



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01255**

(22) Data de depozit: **28.11.2011**

(41) Data publicării cererii:  
**28.06.2013** BOPI nr. **6/2013**

(71) Solicitant:  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
MICROTEHNOLOGIE,  
STR. EROU IANCU NICOLAE NR. 126A,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:  
• **AVRAM MARIOARA, STR. FELEACU  
NR. 19, BL. 12C, SC. 1, AP. 31, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **PETRESCU INA RUXANDRA,  
STR. SABINELOR NR. 98, AP. 3,  
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **AVRAM MARIUS ANDREI, STR. FELEACU  
NR. 19, BL. 12C, SC. 3, AP. 31, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **RĂDOI ANTONIO MARIAN, ALEEA ISTRU  
NR. 7, BL. A3, SC. E, AP. 75, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU DE CARTOGRAFIERE A ARHITECTURII  
ȚESUTURILOR TUMORALE BAZAT PE REZONANȚA  
PLASMONICĂ LA SUPRAFAȚA NANOPARTICULELOR DE  
AUR**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de cartografiere tisulară, în scopul determinării limitelor tumorale, pe suprafață și în profunzime, inclusiv de evidențiere a cuiburilor de celule tumorale aflate în vecinătatea tumorii. Procedeu conform invenției se bazează pe rezonanța plasmonică la suprafața nanoparticulelor de aur aflate într-un mediu dielectric cu indice de refracție mare, nanoparticule care pătrund în tumoră prin

arteriole și capilare, în spațiul interstițial și în celule, și rămân fixate în țesut, iar în momentul realizării unei analize în spectru UV, acestea emit puternic o lumină fluorescentă, generând un aspect particular al țesutului și celulelor tumorale.

Revendicări: 3  
Figuri: 6



u 206 01255  
2007

# PROCEDEU DE CARTOGRAFIERE A ARHITECTURII ȚESUTURILOR TUMORALE BAZAT PE REZONANȚA PLASMONICĂ LA SUPRAFAȚA NANOPARTICULELOR DE AUR

Invenția se referă la un procedeu de cartografiere tisulară în scopul determinării limitelor tumorale, pe suprafață și în profunzime, inclusiv de evidențiere a cuiburilor de celule tumorale aflate în vecinătatea tumorii.

Utilizarea nanoparticulelor de aur (AuNPs) în scop de diagnostic a început să fie studiată recent, datorită proprietăților optice specifice diverse.

Nanosferele de aur, cu dimensiuni cuprinse între 2 și 100nm, se obțin prin reacția de reducere a soluției de tetrahidroaurat (HAuCl<sub>4</sub>), utilizând citratul, iar dimensiunea lor este invers proporțională cu cantitatea de citrat. Menținerea în dispersie a nanoparticulelor de aur se realizează cu ajutorul soluției de citrat, iar apa nu poate fi utilizată ca solvent.

În spectrul vizibil nanosferele de aur prezintă un singur maxim local cuprins în intervalul 510-550 nm, iar creșterea dimensiunilor nanoparticulelor generează un nou maxim local de absorbție la o lungime de undă superioară.

Principalele aplicații ale AuNPs sunt:

- în analize imunologice (Hirsch et al., 2003)
- electroforez[ capilară (Tseng et al., 2005)
- detecția celulelor tumorale (Kah et al., 2007)
- analiza culturilor de celule utilizând o substanță fluorescentă conjugată cu AuNPs (Nitin et al., 2007)
- agent fotoluminiscent datorită luminiscentei crescute (Wang et al., 2005)
- agent de contrast pentru diagnosticul imagistic al tumorilor profunde (Durr et al., 2007)
- spectroscopia Raman: imaginile obținute prin absorbția albastrului de metilen pe un singur strat de AuNPs sunt utile în studierea proprietăților plasmonilor (Laurent et al., 2005)
- terapia neoplaziilor bazată pe proprietatea fototermală de distrugere a celulelor



tumorale (Loo et al., 2005, Huang et al., 2006, Chen et al., 2007)

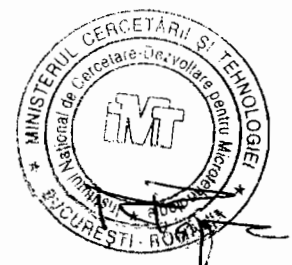
- nanotransportori pentru diferite medicamente

Nanoparticulele de aur sunt biocompatibile cu organismul uman, fără să prezinte efecte citotoxice (Reddy et al., 2010). Studiile privind biocompatibilitatea AuNPs au arătat absența efectului citotoxic asupra macrofagelor, la o concentrație de 100  $\mu\text{M}$  timp de 72h (Shukla et al., 2005).

AuNPs mai mici de 20 nm trec în celulă prin endocitoză, însă nu pătrund în nucleu. Chithrani et al., 2006 au studiat relația între caracteristicile AuNPs (dimensiuni, formă, concentrație) și nivelul de absorbție celulară, constatând că cel mai rapid proces a avut loc în cazul AuNPs cu dimensiuni de 20 nm, iar trecerea intracelulară a AuNPs a fost confirmată la TEM (NA intracelular, în vezicule localizate în citoplasmă, dar în afara nucleului). În momentul actual există un interes crescut privitor la proprietățile optice ale AuNPs, datorat potențialului imens de aplicații în domeniul imagistic.

Emisia în spectru fluorescent a AuNPs a fost recent studiată (Zhang et al.; Huang et al. 2007), care au sintetizat AuNPs fluorescente și au constatat emisia sub forma unor spoturi luminoase de culoare albastru-deschis sub excitația UV la lungimea de undă de 365nm.

Acest efect imagistic se explică teoretic prin rezonanța plasmonică localizată de suprafață care apare la interfața dintre AuNPs și un mediu dielectric în care sunt imersate, intensitatea luminoasă a plasmonilor fiind cu atât mai intensă cu cât indicele de refracție al mediului în care se află AuNPs este mai mare, și implicit permitivitatea electrică a mediului este mai mare, conform teoriei lui Gustav Mie. La interfață, fotonii pot fi împrăștiați sau absorbiți. Fotonii absorbiți pot crea excitații electronice interne în nanoparticule sau, în cazul în care au suficientă energie (e.g. excitația UV), pot scoate electroni din nanoparticule. AuNPs sunt cunoscute pentru puternica absorbție optică și împrăștiere a luminii în UV și vizibil datorită excitației rezonante localizate a plasmonilor la suprafața nanoparticulelor. Factorul determinant al caracteristicilor optice de absorbție este rezonanța plasmonică de suprafață, care poate apărea în particule cu diametru mai mic decât lungimea de undă a luminii de excitație. Teoria care explică acest comportament a fost dezvoltată pentru prima oară de Gustav Mie (1908). Numeroasele raportări recente corelează comportamentul spectroscopic al AuNPs cu teoria Mie. Studiul rezonanței plasmonice de suprafață a rămas un domeniu de cercetare foarte activ, atât științific cât și tehnologic, în special atunci când particulele sunt înglobate în matrice ionice (Astruc 2008). Conform teoriei Mie, secțiunea transversală totală compusă



din suprafața plasmonilor absorbiți și împrăștiați este dat ca o însumare peste toate oscilații electrice și magnetice (Le Ru și Etchegoin 2009). Rezonanța plasmonică de suprafață a fost descrisă cantitativ prin rezolvarea ecuațiilor lui Maxwell pentru particule sferice cu condițiile la limită corespunzătoare. Teoria Mie atribuie apariția plasmonilor la suprafața AuNPs oscilație dipolilor corespunzători electronilor liberi din banda de conducție care ocupă stări energetice imediat deasupra nivelului de energie Fermi (Alvarez et al 1997).

Pornind de la conceptul teoretic al rezonanței plasmonice de suprafață al nanoparticulelor de aur în spectru UV, am studiat rezonanța plasmonică de suprafață a nanoparticulelor de aur cu diametrul de 5,6 nm în țesutul tumoral, melanomul B16 la șoareci, forma de melanom asemănătoare cu melanomul uman cutanat. Scopul experimentului a fost de investigare histopatologică a țesutului tumoral în lumină UV cu lungimea de undă de excitație de 450 nm, după administrare de nanoparticule de aur.

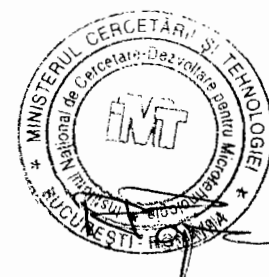
AuNPs au o constantă dielectrică negativă. Într-un mediu dielectric melanom ( $n = 1.997$ ) și într-un mediu de țesut normal ( $n = 1.202$ ), lungime de undă care determină intensitatea maximă a luminii este de aproximativ 490 nm. Partea reală a constantei dielectrice este negativă ( $\epsilon_r(\lambda) = -6.14$ ), iar partea imaginară a constantei dielectrice este pozitivă ( $\epsilon_i(\lambda) = 1.77$ ). Banda de absorbție a plasmonilor de suprafață apare atunci când  $\epsilon_r(\lambda) \approx -2n^2$ , unde  $n$  este indicele de refracție al mediului. Conform teoriei Mie, eficiența împrăștierii este proporțională cu  $\lambda^{-4}$ , ceea ce indică faptul că o lungime de undă a luminii incidente mai scurtă determină o împrăștiere mult mai mare a luminii. În acord cu rezonanța plasmonică la suprafața AuNPs, a teoriei Mie și a măsurătorilor realizate în cadrul acestei invenții, am determinat că secțiunea eficace de împrăștiere a luminii este de 16 ori mai mare în melanom decât în țesutul sănătos.

## **Materiale si metode**

### **Materiale necesare**

Principale materiale utilizate au fost:

- Nanoparticule de aur cu dimensiuni cuprinse între 5-7 nm în soluție de citrat
- Lot de 4 șoareci cu melanom B16 indus dintre care 2 șoareci martor.
- Nanoparticule de aur dispersate în citrat.
- Seringi, mănuși, instrumentar de recoltare a tumorilor.



- Soluție de formol 10%, parafină pentru includerea pieselor.
- Microtom, lame, lamele.
- Microscop optic 10-60 x cu lampa de mercur calibrată la spectrul UV, cu unitate optică de captare a imaginii, conectată la notebook.

### Sintetizarea nanoparticulelor de aur

Obținerea nanoparticulelor de aur uniforme se face prin reacția de reducere a ionilor de tetracloroaurat cu etanol, la temperaturi cuprinse între 30 și 60°C, la presiune atmosferică. Substanțele utilizate au fost:

- 25ml soluție apoasă de acid tetracloroauric (1g  $\text{HAuCl}_4$ )
- 3g linoleat de AuNPs ( $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{ONa}$ )
- 20mL etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ )
- 5mL acid linoleic ( $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$ )

Compușii chimici enumerați sunt introduși într-un recipient închis și se agit, după care se mențin timp de 2h la temperatură pornind de la 30°C până la 60°C. Apoi nanoparticulele de aur se resuspendă în soluție de citrat pentru menținerea lor în dispersie. Sinteza nanoparticulelor de aur s-a efectuat în cadrul Laboratorului de Nanotehnologii al IMT București (Figura 1).

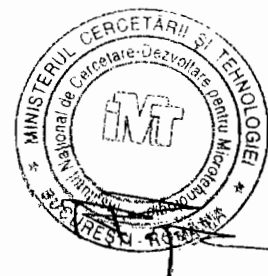
Analiza nanoparticulelor de aur s-a făcut la microscopul cu baleiaj electronic (SEM), disponibil în IMT București, iar imaginea obținută este prezentată în figura 1.

În această soluție au loc următoarele procese chimice: o fază solidă de linoleat de sodiu, o fază lichidă de etanol și acid linoleic și apă ce conține ioni de tetracloroaurat. Etanolul în faza de soluție reduce ionii de tetracloaurat în nanoparticule de aur. Se obține o soluție de culoare roz-roșu pal, datorată nanoparticulelor de aur (Figura 1).

### Etapele experimentului

În ziua a 5-a de la inocularea șoarecilor cu celule de melanom B16, când tumora avea diametrul de 5-6 mm, s-a efectuat injectarea subcutanată peritumorală a 0,2 ml soluție de nanoparticule de aur-citrat. După 2h s-au recoltat tumorile melanom B16 și s-au introdus în formol 10% în recipiente separate, etichetate. Prelucrarea primară a tumorilor, cu includerea în parafină și efectuarea de secțiuni de 2 $\mu\text{m}$  fixate pe lamele și lame. Apoi s-a analizat țesutul tumoral la microscopul optic 10-60x, cu lampa cu mercur, în UV cu lungimea de undă de 450 nm.

Am studiat mai întâi aspectul țesutului tumoral fără nanoparticule, pe secțiune proaspătă



inghețată și s-au măsurat diametrele celulelor tumorale: 9,89-13,44  $\mu\text{m}$  ( Figura 2 și Figura 3 - în UV).

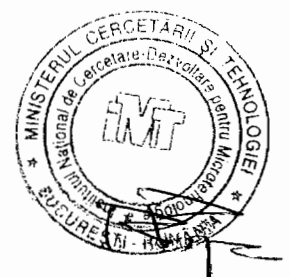
Proprietatea optică specială a nanoparticulelor de aur de fi fluorescente în lumină UV a fost demonstrată prin injectarea peritumorală de soluție de nanoparticule de aur-citrat și examinarea secțiunilor necolorate de țesut tumoral de melanom la șoarecii B16 la microscopul optic cu lampa cu vapori de mercur, care generează radiații în spectrul UV, obținându-se o imagine fluorescentă în albastru-deschis a melanomului. Această luminozitate atât de puternică a AuNPs aflate în melanom față de AuNPs aflate în țesutul sănătos se explică teoretic pe baza rezonanței plasmonilor de suprafață și a teoriei Mie, așa cum a fost explicat mai sus.

Rezultatul imagistic obținut atestă aplicabilitatea nanoparticulelor de aur în studiul arhitecturii tisulare.

Imaginile fluorescente obținute în spectru UV al nanoparticulelor de aur ce au pătruns în țesutul tumoral, inclusiv în melanocitele tumorale pot constitui un punct de plecare pentru analiza histopatologică a țesuturilor.

Studierea limitelor tumorale pentru îmbunătățirea marginilor de excizie tumorală poate beneficia de aportul imagistic de informație, utilizând piesa operatorie în preparat proaspăt congelat din care se efectuează secțiuni similare examenului extemporaneu intraoperator și se examinează la microscopul optic la care este atașată lampa ce generează spectrul UV.

Diagnosticul histopatologic cert al melanomului în cazurile dificile, detecția corectă a primelor celule neoplazice, identificarea limitelor tumorii, precum și a cuiburilor de celule neoplazice din vecinătatea tumorii sunt aspecte care în momentul actual necesită optimizarea metodelor tehnice de analiză. De aceea într-o etapă ulterioară vom realiza funcționalizarea superioară a nanoparticulelor de aur cu molecule țintă pentru tumoră pentru a crește specificitatea investigației.

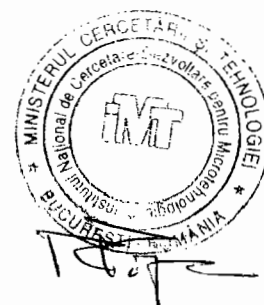


## REVEDICĂRI

1. Procedeu de cartografiere tisulară în scopul determinării limitelor tumorale (melanomul cutanat), pe suprafață și în profunzime, **caracterizat prin aceea că** nanoparticulele de aur devin puternic fluorescente în melanom, datorită indicelui de refracție mult mai mare al melanomului și a rezonanței plasmonice la suprafața nanoparticulelor de aur.

2. Procedeu de cartografiere tisulară în scopul evidențierii cuiburilor de celule tumorale aflate în vecinătatea tumorii **caracterizat prin aceea că** nanoparticulele de aur devin puternic fluorescente după transportul lor molecular prin endocitoză în celulele tumorale.

1. Procedeu de sintetizare a nanoparticulelor de aur, **caracterizat prin** stabilitatea nanoparticulelor ce se obțin prin reacția de reducere a soluției de tetrahidrocloraurat ( $\text{HAuCl}_4$ ), utilizând citratul, iar dimensiunea lor este invers proporțională cu cantitatea de citrat. Menținerea în dispersie a nanoparticulelor de aur se realizează cu ajutorul soluției de citrat, iar apa nu poate fi utilizată ca solvent.



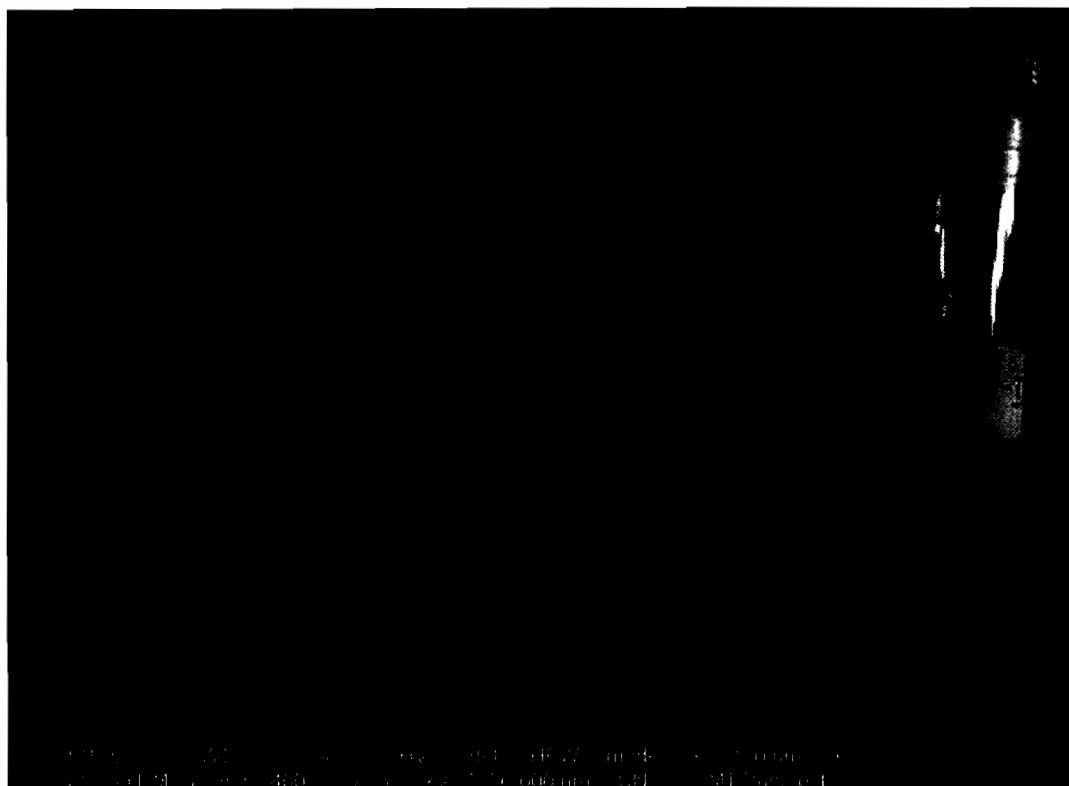


Figura 1. Apectul nanoparticulelor de aur la microscopul cu baleiaj de electroni (SEM)  
Apectul macroscopic al nanoparticulelor de aur în suspensie în soluția de citrat

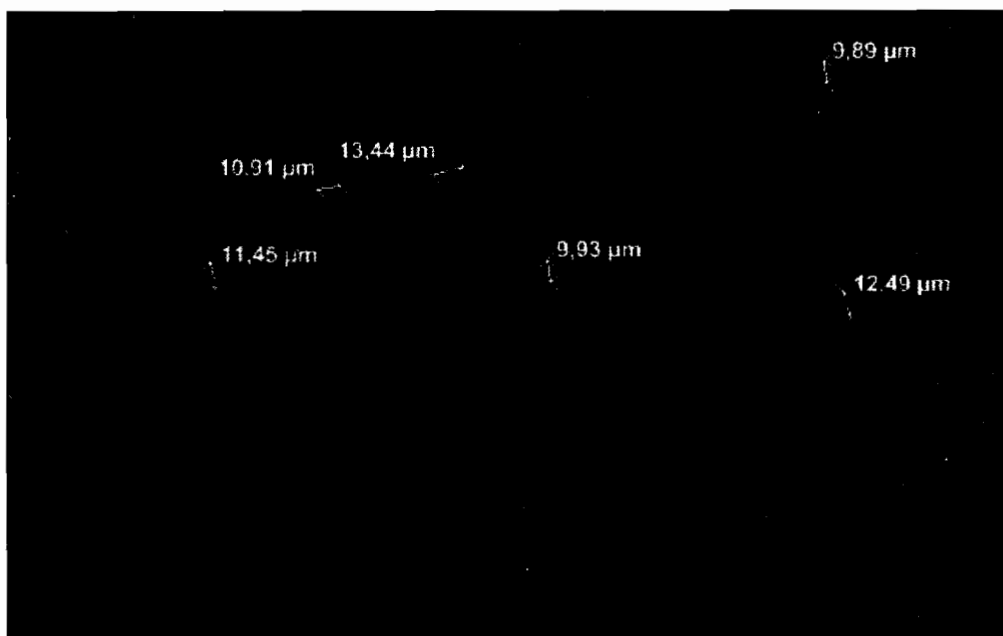


Figura 2. Apectul la microscopul optic 20x al melanomului B16 (tumora martor) la șoareci, în secțiune proaspătă, necolorată





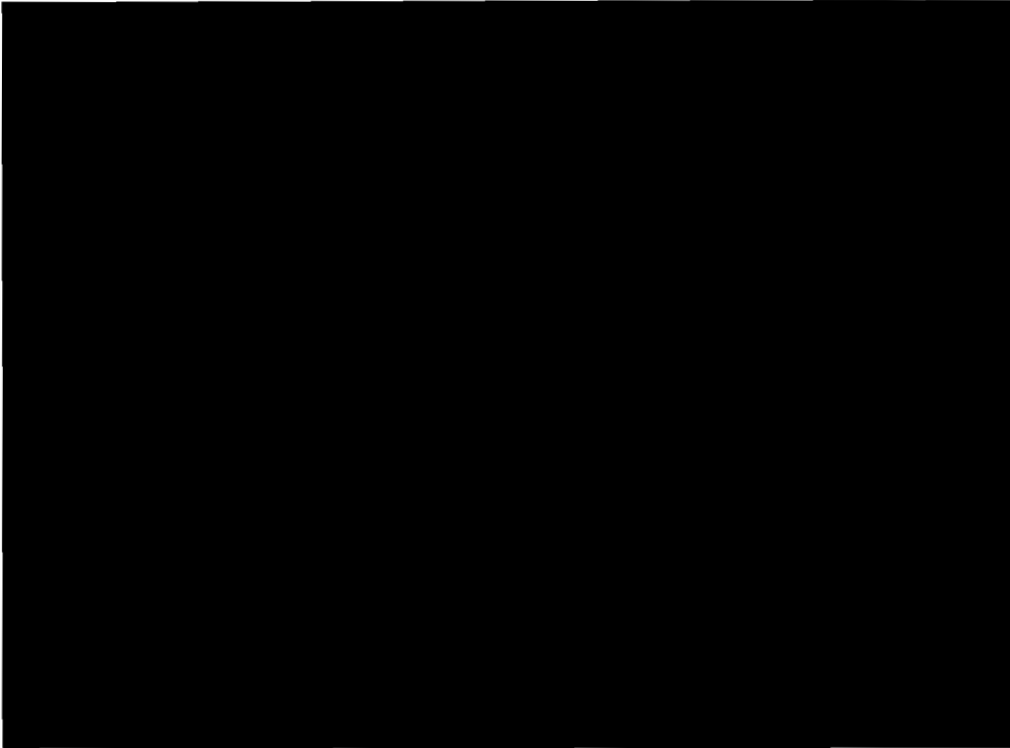


Figura 3. Apectul la microscopul optic în lumină UV al tumorii martor, unde nu s-au administrat nanoparticule de aur

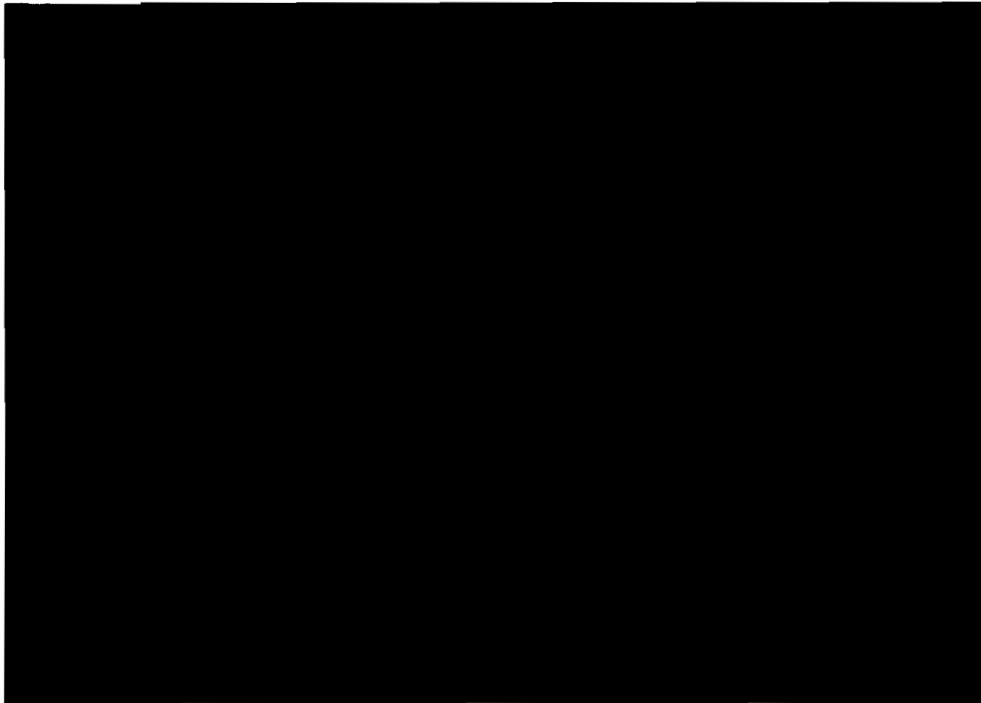


Figura 4. Apectul fluorescent al melanomului B16 la microscopul optic 20x în spectru UV, în cazul inocularii tumorii șoarecilor cu nanoparticule de aur, se observa limita tumorii

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII ȘI PROTECTIEI CONSUMATORILOR  
INSTITUTUL NAȚIONAL DE INVESTIGĂRI ȘI ȘTIINȚĂ ÎN DOMENIUL  
ONCOLOGIEI  
IAT  
BUCUREȘTI, ROMÂNIA

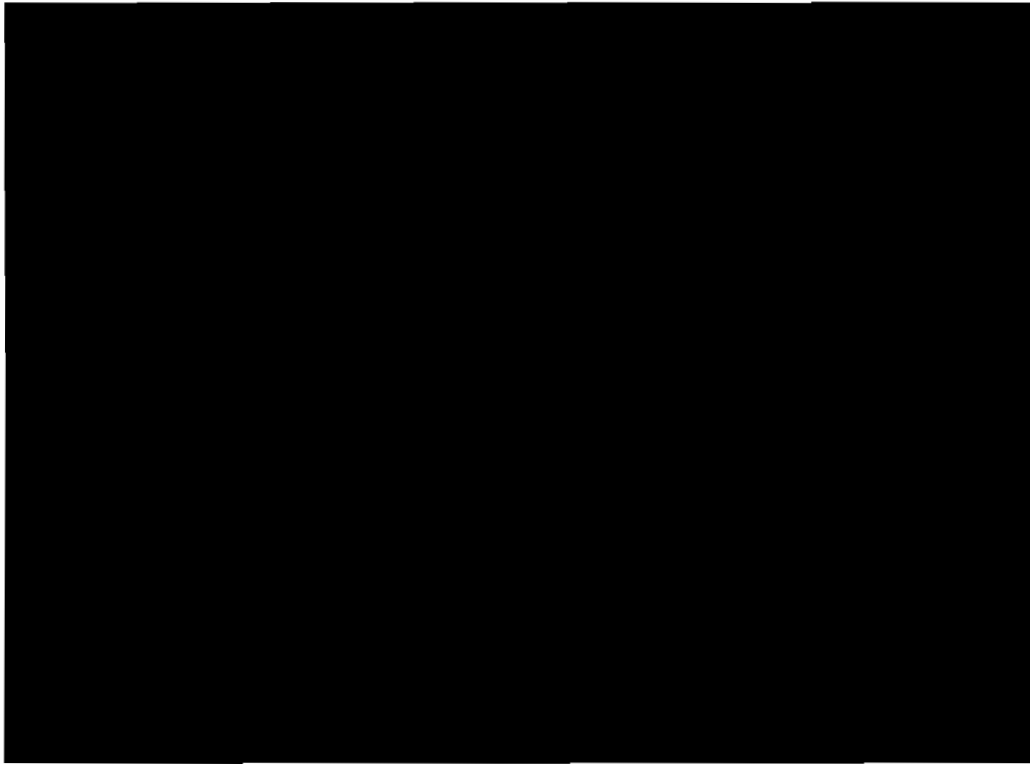


Figura 5. Apectul fluorescent al melanomului B16 la microscopul optic 20x în spectru UV, în cazul inocularii tumorii șoarecilor cu nanoparticule de aur, se observa în dreapta două **structuri** vasculare prin care au fost injectate nanoparticulele de aur în tumoră

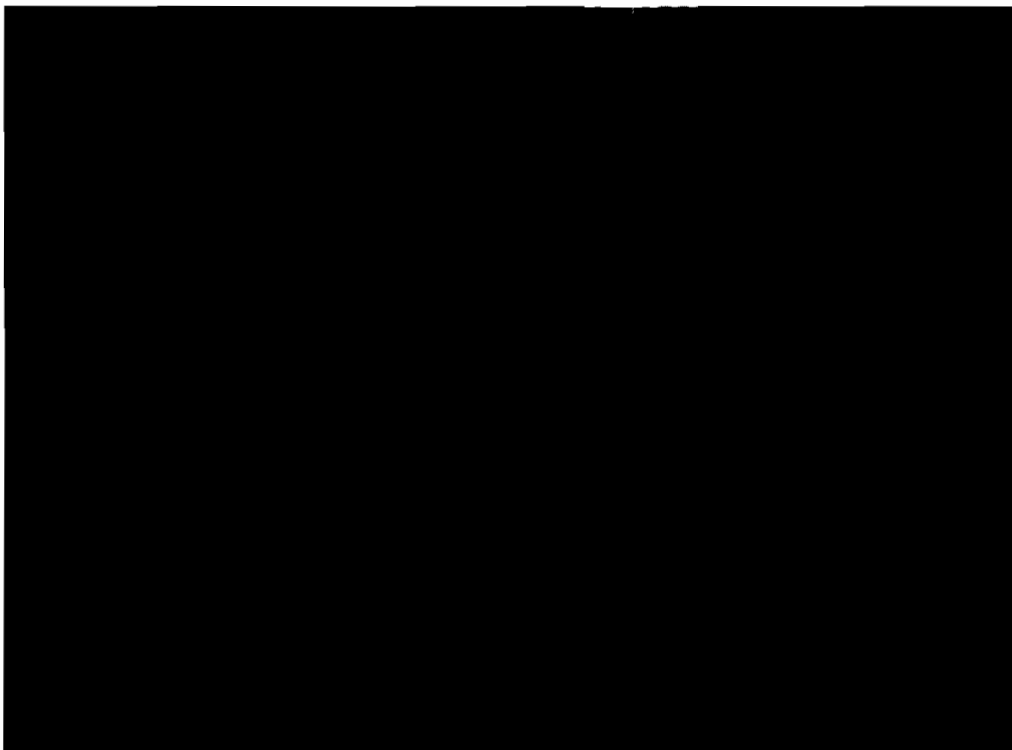


Figura 6. Apectul fluorescent al radacinilor tumorale, la microscopul optic 20x, în spectru UV

