



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00278

(22) Data de depozit: 19/04/2018

(41) Data publicării cererii:
30/10/2019 BOPI nr. 10/2019

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
OPTOELECTRONICĂ - INOE 2000,
STR.ATOMIȘTILOI NR. 409, MĂGURELE,
IF, RO;
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
DIN BUCUREȘTI, BD.MĂRĂȘTI NR.59,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• APEL LASER S.R.L.,
STR.VINTILĂ MIHĂILESCU NR.15, BL.60,
AP.12, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• GRIGORESCU CRISTIANA EUGENIA
ANA, STR.BRÂNDUȘELOR, NR.6, BL. V70,
SC. 4, ET.3, AP.60, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• RUSU MĂDĂLIN ION,
STR. PRELUNGIREA GHENCEA NR. 53,
BL. F2, SC. C, ET. 3, AP. 126, BRAGADIRU,
IF, RO;

• SCOICARU LAURENȚIU OCTAVIAN,
STR. LIBERTĂȚII BL.1601, SC.B, ET.3,
AP.31, ALEXANDRIA, TR, RO;
• MANEA SORIN, STR.TRAIAN POPOVICI
NR. 132, BL.B3d, SC.A, ET.7, AP.37,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• BÎRȚOIU ION ALIN, DECEDAT, RO;
• MILITARU MANUELLA,
ȘOS.MIHAI BRAVU NR.90-96, BL.D17,
SC.B, ET.8, AP.71, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• MUNTEANU RALUCA MĂDĂLINA,
STR.ARMENIȘ NR.6, BL.J3, SC.F, ET.2,
AP.62, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• VIȚĂLARU BOGDAN ALEXANDRU,
STR.DRISTORULUI 114, BL.13C, SC.1,
ET. 5, AP.15, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• CHIRICUTA BOGDAN, STR.OȚELARILOR
NR.29, BL.K, SC.1, ET.4, AP.19, GALAȚI,
GL, RO;
• UDREA VIRGIL MIRCEA,
STR.VINTILĂ MIHĂILESCU, NR.15, BL.60,
SC.1, ET.1, AP.12, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE PREPARARE A SUPRAFETELOR
CU NANOSTRUCTURI DIN AU ȘI AG, ȘI INSTRUMENT
CHIRURGICAL ASTFEL OBTINUT, PENTRU EVALUAREA
INTRAOPERATORIE A STATUSULUI MARGINILOR
TUMORILOR**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de acoperire a suprafețelor utile ale unui instrument chirurgical utilizat pentru evaluarea intraoperatorie a marginilor chirurgicale a tumorilor, și depistarea tipului acestora. Procedeu conform invenției constă în prepararea la temperatura camerei, într-un ulei esențial de uz medical, a unei soluții de nanopulberi metalice de Au de dimensiuni 10...30 nm, respectiv, Ag, de puritate de 99,9%, în concentrație de 20...50%, după care aceasta se depune în cantitate de 0,01...0,05 ml pe suprafețele utile din oțel ale instrumentului, prin centrifugare, cu o viteză de

rotație de 500...1000 rpm, filmul rezultat se usucă timp de 120...180 min la temperatura camerei, se tratează termic într-o etuvă cu vid de 10^{-2} Torr la 150...190°C, timp de 70...100 min, cu răcire naturală până la temperatura camerei, rezultând o acoperire nanostructurată de Au și Ag, aderentă la suprafețele utile, rezistență la temperatura uzuală de sterilizare, care nu oxidează și exfoliază, cu rugozitate uniformă.

Revendicări: 2
Figuri: 3

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



Invenția se referă la un procedeu de preparare a suprafețelor cu nanostructuri din Au și Ag și un instrument chirurgical astfel obținut pentru evaluarea intraoperatorie a statusului marginilor tumorilor prin care se obtine pe suprafețele utile ale unui instrument chirurgical pentru incizare si/sau excizare (de exemplu lama), un film foarte subtire (50...80nm) nanostructurat din Au sau Ag perfect aderent la suprafata initiala, rezistent la temperaturi de 150....200°C, care nu oxideaza si nu exfoliaza, cu rugozitatea uniforma de 2...10nm, pentru evaluarea în timp real a marginilor chirurgicale ale tumorilor si pentru determinarea rapida (2...5 min) ex vivo direct (fara prepararea, colorarea, etc. a probei) a tipului de tumora (maligna sau benigna) prin spectroscopie Raman amplificata de suprafata (surface enhanced Raman scattering- SERS). Instrumentul poate fi utilizat în chirurgia oncologica veterinara si umana, de exemplu mamara, a vezicii urinare, a tumorilor cutanate, a mastocitoamelor, etc.

Se cunoaște faptul că prin chirurgie se poate preveni, in multe cazuri, dezvoltarea extensiva a tumorilor canceroase, prin extirparea formatiunilor considerate maligne sau cu potential de malignizare, pentru a impiedica recidivele si metastazele. Este de dorit ca in urma excizarii formatiunilor sa ramana un contur chirurgical liber de celule maligne, adica sa se obtina o margine curata sau negativa. O definitie general acceptata pentru marginea chirurgicala negativa este inca in dezbatere (Taghian A, et al., Ann Surg 2005;241:629–39.2; Dillon MF, et al., Ann Surg Oncol 2006;13:333–9.; Luini A, et al., Breast Cancer Res Treat 2008;113:397–402) dar chirurgii sunt in totalitate de acord ca statusul marginii este factorul cheie in predictia recidivei (Aziz D, et al., Breast J 2006;12:331–7.). Problema marginii chirurgicale negative a fost mai putin discutata in chirurgia oncologica veterinara si optiunile sunt mai putin numeroase decat in domeniul uman (Kutzler M. 2014 in The MERCK Veterinary Manual, Last full review/revision; Stratmann N, et al., 2008, Vet. Surg. 37, 82–86; Cassali GD et al. 2011, Braz. J. Vet. Pathol. 4,153–180, Uva P et al. 2009, BMC Genomics 10, 135).

În prezent nu există nici o metoda intraoperatorie de analiza nendistructivă pentru a evalua rapid calitatea microscopică a marginilor chirurgicale in integralitatea lor, adica pe intreg conturul inciziei (Freddy T. Nguyen, et al., Cancer Res 2009;69:8790-8796; Valdes EK, et al., Ann Surg Oncol 2007,14:1045–50; Goldfeder S, et al., Acad Radiol 2006;13:1453–9; Erguvan-Dogan B, et al., Am J Roentgenol 2006;187:339–44; Karni T, et al., Am J Surg 2007;194:467–73; Haka AS, et al., Cancer Res 2006;66:3317–22; Abigail S. Haka, et al., Journal of Biomedical Optics 14, 5, 054023, September/October 2009)

Dintre toate metodele utilizate pentru diagnoza in chirurgia oncologica, spectroscopia Raman, care extrage informații chimice, a fost raportată ca având a sensibilitate de 100%, o specificitate de 100% și o acuratețe generală de 93% în identificarea carcinoamelor si au existat tentative de

aplicatii in vivo (Haka AS, et al., Cancer Res 2006;66:3317–22; Horsnell JD, et al., Lasers Med. Sci. 2016, 31, 1143–1149). Este o metoda optica vibrationala nedistructiva, care, in anumite configuratii, poate determina compozitia chimica pana la nivel de molecula (Camden JP et al., 2008, J. Am. Chem. Soc. 130, 12 616–12 617; Kneipp K, et al., 2015, Chem. Sci. 6, 2721; Andreou C, et al., 2015, J. Nucl. Med. 56, 1295–1299; Byrne HJ et al., 2015, Analyst 140, 2066–2073) a tesuturilor, fluidelor corporale, etc., fiind astfel utila in diagnosticul medical. Dezavantajele tuturor metodelor mentionate se refera la costurile ridicate, imposibilitatea de a analiza intr-un timp foarte scurt statusul marginilor complete, de a stabili rapid tipul malign sau benign al tumorilor fara prepararea probelor si in cazul spectroscopiei Raman de a nu obtine semnale suficient de intense in absenta introducerii unor nanoparticule de Au in tesutul de analizat.

Un obiectiv al inventiei este de a face posibila utilizarea efectului Raman cu amplificare de suprafata-SERS intraoperator/ex vivo direct prin obtinerea de suprafete nanostructurate nefunctionalizate pe suprafetele utile ale instrumentelor de incizare/excizare utilizate curent in chirurgia oncologica veterinara si umana, amplificand astfel semnalul Raman de $10^4 \dots 10^8$ ori si reducand timpul de analiza atat a marginilor complete cat si a tumorilor la 2...5 min. Suprafetele nanostructurate din Au sau Ag realizate retin urmele tesuturilor, fluidelor corporale, etc. rezultate in urma incizarii/excizarii pe conturul stabilit, respectiv sectionarii tumorilor, si permit analiza imediata cu ajutorul unui spectrometru Raman.

Un al doilea obiectiv al inventiei este de a dezvolta un procedeu simplu, rapid si putin costisitor de obtinere a acestor suprafete.

Sunt cunoscute procedee de obtinere a suprafetelor cu nanoparticule de Au sau Ag (Sharma B, et al., Mater. Today 15, 16–25), create pentru aplicatii medicale, fie prin modificarea suprafetelor unor instrumente chirurgicale (WO 2011097578 A1), fie prin obtinerea de nanoparticule de Au functionalizate cu proteine (US 20130217037 A1), fie prin depunerea la temperaturi moderate (20-200°C) de straturi de Ag pe diferite suprafete dupa depunerea unui strat de oxid (WO 2015107476 A1) prin atomic layer deposition in mai multe cicluri. Aceste procedee necesita echipamente sofisticate si costuri ridicate si nu conduc la obtinerea unui instrument chirurgical pentru evaluarea directa a marginilor chirurgicale si diagnosticarea rapida a tipului benign sau malign al tumorilor.

Problema pe care o rezolva inventia este de a realiza, printr-un procedeu simplu si putin costisitor, un instrument chirurgical cu suprafata utila acoperita cu nanostructuri din Au sau Ag cu rugozitate 2...10nm, cu aderenta foarte buna la suprafata initiala, cu rezistenta la

temperaturi de 150-200°C și capacitatea de amplificare de $10^4 \dots 10^8$ ori a semnalului Raman al urmelor biologice, aceste proprietăți fiind reproductibile.

Procedeul de preparare a suprafețelor cu nanostructuri din Au și Ag și instrument chirurgical astfel obținut pentru evaluarea intraoperatorie a statusului marginilor tumorilor conform invenției este caracterizat prin aceea că se prepara la temperatura camerei, într-un ulei esențial de uz medical, o soluție de nanopulberi metalice de dimensiuni 10...30nm de Au, respectiv Ag, de puritate 99.9% fără urme de cianuri sau alte elemente toxice, în concentrații de 20%...50%, se depun 0.01...0.05ml de soluție pe suprafața de oțel special a instrumentului prin centrifugare cu viteza de rotație de 500...1000 rpm, se usucă în aer timp de 120...180 min, la temperatura camerei, se amprentează prin presare cu o rețea fină nanogravată într-un material atașat unui tampon de presare automată, se tratează termic într-o etuvă cu vid de 10^{-2} Torr la 150...190°C timp de 70...100min și se răcește natural până la temperatura camerei.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Procedeul este simplu și ușor de aplicat
- Nu necesită echipamente sofisticate
- Se aplică la temperaturi moderate
- Conduce la suprafețe nanostructurate cu proprietăți reproductibile
- Nu alterează capacitatea de tăiere a instrumentelor chirurgicale
- Nu implică funcționalizarea suprafețelor, deoarece urmele de țesuturi și fluide corporale se atașează direct pe nanostructuri
- Are randament ridicat
- Necesită costuri reduse
- Conduce la obținerea unui instrument chirurgical pentru incizie și/sau excizie cu suprafețele utile acoperite cu un film nanostructurat din Au sau Ag, perfect aderent la suprafața inițială, rezistent la temperaturile uzuale de sterilizare, care nu oxidează și nu exfoliază, cu rugozitatea uniformă de ordinul nanometrului, pentru evaluarea în timp real a marginilor chirurgicale ale tumorilor și pentru determinarea rapidă ex vivo direct (fără prepararea, colorarea, etc. a probei) a tipului de tumoră (malignă sau benignă) prin spectroscopie Raman amplificată de suprafață.

Se dau în continuare două exemple de aplicare a invenției în legătură și cu figurile 1...3, care prezintă:

Figura 1 – Detaliu de nanostructuri de Au pe un element din suprafețele utile ale unui instrument chirurgical conform invenției

Figura 2 - Regimul termic de tratare a instrumentului chirurgical pentru finalizarea suprafeței cu nanostructuri din Au, respectiv din Ag.

Figura 3. Detaliu de nanostructuri de Ag pe un element din suprafețele utile ale unui instrument chirurgical conform invenției.

Exemplul 1. Pentru aplicarea procedurii și obținerea instrumentului chirurgical cu suprafețe nanostructurate conform invenției (Fig.1) se cântăresc 1...2 mg pulbere de Au de granulație 10...30nm, de puritate 99.9% fără urme de cianuri sau alte elemente toxice, se măsoară 1...2 ml de ulei esențial de uz medical, având densitatea de 0.8...0.9 g/cm³ se amestecă picurând până la înglobarea completă a uleiului, formându-se astfel o soluție-mamă din care se prepară apoi soluții de concentrații 20%...50% în funcție de necesități. Se iau 0.01...0.05ml din soluția preparată la concentrația dorită, se picură pe suprafața de inox a instrumentului chirurgical așezat pe platanul unui spinner și se aplică o rotație de 500...1000rpm. Instrumentul chirurgical se lasă apoi în aer 120-180min la 25°C, se amprentează cu o rețea fină nanogravată pe suprafața unui tampon care exercită o presiune asupra instrumentului prin acționare automată, se introduce apoi într-o etuvă cu vid 10⁻²Torr și se tratează termic timp de 750...850 min utilizând regimul termic din Fig. 2.

Exemplul 2. Pentru aplicarea procedurii și obținerea instrumentului chirurgical cu suprafețe nanostructurate conform invenției (Fig.3) se cântăresc 1...2 mg pulbere de Ag de granulație 10...30nm, de puritate 99.9% fără urme de cianuri sau alte elemente toxice, se măsoară 1...2 ml de ulei esențial de uz medical, având densitatea de 0.8...0.9 g/cm³ și se amestecă picurând până la înglobarea completă a uleiului. Se formează astfel o soluție-mamă din care se prepară apoi soluții de concentrații 20%...50% în funcție de necesități. Din soluțiile de concentrații dorite se iau 0.01...0.05ml și se picură pe suprafața de inox a instrumentului chirurgical așezat pe platanul unui spinner, imprimând o rotație de 500...1000rpm, după care se lasă în aer 120-180min la 25°C și se amprentează cu o rețea fină nanogravată pe suprafața unui tampon care exercită o presiune asupra instrumentului prin acționare automată. Instrumentele astfel pregătite se introduc într-o etuvă cu vid 10⁻²Torr și se tratează termic timp de 750...850 min utilizând regimul termic din Fig. 2.

REVENDICĂRI

1. Procedeu de preparare a suprafețelor cu nanostructuri din Au și Ag pe un instrument chirurgical pentru evaluarea intraoperatorie a statusului marginilor tumorilor și diagnosticarea rapidă a tipului benign sau malign al tumorii ex vivo direct cu spectroscopie Raman amplificată de suprafață – SERS caracterizat prin aceea că se cântăresc 1...2 mg pulbere de Au sau de Ag de granulație 10...30nm, de puritate 99.9% fără urme de cianuri sau alte elemente toxice, se măsoară 1...2 ml de ulei esențial de uz medical, având densitatea de 0.8...0.9 g/cm³ se amestecă picurând până la înglobarea completă a uleiului, formându-se astfel o soluție- mamă din care se prepară apoi soluții de concentrații 20%...50% în funcție de necesități, se iau 0.01...0.05ml din soluția preparată, se picură pe suprafața de inox a instrumentului chirurgical așezată pe platanul unui spinner, se rotește cu 500...1000rpm, se lasă în aer 120-180min la 25°C, se amprentează cu o rețea fină nanogravată pe suprafața unui tampon care exercită o presiune asupra instrumentului prin acționare automată, se introduce într-o etuvă cu vid 10⁻²Torr și se tratează termic timp de 750...850 min utilizând un regim termic caracterizat prin aceea că viteza de încălzire este de 1...1.5°C/min până la atingerea unui palier de 150...190°C iar viteza de răcire este de 0.15...0.35°C/min.
2. Instrument chirurgical pentru evaluarea intraoperatorie a statusului marginilor tumorilor și diagnosticarea rapidă a tipului benign sau malign al tumorii ex vivo direct cu spectroscopie Raman amplificată de suprafață – SERS obținut prin procedeul de la Revendicarea 1, caracterizat prin aceea că suprafețele utile sunt acoperite cu nanostructuri de Au sau Ag nefuncționalizate, cu rugozitate 2...10nm, cu aderență foarte bună la suprafața inițială, cu rezistență la temperaturi de 150-200°C și capacitatea de amplificare de 10⁴...10⁸ ori a semnalului Raman al urmelor biologice, aceste proprietăți fiind reproductibile.

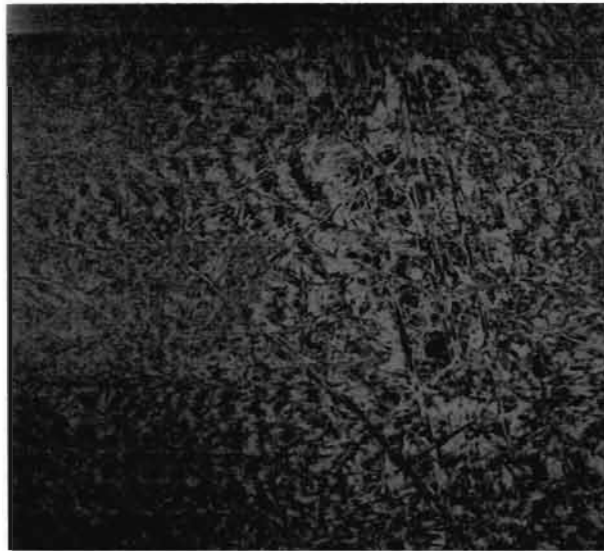


Fig. 1

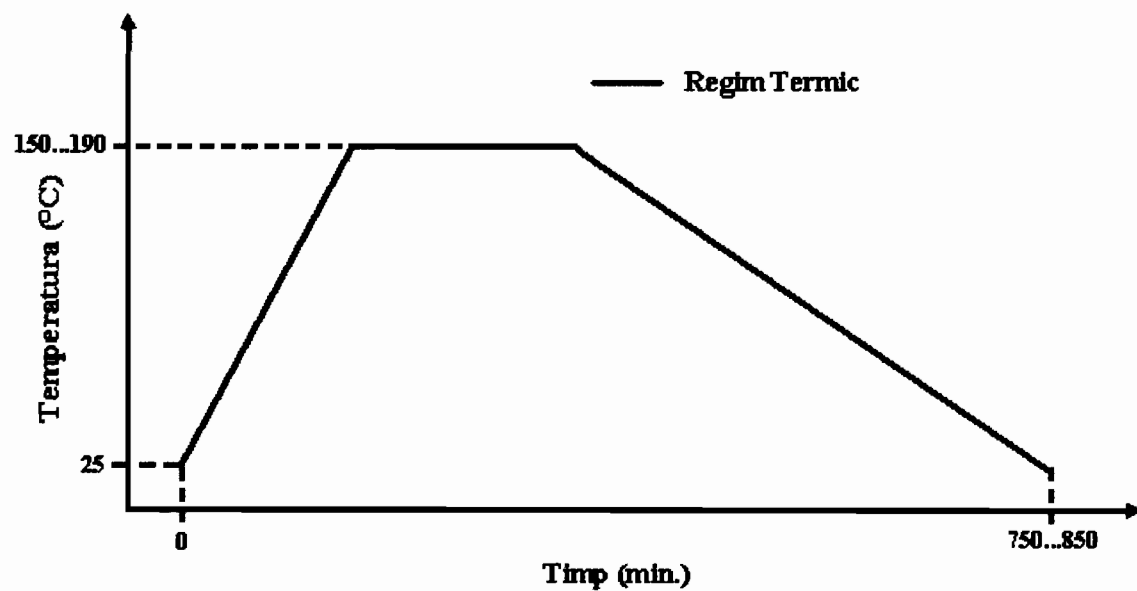


Fig. 2

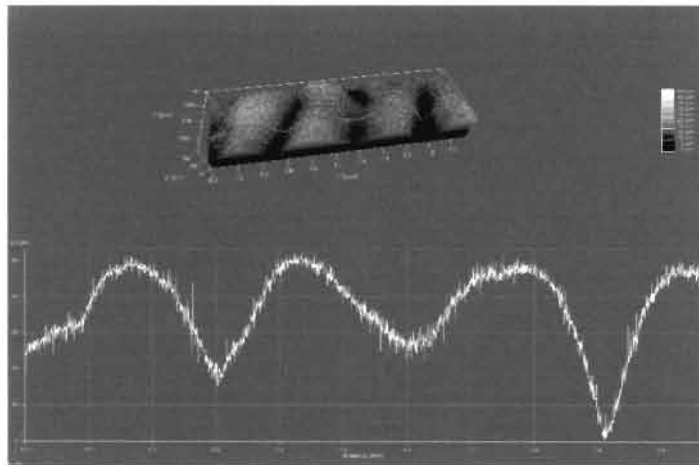


Fig. 3