



CONTRACTUL DE FINANȚARE NR. 649PED din 24/06/2022, Cod depunere: PN-III-P2-2.1-PED-2021-2146

**Titlul Proiectului: Metoda combinata bazata pe imagistica hiperspectrala si investigatii biologice de evaluare a efectelor unor factori naturali terapeutici in afecțiuni din sfera patologiei Neuro-Mio-Arto-Kinetice**

Proiectul BIOHIS își propune să dezvolte, să testeze și să valideze o nouă metodă de bioinginerie, utilizând date corelate de imagistică hiperspectrală (HSI) și investigații biologice pentru evaluarea eficacității terapeutice a factorilor terapeutici naturali, cum ar fi nămolul sau apele minerale sulfuroase naturale, în sfera de patologie Neuro-Mio-Arto-Kinetică.

<https://biohis.projects.umfiasi.ro/>

## Raport științific și tehnic

### Etapa de execuție nr. 1 / 2022

**Contract nr.: 649PED/2022**

**Etapa nr.1/2022: Dezvoltarea metodei BIOHIS**

**Cod proiect: PN-III-P2-2.1-PED-2021-2146**

**Titlul proiectului:** Metoda combinată bazată pe imagistică hiperspectrală și investigații biologice de evaluare a efectelor unor factori naturali terapeutici în afecțiuni din sfera patologiei Neuro-Mio-Arto-Kinetice (BIOHIS)

- **Descrierea științifică cu punerea în evidență a rezultatelor etapei anuale și gradul de realizare a obiectivelor;**

**Etapa 1** din cadrul proiectului BIOHIS are ca obiectiv principal dezvoltarea unei noi metode de bioinginerie - metoda BIOHIS - dedicată evaluării eficacității terapeutice a factorilor terapeutici naturali cum sunt nămolul sau apele minerale sulfuroase naturale asupra diferitelor patologii Neuro-/Myo-/Arto-/Kinetice (NMAK). Metoda BIOHIS se bazează pe combinarea informațiilor furnizate de tehnica de imagistica hiperspectrală (HSI) cu date obținute din investigații biologice care să conduca la evidențierea cantitativa a efectelor factorilor terapeutici naturali și utilizarea lor ca remedii naturale pentru patologia NMAK.

Imagistica hiperspectrală (HSI) este o tehnica emergenta in domeniul medical care integreaza facilitatile oferite de imagistica digitala si spectroscopie pentru a colecta simultan atat informatii spatiale cat si spectrale despre un tesut/organ care permit o descriere fina a structurii/compozitie chimice a tesuturilor investigate ce poate fi utila medicilor in procesul de diagnosticare sau monitorizare a tratamentelor medicale. Posibilitatea utilizarii combinate a unor astfel de informatii spectrale-spatiale furnizate de tehnica HSI cu date obținute din investigații biologice este explorata in cadrul dezvoltarii metodei BIOHIS propuse in acest proiect.

Factorii terapeutici naturali, precum nămolul și apele terapeutice minerale sulfuroase, sunt utilizati în sanatorii și clinici de recuperare prin băi sau aplicații topice pe corp pentru multe afecțiuni în patologia Neuro-Mio-Arto-Kinetica (NMAK). Efectele aplicațiilor topice ale factorilor naturali asupra țesuturilor sănătoase și patologice ar putea fi explorate prin electromiografie (EMG), pulsoximetrie și investigații biologice, folosind diferiți parametri sanguini și biochimici, sau prin metode indirekte, clinice, folosind diverse scale, din activitatea de evaluare medicală, ca și pentru durere (VAS-Visual Analog Scale), pentru capacitatea de mișcare (Range of Motion), sau îmbunătățirea efectuarii activităților de zi cu zi.

Spectrul de afecțiuni patologice legate de aparatul NMAK include artroze, artrită, spondilită, lezuni traumatici, accident vascular cerebral, boli neurodegenerative, disfuncție a tonusului muscular și mobilitate articulară – spasticitate; patologia sistemului nervos periferic: radiculopatii discogene și/sau vertebrogene, poli-radiculonevrite, amputații ale membrelor, nervi periferici post-COVID-19 sau sechele ale sistemului nervos central, osificări heterotopice neurogene, patologie musculo-scheletică traumatică, inclusiv boli degenerative, fracturi; pentru osteoartrita în

special pe articulațiile șoldului, genunchi invalidante, contuzii, contractii/retractii muscularare, algoneurodistrofii, escare, sau arsuri.

Studiile privind factorii terapeutici naturali indică adesea în concluziile lor lipsa de fundamentare științifică a multor practici terapeutice care utilizează remedii balneare. Metodele biologice utilizate pentru evaluarea eficacității terapeutice a factorilor terapeutici naturali nu sunt activități obișnuite pentru sanatoriile sau centrele de recuperare din întreaga lume și, din aceste motive, activitățile de cercetare asupra remediilor balneare sunt la un nivel foarte scăzut. De asemenea, este o mare problemă lipsa de preocupare pentru dezvoltarea metodelor de evaluare a efectelor terapeutice ale factorilor naturali utilizați în stațiunile balneare și a protoocoalelor de tratament actualizate, chiar dacă există câteva posibilități de evaluare. Această situație necesită o prioritizare specifică, luând în considerare importanța bioeconomică a turismului de sănătate și, pe de altă parte, importanța ridicată a unor astfel de cercetări pentru înțelegerea problemelor de sănătate legate de factorii terapeutici naturali, mai ales acum când trebuie să luăm în considerare conceptele de medicină personalizată sau medicină bazată pe dovezi.

Totuși, din considerente psihosociale și istorice, putem observa că interesul pentru factorii terapeutici naturali este destul de ridicat și centrele balneare sunt foarte populare pentru cure de tratament, bazate pe renume tradițional, în România, Franța, Spania, Italia sau Japonia.

Acest proiect se confruntă cu lacunele identificate, promovând cercetarea remediilor naturale și punctând valoarea acestora pentru Bioeconomie și încearcă să dezvolte o nouă ramură a cercetării biotecnologice, conectând instrumente de cercetare de vîrf, cum ar fi instrumente de imagistică hiperspectrală și tehnici de culturi celulare, cu remedii utilizate în mod tradițional, în principal pe baze empirice, creionând noi perspective bioeconomice și dimensiuni de sănătate, găsirea de noi modalități de a sublinia specializarea intelligentă și prioritatea publică, deschizând noi căi pentru cercetare, inovare și dezvoltare.

Proiectul BIOHIS își propune să dezvolte, să testeze și să valideze o nouă metodă de bioinginerie, folosind date combinate ale instrumentelor de imagistică hiperspectrală (HIS) cu investigații biologice pentru evaluarea eficacității terapeutice a factorilor terapeutici naturali, cum ar fi nămolul sau apele minerale sulfuroase naturale, în sfera patologiei NMAK.

Spre deosebire de abordările actuale care iau în considerare doar parametri biologici discreți, cum ar fi parametrii de laborator hematologici sau de biochimie, electromiografia invazivă sau scalele clinice ca instrumente de măsurare, proiectul BIOHIS va putea exploata atât contextul spațial, cât și corelația spectrală, dar și informații biologice intime pentru o mai bună înțelegere a efectelor factorilor terapeutici naturali.

Proiectul BIOHIS este aliniat cu toate direcțiile de cercetare incluse în domenii de specializare intelligentă sau de prioritate publică care urmăresc să transfere cunoștințe științifice în valoare adăugată bioeconomică și societală. Peloterapia sau terapia cu nămol este o metodă balneară care declanșează reacții tisulare locale și funcționale generale, inhibând sau activând unele enzime intermediare și sisteme de metaboliți, dar mecanismele sale de acțiune asupra anumitor patologii sunt înțelese complet.

Lucrarea de pionierat a echipei de proiect în acest domeniu este inspirată de progresele recente în stadiul tehnicii, de exemplu, gazele naturale terapeutice, precum hidrogenul sulfurat, prezente în nămol și apele minerale sulfuroase, ne oferă legătura necesară cu curentul principal al fluxului de cunoștințe, pentru comunitatea științifică mondială.

Abordarea inedită propusă de proiectul BIOHIS reprezintă un progres semnificativ în medicina fizică și de recuperare și balneoclimatologie și ținând cont de numărul crescut de persoane în vîrstă și piramidele demografice dezechilibrate, acest proiect putând reprezenta o punte între știință și nevoile societății.

Aspectele originale și inovatoare ale proiectului BIOHIS sunt următoarele:

- ✓ originalitatea metodei de bioinginerie dedicată evaluării eficacității terapeutice a factorilor terapeutici naturali (inclusiv în recuperarea sechelelor post-COVID-19);
- ✓ aplicarea pentru prima dată, după cunoștințele noastre, a imagisticii hiperspectrale în evaluarea terapeutică a nămolului și apei, anterior fiind stabilită fezabilitatea acestei posibilități pe voluntari individuali sănătoși.

- ✓ evaluarea oxigenării locale a țesuturilor ca nou instrument de monitorizare a eficacității diagnostice și terapeutice;
- ✓ fuziunea datelor de date imagistice biologice și hiperspectrale, obținerea unui nou set de date pentru evaluarea și metoda de monitorizare a terapiei balneare pentru aplicații topice de nămol și ape sulfuroase;
- ✓ patologia neuro-/mio-/arto-/kinetică indusă experimental la animalele de laborator.

Originalitatea și noutatea proiectului țin cont de combinarea investigațiilor biologice cu imagistica hiperspectrală pentru caracterizarea substanțelor biologic active/factorilor terapeutici naturali precum peloidele și apele minerale sulfuroase printr-o nouă metodă originală, denumită metoda BIOHIS. Cu această metodă, care include imagistică hiperspectrală și investigații biologice, aplicată în premieră pentru evaluarea eficacității terapeutice a factorilor terapeutici naturali, putem valida efectele terapeutice ale acestor remedii balneare asupra culturilor de celule fibroblaste, șobolani Wistar și subiecți umani, sănătoși sau cu patologia Neuro-/Myo-/Arto-/Kinetică, principala recomandare pentru utilizarea clinică a stațiunilor balneare.

#### ➤ **Obiectivele proiectului, corelarea acestora cu rezultatul proiectului**

- **Obiectivul general** al proiectului BIOHIS este de a dezvolta, testa și valida o nouă metodă interdisciplinară de bioinginerie pentru evaluarea eficacității terapeutice a factorilor terapeutici naturali, cum ar fi nămolul și apele minerale naturale sulfuroase, folosind o combinație de imagistică hiperspectrală (HIS) cu investigații biologice. Pentru atingerea obiectivului general se vor implementa următoarele obiective specifice:
- **OS1. Dezvoltarea metodei BIOHIS** care exploatează avantajele unor biotehnici pentru a evidenția efectele sanogene ale factorilor terapeutici naturali asupra diferitelor patologii NMAK. Rezultatele așteptate ale acestui obiectiv specific sunt: i) o metodă care permite evaluarea eficacității terapeutice a factorilor terapeutici naturali; ii) înțelegerea utilizării apelor sulfuroase și nămolului ca remedii naturale;
- **OS2. Testarea și validarea metodei BIOHIS** pe celule fibroblaste, animale de laborator și subiecți umani pentru a ne asigura că: (i) rezultatele sunt fezabile și utile din punct de vedere medical și (ii) rezultatele sunt în acord cu cele obținute prin electromiografie și pulsoximetrie. Rezultatele așteptate sunt: 1) date biologice la nivel celular, molecular și sistemic pe animale de laborator și subiecți umani privind efectele nămolului și apelor minerale sulfuroase, având în acest fel argumente științifice pentru utilizarea medicală a acestora; 2) metodologia inducerii experimentale de patologii NMAK la animale de laborator; 3) o procedură specifică de validare care descrie operațiile de comparare a rezultatelor metodei cu datele electromiografiei/pulsoximetriei.
- **OS3. Diseminarea rezultatelor.** Toate rezultatele obținute vor fi diseminate public în fluxul de date național și internațional, realizând pagina web a proiectului, publicând articole și prezentări la congres/conferințe, ca bune practici în cercetare și inovare, contribuind la multiplicarea cunoșterii.

Metoda BIOHIS se bazează pe conceptele existente de utilizare a imagisticii hiperspectrale (HSI) pentru diagnosticul în alte afecțiuni medicale și pe conceptele existente privind proprietățile terapeutice ale factorilor naturali. Nivelul tehnologic parcurs este de la TRL2 la TRL4:

**TRL 2** – Deși există date despre efectele antiinflamatorii ale nămolului și apelor minerale sulfuroase, linia de gândire a proiectului este de a obține o nouă metodă de bioinginerie pentru a evalua și explica eficacitatea terapeutică a acestor remedii naturale. În ceea ce privește metoda noastră originală de bioinginerie BIOHIS prin care interconectăm investigațiile biologice, cu imagistica hiperspectrală, combinarea și interpretarea interferată a datelor colectate la nivel celular, animal și uman al nămolului și apelor minerale sulfuroase reprezintă câștigul inițial al proiectului nostru.

**TRL 3** – Dovada experimentală se realizează prin studii experimentale pe culturi de celule fibroblastice și pe animale de laborator. La acest nivel, informațiile, având rolul de a explica mecanismele celulare, moleculare și sistémice implicate în efectele terapeutice ale nămolului și apelor minerale sulfuroase vor fi furnizate prin metoda noastră originală BIOHIS, care ne poate conduce către stațiunile biologice intime ale efectele lor.

**TRL 4** – Tehnologie validată în laborator, este nivelul TRL atins după implementarea proiectului, fapt argumentat de condițiile de laborator pentru explicarea efectelor asupra sănătății aplicațiilor topice ale nămolului și apelor minerale sulfuroase la subiecți umani în grupuri mici de voluntari sănătoși și pacienți cu NMAK. Astfel de studii nu sunt studii clinice de ampioare cu reguli randomizate și studii dublu-orb ca în cazul produselor farmaceutice industriale, necesare

poate în viitoarele niveluri de testare a produselor cu efecte terapeutice precum creme sau loțiuni. Explicațiile științifice ale efectelor terapeutice ale nămolului și apelor minerale sulfuroase vor reprezenta la sfârșitul implementării proiectului validarea noii noastre metode BIOHIS care va fi eventual utilizată în viitor pentru testarea/evaluarea eficacității terapeutice a unor factori naturali similari precum alte tipuri de ape minerale, nămoluri, mofeturi,

produse climatice sau sanatoase precum creme sau lotiuni. În final, proiectul generează un nou instrument biotecnologic util pentru balneoterapie.

#### Prezentarea rezultatelor etapei anuale și gradul de realizare a obiectivelor.

Mișcarea umană este considerată un proces complex și multifactorial care are loc ca urmare a interacțiunii dintre corp și mediu. Mișcarea este rezultatul acțiunilor de control al sistemului nervos și al tuturor structurilor care formează o articulație (adică ligamente, tendoane, mușchi, fascicule, vase de sânge, nervi etc.). Sistemul Neuro-Mio-Arto-Kinetic (NMAK) poate fi afectat de multe afecțiuni.

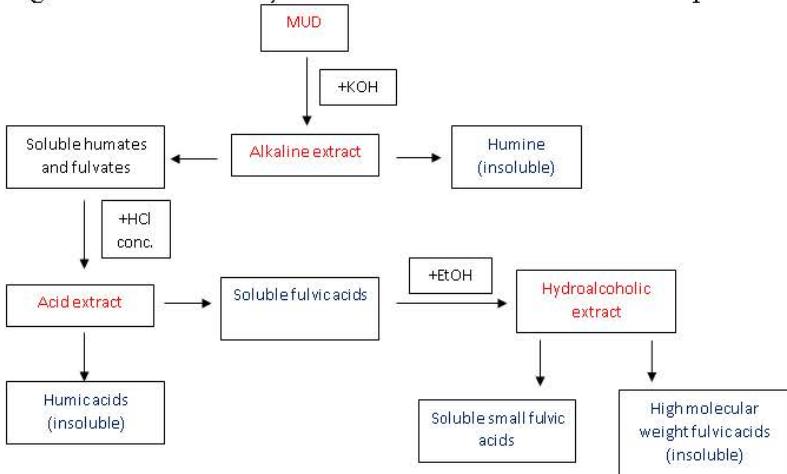
Factorii terapeutici naturali sunt utilizati ca remedii de o lungă perioadă de timp pentru tratamentul patologiilor NMAK. EMG permite stabilirea unui electrodiagnostic pentru patologiile sistemului nervos periferic sau muscular și implică două moduri distincte de colectare a semnalelor electrice de la mușchi: cea invazivă numită electromiografie cu ac (EMG), și a doua neinvazivă numită studiu de conducere nervoasă. În prezent, testarea și înțelegerea răspunsului corpului uman la peloterapie continuă să fie o provocare pentru specialiștii care caută soluții terapeutice alternative pentru diferite patologii.

Datele științifice anterioare spun că, în timpul procesului inflamator, sunt recrutate diferite tipuri de celule, inclusiv fibroblaste, care răspund la diferite semnale intercelulare și de micromediu. Acest lucru duce la producerea reglementată a diferenților mediatori pro și antiinflamatori, inclusiv citokine, cum ar fi factorul de necroză tumorală (TNF)- $\alpha$  și interleukine (IL)-1 $\beta$  și IL-6, chemokine și enzime cum ar fi ciclooxygenaza (COX) -2, toate care joacă roluri critice în controlul procesului inflamator. Conceptul de stres oxidativ cauzat de radicalii liberi reprezintă argumente pentru luarea în considerare a biomarkerilor stresului oxidativ. Activitatea oxidativă și reductivă a enzimelor care acționează asupra glutationului, tioredoxinei și altor substraturi de interes în procesul de oxidare-reducere reflectă nu numai nivelul de protecție antioxidantă, dar sunt și biomarkeri relevanți pentru bolile degenerative reumatice.

În studiile anterioare asupra nămolului terapeutic a fost prezentată fracionarea substanțelor humice. Schema de fracionare a substanțelor humice din nămolul terapeutic folosind variația pH-ului și polaritatea solventului și a fost caracterizată spectrofotometric pe baza absorbției în intervalul de lungimi de undă 340- 700 nm acizi humici și acizi fulvici diferențiați pe baza solubilității și a masei moleculare.

În cazul apelor minerale naturale sulfuroase, efectul protector al H<sub>2</sub>S asupra neuronilor este exprimat împotriva stresului oxidativ prin creșterea substratului pentru producerea antioxidantului GSH, inclusiv a antiporterului cistină/glutamat și a concentrațiilor intracelulare de Cys.

H<sub>2</sub>S are proprietăți vasculoprotectoare în celulele endoteliale și celulele musculare netede vasculare, cum ar fi declanșarea vasorelaxării și scăderea agregării trombocitelor. H<sub>2</sub>S activează,



posibil, canalele voltaj ale membranei plasmaticice (canale  $\text{Ca}^{2+}$  de tip L și T) și depozitele intracelulare de  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizate. În plus, s-a descoperit că  $\text{H}_2\text{S}$  endogen activează canalele de clor ( $\text{Cl}^-$ ) și canalele de potasiu ( $\text{K}^+$ ), oferind efecte neuroprotective. Donatorii de  $\text{H}_2\text{S}$  sau apele minerale bogate în conținut de  $\text{H}_2\text{S}$  vizează multiple mecanisme fiziopatologice.

Imaginile hiperspectrale sunt produse de instrumente numite sisteme de imagistică hiperspectrale sau spectrometre de imagistică. HSI combină posibilitățile oferite de tehnici spectroscopice cu avantajele imaginii digitale. Conține într-o achiziție a unei serii de imagini în multe benzi spectrale înguste adiacente și reconstrucția spectrului de reflectare pentru fiecare pixel al imaginii. Setul de imagini astfel obținute (de obicei zeci sau sute de imagini) se numește hipercub. Hipercubul imaginii are trei dimensiuni: două dimensiuni reprezentă coordonatele spațiale a unui pixel și o dimensiune dă lungimea de undă a unei anumite benzi spectrale. Pe baza HSI, membru al consorțiului, INOE2000, prin proiectul - Programul de Cercetare Nr. PN 16-400101/2016, a dezvoltat o nouă metodă de măsurare a saturației de oxigen în diferite medii clinice. Această metodă constă în esență din trei pași distincti: (1) imagini hiperspectrale ale achiziției regiunii investigate, (2) procesarea imaginilor hiperspectrale și (3) analiza imaginilor hiperspectrale utilizând un model de dezmixare spectrală bazat pe o lege Beer-Lambert modificată. Metoda generează atât hărți de oxihemoglobină și deoxihemoglobină, cât și o hartă de saturație în oxigen a regiunii investigate. Imaginea de test include o gamă largă de valori uzuale ale parametrilor analizați (concentrația de oxihemoglobină, concentrația de deoxihemoglobină și factorul G) cu variații foarte fine, permitând simularea unui număr foarte mare de situații posibile.

În ultimele câteva decenii, imagistica hiperspectrală (HSI) a câștigat importanță și un rol central în multe domenii ale analizei datelor vizuale. Foarte recent, HSI a primit o atenție substanțială pentru aplicațiile de imagine medicală (de exemplu, evaluarea bolii vasculare periferice, prognosticul ulcerului piciorului diabetic, extinderea tumorii, evaluarea terapiei cu oxigen, evaluarea hipoxiei la altitudine etc.) și devine din ce în ce mai mult o modalitate de cercetare activă. În acest moment, nu există alte echipe în lume care să utilizeze imagistica hiperspectrală pentru evaluarea eficacității tratamentului balnear și putem susține că ideile noastre de pionierat pot influența dezvoltarea medicinei de recuperare și a balneologiei.

Imagistica hiperspectrală este o tehnică non-invazivă. Propunerea de proiect se va concentra pe exploatarea sinergiei datelor hiperspectrale cu datele biologice pentru a aborda problema evaluării și explicarea la nivel biologic a efectelor terapeutice ale factorilor naturali asupra țesuturilor vii, influențând starea noastră de sănătate.

Echipa are o experiență semnificativă privind aplicații ale HSI în medicină, în învățarea clasificării bazate pe mașini a imaginilor HSI, pentru investigații biologice, modelare matematică și analiză statistică. Membrii echipei au dezvoltat software care ar putea genera hărți ale concentrațiilor de oxi- și deoxihemoglobină în dermă (cu aplicații în monitorizarea peloterapiei, monitorizarea oxigenoterapiei hiperbare, medicina de mare altitudine, monitorizarea lamboului cutanat), au fost utilizate mai multe metode de clasificare a imaginilor HSI pentru a caracteriza rănilor deschise și arsurile (inclusiv un indice spectral de arsuri original), s-au comparat mai multe metode de clasificare a mașinilor de învățare pentru HSI a arsurilor (spectral angler mapper vs suport vector). mașină) sau ulcere ale piciorului diabetic (tehnica distanței minime, mapper spectral angler, suport vector machine, divergență de informații spectrale).

Noua metodă de bioinginerie BIOHIS dezvoltată pentru a evalua eficacitatea terapeutică a nămolului și a apelor minerale sulfuroase este fezabilă, pe baza rezultatelor preliminare (de exemplu, dezvoltări teoretice, rezultate experimentale) disponibile înainte de aplicarea proiectului, cu indicarea explicită a publicațiilor, brevetelor și proiectelor de cercetare care a condus la conceptul de bază al proiectului.

Prin elaborarea tuturor livrabilelor propuse, s-a atins obiectivul prevăzut pentru această etapa a proiectului, ceea ce permite buna continuare și trecerea la etapa experimentală de testare a metodei. Testarea efectelor metodei BIOHIS asupra culturile de celule fibroblaste primare de la șobolani Wistar, folosind electroforeză, ELISA și tehnici de Western blotting, și obținerea de noi date privind markerii moleculari importanți pentru procesele inflamatorii și echilibrul stresului oxidativ va constitui o activitatea etapei prevăzută pentru anul următor.

- Un sumar al progresului (livrabile realizate, indicatori de rezultat, diseminarea rezultatelor);

## Livrabilele realizate în etapa 1

### ✓ Configurații experimentale originale pentru culturi celulare (D1.1)

În ultimul timp, fibroblastele devin surse celulare pentru utilizarea în modelarea bolii după reprogramarea celulelor, deoarece sunt ușor accesibile în organism. Fibroblastele sunt celule derivate de tip mezenchimatos, importante în mai multe procese fiziologice, cum ar fi sinteza matricei extracelulară (ECM), diferențierea epitelială, reglarea inflamației și vindecarea rănilor. În plus, fibroblastele sunt, de asemenea, responsabile pentru secreția factorilor de creștere și funcționează ca schele pentru alte câteva tipuri de celule, acționând ca principală celulă mediatore pentru fibroza tisulară și formarea cicatricilor.

Fibroblastele sunt ușor de cultivat și menținut in vitro. Recoltarea fibroblastelor se face prin explant, izolând dermul de epidermă cu bisturii și foarfece. Fibroblastul este o celulă conjunctivă cea mai răspândită în țesutul conjunctiv. Fibroblastele active sunt celule alungite sau stelate, cu prelungiri efileate sau bifurcate și contur discret datorită unei membrane citoplasmaticice foarte subțiri cuplate la exteriorul unui film de mucopolizaharide.

Fibroblastele formate în cultură pot varia în funcție de substratul pe care este atașat și de spațiul disponibil pentru mișcare.

Fiziologia celulară își are fundamentul în exprimarea proteinelor celulare și astfel este motivată încercarea de a stabili modul în care această arhitectură este schimbată prin tratamentul celulelor cu noile produse. Potrivirea profilului electroforetic aduce un argument puternic că o cultură de celule tratate într-un anumit mod, are condiții vitale similare și implică procese fiziologice de același nivel.

Electroforeza este o metodă analitică și preparativă de separare a particulelor și agregatelor de particule încărcate electric sub acțiunea unui câmp electric uniform aplicat din exterior. Metoda se bazează pe fenomenul fizico-chimic de deplasare sau migrare diferențială a diferitelor particule într-un câmp electric.

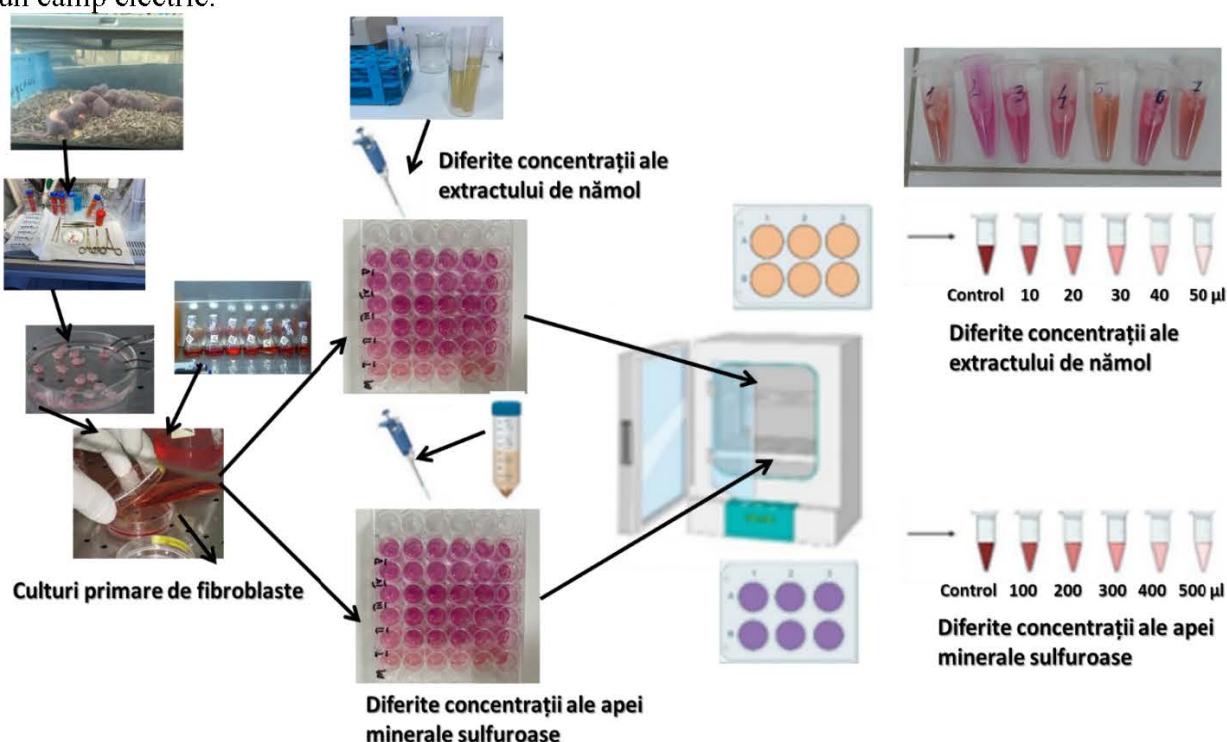


Figura 1 Configurații experimentale originale pe culturi celulare de fibroblaste primare. Culturile vor fi tratate cu diferite concentrații ale extractului de nămol și respectiv de apă minerală sulfuroasă. Date preliminare au arătat o viabilitate celulară acceptabilă la tratamente cu extract de nămol între 10 și 50 µl și între 100 și 500 µl de apă minerală sulfuroasă

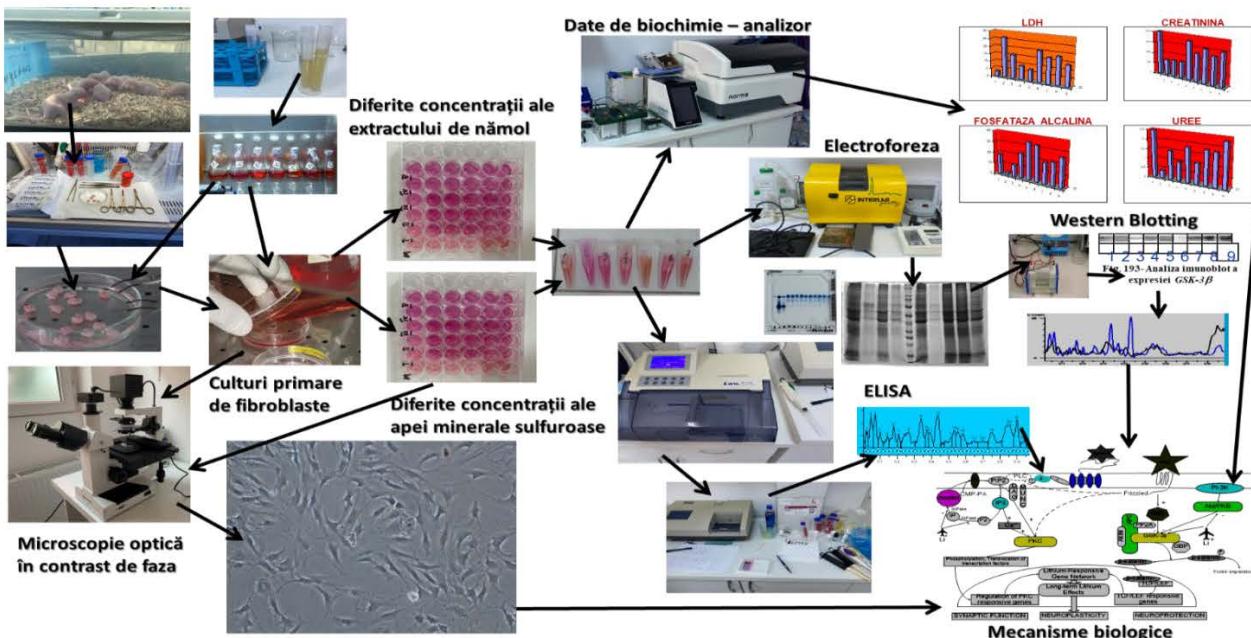


Figura 2 Configurații experimentale originale pe culturi celulare de fibroblaste primare – Investigații biologice

#### ✓ Configurații experimentale originale animale de laborator (D1.2)

Demonstrarea experimentală a efectelor factorilor naturali terapeutici - nămol și ape minerale sulfuroase - asupra animalelor de laborator va fi efectuată pe șobolani Wistar folosind modele experimentale similare cu cele din literatura de specialitate în domeniul gerontologiei și farmacologiei.

Investigațiile biologice sistemică implică investigații sanguine și biochimice folosind șobolanii Wistar, animale de laborator sănătoase și respectiv cazuri patologice neuro-/mio-/artro-/kinetice induse experimental, înainte și după aplicarea pe piele a namoului și a apelor minerale naturale sulfuroase. Investigațiile sanguine și biochimice vor viza markeri inflamatori și elemente ale echilibrului stresului oxidativ, vor aduce date biologice necesare interpretării informațiilor HIS într-un context sistemic.

Fiecare societate are o filozofie diferită privind experimentul pe animale, cu toate acestea, principiile internaționale pot fi considerate ca valoarea globală. Umanitatea este acceptată ca obiectiv al conceptului Trei R - respectarea principiilor, refuzul sau responsabilitatea (4).

#### Selectarea grupelor experimentale și organizarea activităților experimentale.

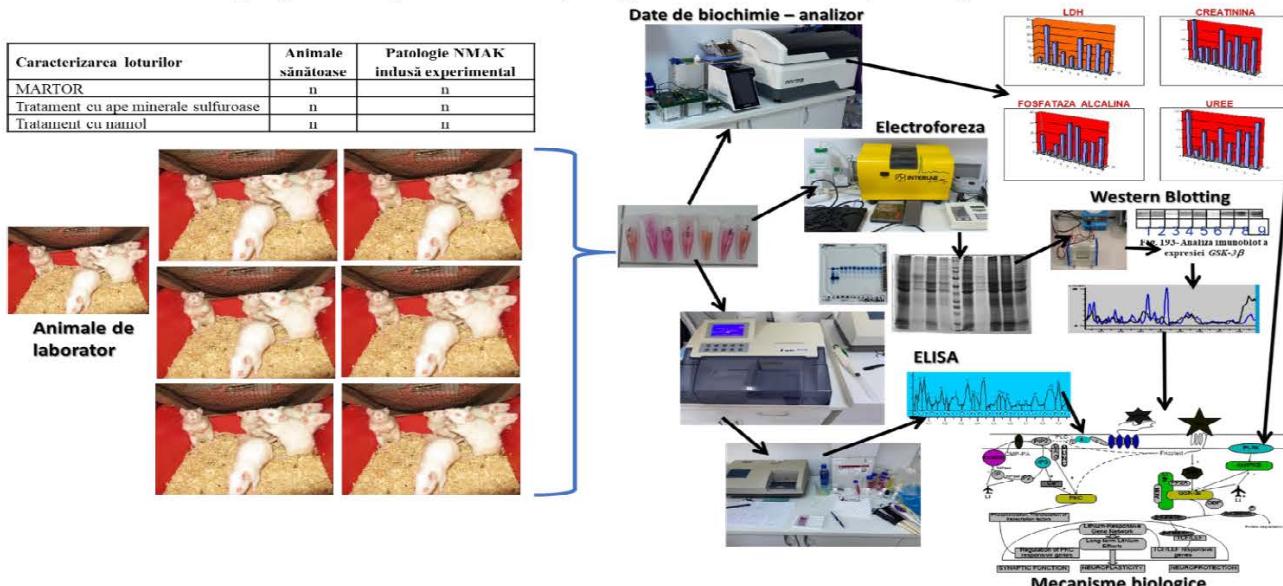


Fig 3. Lot de animale experimentale – șobolani Wistar

Experimentele vor fi efectuate pe animale experimentale din loturile de şobolani Wistar crescute în condiţii standard, în Biobază, în conformitate cu legislaţia în vigoare:

- în cuşti, în grupe de câte 6 animale, astfel încât să fie posibilă observarea fiecărui animal;
- temperatura 21- 22°C;
- umiditate: minim 30 % - maxim 70%;
- ciclu circadian de 12 ore lumina și 12 ore întuneric;
- dieta convențională sau specifică pentru lot.

Vor fi selectate animale de laborator (un număr egal de masculi și femele) de aceeași vârstă inițială (~20 săptămâni), cu o greutate medie de ~150 ± 10%.

Pe parcursul celor 6 luni de cercetare, animalelor de experiment (şobolani Wistar) vor fi monitorizați mai mulți biomarkeri specifici procesului de îmbătrânire, pentru ca la final datele experimentale să fie analizate matematic, discutate și interpretate de către experți.

<b>Caracterizarea loturilor</b>	<b>Animale sănătoase</b>	<b>Patologie NMAK indușă experimental</b>
MARTOR	n	n
Tratament cu ape minerale sulfuroase	n	n
Tratament cu namol	n	n

#### ✓ Configurații experimentale originale subiecți umani (D1.3)

Etapa de stabilire a cohortei constă în precizarea caracteristicilor populației și determinarea modului de eșantionare.

Criterii de includere în studiu:

- caracteristici demografice (vârstă peste 65 de ani);
- clinice: prezența bolilor cronice legate de vârstă: tulburări cognitive ușoare și moderate, depresie ușoară și moderată, sindroame extrapiramidale, boli osteoarticulare: osteoartrita, artrită reumatoidă, osteoporoză, boli cardiovasculare, hipertensiune arterială, aritmii metabolice, diferiți circulatori. tulburări: hipercolesterolemie, diabet

Criteriile de excludere sunt definite pentru eliminarea a subiecților eligibili, a celor care riscau să compromită calitatea datelor sau interpretarea rezultatelor (alcoolici, pacienți psihiatrici, subiecți susceptibili de a merge în altă regiune și aşa mai departe) și eliminarea motivelor etice. De asemenea, vor fi excluși din studiu pacienții de peste 65 de ani cu stadiu acut sever, cei cu alergie sau hipersensibilitate cunoscută la substanțe, medicație necontrolată pentru epilepsie, hipotensiune arterială severă, insuficiență renală și probleme hepatice, astm bronșic, neoplazic cronic, miastenie Gravis. Pacienții incluși în studiu au semnat obligatoriu înainte de includerea în studiu, un consimțământ informat (își dau consimțământul de a participa după ce au înțeles în ce constă studiul, vizitele de studiu și posibilele efecte adverse).

<b>Caracterizarea loturilor</b>	<b>Treatament cu nămol</b>	<b>Treatament apă sulfuroasa</b>
Subiecți umani sănătoși	n	n
Subiecți umani cu patologie NMAK	m	m

Vizita de bază (vizita de screening) constă în realizarea unor evaluări care să permită caracterizarea subiecților incluși în studiu: nume, vârstă, sex, diagnostic (îndeplinește criteriile de diagnosticare a bolii), număr de înregistrare; în plus se realizează evaluarea clinică și de laborator a pacienților incluși în studiu.

Evaluare de bază. Prezentarea modului de administrare a produselor și monitorizarea clinică a stării de sănătate a pacienților:

1. caracteristici individuale: vârstă, înălțime, greutate, sex.
2. evaluarea stării generale: consultarea echipamentelor și sistemelor
3. evaluarea funcției cardiace și respiratorii: electrocardiograma, spirometrie
4. constante biologice: tensiunea arterială sistolică și diastolică, frecvența cardiacă în repaus

Înainte, la mijlocul și la sfârșitul perioadei de studiu se vor preleva probe de sânge. Sângelul va fi recoltat în condiții sterile corespunzătoare parametrilor de dozare biochimică în tuburi de biochimie (capac roșu pe activator).

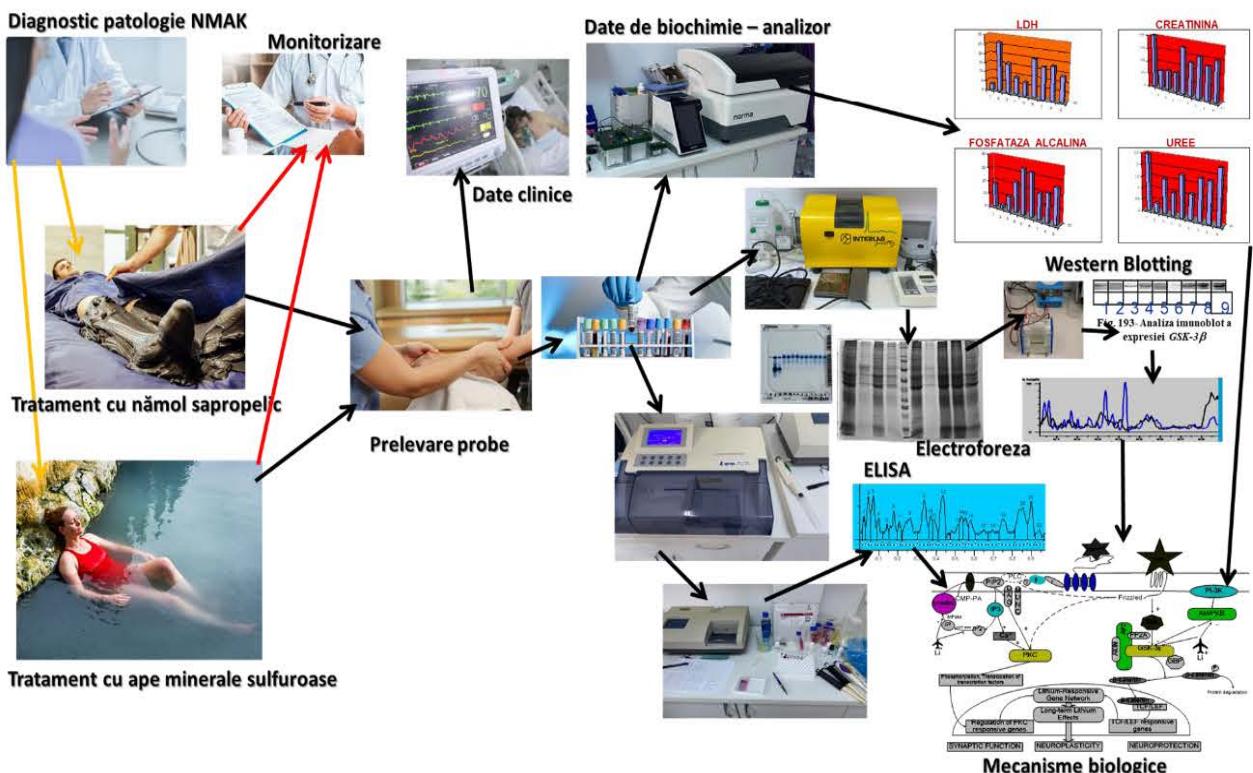


Figura 4 Configurații experimentale originale în context clinic – Investigații biologice

✓ **Manual de proceduri pentru testarea biologică a factorilor terapeutici naturali (D1.4)**

i. **Proceduri utilizate în cazul culturilor primare de fibroblaste**

Folosim şobolani Wistar de 50 g pentru a obține cultura primară de celule dermice.

Subcultura fibroblastelor. Subcultura (pasarea) fibroblastelor se realizează la 80% confluență celulară în placă Petri.

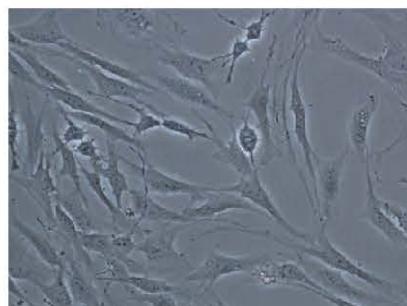


Fig.5 Fibroblaste umane în vas Petri cu morfologie fusiformă. (mărire 100x)

Testarea eficacității terapeutice a factorilor naturali terapeutici va fi realizată prin compararea celulelor din culturile martor crescute în mediu de cultură standard cu celulele crescute în mediu în care sunt plasate la niveluri de masă echivalente din extractul de nămol și respectiv de ape minerale sulfuroase. Caracterizarea comportamentului celular în prezența factorilor naturali va fi atât din punct de vedere morfologic, cât și funcțional.

**Microscopia cu contrast de fază** permite studiul celulelor vii, nefixate și necolorate. După îndepărțarea mediului de pe placă de cultură a fost examinat cu un microscop inversat cu contrast de fază.

Determinarea diviziunii celulare a fost realizată prin numărarea celulelor într-o cameră de numărare Burker-Turk. Celulele au fost numărate într-o rețea într-un volum limitat.

Celulele colorate și necolorate sunt numărate și viabilitatea celulei este calculată conform formulei: Viabilitatea celulară (%) = nr. celule viabile / nr. total celule x 100

**Test de viabilitate celulară (MTT) pe fibroblaste**

Pentru a evalua efectul tratamentului viabilității celulare (fibroblaste), testul de citotoxicitate prin test MTT (soluție de bromură de 3 - (4,5-dimetitiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazoliu).

## **Electroforeza SDS-PAGE**

Electroforeza este o metodă analitică și preparativă de separare a particulelor și agregatelor de particule încărcate electric sub acțiunea unui câmp electric uniform aplicat din exterior. Metoda se bazează pe fenomenul fizico-chimic de deplasare sau migrare diferențială a diferitelor particule într-un câmp electric. Analiza densitometrică pentru evaluarea relativă a cantității de proteine se realizează folosind un software de analiză a gelurilor.

## **ii. Proceduri utilizate în cazul animalelor de laborator**

### **Analiza consumului de apă.**

Media aportului zilnic de apă al animalelor de experiment (șobolani Wistar) în timpul studiului poate varia între diferite loturi. Animalele de experiență vor avea la dispoziție apă controlată fizico-chimic și microbiologic și vor consuma ad libitum iar consumul de apă va fi monitorizat zilnic, cu consumul mediu final de apă zilnic pe animal.

### **Analiza greutății corporale a grupelor de animale**

Toate animalele de experiment vor fi cântărite înainte și după începerea tratamentului cu cele 4 tipuri de tratamente timp de 12 zile și la fiecare interval de o lună de durată a studiului pentru a urmări ritmul de modificare a greutății animalelor de experiment.

### **Tratamentul cu factori naturali terapeutici**

Administrarea de substanțe la animalele de laborator este adesea o componentă critică a designului experimental. Considerațiile specifice pentru administrarea de substanțe către animale sunt numeroase și includ factori precum absorbția, distribuția, metabolismul și excreția agenților terapeutici sau chimici; calea, volumul și frecvența de administrare; durata tratamentului; pH-ul, stabilitatea, omogenitatea și osmolalitatea substanței care urmează să fie administrată; selectarea vehiculului sau solventului pentru eliberarea substanțelor care nu pot fi administrate în stare solidă sau sub formă de particule; prepararea soluției, inclusiv considerații privind sterilitatea dacă substanța este administrată parenteral; și aparatelor de dozare și imobilizarea animalelor necesare pentru anumite rute de livrare (6).

## **iii. Proceduri utilizate în context clinic**

### **Analiza parametrilor sanguini**

Din ser se vor doza urmatorii parametri biochimici: Creatinina, Glucoza, Colesterolul total, HDL Colesterol, LDL colesterol, trigliceridele, nivelul proteinelor totale, apolipoproteinele A și B, nivelul limfocitelor T, cortizolul, adrenalina, nivelul hormonului de creștere și factorul 1α de alungire a tiroidei, Ionograma: Sodiu, potasiu, calciu, magneziu, capacitate antioxidantă totală, concentrație totală de tioli și tioli neproteici, hidroperoxizi lipidici, concentrație de acid uric, activitate paraoxonază, nivel de lactat dehidrogenază, nivel de interleukină 6, nivel de proteină C reactivă, evaluarea indicele optic de refracție al probelor de ser. Determinarea parametrilor biochimici se va realiza cu ajutorul analizorului biochimic folosind kiturile corespunzătoare. Determinarea markerilor imunologici specifici se va efectua cu ajutorul analizorului automat ELISA, folosind kiturile adecvate.

### **Examenul microscopic al sedimentului urinar**

Suspensia urinară conține o serie de elemente care formează sedimentul urinar. Examenul sedimentului urinar permite studiul excreției urinare. Pregătirea sedimentului urinar se face din urina recent contaminată cu alimente sau fecale. Urina va fi colectată într-un tub steril, dimineață, după schimbarea pereților, folosind cuști pentru colectare. Urina este centrifugată timp de 5 minute la 1500 de rotații/minut (turații mai mari distrug elementele organice ale componentelor sedimentului). După ce supernatantul este îndepărtat centrifugarea și sedimentul rămas este omogenizat printr-o agitare puternică a tubului. Într-o picătură de omogenizată se obține o lamă de sticlă pentru microscop pregătită care va fi examinată la microscop cu obiectiv 10x și pentru o observare mai precisă și cu obiectiv 20x. Sedimentul urinar este compus din elemente organizate – celulele epiteliale ale tractului urinar, leucocite, eritrocite, cilindri, uneori paraziți, spermatozoizi și elemente organice neorganizate (acid uric, cistina, leucină, tirozină) sau minerale (oxalați, fosfați, carbonați).

## ✓ Proiectarea aranjamentului experimental pentru achiziția imaginilor hiperspectrale în condiții de laborator (D1.5)

Configuratia propusa pentru aranjamentul experimental de laborator va cuprinde din urmatoarele componente si sisteme: (1) camera hyperspectrala, (2) suport pentru camera hyperspectrala, (3) unitate de iluminare, (4) sistem de scanare si (5) computer pentru achizitia imaginilor hiperspectrale (Fig. 6).

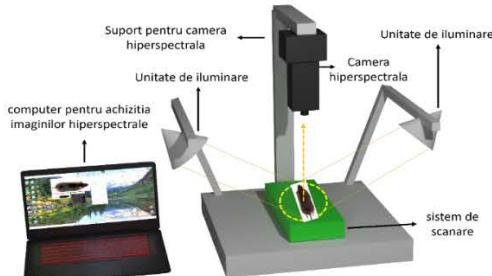


Fig. 6. Aranjament experimental pentru achiziția imaginilor hiperspectrale in conditii de laborator

Componentele aranjamentului experimental trebuie sa indeplineasca urmatoarele cerinte:

1. *Camera hyperspectrala* constituita dintr-un spectrograf si un sensor cu urmatoarele caracteristici:  
Spectrograf:

- tip push-broom
- element dispersiv: sistem combinat prisma si retea de difracție
- dispersie: 66 nm/mm
- domeniul spectral vizibil: (400-800) nm
- numar benzi spectrale: 200-300
- dimensiunea imaginii: 6.6 (spectral) x 8.8 (spatial) mm
- rezolutie spectrala: 1,5-1,8
- apertura numerica: F/2.8

Senzor:

- tip CCD - monocrom 16 bits
- dimensiunea maxima a imaginii (pixel): 348 x 260
- viteza de achiziție imagine: 41 cadre/s
- timpul de expunere: 1 µs la 100 ms

2. *Suport pentru camera hyperspectrala* cu urmatoarea structura:

- placă de bază: aprox. 450 x 500 x 28 mm
- coloana cu înălțimea: aprox. 1000 mm
- braț de cameră montat pe coloana cu bucătă filetată interschimbabilă și dispozitiv de reglare a camerei pe înalțime
- suport pentru unitatea de iluminare cu montare pe placă de bază: 2 buc

3. *Unitate de iluminare*

Unitatea de iluminare constituță din:

- două lămpi cu halogen de cte 300W echipate cu difuzeoare de lumina
- două brațe suport pe montarea lămpilor

4. *Sistem de scanare* constituit dintr-o masă de translată cu urmatoarele caracteristici:

- dimensiune micropas (rezolutie standard): 0.124023437 µm
- cursa maxima de translata: 203.2 mm
- precizie (unidirecțională): 225 µm
- repeatabilitate < 4 µm
- viteza maxima de deplasare: 65 mm/s
- viteza minima de deplasare 0.000076 mm/s
- viteza de translata reglabilă cu pas de: 0.000076 mm/s

5. *Computer pentru achiziția imaginilor hiperspectrale* cu urmatoarele caracteristici:

- procesor model: Intel Core i7 4710MQ@2.5 GHz, 4 nucle/8 Threaduri
- memorie: 32GB DDR3@1600 MHz
- placă video: Nvidia Quadro K610M
- sistem de operare: Windows 10
- software achiziție imagini hiperspectrale: SpectralDAQ

✓ **Proiectarea aranjamentului experimental pentru achiziția imaginilor hiperspectrale in aplicatii clinice (D1.6)**

Aranjamentul experimental propus pentru achiziția imaginilor hiperspectrale in aplicatii clinice va consta din: (1) camera hiperspectrala, (2) suport tip trepid pentru camera hiperspectrala, (3) unitate de iluminare, (4) sistem de scanare cu oglinda galvanometrica si (5) computer pentru achizitia imaginilor hiperspectrale (Fig. 7)



Fig. 7. Aranjament experimental pentru achiziția imaginilor hiperspectrale pentru aplicatii clinice.

Componentele aranjamentului experimental trebuie sa indeplineasca urmatoarele cerinte:

1. *Camera hiperspectrala* constituita dintr-un spectrograf si un sensor cu urmatoarele caracteristici:

Spectrograf:

- tip push-broom
- element dispersiv: sistem combinat prisma si retea de difracție
- dispersie: 66 nm/mm
- domeniul spectral vizibil: (400-800) nm
- numar benzi spectrale: 200-300
- dimensiunea imaginii: 6.6 (spectral) x 8.8 (spatial) mm
- rezolutie spectrala: 1,5-1,8
- apertura numerica: F/2.8

Senzor:

- tip CCD - monochrom 16 bits
- dimensiunea maxima a imaginii (pixel): 348 x 260
- viteza de achizitie imagine: 41 cadre/s
- timpul de expunere: 1 µs la 100 ms

2. *Suport tip trepid pentru camera hiperspectrala* cu urmatoarea structura:

- diametru bazei: 40 mm
- inaltimea maxima: < 150 cm
- inaltime minima: 41 cm
- greutate maxima suportata: 8 kg
- cap cu bila
- sectiuni: 4
- diametru sectiuni picioare: 11.2, 14.7, 18.2, 21.7 mm
- unghi picioare: 22°, 54°, 89°
- prindere: surub 3/8"

3. *Unitate de iluminare*

Unitatea de iluminare constituuta din;

- doua lampi cu halogen de cate 300W echipate cu difuzoare de lumina
- doua brate suport pe montarea lampilor

4. *Sistem de scanare galvanometric o singură axă cu diametru mare al fasciculului* cu urmatoarele caracteristici:

- motor cu magnet mobil pentru răspuns rapid (400 µs pentru ±0,2°)

- detecție capacitive a poziției oglinzi de înaltă precizie ( $15 \mu\text{rad}$ )
- electronică de control analogică cu amortizare a curentului și limitator de eroare
- diametrul maxim al fasciculului: 10 mm
- unghiul de scanare mecanic maxim:  $\pm 20,0^\circ$  (cu scalare de  $w/0,5 \text{ V/grad}$ )
- lățime de bandă (deplasare completă): 25 Hz
- domeniul valorilor de intrare a semnalului de poziție analogică:  $\pm 10 \text{ V}$

**4. Computer pentru achiziția imaginilor hiperspectrale cu urmatoarele caracteristici:**

- processor model: Intel Core i7 4710MQ@2.5 GHz, 4 nuclee/8 Threaduri
- memorie: 32GB DDR3@1600 MHz
- placa video: Nvidia Quadro K610M
- sistem de operare: Windows 10
- software achiziție imagini hiperspectrale: SpectralDAQ

**✓ Proceduri de achiziție de imagini hiperspectrale pentru culturi celulare (D1.7)**

Procedura descrie procesul de înregistrare a imaginilor hiperspectrale ale culturilor celulare cu sistemul de microscopie hyperspectrală în câmp întunecat îmbunătățit care permite observarea optică, achiziția și analiza de imagini la o rezolutie  $> 10 \text{ nm}$ .

Procesul de înregistrare a imaginilor hiperspectrale constă din parcurserea urmatorilor pași: prepararea probei, pornirea microscopului, reglarea obiectivului microscopului, utilizarea programului Ocular pentru salvarea imaginilor digitale de la microscop (Fig. 8), comutarea între camera fotografică și camera hyperspectrală (Fig. 9), utilizarea programului ENVI pentru captarea imaginilor hiperspectrale (Fig. 10), oprirea microscopului. Prezentarea detaliată a procesului de înregistrare a imaginilor hiperspectrale se regăseste în Anexa 1- PO 35/2022.

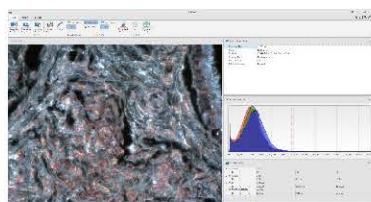


Fig. 8. Programul Ocular

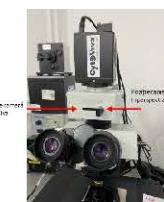


Fig. 9. Comutare între camera foto și camera hiperspectrală



Fig. 10. Programul ENVI

**✓ Proceduri de achiziție de imagini hiperspectrale pentru animale de laborator (D1.8)**

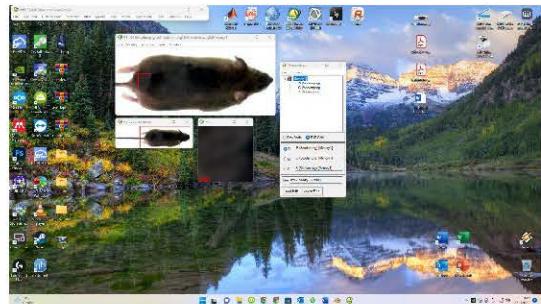
Procedura descrie procesul de efectuare a setarilor initiale ale software-lui SpectralDAQ și software-lui ZaberConsole precum și achiziția imaginilor hiperspectrale în condiții de laborator. Procesul de setare a parametrilor de intrare ai software-lui SpectralDAQ constă din: efectuarea setarilor initiale ale parametrilor sistemului hyperspectral (rezolutia spectrala, rezolutia spatiala) și alegerea locatiei de salvare a datelor într-un fisier de date cu un nume sugestiv care să permită o regasire usoara. Procesul de setare a parametrilor de intrare ai software-lui ZaberConsole presupune reglarea vitezei de deplasare a masutei de translatie astfel încât să se obtina o imagine clara și alegerea directiei de deplasare a masutei pentru scanarea scenei de investigat. Achiziția imaginilor hiperspectrale ale animalelor de laborator se efectueaza utilizand functiile software-lui SpectralDAQ de achiziție imagini și salvarea datelor hiperspectrale sub forma a două fisiere: unul în format .hdr care contine date despre setările de achiziție, modelul senzorului și modul de scanare (Fig. 11) iar celalalt fisier în format .raw care contine datele hiperspectrale înregistrate (Fig. 12). Prezentarea detaliată a procesului de achiziție a imaginilor hiperspectrale ale animalelor de laborator se regăseste în Anexa 2- PO ??/2022.

```

1: #HVI
2: description = {
3:   File Imported into HVI
4: }
5: file type = HVI
6: sensor type = Specim Hyperspectral Sensor, SN ver. 3.6219525
7: DMC SW ver. 3.62.195.25.R
8: acquisition date = DATE('dd-mm-yyyy'): 10-02-2016
9: upfiling = { 39,16, 9422,53}
10:
11: interleave = b11
12: samples = 348
13: lines = 295
14: bands = 258
15: default bands = { 129, 76, 29 }
16: header offset = 0
17: data type = 12
18: byte order = 0
19: x start = 0
20: y start = 0
21:
22: fpx = 41.000
23: Utxing = {4, 4}
24: VRC1 = {1, 258}
25: VRC2 = {1, 348}

```

**Fig. 11.** Fisier .hdr care contine date despre setarile de achizitie a imaginilor hiperspectrale in conditii de laborator



**Fig. 12.** Imagine hiperspectrala (.raw) obtinuta in conditii de laborator

#### ✓ Proceduri de achiziție de imagini hiperspectrale pentru subiecți umani (D1.9)

Procedura descrie procesul de efectuare a setarilor initiale ale software-lui SpectralDAQ in conditiile utilizarii unui sistem galvanometric pentru scanarea scenei de investigat si achizitia de imagini hiperspectrale pentru aplicatii clinice.

Procesul de efectuare a setarilor initiale ale software-lui SpectralDAQ presupune alegerea parametrilor de intrare ai sistemului hiperspectral (rezolutia spectrala, rezolutia spatiala) si a parametrilor sistemului de scanare galvanometric (tensiunea de iesire si frecventa de rotatie a oglinzii) astfel incat sa se obtina o imagine clara si nedeformata. Achizitia imaginilor hiperspectrale pentru aplicatii clinice se efectueaza utilizand functiile software-lui SpectralDAQ de achizitie imagini si salvarea datelor hiperspectrale, cu mentionarea locatiei, sub forma a doua fisiere: un fisier care contine date despre setarile de achizitie, modelul senzorului si modul de scanare (format .hdr) (Fig.13) si un fisier care contine datele hiperspectrale achizitionate (format .raw) (Fig. 14). Prezentarea detaliata a procesului de achizitie a imaginilor hiperspectrale pentru aplicatii clinice se regaseste in Anexa 3- PO ??/2022.

```

1: #HVI
2: description = {
3:   File Imported into HVI
4: }
5: file type = HVI
6: sensor type = Specim Hyperspectral Sensor, SN ver. 3.6219525
7: DMC SW ver. 3.62.195.25.R
8: acquisition date = DATE('dd-mm-yyyy'): 09-05-2019
9: upfiling = { 71,58, 12840,13}
10:
11: interleave = b11
12: samples = 240
13: lines = 295
14: bands = { 135, 309, 67 }
15: header offset = 0
16: data type = 12
17: byte order = 0
18: x start = 0
19: y start = 0
20:
21: fpx = 41.000
22: Utxing = {4, 4}
23: VRC1 = {1, 258}
24: VRC2 = {1, 240}

```

**Fig. 13.** Fisier cu date privind setarile de achizitie a imaginilor hiperspectrale pentru aplicatii clinice



**Fig. 14.** Imagine hiperspectrala obtinuta pe subiecti umani

#### ✓ Proiectarea metodei BIOHIS - destinată evaluării eficacității terapeutice a factorilor terapeutici naturali pe culturi celulare, animale de laborator și subiecți umani (D1.10)

Noua metodă de bioinginerie BIOHIS, dezvoltată pentru a evalua eficacitatea terapeutică a factorilor terapeutici naturali, integrează trei pași interconectați (1) Investigații biologice (2) Procesarea imaginilor hiperspectrale și (3) Analiza statistică și interpretarea datelor

**Pasul 1.** Investigațiile biologice, efectuate la nivel celular și molecular, și sistemic [26] pe animale de laborator și subiecți umani, generează argumentele pentru susținerea conceptelor existente legate de mecanismul de acțiune a factorilor terapeutici naturali în domeniul balneologic propuse în timp prin studii farmacodinamice, incluse în bibliografia pentru studenții la cursul de reabilitare, medicină fizică și balneologie.

Investigațiile biologice celulare și moleculare efectuate prin electroforeză, ELISA și Western blotting pe culturi de fibroblaste primare obținute de la şobolani Wistar vizează două mecanisme

fiziologice principale, respectiv procesele inflamatorii și echilibrul stresului oxidativ [35], presupus a fi influențate de nămol și ape minerale naturale sulfuroase, care va constitui nivelul biologic de bază de la care ne putem gândi să construim o fundamentare științifică pentru efectele terapeutice ale nămolului terapeutic și apelor minerale sulfuroase.

Investigațiile biologice sistemică implică investigații sanguine și biochimice [33,34,35,36] folosind cazuri patologice neuro-/mio-/artro-/kinetice și induse experimental de animale de laborator, cum ar fi șobolanii Wistar, înainte și după aplicarea pe piele a nămolului și a apelor minerale terapeutice sulfuroase. Investigațiile sanguine și biochimice vor viza markeri inflamatori și elemente ale echilibrului stresului oxidativ, vor aduce date biologice necesare interpretării informațiilor HIS într-un context sistemic.

Studii umane, pe voluntari sănătoși și pacienți cu patologie neuro-/mio-/artro-/kinetică, înainte și după aplicarea apelor minerale sulfuroase și a nămolului, care vizează datele biologice legate de starea de echilibru a stresului inflamator și oxidativ al organismului uman, influențată de factori terapeutici naturali.

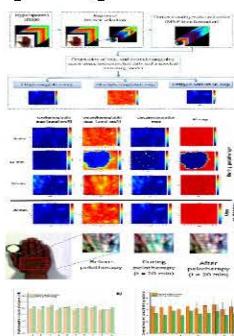
**Pasul 2. Imagistica hiperspectrală.** Măsurările hiperspectrale vor începe cu achiziția de imagini



hiperspectrale. Un microscop de câmp întunecat îmbunătățit hyperspectral (Cytoviva Inc) care oferă analiză spectrală a probelor biologice și bazate pe materiale la scară nanometrică, izolate sau integrate în celule, țesuturi sau alte matrice materiale, va fi utilizat pentru achiziția de imagini hiperspectrale ale culturilor celulare.

Fig. 15. Configurare experimentală pentru achiziționarea imaginilor hiperspectrale: 1. cameră hyperspectrală, 2. obiectivul camerei hyperspectrale, 3. Etapă de poziționare liniară motorizată, 4. controler pas cu pas.

Acest sistem este echipat cu o lampă cu halogen și un detector sCMOS, cu un interval spectral cuprins între 400 nm și 1000 nm și o rezoluție de 1,5 nm. Imaginile hiperspectrale ale modelelor animale și ale subiecților umani vor fi achiziționate cu un sistem hyperspectral constând din (a) un spectrograf de imagistică push-broom (ImSpector V8E, Specim, Finlanda) care permite achiziția a



205 benzi spectrale care acoperă un (400-800) nm domeniul spectral cu o rezoluție spectrală de 1,97 nm; (b) un dispozitiv cuplat la încărcare (camera DX4, Kappa, Germania) și (c) o unitate de iluminare care conține două lămpi cu halogen de 300 W (OSRAM, Germania) echipate cu filtre de difuzie (Kaiser Fototechnik GmbH and Co. KG, Buchen, Germania). Scanarea regiunii de interes se va face folosind fie un tabel de translație, fie un sistem de oglindă de scanare galvanometru cu o singură axă echipat cu o oglindă dielectrică de bandă largă. Imaginile hiperspectrale astfel dobândite vor fi apoi preprocesate și normalizate pentru a elmina neuniformitatea spațială inherentă a intensității luminii artificiale pe scenă și a curentului de întuneric din senzorul hyperspectral și pentru a selecta o regiune de interes (ROI) din hyperspectral. imagine legată doar de zona investigată. Conversia intensităților pixelilor la reflectanță normalizată [0 la 1] prin procesul de normalizare este utilă nu numai pentru optimizarea numerică care rareori se comportă bine cu valori foarte mari, ci și pentru a obține intervalul dinamic real al senzorului și pentru a facilita interpretarea medicală. Zgomotul prezent în imaginea ROI adăugat semnalului de către senzorul de imagine hyperspectral poate afecta interpretarea imaginii și procesele de ioni de informații. Prin urmare, este necesară o etapă de procesare a imaginii înainte de orice analiză ulterioară pentru a reduce zgomotul datelor. Pentru a aborda problema reducerii zgomotului de date, transformarea fracției minime de zgomot (MNF), folosită frecvent în teledetectie, va fi aplicată în acest proiect imaginilor ROI. În cele din urmă, informațiile spațiale și spectrale conținute în imaginile hiperspectrale procesate vor fi analizate folosind diferite învățare automată (mașină de suport vector, mapper spectral unghi, k-means) sau metode chimiotométrice (pentru maparea concentrațiilor de cromofori, cum ar fi oxihemoglobina și deoxihemoglobina) pentru a evidenția efectele induse de factorii terapeutici naturali la nivel celular și tisular. Fig. 16. Fluxul procesării imaginilor hiperspectrale.

**Pasul 3. Analiza statistică și interpretarea datelor** vor veni în sprijinul și validarea datelor experimentale colectate în cadrul proiectului. Integrarea datelor și a cunoștințelor din mai multe

surse este cunoscută ca fuziunea datelor. Analiza statistică va folosi metodele de bază de analiză și validare a datelor colectate. Validarea încrucișată va fi utilizată pentru a rezolva problemele de supraadaptare și de selecție. Analiza ANOVA estimează importanța factorilor individuali (analiza de sensibilitate); selectarea variabilelor care sunt luate în considerare pentru concluziile trase din fuziunea datelor multiple. Interpretarea datelor poate ajuta la concluzia datelor colectate, poate sprijini luarea deciziilor și poate contribui la calitatea metodei. Interpretarea datelor trebuie să răspundă la următoarele întrebări: Care sunt mecanismele namului sau apelor minerale sulfuroase asupra patologiei neuro-/mio-/artro-/cinetice? și/sau Care sunt riscurile asociate cu aceste tratamente balneare? În ceea ce privește interpretarea datelor clinice, răspunsurile sunt adesea încurcate într-un șir de numere și statistici; numerele necesare pentru a trata (NNT); raportul de cote (OR); hazard ratio (HR); risc relativ (RR); risc absolut; intervale de încredere (IC); și valorile P-. Deoarece studiile clinice implică în general doar un eșantion de participanți dintr-o populație (mai degrabă decât întreaga populație), IC sunt furnizate pentru a estima intervalul în care o statistică pentru întreaga populație ar putea fi găsită la o probabilitate specificată. RR descrie raportul dintre probabilitățile ca un eveniment să apară într-un grup expus la tratament în comparație cu cel din grupul de control. NNT se referă la numărul de pacienți care trebuie să primească intervenția pentru ca un pacient să obțină rezultatul dorit al tratamentului. De asemenea, interpretarea clinică este importantă și interpretarea biologică a datelor obținute, corespunzătoare proceselor biologice modulate sau influențate de factorii terapeutici naturali, explicând mecanismele biologice ale acestora.

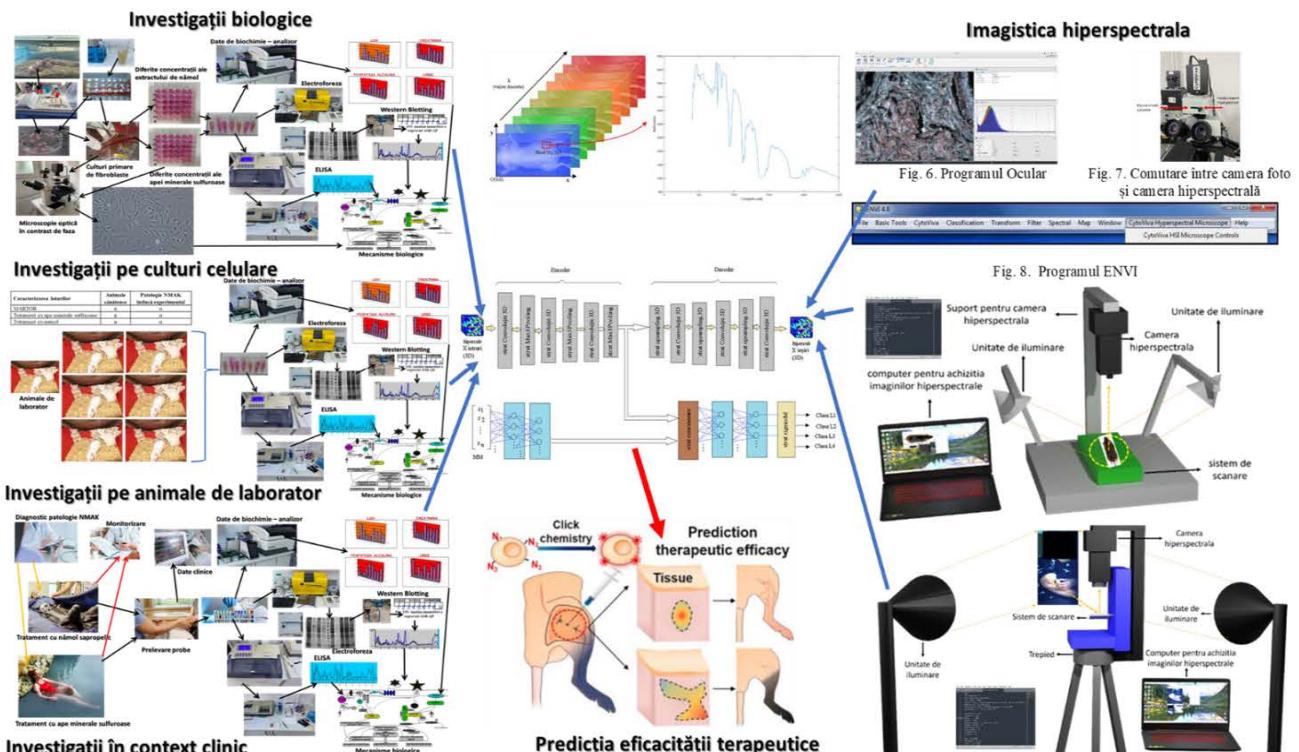


Figura 17 Configurații experimentala originala a testării experimentale a metodei BIOHIS

Modalitatea de combinare a datelor biologice și hyperspectrale într-o metodă unitară integrată destinată evaluării eficacității terapeutice a factorilor terapeutici naturali pe culturi celulare, animale de laborator și subiecți umani implică o abordare matematică de construcție a unui model care evaluează/clasifică/prezice eficacitatea terapeutică în funcție de valorileși parametrii de intrare.

Datele de intrare sunt structurate pe două nivele: (1) imagini hyperspectrale (HSI) și (2) markerii moleculari importanți descriși în literatură sau propuși în proiect. Ieșirea este o variabilă categorială asociată unor praguri de nivel, între 0 și 1 (de exemplu ineficient între 0 și 0,1, eficiență scăzută între 0,1 și 0,3, eficiență medie între 0,3 și 0,6, eficiență ridicată între 0,6 și 0,9, sănătos între 0,9 și 1,0 sau clase mutual exclusive (simultan, doar una din variabile este mai mare ca un threshold, e.g. 0,5 celelete fiind sunt un prag de 0,5)

In literatură există o largă varietate de modele simple (regresie lineară, black-box, logistică, *response surface method*) sau complexe (regresie nelineară, probabilistice, stochastice, cu ecuații diferențiale, etc.) sau de o complexitate ridicată (*Deep Neural Networks -DNN*).

Primul pas este analizarea datelor intrare-iesire pentru a alege modelul cel mai potrivit care poate da rezultatele cele mai bune ca predictor/clasificator. Imaginele care constituie date de intrare sunt hiperspectrale ([1]-[2]). Imagistica hiperspectrală colectează și prelucrează informații din întreaga spectru electromagnetic, de obicei pe nivele discrete. Imaginele hiperspectrale furnizează atât informații spațiale cât și spectrale.

Scopul imaginii hiperspectrale este de a obține spectrul pentru fiecare pixel din imaginea unei scene, cu scopul de a găsi obiecte, de a identifica materiale sau de a detecta procese. Reprezentarea uzuală a imaginii hiperspectrale este un hipercub, în care fiecărui pixel i se asociază un set de lungimi de undă (e.g. 220 nivele, Fig. 18) rezultând matrici de tipul  $n \times m \times L$  spre deosebire de imaginile RGB care sunt matrici de tipul  $n \times m \times 3$ , corespunzător celor 3 nivele R (Roșu), G (Verde) și B (Albastru).

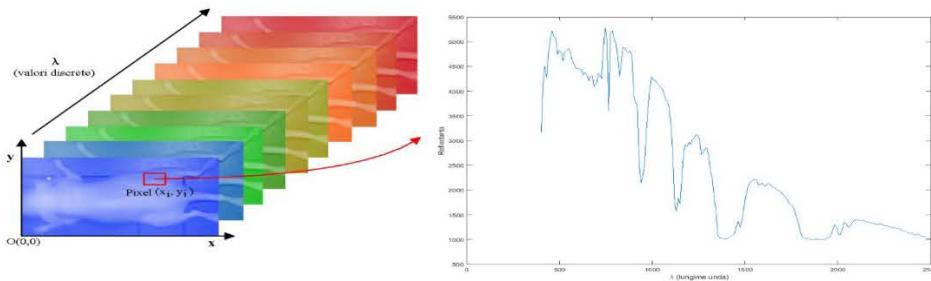


Fig. 18 Hipercubul unui set de date 2D și graficul reflectanței pentru un pixel cu 220 nivele de lungimi de undă  $\lambda$

Volumul de informații care îl are o imagine este enorm față de o imagine RGB. De remarcat că în cazul classic de imagine RGB pentru clasificare de exemplu, procedurile de pre-procesare în cele mai multe cazuri propun o reducere a informațiilor de la color la alb-negru (binare) sau cu nivele de gri (matricile RGB sunt mapate într-o singură matrice cu valori intregi în domeniul 0...255 corespunzător nivelului de gri, eventual normalizate în domeniul de valori [0,1].

Ca urmare, extragerea trăsăturilor sau reducerea dimensionalității vectorilor de intrare (sau imaginii 2D/3D de intrare) se poate face aplicând reducerea dimensiunilor pentru a face algoritmii de clasificare sau predicție aplicabili la probleme tractabile ([3]-[4]): metoda componentelor principale (PCA); Factorizarea matriceală nenegativă (NMF); Kernel PCA; Analiza lineară discriminant (LDA); t-SNE; Laplacian eigenmaps (LE) – cu variante *manifold*, autoencodere, etc. În funcție de rezultate, se va alege metoda cea mai eficientă în raport cu performanțele predictorului/clasificatorului pentru selectia trasaturilor.

Valorile markerilor moleculari (MM) sunt elemente ale unor vector care au o lungime relativ mică (un maxim de 20-30 markeri sunt de așteptat) și o normalizare a acestor vectori înainte de intrare în predictor este o metodă uzuală de îmbunătățire a rezultatelor.

Această abordare (reducerea dimensionalității) este extrem de dificilă și cunoscut a produce în unele situații o rată ridicată de clasificări eronate datorită volumului imens de date de procesat cu metode clasice.

O abordare mai realistă cu rezultate foarte bune este cea care folosește DNN (Deep Neural Network) și în special rețele Deep Learning convolutionale (CDNN). Pe de altă parte, volumul de date hipercub din HIS care conține trăsături spațiale și trăsături spectrale, ca volum ocupă un spațiu foarte mare la intrare față de trăsăturile MM, tinzând să reducă spre zero importanța acestor variabile în numărul de trăsături total de intrare în predictor/clasificator.

Propunem o abordare originală de fuziune a HIS și MM care se poate încadra în post-procesare DNN, prin fuziune de rețele integrate de convoluție 3D (care extrag simultan date spațiale și spectrale, 3-D CNN) cu rețea conectată complet (include un strat LSTM -Long Short Term Memory ) și apoi cu strat de ponderare și respective regresie (cu ieșiri sigmoidale sau softmax) să rezulte o clasificare mutual exclusivă a nivelului de sănătate (vindecare) a țesuturilor corespunzătoare (Fig. 19).

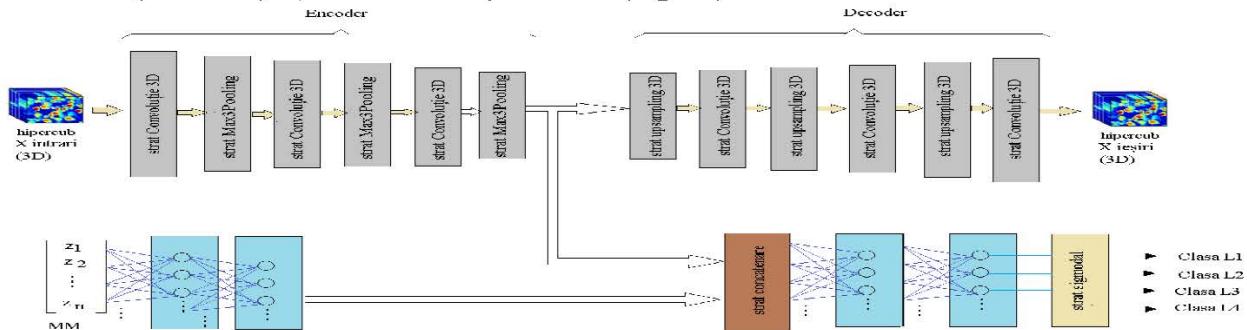


Fig. 19. Schema bloc de clasificare a stării de sănătate data de țesuturi (L1 – nevindecat, L2-ameliorare ușoară, L3-ameliorare medie, L4-ameliorare completă).

Sistemul este structurat pe două coloane care se vor adapta separat folosind metoda cunoscută ADAM implementată atât în tensorflow (Python) cât și în Matlab. Se va avea în vedere și posibilitatea unei variante de optimizare Arithmetic Optimization Algorithm with Deep Learning (AOA) [10], sub rezerva convergenței și scalabilității pentru acest tip complex de aplicație.

Blocul Autoencoder va face selecția trăsăturilor (reducerea dimensiunilor), selectând acele trăsături care sunt esențiale și eliminând trăsăturile mai puțin importante (extragerea trăsăturilor). Reducerea dimensionalității previne supraadaptarea (*overfitting*). Supraadaptarea este un fenomen în care modelul învăță prea bine din setul de date de antrenament și nu reușește să generalizeze bine pentru datele nevăzute din lumea reală.

Cele două stive sunt concatenate, vectorii dimensionali fiind intrare în straturile de FC (Fully Connected) cu ieșiri sigmoidale pentru clasificare stare de sănătate în clase mutual exclusive.

Modelele multicompartmentare sunt utilizate în multe domenii precum farmacocinetică, epidemiologie, biomedicină, teoria sistemelor, circuite electrice, teoria complexității, inginerie, fizică, sisteme informaționale, etc. mai multe strategii pentru rezolvarea proceselor lor relevante pot fi controlate, este posibilă optimizare. Pentru a prezenta toate informațiile și acțiunile disponibile, o interfață grafică va fi dezvoltată de către P3.

Analiza datelor experimentale ale studiilor farmacodinamice efectuate la nivel sistemic, celular și molecular va permite compararea eficacității terapeutice a noilor produse de îmbătrânire sănătoasă în funcție de rezultate, echipa de cercetare a proiectului urmând a stabili care produs va avea cele mai bune proprietăți geroprotector. . Acest produs va fi testat în studii clinice și va reprezenta produsul final al proiectului.

#### ✓ Site-ul web al proiectului (D1.11)

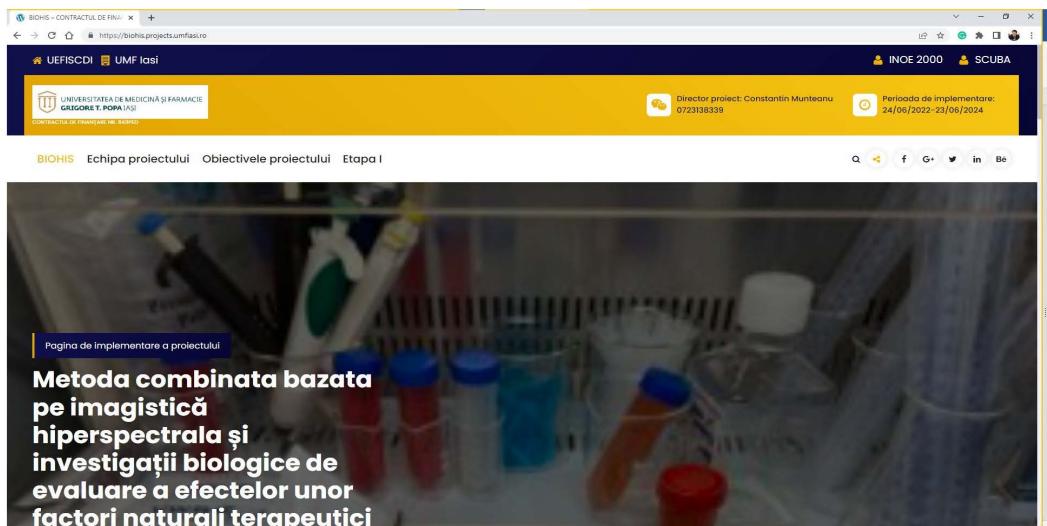


Fig. 20 Imaginea website-ului proiectului

#### ✓ Manual de setări și proceduri experimentale pentru validarea clinică a metodei BIOHIS (D1.12)

Validarea metodei va fi posibilă prin utilizarea electromiografiei (EMG) și puls-oximetriei.

**Pulsoximetria** sau măsurarea neinvazivă a procentului de hemoglobină legată de oxigen, oferă estimări în timp real a saturației arteriale în intervalul de 80% până la 100% și avertizează în cazul perfuziei capilare diminuate evitând în același timp disconfortul și riscurile asociate recoltării arteriale. Este o tehnică standard de monitorizare a pacienților într-o mare varietate de situații clinice.

Pulsoximetria poate fi utilizată și pentru evaluarea perfuziei periferice și identificarea unei posibile ischemii la nivelul extremităților. O astfel de utilizare nu este standardizată; deși studiile clinice validează utilizarea sa, sunt disponibile puține date despre această utilizare. Chirurgii vasculari vor folosi pulsoximetrul pe un deget de la mâna sau unul de la picior pentru a evalua rezultatele chirurgicale la nivelul brațului sau piciorului. Ocluzia arterelor periferice datorată bolii arteriale periferice poate fi sugerată prin compararea rezultatelor pulsoximetriei la nivelul extremităților. Oxigenare periferică scăzută poate fi observată la pacienții cu sindrom de compartiment, leziune arterială traumatică și compresie externă a circulației proximale.

Pulsoximetria poate valida rezultatele privind harta de saturație în oxigen a regiunii investigate obținută prin imagistica hiperspectrală.

## **Electromiografia**

EMG reprezintă înregistrarea grafică a biocurenților generați de contracția mușchilor scheletici. Recoltarea curenților se realizează cu ajutorul a două tipuri de electrozi: de suprafață, cutanăți (EMG globală) și electrozi tip ac (EMG elementară). EMG permite stabilirea unui electrodiagnostic pentru patologiile sistemului nervos periferic sau muscular și implică două moduri distințe de colectare a semnalelor electrice de la mușchi: cea invazivă numită electromiografie cu ac (EMG), și a doua neinvazivă numită studiu de conducere nervoasă.

EMG elementară se obține prin introducerea în mușchi a unui electrod coaxial alcătuit dintr-un ac de seringă în interiorul căruia se găsește un fir metalic izolat, cu excepția vârfului. În repaus nu apar potențiale electrice. Contractia musculară voluntară generează descărări a căror frecvență maximă este de 50 cicli/sec. Amplitudinea lor variază în funcție de mușchi de la 300 la 2000 µV.

EMG se aplică la studiul mușchiului scheletic. Țesutul muscular al scheletului este atașat de os și contractia acestuia este responsabilă de susținerea și deplasarea scheletului. Contractia mușchiului scheletului este inițiată de impulsuri în neuroni către mușchi și este, de obicei, sub control voluntar. Fibrele musculare scheletice prezintă neuroni pentru a putea realiza contractia. Acest tip particular de neuron se numește „neuron motor” și se apropie de țesutul muscular, dar nu este în realitate conectat la acesta. Un neuron motor furnizează de obicei stimularea multor fibre musculare.

Protocolul de analiză neurografic presupune: analiza conducerii motorie a NM cu culegere pe mușchiul scurt abductor al pollicelui, stimulare palmar, la pumn și în fosa antecubitală medială și analiza conducerii motorie a nervului ulnar (NU), culegere pe mușchiul scurt abductor al degetului mic, stimulare la nivelul pumnului, sub sănțul olecranian și respectiv deasupra sănțului olecranian. Se execută analiza conducerii senzitive se face pentru nervii NM, NU și nervul radial NR, antidromic. Pentru un CTS vom obține latențe CMAP și SNAP prelungite, latența undei F prelungită, amplitudinea CMAP și SNAP diminuată sau normală, VCM, VCS normale sau scăzute în condițiile în care analiza CMAP NU și respectiv a SNAP NU, NR sunt normale (3).

## **Indicatori de rezultat, diseminarea rezultatelor**

Rezultatele preliminare obținute în cadrul acestei faze a proiectului au fost diseminate prin: articol științific cotată ISI și 2 prezentări orale la conferință:

- Articol ISI:  
Munteanu, C.; Rotariu, M.; Turnea, M.; Tătăranu, L.G.; Dogaru, G.; Popescu, C.; Spînu, A.; Andone, I.; Ionescu, E.V.; Țucmeanu, R.E.; Oprea, C.; Țucmeanu, A.; Cseppento, C.N.; Silișteanu, S.C.; Onose, G. Lithium Biological Action Mechanisms after Ischemic Stroke. Life 2022, 12, 1680. <https://doi.org/10.3390/life12111680>

- Prezentări orale la conferință  
MUNTEANU Constantin, CĂLIN Mihaela Antonina, POPESCU Cristina, ROTARIU Mariana, CORCIOVA Călin, AROTĂRIȚEI Dragoș, BUTNARU Maria, LUCA Andreea, CONDURACHE Iustina, MANEA Dragoș, SAVASTRU Dan, SAVASTRU Roxana, CÂRSTEIA Elfrida, ANGHELESCU Aurelian, DAIA Cristina, ONOSE Gelu - Combined method based on hyperspectral imaging and biological investigations to evaluate the effects of natural therapeutic factors in diseases in the field of Neuro-Mio-Arto-Kinetic pathology (BIOHIS Project) - Balneo and PRM Research Journal – Romanian Congress of Physical and Rehabilitation Medicine & Balneology, 03-10 September 2022, Slanic Moldova / Techirghiol, Abstracts Volume, Balneo and PRM Research Journal. 2022;13(3): L1 DOI: <http://dx.doi.org/10.12680/balneo.2022.510>, eISSN: 2734-8458 pISSN: 2734-844X, <http://bioclima.ro/Balneo510.pdf>

Calin MA, Manea D, Munteanu C, Savastru R, Piticescu RM, Onose G. Evaluation of changes in melanin levels in common nevi induced by mud therapy using a spectrophotometric approach. Congresul Național de Medicină Fizică, de Recuperare și Balneologie-2022, - Balneo and PRM Research Journal – Romanian Congress of Physical and Rehabilitation Medicine & Balneology, 03-10 September 2022, Slanic Moldova / Techirghiol, Abstracts Volume, Balneo and PRM Research Journal. 2022;13(3): L1 DOI: <http://dx.doi.org/10.12680/balneo.2022.510>, eISSN: 2734-8458 pISSN: 2734-844X, <http://bioclima.ro/Balneo510.pdf>

- **Rezumat executiv al activităților realizate în perioada de implementare.**

**Etapa 1 - Dezvoltarea metodei BIOHIS.**

- ✓ **Activitatea 1.1** - Configurația și elaborarea procedurilor experimentale pentru investigațiile biologice ale metodei BIOHIS privind acțiunile nămolului și apelor minerale sulfuroase asupra culturilor de fibroblaste primare, animale de laborator și subiecți umani, bazate pe studii despre utilizarea factorilor terapeutici naturali pe diferite patologii NMAK
- ✓ **Activitatea 1.2** - Configurarea procedurilor experimentale pentru achiziția și analiza de imagini hiperspectrale la nivel celular și tisular (animale de laborator) și pentru subiecți umani.
- ✓ **Activitatea 1.3** - Elaborarea procedurilor de combinare a datelor biologice și hiperspectrale într-o metodă unitară integrată destinată evaluării eficacității terapeutice a factorilor terapeutici naturali pe culturi celulare, animale de laborator și subiecți umani: Dezvoltarea designului metodei BIOHIS (D1.10), inclusiv analiză statistică, asociere de date și proceduri de optimizare. Va fi construit site-ul web al proiectului (D1.11). Rezultate așteptate: o metodă care permite evaluarea eficacității terapeutice a factorilor terapeutici naturali precum nămolul și apele minerale naturale sulfuroase.
- ✓ **Activitatea 1.4** - Elaborarea procedurilor de validare a metodei BIOHIS. Dezvoltarea procedurilor de validare clinică a metodei BIOHIS (D1.12). Rezultate așteptate: manualul procedurilor de validare clinică a metodei BIOHIS.

**Obiectivul general al prezentei faze** a proiectului care a vizat dezvoltarea metodei BIOHIS care exploatează avantajele unor biotehnici pentru a evidenția efectele sanogene ale factorilor terapeutici naturali asupra diferitelor patologii Neuro-/Myo-/Arto-/Kinetice a fost atins prin:

- proiectarea aranjamentelor experimentale specifice investigațiilor biologice la nivel celular, pe animale de laborator și în context clinic și al achiziției de imagini hiperspectrale în condiții de laborator (animale de laborator) și pentru aplicatii clinice. Au fost stabilite configurațiile aranjamentelor experimentale și caracteristicile tehnice ale elementelor componente astfel încât să permită achiziția imaginilor hiperspectrale ale animalelor de laborator și subiecților umani la un nivel înalt de calitate care să faciliteze analiza detaliată și precisa a datelor cu utilitatea clinică în monitorizarea efectelor factorilor terapeutici naturali asupra tesuturilor biologice.
- elaborarea procedurilor de testare biologică și a celor de achiziție a imaginilor hiperspectrale la nivel celular, tisular și de organ, parte integrantă a manualului de utilizare a metodei BIOHIS.

**Livrabilele etapei 1**

- ✓ Configurații experimentale originale pentru culturi celulare (D1.1)
- ✓ Configurații experimentale originale animale de laborator (D1.2)
- ✓ Configurații experimentale originale subiecți umani (D1.3)
- ✓ Manual de proceduri pentru testarea biologică a factorilor terapeutici naturali (D1.4)
- ✓ Proiectarea aranjamentului experimental pentru achiziția imaginilor hiperspectrale în condiții de laborator (D1.5)
- ✓ Proiectarea aranjamentului experimental pentru achiziția imaginilor hiperspectrale în aplicatii clinice (D1.6)
- ✓ Proceduri de achiziție de imagini hiperspectrale pentru culturi celulare (D1.7)
- ✓ Proceduri de achiziție de imagini hiperspectrale pentru animale de laborator (D1.8)
- ✓ Proceduri de achiziție de imagini hiperspectrale pentru subiecți umani (D1.9)
- ✓ Proiectarea metodei BIOHIS - destinată evaluării eficacității terapeutice a factorilor terapeutici naturali pe culturi celulare, animale de laborator și subiecți umani (D1.10)
- ✓ Site-ul web al proiectului (D1.11)
- ✓ Manual de setări și proceduri experimentale pentru validarea clinică a metodei BIOHIS (D1.12)

Prin activitatile realizate și livrabilele elaborate în cadrul acestei etape a proiectului s-a atins stadiul planificat (pană la aceasta data) de realizare a obiectivului specific acestei etape, ceea ce va permite în continuare atingerea obiectivelor specifice ale acestui proiect, astăzi cum sunt menționate în proiectul initial.

**Munteanu Constantin**  
Cercetător științific III - Master Neurobiologie  
Biolog medical principal - Biologie aplicată  
Doctor în biologie

**Director de proiect**  
Dr. Constantin Munteanu

