

## RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC

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

ETAPA 1 2014

#### **Rezumat**

În cadrul acestei etape, în primul rând, s-a realizat recoltarea formațiunilor tumorale mamare de la cățele cu tumori spontane prin tehnica mamectomiei totale a unui lanț mamar datorită localizării tumorilor și conexiunilor limfatice ale mamelelor. Cazurile investigate și prezentate în acest studiu sunt catele de diferite rase și vârste, cu tumori mamare: Ciobanesc German/3 ani; Metis/15 ani; Cocker Spaniel 11 ani, nesterilizate.

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 și au executat examene hematologice, biochimice sanguine și radiologice

#### **Activitate I.1**

##### ***Selectarea parametrilor relevanti pentru masuratori, domeniile și acuratetea de masurare***

S-au studiat influențele, asupra spectrelor Raman, ale lungimii de undă de excitație Raman, a densității de putere a fascicolului pe probă, a volumului probei și a formei nanoparticulelor din substratul SERS. Domeniul  $100-4000\text{cm}^{-1}$  a fost acceptat ca domeniu de lucru în etapele viitoare. Utilizarea ariei picului ca măsură a malignității nu este o soluție acceptabilă. Intensitatea picurilor (înălțimea) și deplasarea în frecvență ar putea însă furniza o soluție cel puțin calitativă.

#### **Activitate I.2**

##### ***Proiectare și experimente pentru realizarea accesoriului SERS pe baza de nanoparticule de Au (parțial)***

Au fost efectuate experimente de obținere a accesoriului SERS prin depunere cu laser pulsant. S-a observat, în cadrul analizelor Raman, că acest accesoriu are un rol benefic în rezolvarea spectrelor tesuturilor biologice și că fluorescența indusă de absorbția radiației în domeniul vizibil dispare sau se atenuează semnificativ.

#### **Rezultate**

Studiu asupra domeniului spectral de interes în caracterizarea Raman a marginilor tumorilor maligne

Website proiect

#### **CONCLUZII:**

1. Spectrele Raman ex vivo ale materialului biologic studiat au fost obținute cu o sursă laser în vizibil (632nm) și prezintă fond mediu de fluorescență atunci când proba este masivă și nul atunci când se folosește un substrat cu nanoparticule.

2. Trasaturile spectrale din zona  $2750-3100\text{ cm}^{-1}$  par sa aiba originea in tesut gras, iar nu in tesut malign. O verificare pe un numar mare de cazuri este programata.
3. O alegere posibila pentru substratul SERS sunt nanoparticule de forma cilindrica
4. Asocierea spectrelor Raman cu analizele citopatologice poate duce la o metoda rapida de diagnosticare a tumorilor maligne, cel putin in cazul tesutului mamar.
5. Radiatia monocromatica de  $633\text{nm}$  poate fi utilizata pentru construirea sistemului NANOMARDET

### **Raport stiintific si tehnic**

***Etapa I Studii preliminare de imprastiere Raman pe probe biologice (in vitro) luand in considerare combinatii de nanoparticule de Au si material-gazda.***

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 dezbaterrilor 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 tumorilor 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 adincime 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 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 [1]. De aceea au fost utilizate pe scara larga ca agenti de contrast in imagistica pentru fluorescanta NIR, fotoacustica, imprastiere Raman si reflexie difuza. Studii de imprastiere Raman

### **Influenta lungimii de unda a laserului asupra semnalului Raman<sup>1</sup>:**

Alegerea lungimii de unda de excitare afecteaza mai multi parametri precum:

- Colectarea semnalului, deoarece intensitatea semnalului Raman este direct proportionala cu  $(1/\lambda)^4$
- Volumul analizat, care depinde de diametrul fasciculului laser si de adancimea de penetrare a laserului in proba
- Nivelul semnalului de fluorescanta care poate acoperi ca intensitate si domeniu spectru semnalul Raman
- Efectul de rezonanta, existand o puternica dependenta intre lungimea de unda si benzi Raman specifice
- Domeniul spectral acoperit si rezolutia avand in vedere ca dispersia retelei de difractie variaza cu domeniul spectral si influenta lungimii de unda de excitare [2]

Lungime de unda laser (nm)	Adancime de penetrare laser in Si (nm)
633	3 000
514	762
488	569
457	313
325	10

Fig. 1 Tabel care prezinta adancimile de penetrare in Si

### **Activitati experimentale**

În cadrul acestei etape, în primul rând, s-a realizat recoltarea formațiunilor tumorale mamare de la cățele cu tumori spontane prin tehnica mamectomiei totale a unui lanț mamar datorită localizării tumorilor și conexiunilor limfatice ale mamelelor. Cazurile investigate și prezentate în acest studiu sunt cățele de diferite rase și vârste, cu tumori mamare: Ciobanesc German/3 ani; Metis/15 ani; Cocker Spaniel 11 ani, nesterilizate.

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

#### **Activitate I.1**

**Selectarea parametrilor relevanți pentru măsuratori, domeniile și acurătatea de măsurare**

#### **Activitate I.2**

**Proiectare și experimente pentru realizarea accesoriului SERS pe baza de nanoparticule de Au (partial)**

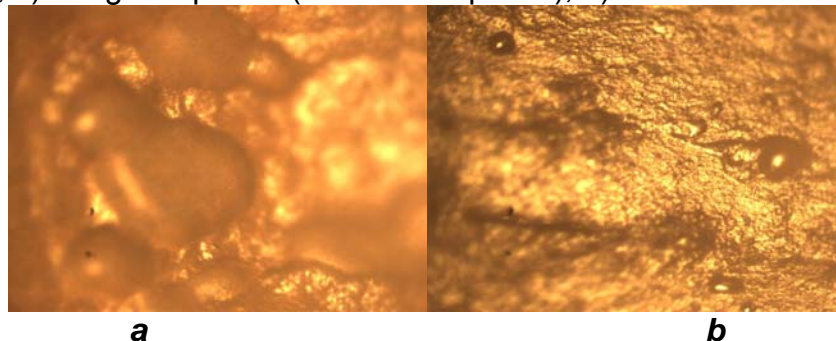
Aceste activități au un caracter experimental și se influențează reciproc, așa cum se remarcă din cele ce urmează. În prima etapă experimentele Raman s-au desfășurat *ex vivo* dar simulându-se condițiile *in vivo*. Probele recoltate au fost investigate la foarte scurt timp după operație. Măsurătorile au fost efectuate atât pe țesut masiv cât și pe amestecuri de țesut și fluide transferate pe substrat cu nanoparticule de Au pentru evaluarea efectului SERS.

Examenle morfopatologice și identificarea tipului de tumoră s-au realizat după includere la parafină, secționare, colorare și examinare. Durata unui astfel de examen este de minim 3 săptămâni.

O variantă de diagnosticare posibilă în timp mai scurt ar putea consta în coroborarea analizelor citologice cu analizele prin spectroscopie Raman, ramanând că examenul morfologic să valideze/invalidizeze (în această etapă de testare) rezultatele.

#### **Caz 1. Ciobanesc German, 3 ani**

În Fig. 7 sunt prezentate imaginile zonelor pe care au fost efectuate măsurătorile Raman. a) suprafața țesut tumoral aproape de piele; b) suprafața țesut tumoral în centrul probei; c) marginea probei (interfața cu pielea); d) lama excizie



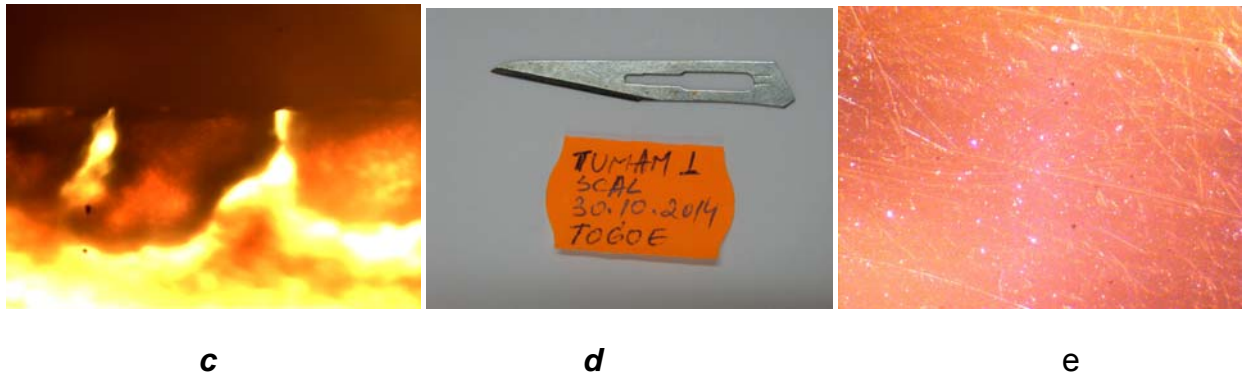


Fig. 7 Zonele pe care au fost efectuate masuratorile Raman. a) suprafata tesut tumoral aproape de pielea; b) suprafata tesut tumoral in centrul probei; c) marginea probei (interfata cu pielea); d) lama excizie; e) substrat cu nanoparticule depuse cu PLD (INOE)

Masuratorile de imprastiere Raman au fost efectuate pe tesut netratat (“proaspat”) cu spectrometrul LABRAM HR 800 (Horiba Jobin Yvon) la INOE. Desi in mod obisnuit tesutul biologic este investigat cu sursa de IR (785nm sau 830nm), in experimentele

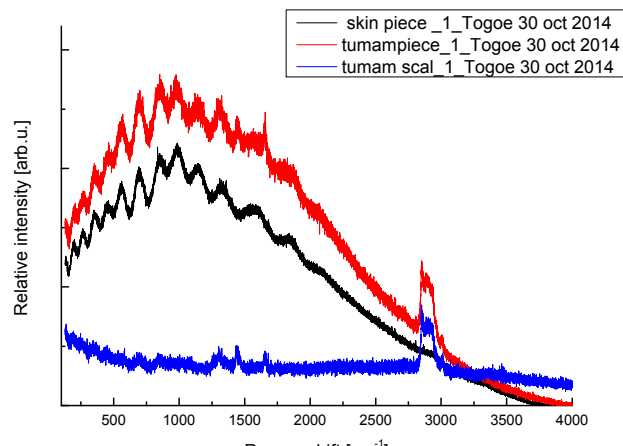


Fig. 8 Spectrele Raman ale unei portiuni de piele (negru), ale unei zone de tumora (rosu) si ale fluidelor si tesutului tumoral pe substrat cu nanoparticule.

noastre am utilizat sursa de 632nm (rosu, laser HeNe), cu o putere de 12mW pe suprafata probelor. Pentru tesutul masiv (liniile rosu si negru) trasaturile spectrale se regasesc pe un fond de fotoluminescenta, care dispare in situatia in care proba se colecteaza pe substratul cu nanoparticule (albastru). Utilizarea unei surse cu lungimea de unda in vizibil permite si scanarea unui domeniu mai larg de frecvente (in cazul nostru de la 100 la 4000  $\text{cm}^{-1}$ ), spre deosebire de majoritatea studiilor publicate pana in prezent. Deconvolutia picurilor din regiunea 2750-3100  $\text{cm}^{-1}$ , in care se semnaleaza modurile de intindere C-H, arata ca ariile picurilor se suprapun. **Aceasta demonstreaza ca utilizarea ariei picului ca masura a malignitatii nu este o solutie acceptabila.** Intensitatea picurilor (inaltimea) si deplasarea in frecventa ar putea insa furniza o solutie cel putin calitativa.

În urma examenului morfopatologic și a interpretării acestuia s-a constatat proliferare multicentrică benignă de celule epiteliale; secreție lactată în lumenul unor acini. Limfonoduri reactive cu centrii germinativi

**Diagnostic:** Glandă mamară cu hiperplazie lobulară.

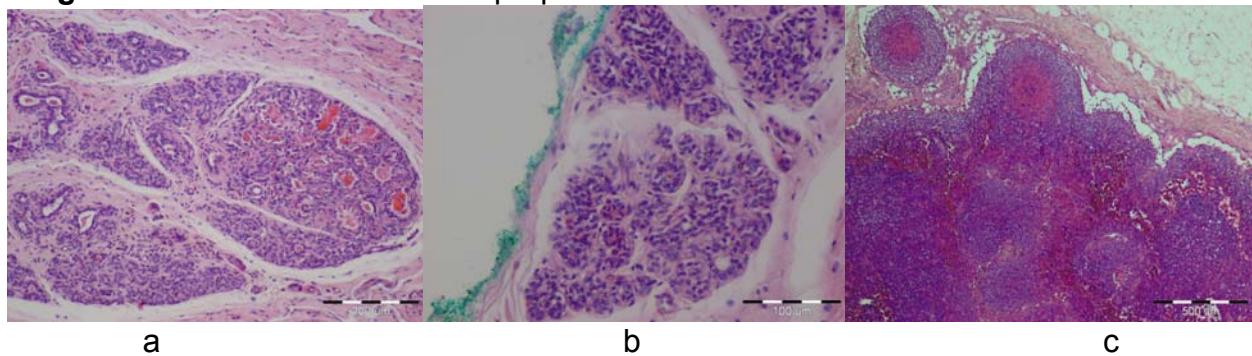


Fig. 9 a) & b) Glandă mamară cu hiperplazie lobulară; c) Limfonod mamar reacționat

### Caz 2 Metis 15 ani

Probele au constat din secțiuni proaspete ale formațiunii tumorale, margine+piele, doi noduli (indurații) de diametru aprox 1 cm, amestec de fluide și țesut pe bisturiul cu care s-a executat excizarea, acestea din urmă transferate pe substrat cu nanoparticule (Fig 10).

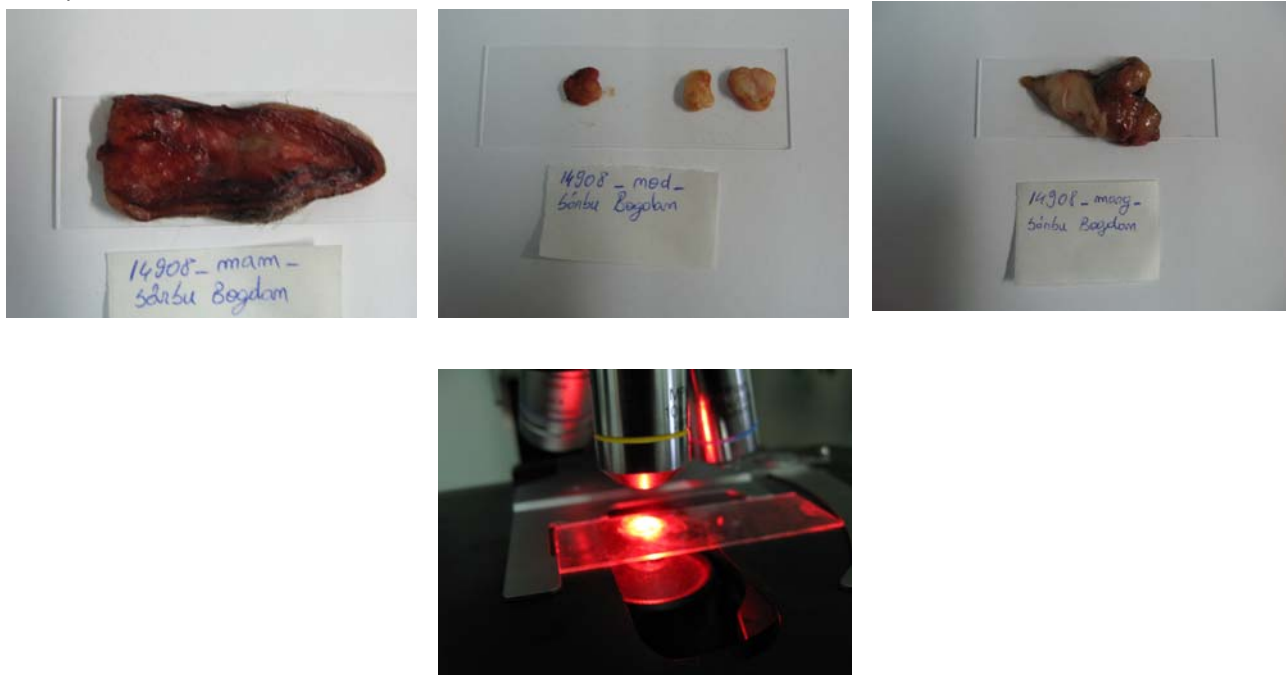


Fig. 10. Probele caz 14908 (Metis, 15 ani)

### Rezultat examen citopatologic (FMVB)

Frotiuri bogate celular, în care se regăesc numeroase celule epiteliale tumorale, dispuse în plaje, ce prezintă anizocarioză și anizocitoză moderate, nucleu rotund-ovular, cromatină fin granulară, cu 1-3 nucleoli evidenți, citoplasmă bazofilă, rare celule binucleate. Unele celule prezintă intracitoplasmatic vacuole de secreție. Numeroase

celule de tip inflamator, preponderent macrofage active, cu material intracitoplasmatic fagocitat, rare neutrofile și mastocite.  
Fondul froiturilor ocupat de hematii, detritus celular în cantitate mare, rare cheratinocite tipice.

Caracteristicile citomorfologice sunt reprezentative pentru o tumoră epitelială malignă – suspiciune adenocarcinom mamar.

### Masuratori micro-Raman

Spectrele de imprastiere Raman au fost colectate atat din tesut masiv cat si din tesut amestecat cu fluide. (fig 10). In fig. 11a sunt reprezentate spectrele micro Raman ale tesutului tumoral nodular, colectate din proba masiva (linia neagra) si din proba asezata pe substrat cu nanoparticule (linia rosie). Ca si in **cazul 1**, pentru proba asezata pe substratul cu nanoparticule fluorescenta se diminueaza semnificativ, desi lungimea de unda este din domeniul vizibil. Regiunea 2750-3100 $\text{cm}^{-1}$  este bine reprezentata si in aceste spectre, si se remarca si in fig 11.b, atat in spectrul tumorii benigne (linia neagra, caz 1) cat si al celei suspecta de malignitate in urma examenului citopatologic (rosu si albastru, unde linia albastra corespunde marginii zonei excizate). Acest fapt ne sugereaza ca figura spectrala din aceasta regiune ar putea avea o alta origine decat celulele maligne. Revenind la linia rosie din fig. 11b, sunt de remarcat doua picuri bine rezolvate in domeniul frecventelor mici (100-500  $\text{cm}^{-1}$ ), care nu sunt prezente in spectrul marginii si nici in al probelor din cazul 1 (benign)

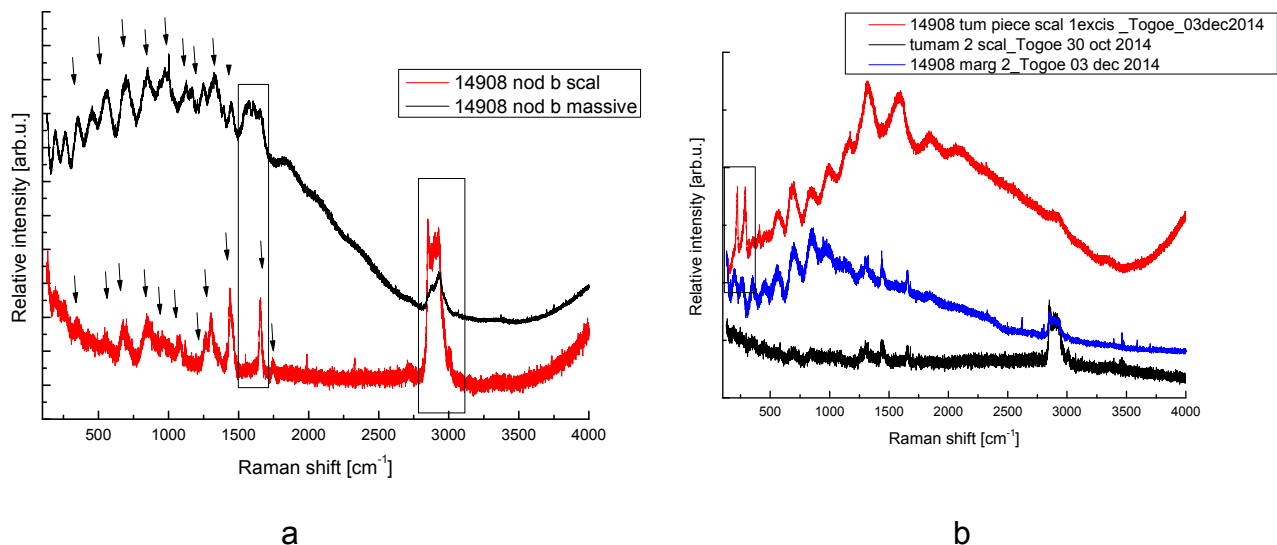
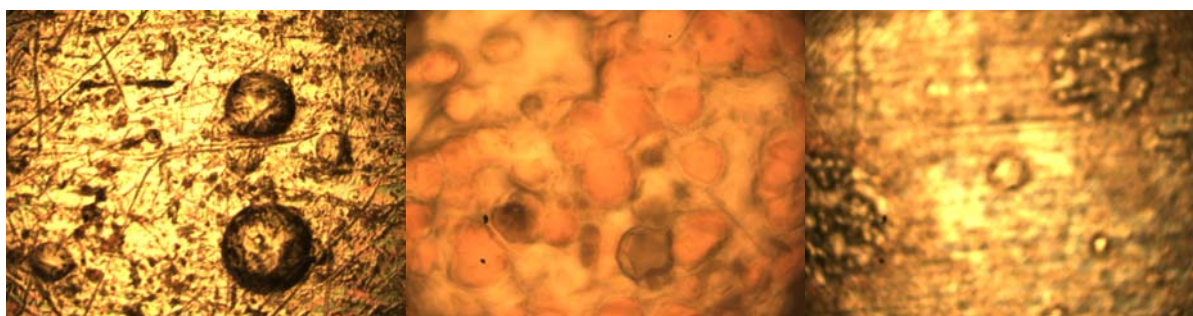


Fig 11. Spectrele Raman (633nm) ale: a) nodurilor tumorali (linia neagra – masiv; linia rosie – substrat cu nanoparticule); b) comparatie între spectrele Raman ale tesutului benign (caz 1, linia neagra, substrat cu nanoparticule) si ale tesutului suspectat malign din examenul citopatologic (caz 2/14908), linia rosie si respectiv albastra (marginie)

## Explorarea trasaturilor spectrale din zona 2750-3100cm<sup>-1</sup>

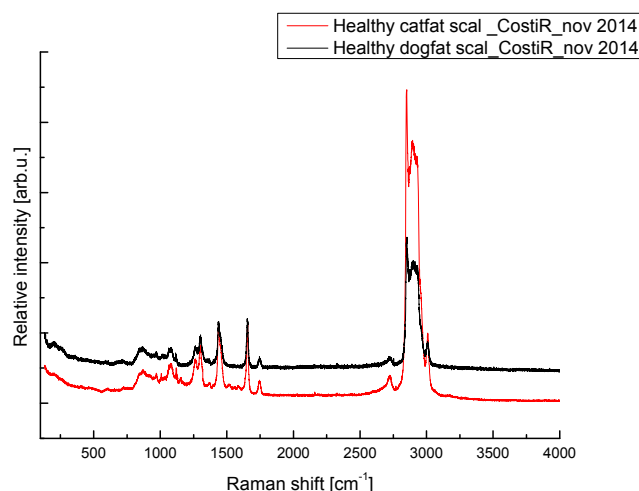
Formatiunile microsferice prezente in imaginile din fig. 12 (a, b, c) sunt caracteristice grasimii. Spectrele asociate imaginilor se observa in fig 12 d, in care zona 2750-3100 cm<sup>-1</sup> este proeminenta si reproductibila. Spectrele Raman ale acestor formatiuni au fost obtinute cu radiatia laser 633nm, utilizand substrat cu nanoparticule cilindrice. Se remarca absenta fluorescentei. Trasaturile spectrale de la frecvente in domeniul 2750-3100 cm<sup>-1</sup> sunt prezente deopotriva in tesut cu formatiuni benigne (Caz 1\_FMVB), in tesut suspectat malign (Caz 2\_FMVB) si in tesut sanatos (colaborare Roxy Veterinary S.R.L.)



a

b

c



d

Fig. 12 Imagini ale unor zone de grasime pe substrat cu nanoparticule: a) caz1(Togoe\_FMVB USAMVB); b)caine sanatos (colaborare Roxy Veterinary S.R.L.) c) caz2 (Togoe\_FMVB USAMVB)

Avand in vedere aceste rezultate se pot trage urmatoarele concluzii:



## **CONCLUZII:**

1. Spectrele Raman ex vivo ale materialului biologic studiat au fost obtinute cu o sursa laser in vizibil (632nm) si prezinta fond mediu de fluorescenta atunci cand proba este masiva si nul atunci cand se foloseste un substrat cu nanoparticule.
2. Trasaturile spectrale din zona  $2750-3100\text{ cm}^{-1}$  par sa aiba originea in tesut gras, iar nu in tesut malign. O verificare pe un numar mare de cazuri este programata.
3. O alegere posibila pentru substratul SERS sunt nanoparticule de forma cilindrica
4. Asocierea spectrelor Raman cu analizele citopatologice poate duce la o metoda rapida de diagnosticare a tumorilor maligne, cel putin in cazul tesutului mamar.
5. Radiatia monocromatica de 633nm poate fi utilizata pentru construirea sistemului NANOMARDET.

## Referinte bibliografice

- [1] Taghian A, Mohiuddin M, Jaggi R, Goldberg S, Ceilley, E, Powell S. Current perceptions regarding surgical margin status after breast-conserving therapy: results of a survey., *Ann Surg* 2005;241:629–39.2
- [2] Dillon MF, Hill AD, Quinn CM, McDermott EW, O'Higgins N. A, Pathologic assessment of adequate margin status in breast-conserving therapy. *Ann Surg Oncol* 2006;13:333–9.;
- [3] Luini A, Rososchansky J, Gatti G, et al. The surgical margin status after breast-conserving surgery: discussion of an open issue. *Breast Cancer Res Treat* 2008;113:397–402.
- [4] Aziz D, Rawlinson E, Narod SA, et al. The role of reexcision for positive margins in optimizing local disease control after breast-conserving surgery for cancer. *Breast J* 2006;12:331–7.;
- [5] Cefaro GA, Genovesi D, Marchese R, et al. Predictors of local recurrence after conservative surgery and whole-breast irradiation. *Breast Cancer Res Treat* 2006;98:329–35.;
- [6] Cellini C, Hollenbeck ST, Christos P, et al. Factors associated with residual breast cancer after re-excision for close or positive margins. *Ann Surg Oncol* 2004;11:915–20.;
- [7] Connolly JL, Boyages J, Nixon AJ, et al. Predictors of breast recurrence after conservative surgery and radiation therapy for invasive breast cancer. *Mod Pathol* 1998;11:134–9.;
- [8] Dillon MF, Mc Dermott EW, O'Doherty A, Quinn CM, Hill AD, O'Higgins N. Factors affecting successful breast conservation for ductal carcinoma in situ. *Ann Surg Oncol* 2007;14:1618–28.;
- [9] Huston TL, Pigalarga R, Osborne MP, Tousimis E. The influence of additional surgical margins on the total specimen volume excised and the reoperative rate after breast-conserving surgery. *Am J Surg* 2006;192:509–12.;
- [10] McIntosh A, Freedman G, Eisenberg D, Anderson P. Recurrence rates and analysis of close or positive margins in patients treated without re-excision before radiation for breast cancer. *Am J Clin Oncol* 2007;30:146–51.;
- [11] Schouten van der Velden AP, Van de Vrande SL, Boetes C, Bult P, Wobbes T. Residual disease after reexcision for tumour-positive surgical margins in both ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma of the breast: the effect of time. *J Surg Oncol* 2007;96:569–74.;
- [12] Scopa CD, Aroukatos P, Tsamandas AC, Aletra C. Evaluation of margin status in lumpectomy specimens and residual breast carcinoma. *Breast J* 2006;12:150–3;
- [13] Smitt MC, Nowels KW, Zdeblick MJ, et al. The importance of the lumpectomy surgical margin status in long-term results of breast conservation. *Cancer* 1995; 76:259–67.;; Swanson GP, Rynearson K, Symmonds R. Significance of margins of excision on breast cancer recurrence. *Am J Clin Oncol* 2002;25:438–41.;
- [14] Zavagno G, Goldin E, Mencarelli R, et al. Role of resection margins in patients treated with breast conservation surgery. *Cancer* 2008;112:1923–31
- [15] Bușcă Antoanela, Negoită D., Ciobotaru Emilia, **Bîrtoiu A.**, Militaru Manuella, *Date preliminare privind implicațiile estradiolului și progesteronului seric în cancerul mamar la cățea și pisică*, *Revista Română de Oncologie și Transfer Tehnologic*, 2003, no. 8, 501-507, ISSN 1584-6547
- [16] Freddy T. Nguyen, Adam M. Zysk, Eric J. Chaney, Jan G. Kotynek, Uretz J. Oliphant, Frank J. Bellafiore, Kendrieth M. Rowland, Patricia A. Johnson, and Stephen A. Boppart, Intraoperative Evaluation of Breast Tumor Margins with Optical Coherence Tomography *Cancer Res* 2009;69:8790-8796

- [17] Valdes EK, Boolbol SK, Cohen JM, Feldman SM. Intra-operative touch preparation cytology; does it have a role in re-excision lumpectomy? *Ann Surg Oncol* 2007;14:1045–50..
- [18] Goldfeder S, Davis D, Cullinan J. Breast specimen radiography: can it predict margin status of excised breast carcinoma? *Acad Radiol* 2006;13:1453–9
- [19] Erguvan-Dogan B, Whitman GJ, Nguyen VA, et al. Specimen radiography in confirmation of MRI-guided needle localization and surgical excision of breast lesions. *AJR Am J Roentgenol* 2006;187:339–44.
- [20] Karni T, Pappo I, Sandbank J, et al. A device for realtime, intraoperative margin assessment in breast-conservation surgery. *Am J Surg* 2007;194:467–73.
- [21] Haka AS, Volynskaya Z, Gardecki JA, et al. In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using Raman spectroscopy. *Cancer Res* 2006;66:3317–22.;
- [22] Abigail S. Haka, Zoya Volynskaya, Joseph A. Gardecki, Jon Nazemi, Robert Shenk, Nancy Wang, Ramachandra R. Dasari, Maryann Fitzmaurice, Michael S. Feld, Diagnosing breast cancer using Raman spectroscopy: prospective analysis, *Journal of Biomedical Optics* 14, 5, 054023, September/October 2009.
- [23] Luis Felipe das Chagas e Silva de Carvalho, Renata Andrade Bitar, Emilia Angela Loschiavo Arisawa, Adriana Aigotti Haberbeck Brandao, Kathia Maria Honorio, Luiz Antonio Guimaraes Cabral, Ailton Abrahao Martin, Herculano da Silva Martinho, and Janete Dias Almeida, Spectral Region Optimization for Raman-Based Optical Biopsy of Inflammatory Lesions, *Photomedicine and Laser Surgery*, Volume 28, Supplement 1, 2010, Mary Ann Liebert, Inc., S111–S117
- [24] Lee C.L. Chin, William M. Whelan, and I. Alex Vitkin, Optical Fiber Sensors for Biomedical Applications, in *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue*, 2nd ed, A.J. Welch, M.J.C. van Gemert (eds.), Springer Science+Business Media B.V. 2011)
- [25] von Maltzahn G, Centrone A, Park JH, et al. SERS-coded gold nanorods as a multifunctional platform for densely multiplexed near-infrared imaging and photothermal heating. *Adv Mater*. 2009;21(31):3175–3180.
- [26] Loo C, Lowery A, Halas N, West J, Drezek R. Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. *Nano Lett*. 2005;5(4): 709–711.
- [27] Huang X, Qian W, El-Sayed IH, El-Sayed MA. The potential use of the enhanced nonlinear properties of gold nanospheres in photothermal cancer therapy. *Lasers Surg Med*. 2007;39(9):747–753.
- [28] Terentyuk GS, Maslyakova GN, Suleymanova LV, et al. Laser-induced tissue hyperthermia mediated by gold nanoparticles: toward cancer phototherapy. *J Biomed Opt*. 2009;14(2):021016.
- [29] von Maltzahn G, Park JH, Agrawal A, et al. Computationally guided photothermal tumor therapy using long-circulating gold nanorod antennas. *Cancer Res*. 2009;69(9):3892–3900.
- [30] Tong L, Wei Q, Wei A, Cheng J-X. Gold nanorods as contrast agents for biological imaging: optical properties, surface conjugation and photothermal effects. *Photochem Photobiol*. 2009;85(1):21–32.
- [31] Gobin AM, Lee MH, Halas NJ, James WD, Drezek RA, West JL. Near-infrared resonant nanoshells for combined optical imaging and photothermal cancer therapy. *Nano Lett*. 2007;7(7):1929–1934
- [32] MELANIE HOMBERGER AND ULRICH SIMON On the application potential of gold nanoparticles in nanoelectronics and biomedicine, *Phil. Trans. R. Soc. A* (2010) **368**, 1405–1453
- [33] AN01 Semiconductor Horiba Scientific
- [34] Optical properties of biological tissues: a review Steven L Jacques, 2013 *Phys. Med. Biol.* 58 R37

- [35] Handbook of Lasers in Dermatology, Keyvan Nouri
- [36] 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 )
- [37] RA04 In vivo Raman measurement of human skin
- [38] Svanberg, S. Atomic and Molecular Spectroscopy: Basic Aspects and Practical Applications; Springer Verlag, 2004.
- [39] 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
- [40] Horiba Scientific LabSpec 6  
(<http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/Raman/HORIBA - LabSpec 6.pdf>)
- [41] 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
- [42] Raman based imaging in biological application - a perspective, Partha P . Kundu, *J M e d A l l i e d S c i* 2 0 1 2; 2(2) :41-48
- [43] 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
- [44] Label-Free Nanometer-Resolution Imaging of Biological Architectures through Surface Enhanced Raman Scattering, Sencer Ayas et al, doi:10.1038/srep02624
- [45] Near-Infrared Micro-Raman Spectroscopy for *in Vitro* Detection of Cervical Cancer, LORI E. KAMEMOTO et al, *Appl Spectrosc.* Mar 2010; 64(3): 255–261.
- [46] Raman Spectroscopy for Clinical Oncology, Michael B. Fenn et al, *Advances in Optical Technologies* Volume 2011 (2011), Article ID 213783