymphomas, which in turn fall into two main subcategories, depending on their origin: mature non-Hodgkin's lymphomas with B cells, and lymphomas originating in T / NK cells. The gold standard for the diagnosis of malignant hematopathy is still represented by histopathological examination, which involves biopsy of the affected tissue, which is included in paraffin, to be sectioned, displayed and stained in the usual hematoxylin-eosin staining. The elaboration of a correct diagnosis is dependent on the experience of the pathologist who makes the microscopic analysis, on the quality and quantity of the material, but also on the immunohistochemical stains, respectively on the genetic and cytogenetic techniques he has at his disposal. This method is operator-dependent, and the disadvantages include the extended time to develop a diagnosis and the relatively high costs. As we know from the literature, in most neoplastic pathologies, time is the biggest enemy in terms of management and therapeutic success in these patients. Thus, the longer the diagnosis is delayed, and the longer the period from the onset of symptoms and clinical signs, the lower the rate of therapeutic success.

The main research topics of this PhD thesis are defined by the unfavorable impact of exogenous factors that can be avoided, referring here to chronic alcohol consumption and at the same time maximizing resources in order to make a partial or definitive diagnosis cost-effective, using platforms and techniques such as RAMAN spectroscopy and flow cytometry.

As such, the results presented in our studies are extremely promising, reporting high rates of sensitivity, specificity and accuracy of the evaluated techniques. It should be noted that the investigated methods have the advantages of being minimally invasive, fast and easy to implement in clinical medical practice.

PERSONAL CONTRIBUTION

Working hypothesis

Non-Hodgkin's lymphomas (NHL) are a heterogeneous group of lymphatic tissue cancers. This group includes different subtypes, each with epidemiological and etiological variability, with distinct immunophenotypic and genetic traits but also with various clinical pictures. NHL can be divided into 2 broad categories in terms of prognosis and their evolution, being grouped clinically into two categories: aggressive or indolent.

The World Health Organization (WHO) has identified chronic alcohol consumption as one of the top ten risk factors for years of life lost due to premature mortality. One of the most important risk factors is chronic alcohol consumption, which can lead to malignant lesions.

Fine needle aspiration (FNA) is often one of the first non-invasive investigations used in most diagnostic protocols in a patient with lymphadenopathy of unspecified etiology. But now there is controversy over the accuracy of a diagnosis based solely on FNA, as it has been shown to occasionally provide false negative results. Thus, classical histology, in combination with flow cytometry (FC), would increase the diagnostic accuracy rate, respectively decrease the incidence of false negative results.

This PhD thesis includes 3 clinical studies that took place in 2018-2021 at the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy in Cluj-Napoca, in collaboration with other international specialized centers.

STUDY I: Considering that alcohol is involved in both the stage of initiation and the spread of cancer, the aim of this research is dedicated to correlating chronic alcohol consumption with the risk of developing T-cell lymphomas. This pilot epidemiology study is conducted as a result of a collaboration between the Sixth Medical Center of People's Liberation Army Navy General Hospital in Beijing, China and the Department of Hematology of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy in Cluj-Napoca, Romania.

STUDY II: The objective of this study is to streamline the diagnosis of NHL using the minimally invasive technique - fine needle aspiration (FNA), in combination with flow cytometry (FC). This study is conducted as a result of a collaboration with "Tygerberg" Hospital in Cape Town, South Africa and the Department of Hematology of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy in Cluj-Napoca, Romania.

STUDY III: The main objective of this study is the clinical applicability and potential of RAMAN-SERS spectroscopy to differentiate benign from malignant lymphadenopathy, but last but not least to demonstrate the potential of this method in differentiating the two main subtypes of B and T lymphomas of lymph node metastases. This study was conducted at the Advanced Medicine Research Center "MEDFuture" within the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy in Cluj-Napoca, in collaboration with the "Babes-Bolyai" University in Cluj-Napoca, Romania.

Study 1. The association of alcohol with the potential increase in the incidence of lymphomas

Working hypothesis

Considering the fact that alcohol is involved in both the initiation stage and the spread of cancer, the aim of this research is dedicated to correlating chronic alcohol consumption with the risk of T-cell lymphomas. Thus, we present the results of a pilot epidemiology study carried out as a result of a collaboration between Romania and China.

Material and methods

This study included patients from the Sixth Medical Center of the People's Liberation Army Navy General Hospital in Beijing, China, under the coordination of Dr. Liren Qian. Data collection was performed using information from observation sheets of patients with T-cell lymphomas of all subtypes, diagnosed by histopathological examination. Patients were included regardless of age, sex, geographical region, comorbidities or associated risk factors. Inclusion in this study was not possible for cases where past or current alcohol data were not available. Data from patient observation sheets were entered into an Excel file, taking into account previously important demographic and clinical characteristics. These variables were chosen in accordance with the studied objective, in order to provide a complete picture of the subjects and the characteristics related to possible comorbidities.

Results and conclusions

Patients who consistently consume alcohol have a tendency to develop angioimmunoblastic T-cell lymphomas (AITL) more frequently, while people who do not consume alcohol are more frequently diagnosed with adult T-cell leukemia / lymphoma (ATLL).

Because these subtypes of malignant lesions are very rare pathological entities in medical practice, research should be conducted through large-scale epidemiological studies in order to obtain valuable information. These studies with small cohorts, as well as our study can be a first step towards conducting global, high-profile studies. Due to the small number of subjects in our study, it was not possible to establish a clear correlation between alcohol consumption and the distribution of T-cell lymphomas.

All these findings made in our research should be highlighted in the context of further research.

Study 2. Correlation of flow cytometry of FNA with morphopathological outcome in malignant hematological diseases

Working hypothesis

În acest studiu am inclus pacienți cu limfadenopatii pentru care s-a practicat FC-FNA la Spitalul Tygerberg din Cape Town, Africa de Sud, în perioada ianuarie 2011 și decembrie 2016. FC-FNA și diagnosticul histologic au reprezentat principalele variabile incluse, pe lângă care au fost adăugate sexul și vârsta pacientului.

Rezultatele citometriei în flux au inclus și caracterizarea populațiilor limfoide atipice sau clonale. Apoi s-a întocmit un raport, care ulterior a fost inclus în diagnosticul citologic final. Pentru fiecare caz în parte s-au folosit panouri standardizate de antigeni.

Fragmentele de țesut prelevate au fost fixate în soluție de formol - 10% formaldehidă. Ulterior, proba a fost inclusă în parafină, obținându-se un bloc de parafină. S-au realizat secțiuni la parafină cu grosimea de 2-3 μm , care mai apoi au fost colorate cu hematoxilină-eozină. Lamele astfel obținute au fost evaluate de medici anatomopatologi, întocmindu-se pentru fiecare probă câte un raport diagnostic, care a inclus și colorațiile imunohistochimice solicitate la fiecare caz în parte.

Material and method

In this study we included patients with lymphadenopathy for whom FC-FNA was performed at Tygerberg Hospital in Cape Town, South Africa, between January 2011 and December 2016. FC-FNA and histological diagnoses were the main variables included, in addition to the sex and age of the patient that were added.

Flow cytometry results also included characterization of atypical or clonal lymphoid populations. A report was then prepared, which was later included in the final cytological diagnosis. Standardized antigen panels were used for each case.

The sampled tissue fragments were fixed in formalin solution - 10% formaldehyde. Subsequently, the sample was embedded in paraffin, obtaining a block of paraffin. Paraffin sections with a thickness of 2-3 μm were made, which were then stained with hematoxylin-eosin. The films thus obtained were evaluated by pathologists, drawing up for each sample a diagnostic report, which also included the immunohistochemical stains required in each case.

Results and conclusions

The FC-FNA technique using four-color flow cytometry, as was the case in this study, was a useful diagnostic tool in the diagnosis of B-cell lymphomas. However, the complete exclusion of a reactive lymphadenopathy is difficult to achieve, especially in cases with a high suspicion of malignancy. It is also difficult to diagnose cases of Hodgkin's lymphoma and T-cell lymphoma. However, in less developed

countries, this technique is very helpful in diagnosing B-cell lymphoma, especially when the clinical presentation involves immediate therapeutic decisions or in the case of difficult anatomical locations.

Study 3. The SERS-based DNA methylation model allows the initial differential diagnosis of malignant lymphadenopathy. Initial evaluation by comparison of reactive lymphadenopathy, follicular B-cell lymphomas, peripheral T-cell lymphomas - NOS and lymph node metastases of malignant melanoma

Working hypothesis

In this study, through SERS we analyzed DNA extracted from patients diagnosed with B-cell follicular lymphomas, NOS peripheral T-cell lymphomas, lymph node metastases of malignant melanoma and lymph nodes with nonspecific reactive changes, in order to demonstrate the potential SERS in the rapid diagnosis of various types of Non-Hodgkin's lymphomas.

Material and method

Tissue samples were selected from patients diagnosed with B-cell follicular lymphomas (n = 9), NOS peripheral T-cell lymphomas (n = 9), lymph node metastases of malignant melanoma (n = 9), and patients with reactive lymphadenopathy (n= 10). The tissue fragments were processed and then heated to 90 ° C, the stage at which DNA binding to the membrane takes place. The pure DNA was then detached from the membrane by elution. An InVia RAMAN (Renishaw) spectrometer was used to acquire the SERS spectra from the tissue samples. All SERS spectra were obtained by using nanoparticles belonging to the same batch, in order to avoid any interference caused by SERS substrate differences.

Results and conclusions

The results of this preliminary study show that SERS analysis of DNA extracted from FFPE lymph node tissue samples is able to detect cancer-associated methylation changes, while allowing a rapid differential diagnosis between follicular B-cell lymphomas and NOS peripheral T-cell lymphomas.

We were able to demonstrate not only that the changes in the two SERS strips from 730 cm^{-1} and 1005 cm^{-1} allow the differentiation of the control DNA from the malignant DNA, but also that based on the analysis of the SERS band from 730 cm^{-1} it was possible to differentiate follicular B-cell lymphomas from NOS peripheral T-cell lymphomas.

Compared to other methods of DNA methylation analysis, such as ELISA or DNA sequencing, SERS is notable for being faster, with an analysis interval of a few minutes. Both the rapidity and the increased accuracy of the SERS diagnostic method make it an ideal diagnostic method, which should be considered in further studies, with the aim of implementing it in routine medical practice [1].

General conclusions

T-cell lymphomas are a subtype of malignant lesions rarely found in routine medical practice, which often results in the inability to conduct studies on large cohorts of patients, all these impediments being reflected in the statistical data obtained. The study conducted by us is part of the category of pilot studies, so that some data obtained failed to reach the statistically significant threshold due to the small number of patients. However, we managed to launch valid hypotheses, which in the future are worth testing in larger cohorts.

Regarding our second study, it was observed that the FC-FNA technique using four-color flow cytometry was a useful diagnostic tool in the diagnosis of B-cell lymphomas, but in the case of reactive hyperplasias, Hodgkin's lymphomas or T-cell lymphomas, the specificity and sensitivity of the method

were much lower. However, this technique could prove effective in less developed countries for the diagnosis of B-cell lymphomas, especially when the clinical presentation involves special management or in the case of lesions with difficult locations.

The results of the third study show that SERS analysis of DNA extracted from FFPE lymph node tissue samples is a powerful diagnostic technique, being able to detect methylation changes associated with malignant lesions, while allowing a rapid differential diagnosis between different types of lymphomas (follicular B-cell lymphomas and NOS peripheral T-cell lymphomas).

Originality and innovative contributions of the thesis

The originality of the PhD thesis is largely due to the fact that in our studies we managed to include several patients from different medical centers, both nationally and from other countries, such as: South Africa or even China, which brings an extra innovation to this thesis.

This paper contains one of the first studies analyzing the impact of alcohol consumption on the risk of developing T-cell lymphomas, and the results obtained are promising and may represent the beginning of studies with larger cohorts.

Currently, this research paper is the first to perform an analysis of the SERS method as a possible method of diagnosis of T-cell lymphoproliferations. For the first time in the literature we managed to obtain a differential diagnosis of T-cell lymphomas, when compared to B-cell lymphomas, lymph node metastases or reactive lymphadenopathy.

Another important contribution in the research of the diagnostic methods of malignant lymphoproliferations is found in our work, by implementing the FC-FNA technique, using four-color flow cytometry. It has been shown that this diagnostic technique is a useful tool in the diagnosis of B-cell lymphomas, which paves the way for further research to improve the method, in order to increase its sensitivity and specificity in the diagnosis of T-cell lymphomas and Hodgkin's lymphomas.