

(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00279

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

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

(71) Solicitant:

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

(72) Inventatori:

- UDREA MIRCEA VIRGIL,  
STR. VINTILĂ MIHĂILESCU, NR.15, BL.60,  
AP.12, BUCUREȘTI, B, RO;

- CHIRICUȚĂ BOGDAN, STR. OȚELARIILOR  
NR. 29, BL. K, SC. 1, ET. 4, AP. 19, GALAȚI,  
GL, RO;
- GRIGORESCU CRISTIANA EUGENIA  
ANA, STR.BRÂNDUȘILOR, NR.6, BL. V70,  
SC.4, ET.3, AP.60, 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;
- MUNTEANU RALUCA MĂDĂLINA,  
STR.ARMENIȘ NR.6, BL.J3, SC.F, ET.2,  
AP.62, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
- BÎRȚOIU ION ALIN, DECEDAT, RO;
- VIȚĂLARU BOGDAN ALEXANDRU,  
STR.DRISTORULUI 114, BL.13C, SC.1,  
ET.5, AP.15, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO

(54) APARAT PORTABIL CU LASER PENTRU DETECTAREA  
ÎN TIMP REAL A UNOR MARKERI MOLECULARI

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un aparat portabil cu laser, care permite efectuarea de analize spectrale Raman pentru probe biologice, atât în laborator, cât și pe teren, cu posibilitate de deplasare a probei în planurile X, Y și Z, și focalizarea fasciculului laser. Aparatul conform invenției cuprinde o sursă de excitare laser și un spectrometru Raman prevăzut cu un detector CCD și un software aferent, și poate fi folosit pentru identificarea markerilor moleculari prin spectroscopie Raman, utilizând o lungime de undă de 633 nm, care asigură un domeniu spectral larg, și software-ul care este specializat pentru filtrare și analiză selectivă a frecvențelor specifice markerilor moleculari.

Revendicări: 7

Figuri: 10

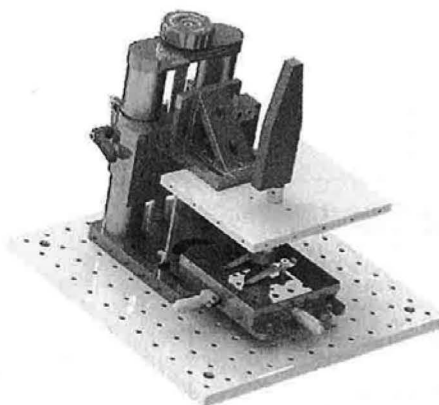
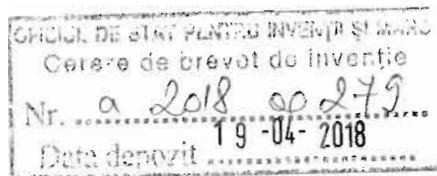


Fig. 7

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).





## APARAT PORTABIL CU LASER PENTRU DETECTAREA IN TIMP REAL A UNOR MARKERI MOLECULARI

Invenția se referă la un aparat portabil care permite efectuarea analizelor spectrale Raman pentru probe biologice, atat in laborator cat si pe teren cu posibilitatea de deplasare a probei in planurile XYZ si focalizarea fascicului laser.

Desi spectroscopia Raman a debutat acum peste 80 de ani cu caracterizarea in principal a probelor anorganice, avansarile tehnologice recente (laseri, detectori, filtre si componente) a acestei tehnici au permis extinderea domeniului de expertiza si asupra probelor biologice.

Metoda permite determinarea amprentei chimice moleculare ceea ce o face extrem de atragatoare atat in aplicatiile de identificare a compusilor cat si a proprietatilor inerente si indirecte ale materialelor: stres, orientare cristalografica, forme polimorfe, chiralitatea si puritatea nanotuburilor de carbon.

In cazul probelor biologice metoda prezinta mai multe avantaje intrinseci precum lipsa necesitatii prepararii probelor si abordarea non-invaziva. Specificitatea asigura acoperirea unui domeniu investigational larg, de la studiul mitozei si ADN pana la studii de imagistica. Fata de alte tehnici complementare precum microscopia de fluorescenta, spectroscopia Raman a atins deja un nivel competitional in ceea ce priveste sensibilitatea, specificitatea si rezolutia [Raman spectroscopy for medical diagnostics—from in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. Kong K, Kendall C, Stone N. 2015 Adv. Drug Deliv. Rev. 89, 121–134. doi:10.1016/j.addr.2015.03.009].

Problematica extragerii informatiilor de diagnostic complete si utile din spectrele Raman tisulare are trei aspecte: morfologica, statistica si chimica [Prospects for in vivo Raman spectroscopy, E B Hanlon et al, Phys. Med. Biol. 45 (2000) R1–R59]

(a) Analiza morfologica: pot fi dezvoltate metode cantitative pentru extragerea informatiilor referitoare la constituentii microscopici dintr-o proba tisulara precum structurile morfologice. Patologii pun un diagnostic prin evaluarea prezentei, absentei sau abundentei acestor constituenți care pot reprezenta celule, depozite de minerale, fibre. Spectroscopia Raman poate conferi acest tip de informatie morfologica in timp real, intr-o maniera cantitativa si obiectiva, fara a fi nevoie de inlaturarea tesutului. Un astfel de avantaj il aduce dispozitivul

propus, care, permite deplasarea cu precizie micrometrica a fibrei optice, permite cartografierea unei suprafete pastrand in acelasi timp proba in focus.

(b) Analiza statistica: cea mai mare parte din lucrarile de profil s-au bazat pe metode de analiza empirice, precum corelarea tipului de tesut cu benzile spectrale proeminente. Pot fi inasa aplicate si metode matematice precum PCA sau analize multivariate pentru caracterizarea intregii game de variatii spectrale. Corelarea coeficientilor cu tipul de tesut poate fi folosita pentru clasificarea tesuturilor in categorii de diagnostic. In plus, pot fi folosite caracteristicile constituentilor principali ca model pentru identificarea constituentilor cheie biochimici si morfologici ai tesutului sau bolii investigate

(c) Analiza chimica: un spectru Raman poate fi modelat ca o superpozitie a spectrelor constituentilor chimici conferind astfel informatii chimice cantitative. Informatiile chimice sunt de o mare importanta avand in vedere ca afectiunile somatice sunt insotite de modificari biochimice iar spectroscopia Raman poate fi o metoda excelenta pentru detectarea modificarilor biochimice minore ce pot aparea atat in spatiul intracelular cat si extracelular.

#### Schema bloc aparat cu laser portabil

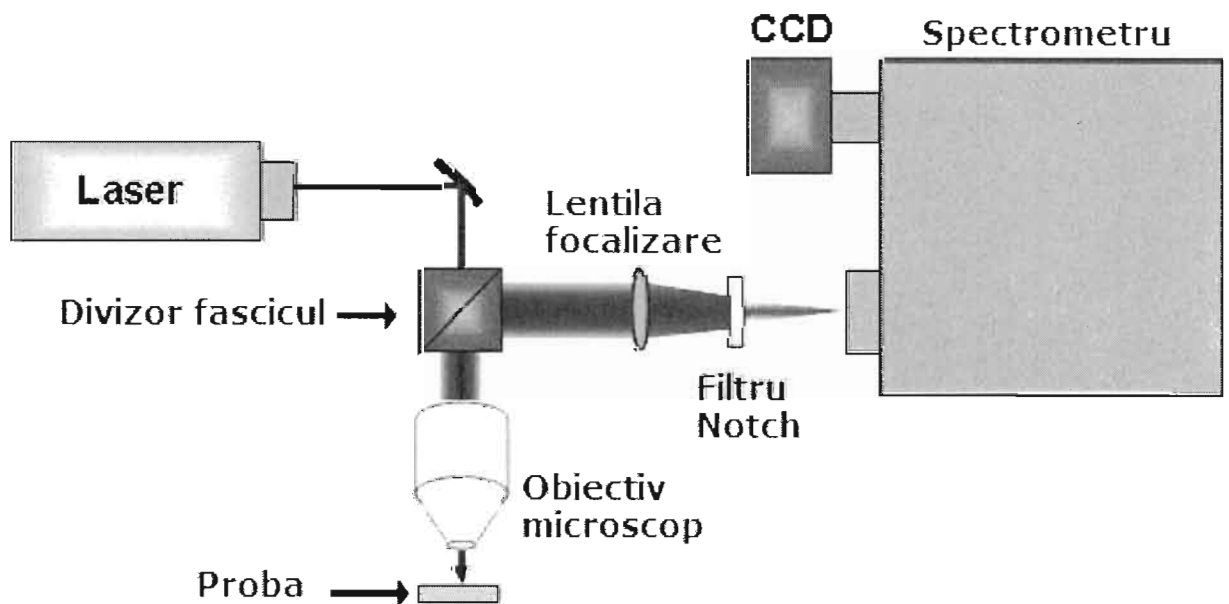


Fig.1 schema bloc sistem Raman portabil

In figura 1 este prezentata schema bloc a unui sistem Raman ce poate fi folosit pentru studii de imagistica si / sau diagnostic. Provocarea consta in alegerea componentelor potrivite astfel incat sistemul sa asigure un inalt nivel de performanta precum sensibilitate si rezolutie dar sa pastreze in acelasi timp capabilitatea de portabilitate.

Precum se poate observa din diagrama ansamblul experimental consta din sursa de excitare laser, fibra optica, spectrometrul Raman cu detectorul CCD 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 difractie 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  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

Pentru colectarea facila a semnalului, avand in vedere necesitatea de portabilitate s-a optat pentru o structura in forma de Y care include intr-o montura rigidizata filtre de rejectie pentru radiatia laser, lasand doar semnalul Raman sa ajunga in spectrometru si pe detector.

Diagrama schematica a probei Raman este prezentata in figura de mai jos:

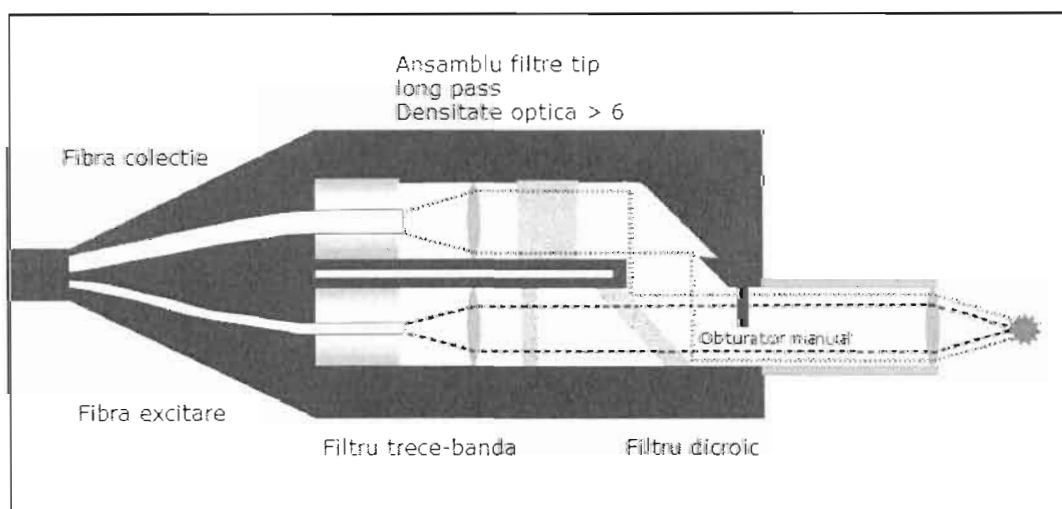


Fig 2 Diagrama schematica proba Raman

Unul dintre cele mai dificile aspecte a fost selectarea lungimii de unda de excitare.

Alegerea lungimii de unda de excitare afecteaza mai multi parametri (AN01 Semiconductor Horiba Scientific) 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 fluorescenta, care poate parazita ca intensitate si domeniu spectral 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

Pentru tesuturi biologice sunt mai multi factori care influenteaza adancimea de patrundere. Pe langa influenta diametrului spotului laser si a lungimii de unda folosita, proprietatile optice ale unui tesut sunt descrise in termeni de coeficient de absorbtie, coeficient de imprastiere, unghi de imprastiere si indicele de refractie al tesutului [Optical properties of biological tissues: a review Steven L Jacques, 2013 Phys. Med. Biol. 58 R37].

Pentru o diferenta de doar 48 de nm intre 585 nm si 633 nm, pentru lungimea de unda 633 nm adancimea de patrundere creste cu aproximativ 3,5 ordine de marime; aceasta permite radiatiei la 633 nm sa patrunda si sa treaca de tesutul adipos subdermic.

Spre deosebire de lungimile de unda utilizate in prezent pentru diagnosticare in timp real (785 si 830 nm) [Advances in the in Vivo Raman Spectroscopy of Malignant Skin Tumors Using Portable Instrumentation, Int. J. Mol. Sci. 2015, 16, 14554-14570; doi:10.3390/ijms160714554], care asigura o analiza pana la  $2200\text{ cm}^{-1}$ , lungimea de unda de 633 nm permite determinari pana la  $4500\text{ cm}^{-1}$ , asigurand astfel identificarea tuturor markerilor moleculari importanti pentru evaluare (ADN, carotenoide, proteine, lipide, apa interfaciala). Aceasta lungime de unda permite, in configuratia actuala, observarea modurilor de intindere pentru OH, NH si CH care se manifesta in domeniul  $2800\text{ cm}^{-1} - 3500\text{ cm}^{-1}$ , de mare interes si prezenta in tesuturile biologice

Sursa laser inclusa in configuratie are urmatoarele caracteristici:

Lungime de unda (nm)	633
Putere (mW)	50
Mod	Single mode

Software-ul ce urmeaza a fi utilizat este un software de operare in timp real a spectrometrului si ruleaza sub Windows.

Acesta include module care pot fi personalizate prin Labview sau VBA pentru Excel, precum si pentru C#, C-SDK, si Delphi Pascal. Fisierile de iesire pot fi analizate in Matlab prin Principal Component Analysis (PCA), K Means Clustering Analysis (KMCA) sau alte tehnici statistice. Intai sunt procesate datele astfel sa fie de aceeași dimensiune si pas. PCA este o tehnica ce

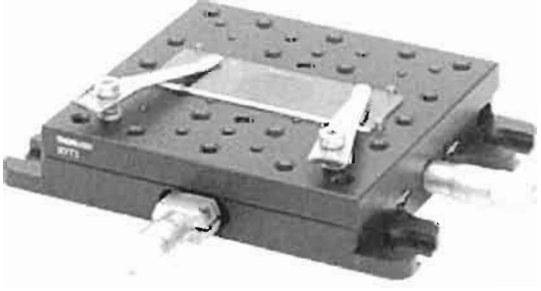
transforma datele in componente necorelate [Prospects for in vivo Raman spectroscopy, E B Hanlon et al, Phys. Med. Biol. 45 (2000) R1–R59].




Deoarece componentele sunt necorelate, primele cateva sunt suficiente in descrierea datelor si constituie axe de variatie maxima in spatiul variatiei dintre date permitand astfel diferentierea/ asemanarea dintre probe. Componentele ofera indicii despre markeri si probe. KMCA grupeaza datele in clusteri dupa similitudinile valorilor specifice ale variabilelor de interes unele functie de celelalte [The role of lipid droplets and adipocytes in cancer. Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 compared to adipocytes in cancerous human breast tissue, Analyst. 2015 Apr 7;140(7):2224-35. doi: 10.1039/c4an01875c].

Algoritmul KMCA urmareste minimizarea distantelor dintre date si centroidul clusterilor. Datele sunt atribuite clusterului cu centroidul cel mai apropiat de ele. De exemplu, daca o componenta are un coeficient mare in modul pentru cateva variabile putem sti ca acele variabile arata comportament comun acelor probe in functie de componenta respectiva si urmarind diagnosticul putem gasi posibili markeri, adica variabilele in cauza. Combinand informatia cu ponderea componentei in functie de variabile se gasesc variabilele relevante ce pot fi folosite ca markeri. De asemenea se gasesc facand grafice pentru doua componente legaturi intre probe.

Exista diferite metode pentru a selecta numarul componentelor, printre care varianta exprimata, prag pentru valori proprii a matricii de covarianta, corespondenta fata de varianta unei matrici aleatoare.

Sistemul de deplasare XYZ pentru probei analizate are urmatoarele parti componente cu urmatoarele caracteristici:

<p>Platforma XYZ <b>XYT1/M</b> cu prinderi pentru lamele de microscop <b>SLH1/M</b></p> 	<p>Capacitate incarcare (Max) (4.5 kg)          Dimensiuni platforma(108.0mm × 106.7mm)          Inaltime platforma (25.4 mm)          Amprenta inclusiv suruburi micrometrice (160.8 mm x 154.9 mm)          Micrometre XY          Deplasare (13 mm)          Deplasare per rotatie (0.5 mm)          Gradatie pe diviziune (10 μm)</p>
---	---

<p>Platforma montare in unghi drept <b>AP90/M</b></p>  <p>Back</p> <p>Front</p>	<p>Structura compacta din aluminiu          Dimensiuni (73.2 mm x 63.5 mm x 76.2 mm)          Gauri M6          Orificii de culisare M6</p>
<p>Blat optic <b>MB3030/M</b></p> 	<p>Balt aluminiu cu finisare neagra mata pentru eliminarea reflexiilor.          Grosime (12.7 mm)          Planeitate (<math>\pm 0.15</math> mm pentru <math>0.09</math> m<sup>2</sup>)          Gauri M6 filetate dispuse la 25 mm          Distanța de la margini la primul rand de gauri (12.5 mm)</p>
<p>Platforma de translatie verticala <b>VAP4/M</b></p> 	<p>Deplasare (101.6 mm)          Deplasare per revolutie (1.27 mm)          Capacitate incarcare (23 kg)          Moment Maxim (16.9 N•m)          Stabilitate drift <math>\leq 15</math> <math>\mu</math>rad pentru 6 ore          Linearitate &gt;90%          Greutate (3.9 kg)          Buton tip quick release</p>

Pentru optimizarea focalizării și a culegerii semnalului sonda Raman a fost cuplată rigid cu un obiectiv microscopic cu mărire 100X și apertură numerică mare (0.9). Obiectivul permite focalizarea fascicului laser cu precizie pe probă iar montura mecanică rigidă care cuplează fibra optică cu obiectivul de microscop asigură măsurători de înaltă precizie, neexistând riscul de deplasări accidentale.

În figura 3 sunt prezentate desenele tehnice ale modulului de cuplare între sonda Raman și obiectivul de microscop.

Având în vedere că obiectivul de microscop focalizează fasciculul laser la o distanță de 300 micrometri este important ca platforma de translație să asigure o bună rezoluție de deplasare astfel încât plasarea probei de interes în focus să fie făcută cu ușurință și precizie. O revoluție a butonului de deplasare a platformei VAP4/M asigură sensibilitatea necesară cuantificării unei deplasări de 0,3 mm.

Pentru a evita patrunderea luminii parazite și eventuala interferență a acesteia cu probă, sistemul de cuplare al obiectivului de microscop cu probă Raman este prevăzut cu capace laterale (figura 4). Când este coborâtă platforma cu obiectivul de microscop pentru poziționarea probei în focus, prin plasarea acesteia la 0.3 mm de platforma XYT1M este asigurată și izolarea optică, fețele laterale coborând sub nivelul platformei XYZ.



## REVENDICĂRI

Aparat laser portabil **caracterizat prin aceea ca:**

- 1- Este compact, usor transportabil si poate fi folosit pentru identificarea markerilor moleculari prin spectroscopie Raman
- 2- Utilizeaza o lungime de unda laser in domeniul vizibil (633 nm) acoperind astfel un domeniu spectral larg
- 3- Include un cuplaj optic rigid intre sonda Raman/ fibra optica si obiectivul de microscop 100X cu apertura numerica mare
- 4- Include un sistem de deplasare micrometric al probei de analizat in directiile XYZ
- 5- Accepta sistemul de fixare a lamelelor standard de microscopie, ceea ce permite utilizarea fara preparare a probelor, culturi celulare sau lamele tratate pentru studii SERS.
- 6- Include un sistem de inchidere lateral, care impiedica patrunderea luminii parazite si analiza probei in conditii de intuneric
- 7- Pachet software personalizat pentru fitare si analiza selectiva a frecventelor specifice markerilor moleculari

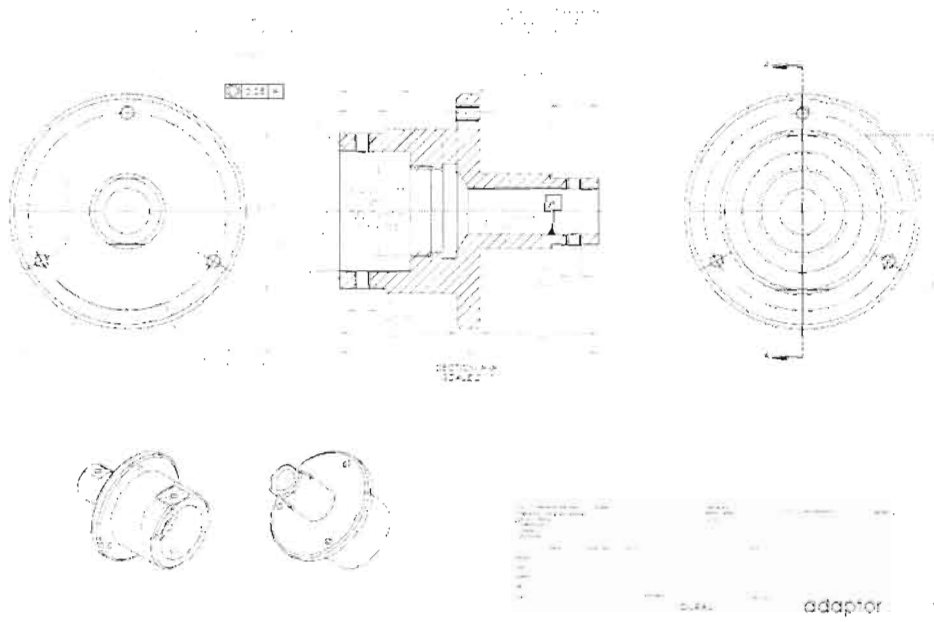


Fig. 3 Modul mecanic cuplare sonda Raman / obiectiv microscop

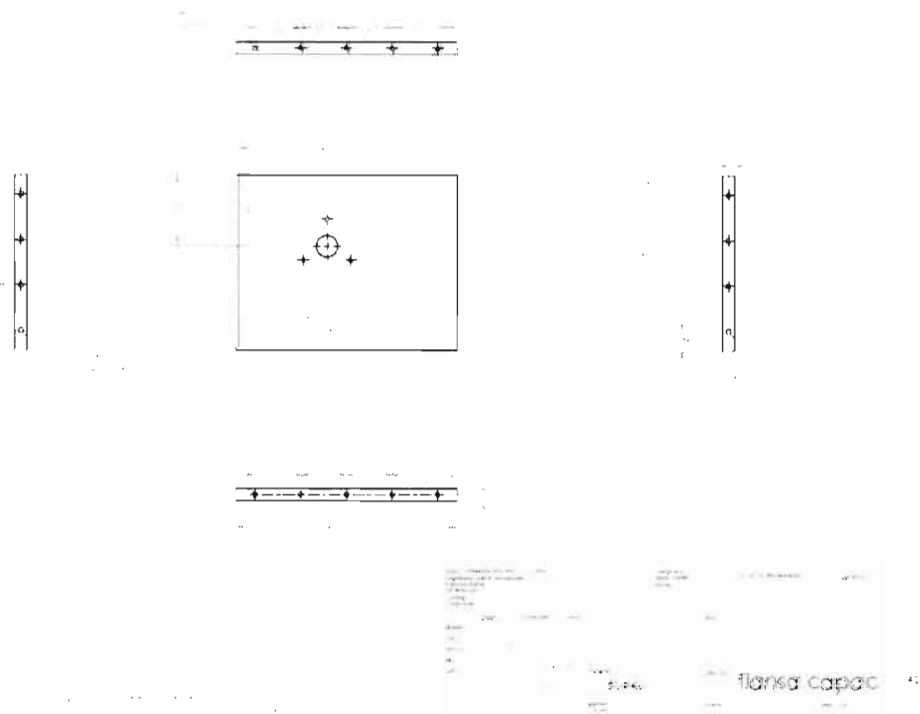


Fig.4 Flansa capac lateral

In figurile 5 si 9 este prezentat cuplajul obiectiv microscop / sonda Raman in reprezentare 3D, iar in figura 10 ansamblul experimental construit.



Fig. 5 Cuplaj optic vedere laterala

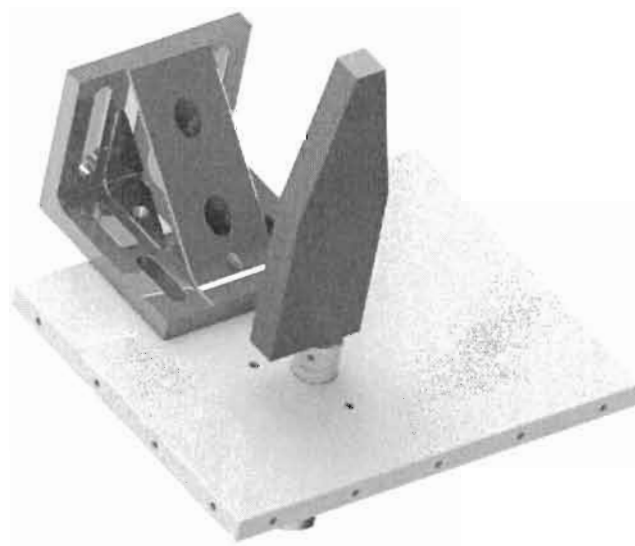


Fig. 6 Cuplaj optic vedere superioara

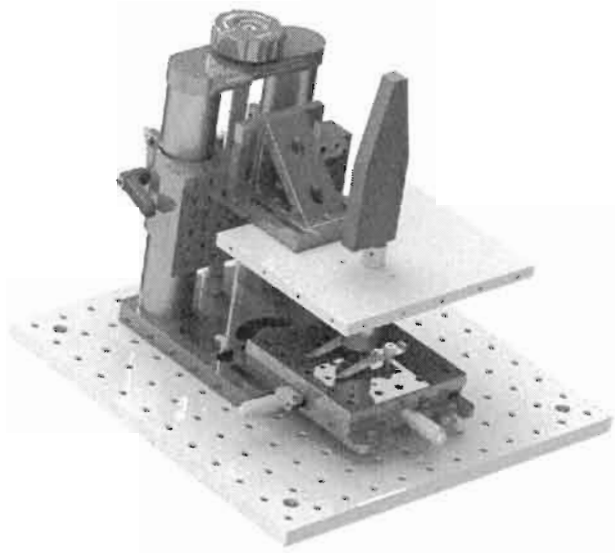


Fig. 7 Ansamblu cuplare optica, pozitionare si deplasare proba

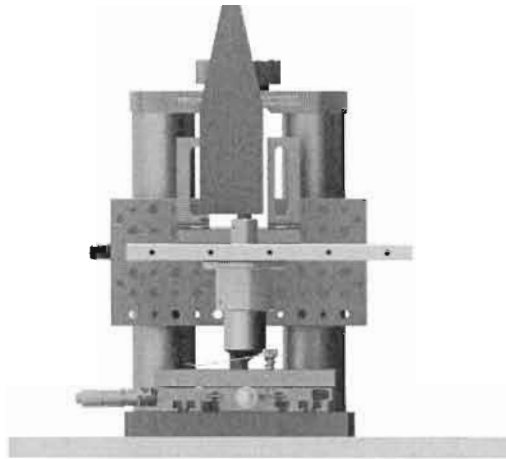


Fig. 8 Ansamblu cuplare optica, pozitionare si deplasare proba

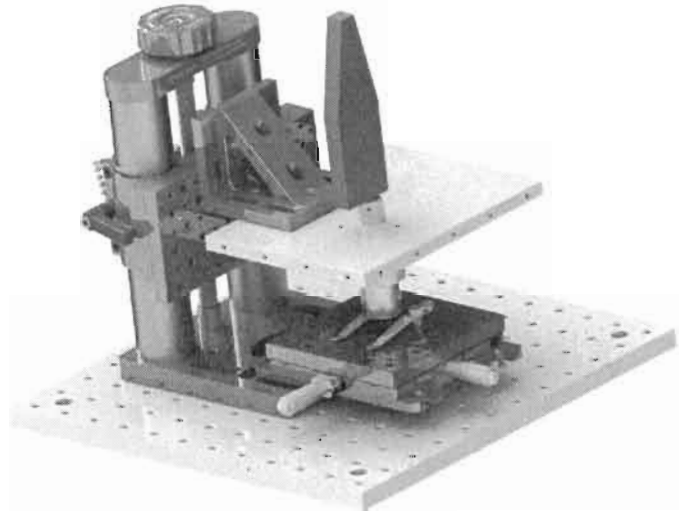


Fig. 9 Ansamblu cuplare optica, pozitionare si deplasare proba

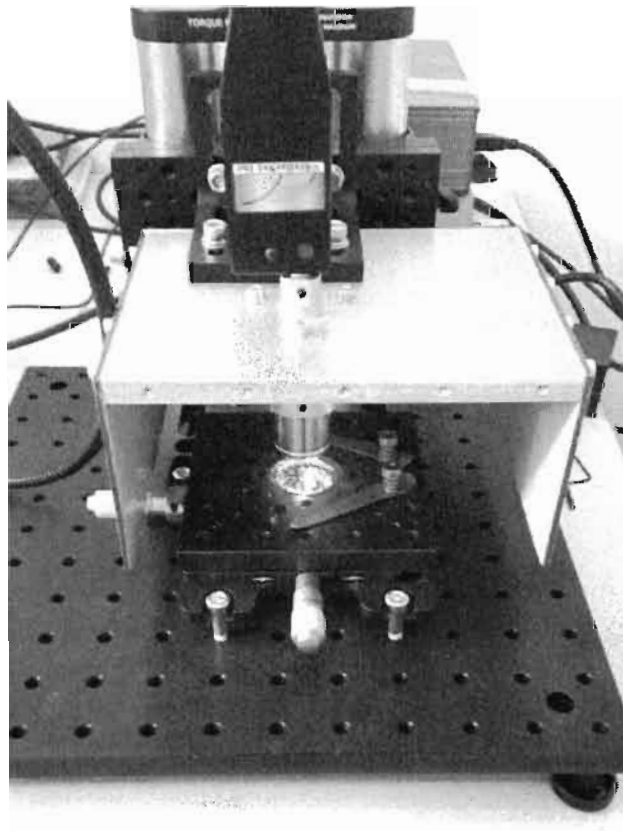


Fig 10. Ansamblu experimental cu capacul fata inlaturat pentru observarea cuplajului