

# RAPORT TEHNIC

SISTEM BAZAT PE NANOSTRUCTURI PENTRU  
DETECTIA IN TIMP REAL A MARGINILOR  
TUMORILOR MALIGNNE. (NANOMARDET)

ETAPA 2 2015

*Etapa II* Elaborarea si dezvoltarea modelului de laborator al sistemului NANOMARDET si stabilirea protocoalelor specifice de caracterizare Raman a marginilor chirurgicale ale tumorilor (in vitro si in vivo).

## **Introducere**

In ultimele decade, frecventa bolilor tumorale atat la animale cit si la om a inregistrat o crestere continua. S-a inregistrat o intensificare spectaculoasa a activitatii de cercetare pentru a identifica factorii etiologici si pentru a gasi noi terapii in vederea reducerii mortalitatii si cresterii sansei de vindecare. O metoda obisnuita de contracarare a dezvoltarii extensive a tumorilor canceroase este chirurgia cu ajutorul careia tesuturile maligne sunt fie complet indepartate din corp, fie li se reduce dimensiunea pentru a preveni metastaza. Realizarea unui contur chirurgical clar, curat, reprezinta o provocare tehnica cu implicatii clinice importante. In ciuda dezbaterilor actuale privind conservarea tesuturilor sanatoase, factorul cheie de predictie a reaparitiei locale il constituie statusul marginilor. In mod current, nu exista nici o metoda intraoperativa nondistructiva in timp real pentru a detecta rapid situatia microscopica a marginilor in lumpectomie ca standard de ingrijire. De aceea este esential sa se realizeze noi mijloace de inlocuire sau de completare a tehnologiilor existente care sa poata oferi detectarea si delimitarea marginilor tumorale in timp real, fiind astfel foarte utile in chirurgie pe parcursul diagnosticarii sau a procedurii terapeutice. Au fost cercetate o serie de tehnici, inclusiv analiza de sectiuni inghetate, citologie prin preparare directa (prin atingere), spectroscopie prin radiofrecventa si spectroscopie Raman. S-a raportat ca aceasta din urma are o sensibilitate de 100%, o specificitate de 100% si o acuratete de 93% in identificarea carcinoamelor. O tehnica de detectare exacta in vivo a marginii si instrumentarul aferent vor reduce numarul de proceduri de reincizare necesare pentru a realiza margini negative. Spectroscopia Raman este o metoda optica ce este capabila sa furnizeze informatii chimice cantitative detaliate despre un esantion de tesut. Se preteaza in special la masuratori in vivo deoarece puterile si lungimile de unda de excitatie folosite sunt nedistructive pentru tesut si au o adancime de penetrare relativ mare. Schimbarile biochimice intre hiperplazia fibroasa inflamatorie (IFH) si tesutul normal al mucoasei bucale au fost testate prin folosirea tehnicii spectroscopiei FT-Raman. Scopul a fost a fost acela de a gasi un set minim de benzi Raman care sa furnizeze cea mai buna discriminare. Biopsia optica bazata pe tehnica Raman este o tehnica cu potential larg cunoscuta pentru diagnosticare noninvaziva in timp real. Si totusi, studiile dedicate discriminarii starilor subtile foarte comune sau a celor patologice incipiente ca procese inflamatorii care sunt intotdeauna prezente ca, de exemplu, pe marginile leziunilor canceroase au fost putine. In ultimul timp s-au realizat citeva metode optice pentru detectarea marginilor tumorale intraoperativ, in timp real. Unele dintre ele necesita substante de contrast si cromofori, altele sunt strict tehnici imagistice. Si totusi ramine necesitatea urgenta de a realiza o metoda intraoperativa, in timp real, foarte specifica si sensibila pentru detectarea marginii tumorale, metoda care sa reduca riscul reaparitiei cancerului si riscul de reoperare. In ultima decada majoritatea cercetarilor s-au axat pe dezvoltarea nanoparticulelor care maresc imprastierea si absorbtia in zona infrarosu apropiat datorita transmitantei relativ ridicate a tesutului in acest domeniu spectral. Particule precum coloranti fluorescenti, nanostraturi din aur (straturi si structuri filiforme), au fost utilizate fie ca instrumente de diagnosticare fie ca agenti in

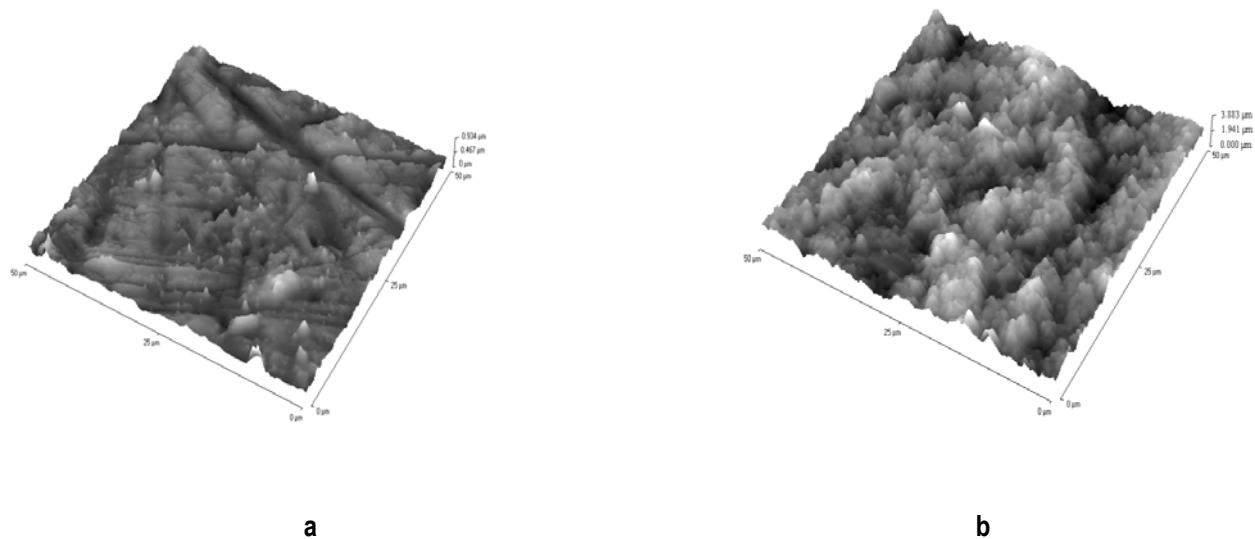
terapia fototermica. Nanotijele din aur au captat atentia ca instrument de diagnosticare datorita biocompatibilitatii lor, a fabricarii relativ usoare si a bioconjugarii cu biomolecule tinta, a proprietatilor lor optice unice si lungimii lor de unda de rezonanta plasmonica de suprafata.[32]. De aceea au fost utilizate pe scara larga ca agenti de contrast in imagistica pentru fluorescenta NIR, fotoacustica, imprastiere Raman si reflexie difuza.

### 1. Proiectare si experimente pentru realizarea accesoriului SERS pe baza de nanoparticule de aur

Instrumentele chirurgicale experimentate ca substrat SERS au fost bisturie din INOX.

O parte au fost utilizate ca atare, stiindu-se ca suprafetele metalice cu rugozitate acceptabila pot genera plasmoni de suprafata in prezenta unei probe biologice, si o alta parte au fost acoperite cu filme nanostructurate de Ag si de Au.

In figura 1 sunt prezentate imaginile AFM, prin comparatie, ale suprafetelor neacoperite si ale celor cu depunere de metal nobil



**Figura 1. a) suprafata de bisturiu neacoperita; b) suprafata de bisturiu cu nanofilm de metal nobil (Ag)**

Experimentele Raman, considerand cele doua tipuri de suprafete, au dus la concluzia ca **intensitatea semnalului creste  $\times 10^5$**  prin utilizarea nanostructurilor de metal nobil fata de suprafetele nedepuse. De asemenea, **timpul de acumulare a spectrelor (diagnoza a starii marginii) a fost redus de la 25 min la 3 min.**

### 2. Evaluarea solutiei tehnice si proiectarea modelului de laborator de masurari Raman cu fibra optica si activitati legate de procesarea semnalului

In evaluarea tehnica a solutiei propuse pentru determinarile Raman pe tesuturi sanatoase si tumorale s-a tinut cont de mai multi parametri care influenteaza portabilitatea si usurinta in utilizare a echipamentului precum si eficacitatea acestuia pe teren.

Ansamblul experimental consta din sursa de excitare laser, fibra optica, spectrometrul Raman si software-ul aferent.

Pentru spectrometru s-a avut in vedere portabilitatea si rezistenta la transport precum si maximizarea eficientei acestuia considerand dimensiunile relative reduse comparativ cu un sistem Raman de laborator de mari dimensiuni si implicit distanta focala mare.

Sistemul este dotat cu retea de difracție concava cu depunere de aur, acoperind domeniul spectral 200 – 4500  $\text{cm}^{-1}$ .

Sistemul nu utilizeaza oglinzi in configuratie pentru minimizarea luminii parazite (atingand valori de pana la 0,05%) si poate adapta fibre optice in domeniu UV-VIS-NIR cu conectori SMA.

Spectrometrul nu necesita ajustari optice pentru a asigura o stabilitate termica extrema iar conexiunea la PC este simpla, de tip USB.

Detectorul CCD cu 2048 pixeli este racit termoelectric asigurand o rezolutie de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

Semnalul Raman al tesuturilor biologice, in vivo si nu numai poate avea o intensitate scazuta corelata cu volumul mic de analiza folosit uzual si cu fenomenele de fluorescenta adiacente ce pot aparea.

Pentru optimizarea semnalului Raman si obtinerea unor date relevante sunt posibile mai multe abordari, folosite singular sau conjugate.

Timpul de achizitie poate fi prelungit astfel incat sa fie inregistrat un semnal mai puternic. O data cu prelungirea timpului de achizitie creste insa si nivelul de zgomot ceea ce implica necesitatea inregistrarii mai multor spectre pentru acelasi punct, timpul de achizitie total devenind substantial mai indelungat limitandu-se astfel numarul de probe ce poate fi analizat.

**De aceea abordarea in acest proiect pentru marirea eficientei analizei este utilizarea tehnologiei SERS care a dovedit in timp capabilitatea de multiplicare cu pana la cateva ordine de marime a semnalului Raman prin fenomenul de rezonanta** <sup>(10, 11, 12, 13)</sup>.

### **3. Studii si analize pentru elaborarea protocoalelor preliminare in vederea caracterizarii marginilor tumorilor utilizand accesoriul chirurgical SERS**

In cadrul acestei etape, în primul rând, s-au executat mamectomii totale folosind pentru secționarea țesuturilor moi peritumorale lame de bisturiu pe care INOE a depus diferite tipuri de material specifice (argint, aur, etc.) după care formațiunile tumorale mamare au fost secționate în două părți din care o parte a fost trimisă pentru examen histopatologic iar altă parte împreună cu lamele de bisturiu cu care s-a realizat secționarea țesuturilor moi peritumorale, pentru analiză Raman la INOE.

Mamectomia s-a realizat în cadrul Clinicii de Obstetrică-Patologia reproducției de la Facultatea de Medicină Veterinară București din componența USAMV București (partener 1).

Cățelele supuse intervenției chirurgicale au fost examinate clinic s-au executat examene hematologice, biochimice sanguine și radiologice.

Cățelele care nu prezentau riscuri vitale în urma intervenției chirurgicale au fost operate. Intervenția chirurgicală a constat în realizarea mamectomiei totale folosind pentru secționarea țesuturilor moi peritumorale lamele de bisturiu pe care INOE a depus diferite substraturi.

*Tehnica operatorie s-a executat astfel:*

Incizia pielii – s-au executat două incizii în felie de pepene de o parte și de alta a lanțului mamar dinainte spre înapoi, la distanță de zona tumorizată, pentru siguranța marginilor tumorale, **folosind lamele de bisturiu pe care INOE a depus diferite nanostructuri din metal nobil.**

Probele recoltate chirurgical au fost secționate în două părți:

- O parte a fost trimisă la Laboratorul disciplinei de morfopatologie.
- A doua parte a mers la Institutul Național de Optoelectronică (INOE) pentru analiza prin spectroscopie Raman.
- **Lamele de bisturiu pe care INOE a depus diferite filme nanostructurate din metal nobil și cu care s-a realizat secționarea țesuturilor moi peritumorale au fost trimise la Institutul Național de Optoelectronică (INOE) pentru analiza prin spectroscopie Raman (SERS)**

Examele morfopatologice și identificarea tipului de tumoră s-au realizat după includere la parafină, secționare, colorare și examinare.

### **Analize Raman (SERS)**

Probele au fost analizate Raman (SERS) ex vivo. Un rezumat al rezultatelor este prezentat în figura 6, care compară spectrele grăsimii subcutanate sănatoase cu cele ale tegumentului sănătos și ale tumorii respective.

În literatura nu sunt menționate decât experimente efectuate pe țesut uman. Multe benzi Raman ale țesutului uman implică benzi C-H caracteristice acizilor grași atribuite diferitelor grupări CH, CH<sub>2</sub>, și CH<sub>3</sub> ale căror frecvențe de vibrație se situează în domeniul 1400 - 3000 cm<sup>-1</sup>.

Vibrațiile H-C=C produc o bandă la 3009 cm<sup>-1</sup>, corespunzând acizilor grași și mai puțin proteinelor. În cercetările de oncologie umană această bandă a fost considerată deosebit de importantă, știindu-se că rolul proteinelor în tumorile maligne este preponderant. Totuși, în fig. 6 această bandă este deopotrivă observată în spectrul corespunzător țesutului malign, (confirmat de analizele histopatologice) în cel al tegumentului sănătos și în grăsimea subcutanată. Deoarece grăsimea este prezentă în aproape orice țesut (sân, abdomen, torace) este destul de improbabil ca această bandă să fie utilizată ca marker de diagnostic malign-benign. În contrast cu aceasta, linia de la 1558 cm<sup>-1</sup> atribuită carotenoizilor și care nu se găsește în țesuturile maligne (spectrul b) ar putea reprezenta un început pentru definirea unor markeri de diagnostic.

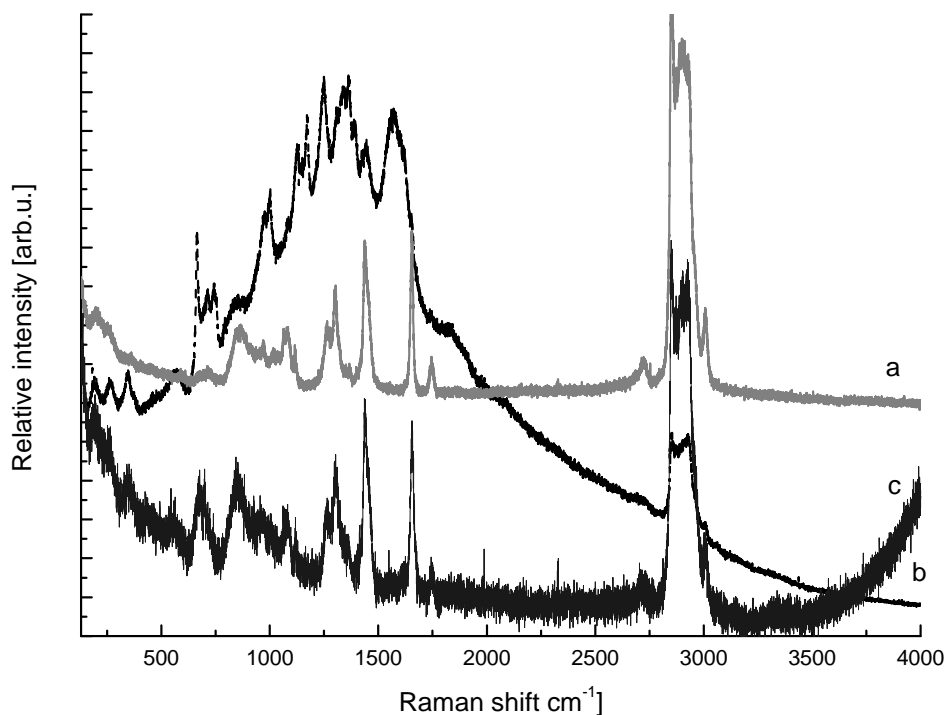


Fig. 6. Spectrele SERS ale: a) tesutului gras subcutanat sanatos; b) tesut sanatos cutanat (marginie curata); c) tesut malign

In spectrul c) se observa un maxim la  $3311\text{ cm}^{-1}$ , care nu apare decat in spectrele tesuturilor maligne. Acesta a fost utilizat ca marker in identificarea marginii chirurgicale curate.

**CONCLUZIE:** Linia de la  $3311\text{ cm}^{-1}$  corespunde modului de vibratie al gruparii OH si a fost identificata numai in tesuturile maligne (confirmare histopathologica). Aceasta impreuna cu banda de la  $1558\text{ cm}^{-1}$  vor reprezenta subiectele importante ale studiilor viitoare pentru stabilirea markerilor Raman cel putin in chirurgia veterinara.

O parte din rezultate au fost comunicate prin doua prezentari orale la la EMRS –Spring meeting 2015, Lille, Franta, 11-15 mai 2015.

A fost acceptata spre publicare o lucrare la Romanian Reports in Physics (IF 2014 1,57) si o a doua a fost trimisa spre publicare la Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences .

Obiectivele fazei au fost atinse

## Bibliografie selectiva

- (1) AN01Semiconductor Horiba Scientific
- (2) Optical properties of biological tissues: a review Steven L Jacques, 2013 Phys. Med. Biol. 58 R37
- (3) Handbook of Lasers in Dermatology, Keyvan Nouri
- (4) Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury, Byrnes et al, Lasers Surg Med 2005 Mar 36 (3 )
- (5) RA04 In vivo Raman measurement of human skin
- (6) <http://www.horiba.com/scientific/products/raman-spectroscopy/raman-academy/raman-faqs/what-laser-wavelengths-are-used-for-raman-spectroscopy/>
- (7) Svanberg, S. Atomic and Molecular Spectroscopy: Basic Aspects and Practical Applications; Springer Verlag, 2004.
- (8) Effects of laser excitation wavelength and optical mode on Raman spectra of human fresh colon, pancreas, and prostate tissues, Ran Li et al, Journal of Raman Spectroscopy, [Volume 45, Issue 9](#), pages 773–780, September 2014
- (9) Horiba Scientific LabSpec 6  
<http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/Raman/HORIBA - LabSpec 6.pdf>
- (10) Determination of Resonance Raman Cross-Sections for Use in Biological SERS Sensing with Femtosecond Stimulated Raman Spectroscopy, W. Ruchira Silva et al, *Anal. Chem.*, 2014, 86 (15), pp 7782–7787
- (11) Raman based imaging in biological application - a perspective, Partha P . Kundu, *J M e d A I I*  
*i e d S c i 2 0 12; 2(2) :41-48*
- (12) Understanding tip-enhanced Raman spectra of biological molecules: a combined Raman, SERS and TERS study, Carolin Blum et al, Journal of Raman Spectroscopy, DOI: 10.1002/jrs.4099
- (13) Label-Free Nanometer-Resolution Imaging of Biological Architectures through Surface Enhanced Raman Scattering, Sencer Ayas et al, doi:10.1038/srep02624