

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno



Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Ricevuto: 2 giugno 2017

Accettato: 22 settembre 2017

Pubblicato online: 12 ottobre 2017

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno



Xiaolei Zhao¹, Meina Yang², Yong Wang³, Jingxiang Pang², Eduard Van Wijk^{4,5}, Yanli Liu⁶, Hua Fan², Liewei Zhang⁷ & Jinxiang Han^{1,2}

In questo studio, abbiamo studiato le caratteristiche spettrali dell'emissione fotonica spontanea (SPE) dalla superficie corporea di un modello di topi nudi portatori di cancro al seno umano durante il processo di crescita globale dei tumori al seno. Confrontando e analizzando i dati, abbiamo scoperto che c'era una notevole differenza tra topi tumorali e controlli sani nella distribuzione spettrale della SPE dalla superficie corporea del sito della lesione, anche quando i cambiamenti morfologici nel sito della lesione non erano evidenti. La distribuzione spettrale della SPE dal sito sano dei topi tumorali differiva anche da quella dei controlli sani poiché il cancro al seno si sviluppava fino a un certo stadio. Inoltre, la differenza di spettro era correlata a diversi stati di crescita dei tumori. È interessante notare che c'era una correlazione positiva tra il rapporto spettrale (610–630 / 395–455 nm) e il logaritmo del volume del tumore sia per il sito della lesione ($R^2 = 0,947$; $p < 0,001$) e il sito normale ($R^2 = 0,892$; $p < 0,001$) dei topi tumorali. I risultati hanno suggerito che lo spettro della SPE era sensibile ai cambiamenti nello stato del tumore.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Il cancro al seno è il tumore più frequentemente diagnosticato e la principale causa di morte per cancro tra le donne in tutto il mondo. Da solo rappresenta il 25% di tutti i casi di cancro e il 15% di tutti i decessi per cancro tra le donne [1](#). Nonostante la crescente conoscenza della malattia, la sua incidenza è in costante aumento in molti paesi del Sud America, Africa e Asia. Il cancro al seno è una delle forme più curabili di cancro se viene rilevato e diagnosticato in una fase precoce. La diagnosi precoce è anche il modo migliore per ridurre gli effetti della malattia e migliorare la sopravvivenza [2](#). Come metodo di screening più comunemente usato, la mammografia può spesso rilevare il carcinoma mammario in una fase precoce, ma è imperfetta. Non tutti i tumori al seno saranno rilevati da una mammografia, specialmente quando le caratteristiche morfologiche delle lesioni anomale non sono evidenti. La mammografia provoca occasionalmente risultati falsi positivi o diagnosi eccessiva e trattamento eccessivo di alcuni tumori al seno [1](#). Inoltre, sebbene gli attuali metodi di imaging possano fornire un'alta risoluzione spaziale, ci sono relativamente poche informazioni sul metabolismo e sui cambiamenti a livello molecolare nel tessuto mammario [3-5](#).

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Come è ben noto il metabolismo delle cellule tumorali al seno è diverso da quello delle cellule sane⁶. I ricercatori hanno mostrato un crescente interesse per le specie reattive dell'ossigeno (ROS) come i radicali idrossilici ($\text{OH} \cdot$), gli anidridi superossido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e il perossido di idrogeno (H_2O_2) che sono sottoprodotti del metabolismo cellulare e nei loro ruoli in un microambiente tumorale^{7,8}. In circostanze normali, i livelli di ROS e la capacità di difese ossidative sono ben bilanciati. Tuttavia, molti fattori possono interrompere questo equilibrio e generare ROS eccessivi per causare danni ossidativi alle biomolecole che possono portare a alterazioni cellulari e, in definitiva, alla tumorigenesi e alla trasformazione neoplastica⁸⁻¹¹. Pertanto, si verificano cambiamenti biochimici prima dei cambiamenti morfologici nelle regioni della lesione. In realtà, i ROS sono ora considerati come un segno distintivo del cancro^{8,11,12}. Numerosi studi hanno riportato che i tumori al seno mostrano un aumento della produzione di ROS e un alto livello di stress ossidativo nel tessuto del carcinoma mammario o un aumento significativo dei livelli di marcatori di stress ossidativo nel plasma da pazienti con carcinoma mammario¹²⁻¹⁶. In questo senso, è di grande importanza sviluppare un nuovo approccio sensibile e non invasivo per rilevare i cambiamenti del metabolismo in vivo per migliorare il tasso di indagine e l'accuratezza dello screening preliminare dei tumori al seno, specialmente nelle sue fasi iniziali.

¹Dipartimento di biochimica e biologia molecolare, Università di Shandong, Jinan, 250012, Cina. ²Shandong

Centro di biotecnologia medicinale, Accademia delle scienze mediche di Shandong, Jinan, 250062, Cina.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

³Department of Neurosurgery, Shandong Cancer Hospital, Jinan, 250117, China. ⁴ Centro cino-olandese di medicina preventiva e personalizzata / Centro di fotonica dei sistemi viventi, Università di Leida, Leida, Paesi Bassi. ⁵Meluna Research, Geldermalsen, Paesi Bassi. ⁶ Dipartimento di medicina di base, Università di medicina tradizionale cinese di Shandong, Jinan, 250355, Cina. ⁷Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, 250355, Cina. La corrispondenza e le richieste di materiali devono essere indirizzate a JH (e-mail:samsjxhyx@163.com)

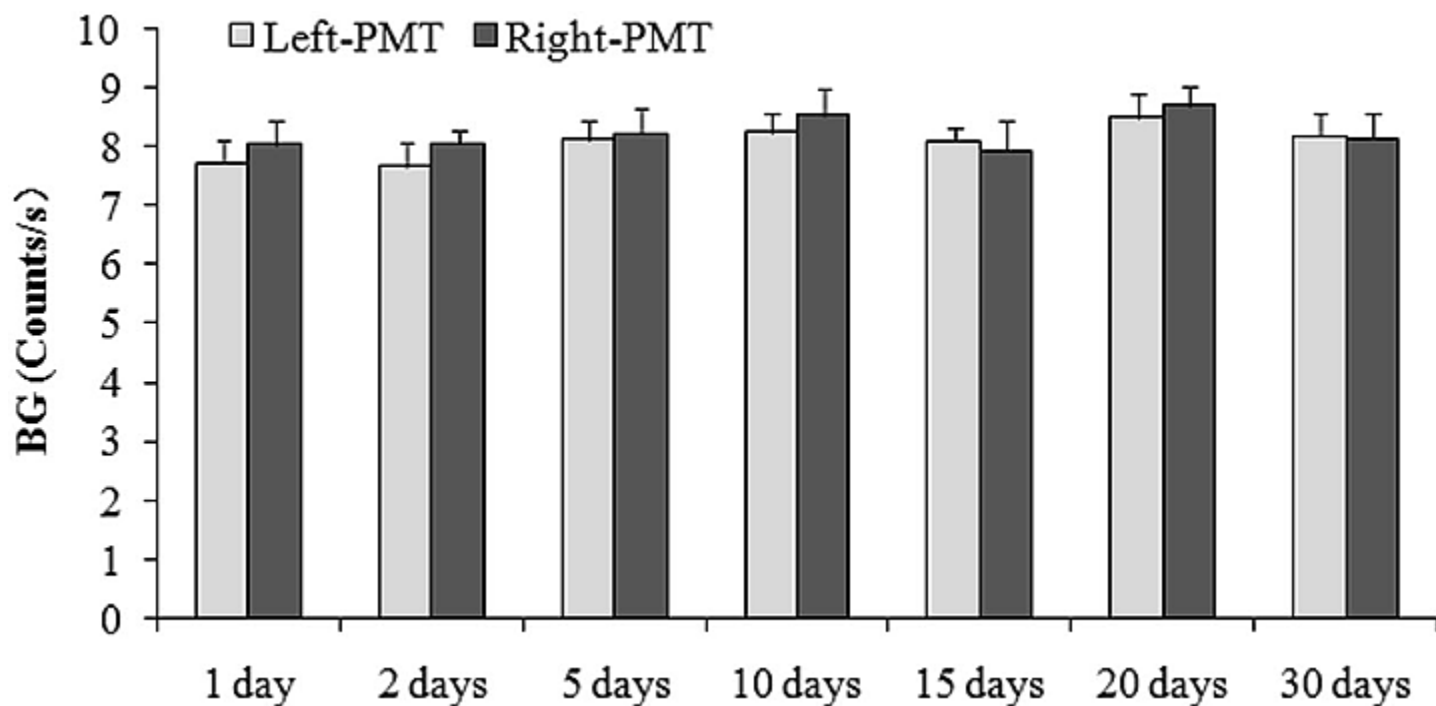


Figura 1. Segnali BG del PMT destro e sinistro senza filtri contemporaneamente (2:00 pm) in giorni diversi.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

L'emissione spontanea di fotoni ultra-deboli (SPE), come attributo intrinseco dei sistemi biologici, è un possibile candidato per l'uso nello sviluppo di un metodo di biopsia ottica per monitorare i livelli di ROS durante i processi metabolici in cellule normali e anormali, tessuti e organismi¹⁷⁻²⁰. La SPE ha origine dal rilassamento di specie eccitate elettronicamente (ad es. $^3R = O^*$, 1O_2 e $^1P^*$) nei sistemi biologici. Le specie eccitate elettronicamente provengono dall'ossidazione di lipidi, proteine e acidi nucleici da parte dei ROS che si formano in processi metabolici ossidativi normali o anormali^{21- 24}. Ogni specie eccitata elettronicamente può emettere la sua energia come un fotone a una lunghezza d'onda specifica. I cambiamenti biofisici che accompagnano la progressione displastica spesso portano ad alterazioni delle caratteristiche ottiche dei tessuti. La tecnologia di rilevazione SPE sensibile a queste alterazioni può essere utilizzata per monitorare gli stati fisiologici e patologici dei sistemi biologici. Come marcatore biofisico non invasivo per il monitoraggio dello stato del sistema biologico, la SPE ha attirato una notevole attenzione ed è stata utilizzata in molti settori, compresa l'agricoltura²⁵, qualità del cibo²⁶ e assistenza sanitaria ^{20,27-29}.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Sono stati condotti studi preliminari per definire il potenziale della SPE di fungere da marcatore biofisico sensibile per rilevare diversi stati fisiologici e patologici dei tumori in base ai loro diversi stati metabolici ossidativi. Ad esempio, Bustamante et al. hanno trovato una differenza nell'intensità di emissione tra la fase di crescita logaritmica e la fase stazionaria usando cellule di melanoma maligno umano, e l'hanno attribuita alla differenza nell'attività della catalasi nelle cellule, che ha portato a cambiamenti metabolici³⁰. Takeda et al. ha riportato i cambiamenti temporali nelle intensità della SPE, insieme alla proliferazione delle cellule tumorali e alla distribuzione spettrale della SPE dalla linea di cellule tumorali TE9, e ha scoperto che questi cambiamenti nella SPE erano strettamente correlati ai ROS prodotti durante i processi metabolici³¹. L'esperimento di Rác et al. ha illustrato che le cellule di mieloma multiplo umano U266 esposte al perossido di idrogeno porterebbero alla formazione di $^3(\text{R} = \text{O})^*$ e $^1\text{O}_2$ che porterebbe a un potenziamento immediato dell'emissione fotonica ultra-debole seguita da un lento decadimento³². Kim et al. misurato SPE da tessuto polmonare canceroso umano e tessuto polmonare normale adiacente e i risultati hanno suggerito che l'emissione SPE potrebbe essere utilizzata per differenziare un tumore da tessuto normale adiacente; hanno anche mostrato una differenza saliente tra carcinoma a cellule quadrate e adenocarcinoma¹⁸. Chen et al. utilizzato con successo campioni di siero per distinguere i pazienti con leucemia linfoblastica acuta da volontari sani³³. Inoltre, Kim et al hanno condotto un confronto tra le intensità della SPE da topi portatori di tumore trapiantati con cellule tumorali ovariche e topi di controllo.³⁴. Pertanto, si prevede che la SPE potrebbe essere un promettente marcatore biofisico per il monitoraggio dello stato patofisiologico dei tumori al seno.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Nel nostro studio precedente³⁵, abbiamo dimostrato che l'intensità della SPE dalla superficie corporea potrebbe distinguere in modo significativo i topi nudi portatori di cancro al seno da controlli sani, indipendentemente dal fatto che i cambiamenti morfologici dei tumori fossero evidenti. Abbiamo anche scoperto che gli SPE sono cambiati con la dimensione del tumore. Nel presente studio, la nostra ricerca si è concentrata sulle caratteristiche spettrali della SPE dalla superficie corporea di un modello di topi nudi portatori di cancro al seno umano e controlli sani durante l'intero processo di crescita dei tumori al seno. Speriamo di esplorare più profondamente la relazione tra le componenti spettrali della SPE e gli stadi tumorali. In questo modo, potremmo fornire una prova più precisa dell'uso della SPE come indicatore biofisico non invasivo nella ricerca sul cancro al seno.

Risultati

Prestazioni dei due PMT nel sistema di rilevamento. Figura. 1 visualizza i segnali BG del PMT sinistro e destro senza filtri contemporaneamente (14:00) in giorni diversi. La figura mostra che le prestazioni del sistema di rilevamento erano stabili e non c'erano differenze significative tra il PMT sinistro e destro.

Caratteristiche spettrali della SPE dalla superficie corporea dei topi in ciascun gruppo durante il processo di crescita del carcinoma mammario. Quaranta topi nudi sono stati usati in questo studio: venticinque nel gruppo di esperimenti, dieci nel gruppo di controllo e cinque nel gruppo normale. Dei venticinque topi nel gruppo di esperimenti, ventuno topi hanno sviluppato tumori (etichettati come gruppo di topi tumorali), ma gli altri quattro topi no (etichettati come gruppo di topi privi di tumore). La figura 2 mostra un esempio delle diverse fasi di crescita di un topo il cui ascellare destro è stato iniettato con cellule tumorali al seno.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

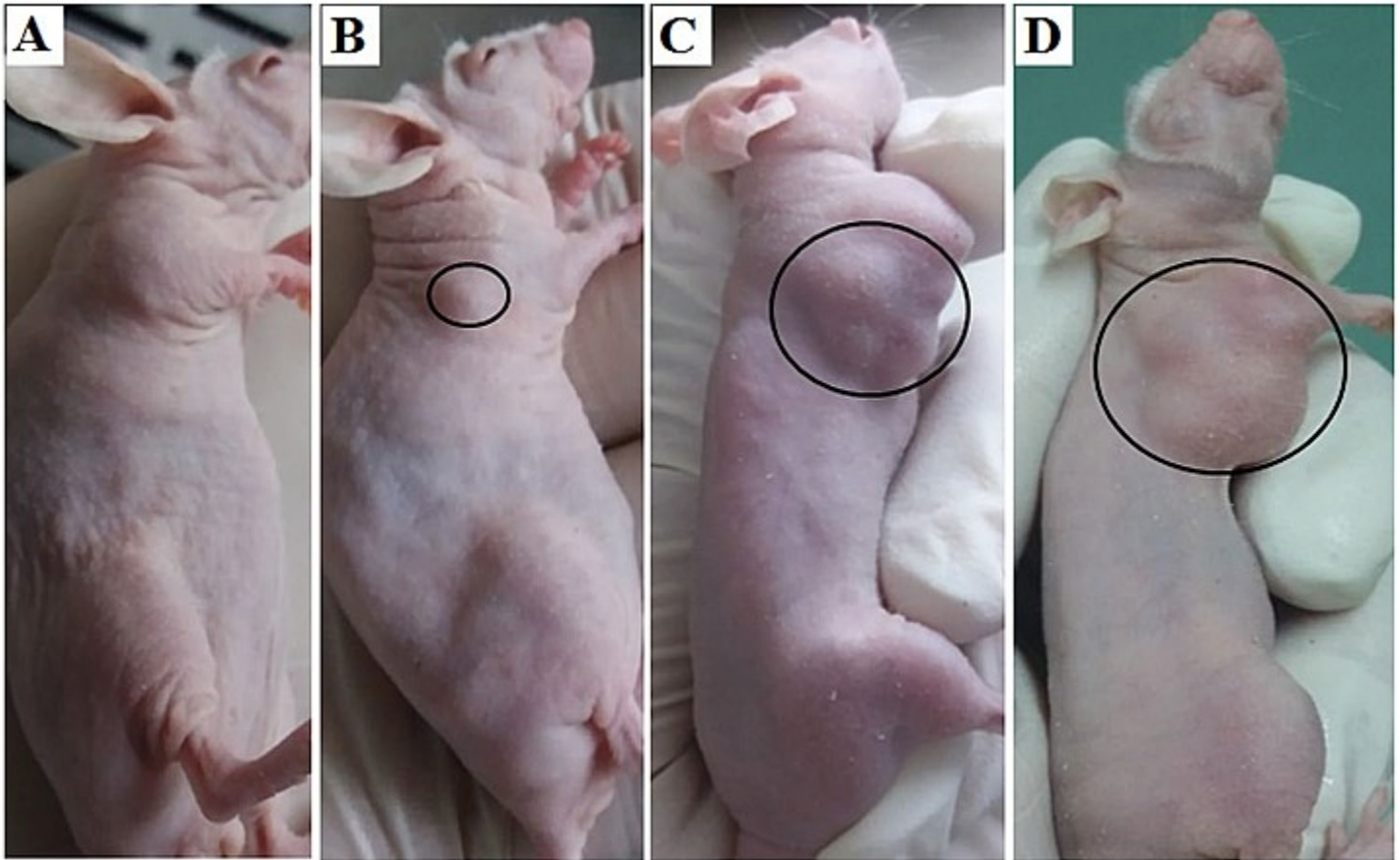


Figura 2. Diverse fasi di crescita di un topo il cui ascellare destro è stato iniettato con cellule tumorali al seno. (A) Periodo di incubazione del carcinoma mammario; (B) diametro del tumore inferiore a 0,5 cm; (C) Diametro del tumore tra 1 e 1,5 cm; (D) Diametro del tumore superiore a 1,5 cm.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

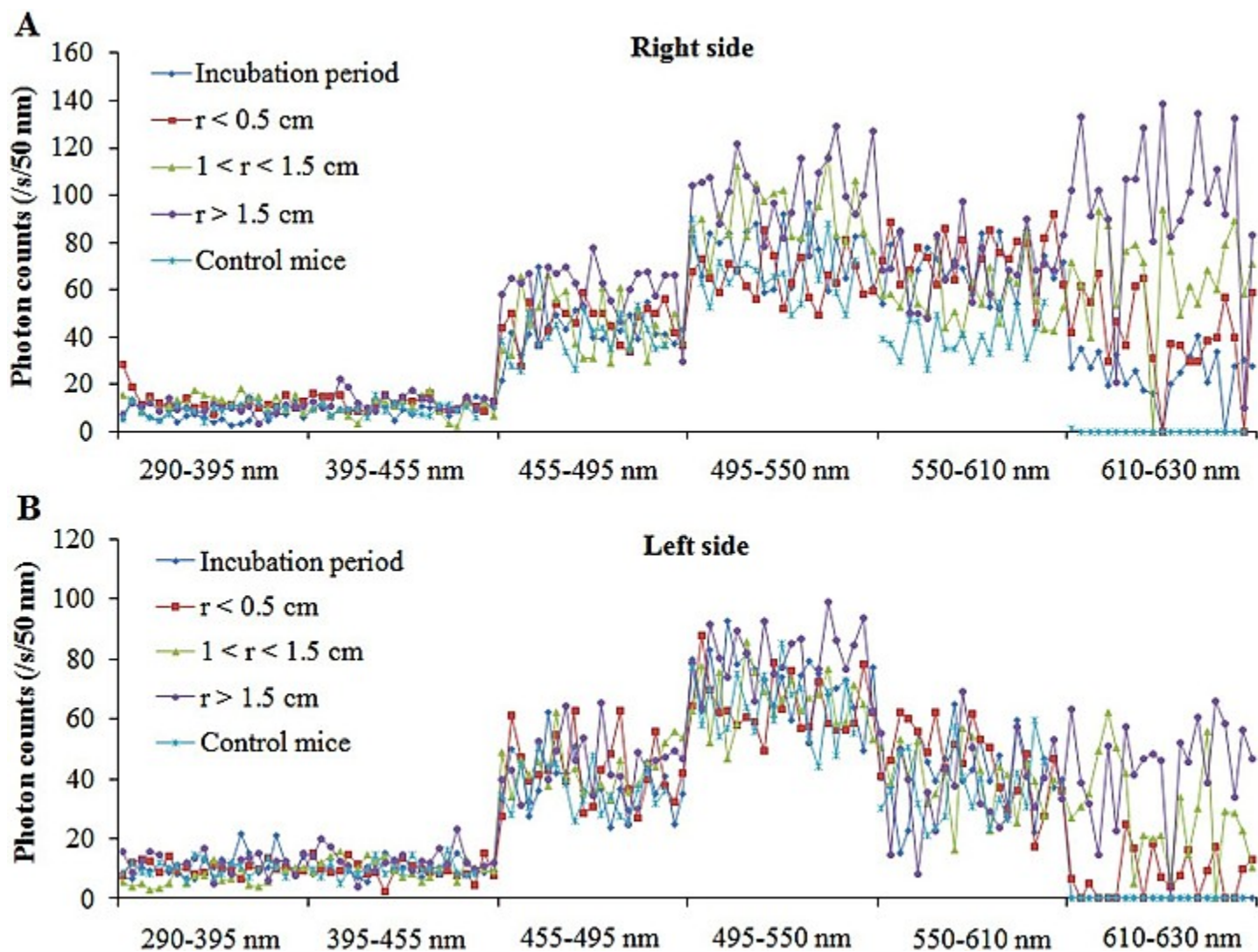


Figura 3 Le distribuzioni spettrali di SPE da entrambi i lati di 21 topi tumorali in diversi stadi di crescita di tumori al seno e diciannove controlli sani. (A) Distribuzioni spettrali nei siti giusti di topi tumorali in diversi stadi di crescita di tumori e controlli sani. (B) Distribuzioni spettrali nei siti di sinistra dei topi tumorali in diversi stadi di crescita dei tumori e controlli sani. r , diametro del tumore.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Per analizzare le caratteristiche spettrali della SPE dalla superficie corporea dei topi in ciascun gruppo rispetto ai diversi stadi di crescita del tumore, le misurazioni sono iniziate quando le cellule del cancro al seno erano nel periodo di incubazione e continuava due volte a settimana fino a quando i tumori erano evidenti. Il protocollo di misurazione dettagliato è descritto nella sezione del metodo di misurazione. I dati dei fotoni (con diversi filtri di cut-off) per entrambi i lati di ciascun topo di ciascun gruppo in diversi stadi di crescita del tumore (come mostrato in Fig.3) sono stati registrati e mediati in media \pm deviazione standard (SD) corretta per i propri segnali BG.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

lunghezza d'onda gamma	incubazione periodo	r < 0,5 cm	1 < r < 1,5 cm	r > 1,5 cm	Controlla i topi
Lato destro dei topi					
290–395 nm	6,84 ± 2,91	7,40 4,41	± 7,91 2,94	± 5,22 ± 2,27	6,33 ± 2,89
395–455 nm	9,76 ± 2,19	7,35 2,67	± 8,70 3,98	± 9,70 ± 3,43	8,54 ± 2,49
455–495 nm	42,07 ± 9,27	43,04 8,22	± 42,32 12,76	± 57,45 11,27 *	± 38,46 8,36
495-550 nm	74,04 ± 11,84	64,47 9,19	± 91,02 12,54 *	± 101,41 14,81 *	± 66,72 11,97
550–610 nm	68,98 ± 11,26 *	71,09 11,23 *	± 57,11 11,95 *	± 68,69 13,76 *	± 38,24 8,85

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

610–630 nm	26,51 10,33 *	± 41,20 18,41 *	± 79,73 21,11 *	± 105,86 32,66 *	± 0.00	
Lato sinistro dei topi						
290–395 nm	7,10 ± 4,17	8,19 ± 1,96	7,02 ± 3,06	6,01 ± 3,24	7,06 ± 2,48	
395–455 nm	9,20 ± 2,39	8,33 ± 3,17	8,45 ± 2,94	8,71 ± 4,02	9,05 ± 2,78	
455–495 nm	38,06 ± 9,35	44,88 11,23	± 43,41 ± 7,85	44,80 ± 9,84	36,01 7,85	±
495-550 nm	72,21 ± 9,68	67,94 ± 9,54	69,85 ± 9,53	79,61 ± 11,57 *	63,95 10,98	±

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

550–610 nm	41,45 12,10	± 43,09 12,02	± 39,76 ± 10,83	37,78 ± 14,83	34,79 11,51	±
610–630 nm	0.00	7,49 ± 7,74 *	28,33 ± 16,75 *	43,80 ± 16,40 *	0.00	

tavola 1. L'intensità media del segnale della SPE a diverse lunghezze d'onda varia da ventuno topi tumorali in diversi stadi di crescita del cancro e diciannove controlli sani. r, diametro del tumore. * Statisticamente significativo rispetto ai topi di controllo.

Il successivo metodo di calcolo è stato uguale a quello riportato da Van Wijk³⁶. La differenza di intensità SPE tra due filtri con interruzioni successive della lunghezza d'onda è stata utilizzata per calcolare l'emissione di fotoni di un determinato intervallo di lunghezze d'onda. L'emissione di fotoni del particolare intervallo di lunghezze d'onda è stata corretta matematicamente per la trasparenza dei filtri e l'efficienza quantum del PMT. Le efficienze quantistiche dettagliate del corrispondente intervallo di lunghezze d'onda dei PMT utilizzati sono descritte nella sezione "Metodi". Se la differenza non era significativa ($p > 0,05$), l'emissione di fotoni del topo con quella gamma di lunghezze d'onda era considerata zero. La stima finale della distribuzione spettrale di ciascun lato di un topo è stata espressa in cps per 50 nm. A causa delle caratteristiche simili ($p > 0,05$) dell'emissione spontanea di fotoni tra topi senza tumore e topi normali,³⁵ li abbiamo uniti in un unico gruppo: vale a dire il gruppo di controllo. Le distribuzioni spettrali di SPE dalla superficie corporea di ventuno topi tumorali e diciannove topi di controllo durante il processo di crescita dei tumori al seno sono illustrate in Fig.3.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

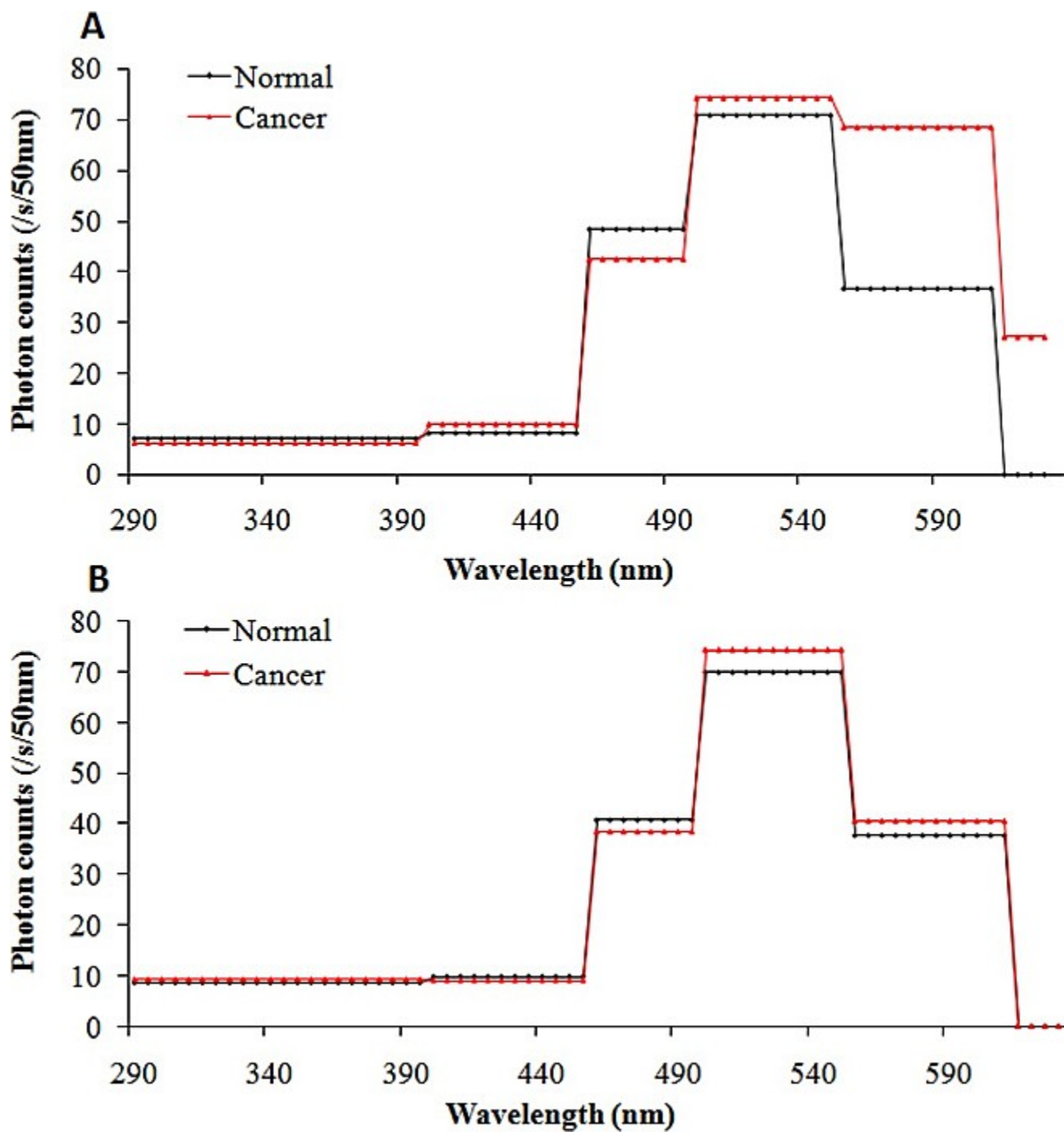
I dati in Fig. 3 illustrano che esiste un'elevata varianza individuale della distribuzione spettrale tra topi diversi. Tuttavia, la tendenza dei cambiamenti di spettro nei diversi topi negli stessi gruppi era simile. Al fine di esibire chiaramente le caratteristiche spettrali della SPE durante il processo di crescita del tumore, abbiamo mediato i dati spettrali dei topi nudi nello stesso stadio di crescita dei tumori dello stesso gruppo. I risultati sono stati visualizzati nella tabella 1 e figg 4-7. Come rappresentato in Fig.4, la distribuzione spettrale di SPE dai lati destro e sinistro dei topi di controllo era simile: il picco massimo era di 495-550 nm e i segnali di fotoni da entrambi i lati non erano più rilevabili con filtri di cut-off a 610 nm e superiori. La distribuzione spettrale della SPE dal lato sinistro (nessun lato del tumore) dei topi tumorali era coerente con quella dei topi di controllo, mentre le caratteristiche spettrali della SPE dal lato destro (lato della trapianto del tumore) dei topi tumorali erano diverse. Per il lato destro dei topi tumorali, la gamma di lunghezze d'onda del picco massimo era la stessa dei controlli; tuttavia, il segnale a 550–610 nm era 1,9 volte superiore a quello dei controlli. Inoltre, la distribuzione spettrale del lato destro dei topi tumorali ha mostrato un'emissione relativamente elevata a 610–630 nm, contrariamente all'emissione zero del lato destro dei controlli. Questo mostra che lo spettro della SPE dal sito di impianto del tumore sulla superficie del topo è comunque cambiato nel period di incubazione del cancro al seno (prima di qualsiasi cambiamento morfologico) nei topi tumorali.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Figura 5 illustra lo spettro della SPE da entrambi i lati dei topi tumorali e controlla quando i diametri del tumore erano inferiori a 0,5 cm. Non c'erano differenze significative tra i topi tumorali e i controlli nella caratteristica spettrale della SPE dal lato sinistro (lato normale) in questo stadio del tumore ($r < 0,5$ cm), ad eccezione di alcuni segnali di fotoni a 610–630 nm nei topi tumorali. Tuttavia, dal lato destro (sito di trapianto del tumore) dei topi tumorali, il picco massimo di distribuzione spettrale appariva a 550–610 nm, che era nettamente diverso dai controlli e dai topi tumorali quando il tumore non era evidente. Rispetto ai topi tumorali durante il periodo di incubazione per i tumori al seno, i segnali dei fotoni dai topi tumorali in questo stadio del tumore sono aumentati significativamente (circa 1,7 volte) a 610-630 nm. In altri componenti spettrali di SPE, distinti dai dati sui topi tumorali menzionati sopra, due picchi apparivano nello spettro della SPE dai lati destri dei topi tumorali quando il diametro del tumore era maggiore di 1 cm e inferiore a 1,5 cm, come mostrato in Fig. 6A: un picco appariva a 455-495 nm, che era uguale a quello dal lato destro dei controlli e un altro picco appariva a 610-630 nm. In particolare, a 610–630 nm nello spettro della SPE (mostrato in Fig. 6B), i livelli di emissione dal lato sinistro dei topi tumorali in questo stadio del tumore erano 4 volte superiori rispetto all'emissione dal lato sinistro dei topi tumorali quando i diametri del tumore erano inferiori a 0,5 cm.

In fig. 7A, la SPE dalla parte destra dei topi tumorali in questo stadio del tumore ($r > 1,5$ cm) ha mostrato caratteristiche spettrali simili con quelle dallo stesso lato dei topi tumorali quando il diametro del tumore era compreso tra 1 cm e 1,5 cm. Tuttavia, rispetto allo spettro mostrato in Fig. 6A, le intensità dei fotoni della SPE dai topi tumorali in questo stadio erano significativamente aumentate a 455-495 nm e 610-630 nm.

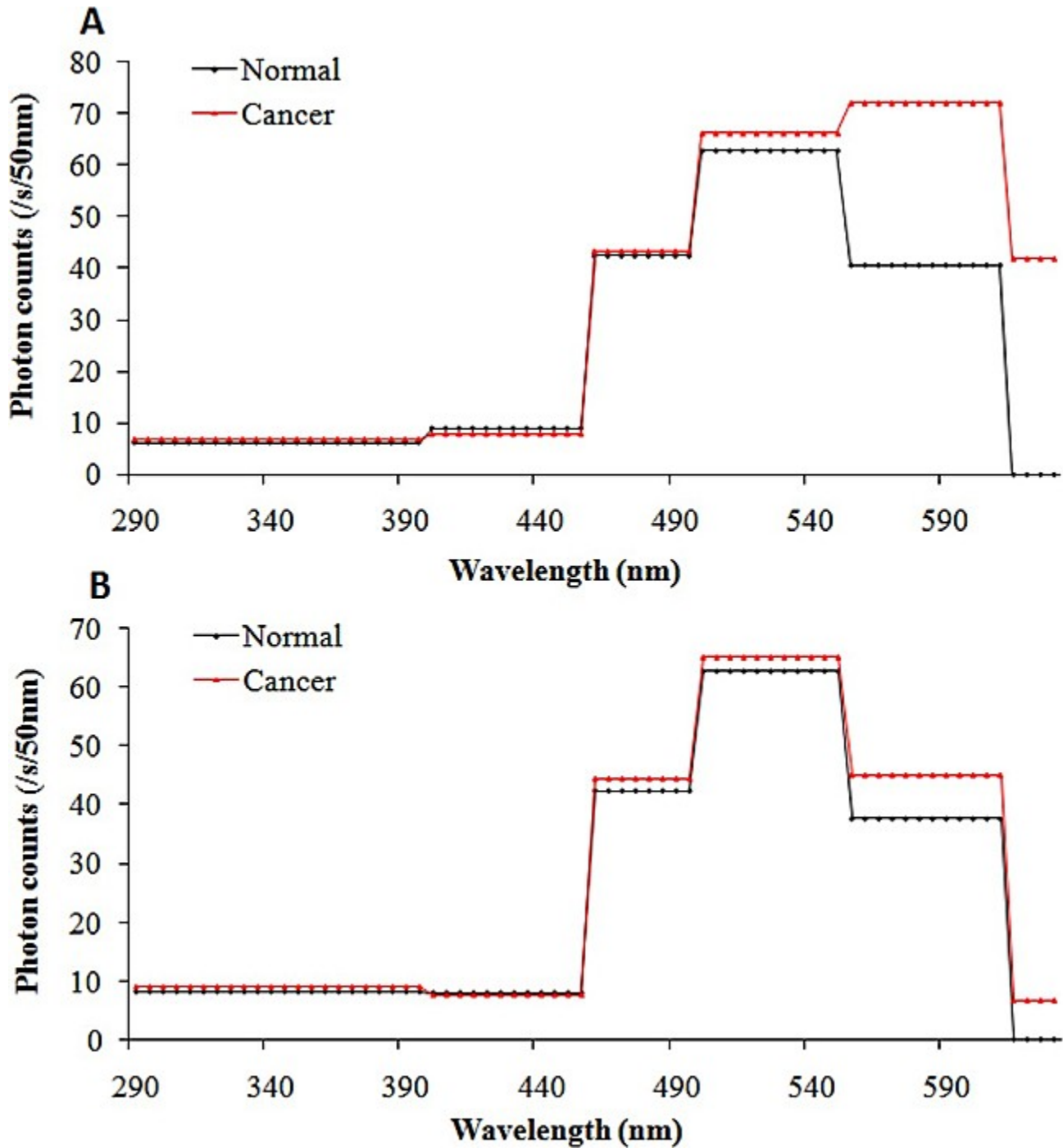
Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno



Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Figura 4 Distribuzione spettrale della SPE da entrambi i lati dei topi tumorali e controlli nel periodo di incubazione dei tumori al seno. (A) Distribuzione spettrale nei siti di lesione destra dei topi tumorali (linea rossa) e stessi siti sui controlli (linea nera). (B) Distribuzione spettrale nei siti di sinistra, che corrispondeva ai siti di lesione dei lati destro dei topi tumorali (linea rossa) e gli stessi siti per i controlli (linea nera).

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

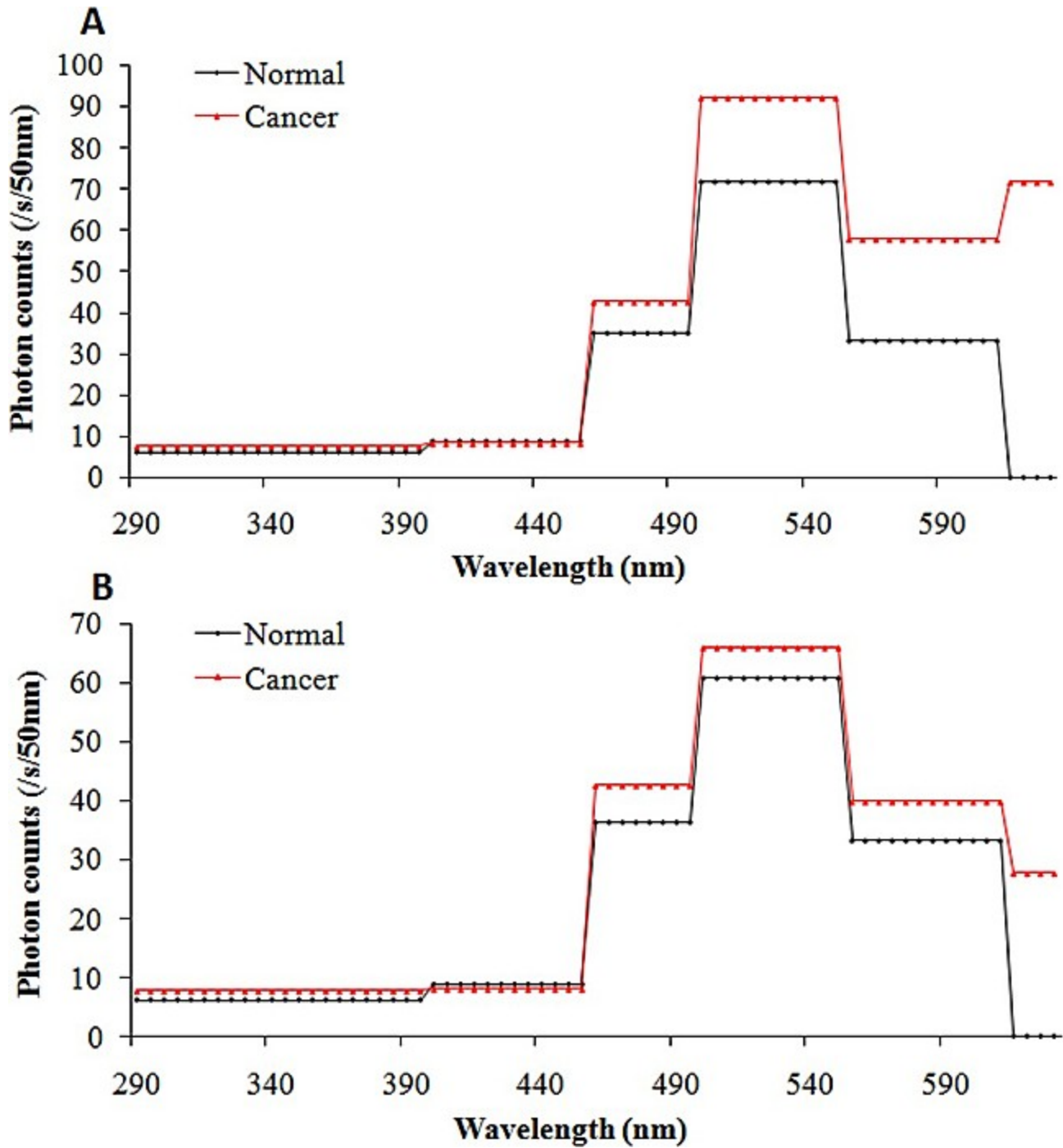


Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Figura 5 Distribuzione spettrale della SPE da entrambi i lati dei topi tumorali e controlli quando i diametri tumorali erano inferiori a 0,5 cm. (A) Distribuzione spettrale nei siti di lesione destra nei topi tumorali (linea rossa) e stessi siti nei controlli (linea nera). (B) Distribuzione spettrale nei siti di sinistra, che corrispondeva ai siti di lesione dei lati destro nei topi tumorali (linea rossa) e stessi siti nei controlli (linea nera).

È interessante notare che la distribuzione di SPE dal lato sinistro dei topi tumorali in questa fase del tumore, come mostrato in Fig. [7B](#), includeva un piccolo picco apparso a 610–630 nm e i segnali a 495–550 nm tendono ad aumentare rispetto allo spettro di Fig. [6B](#).

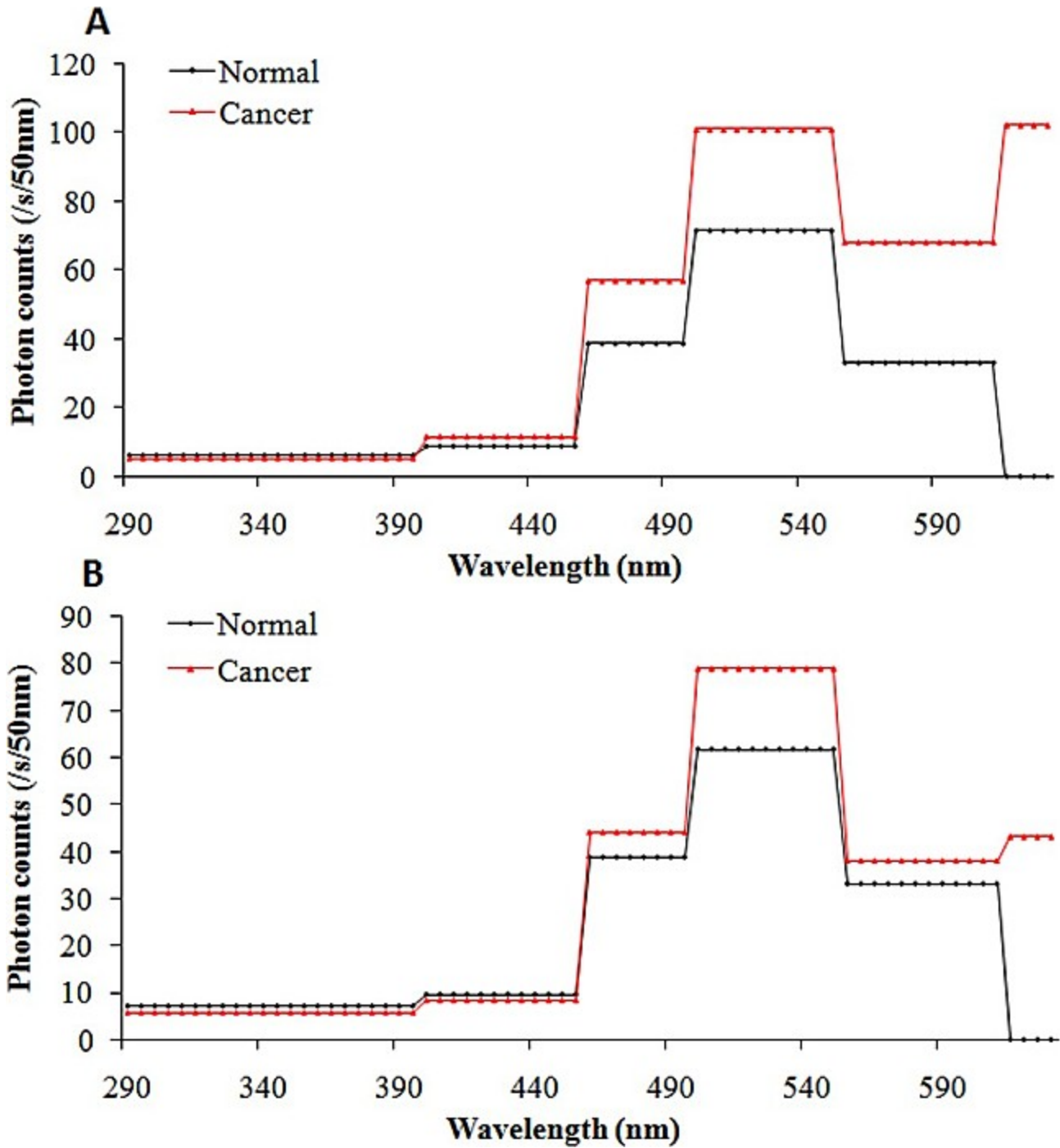
Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno



Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Figura 6 Distribuzione spettrale della SPE da entrambi i lati dei topi tumorali e controlli quando i diametri del tumore erano superiori a 1 cm e inferiori a 1,5 cm. (A) Distribuzione spettrale nei siti di lesione destra nei topi tumorali (linea rossa) e stessi siti nei controlli (linea nera). (B) Distribuzione spettrale nei siti di sinistra, che corrispondono ai siti di lesione dei lati destro nei topi tumorali (linea rossa) e stessi siti nei controlli (linea nera).

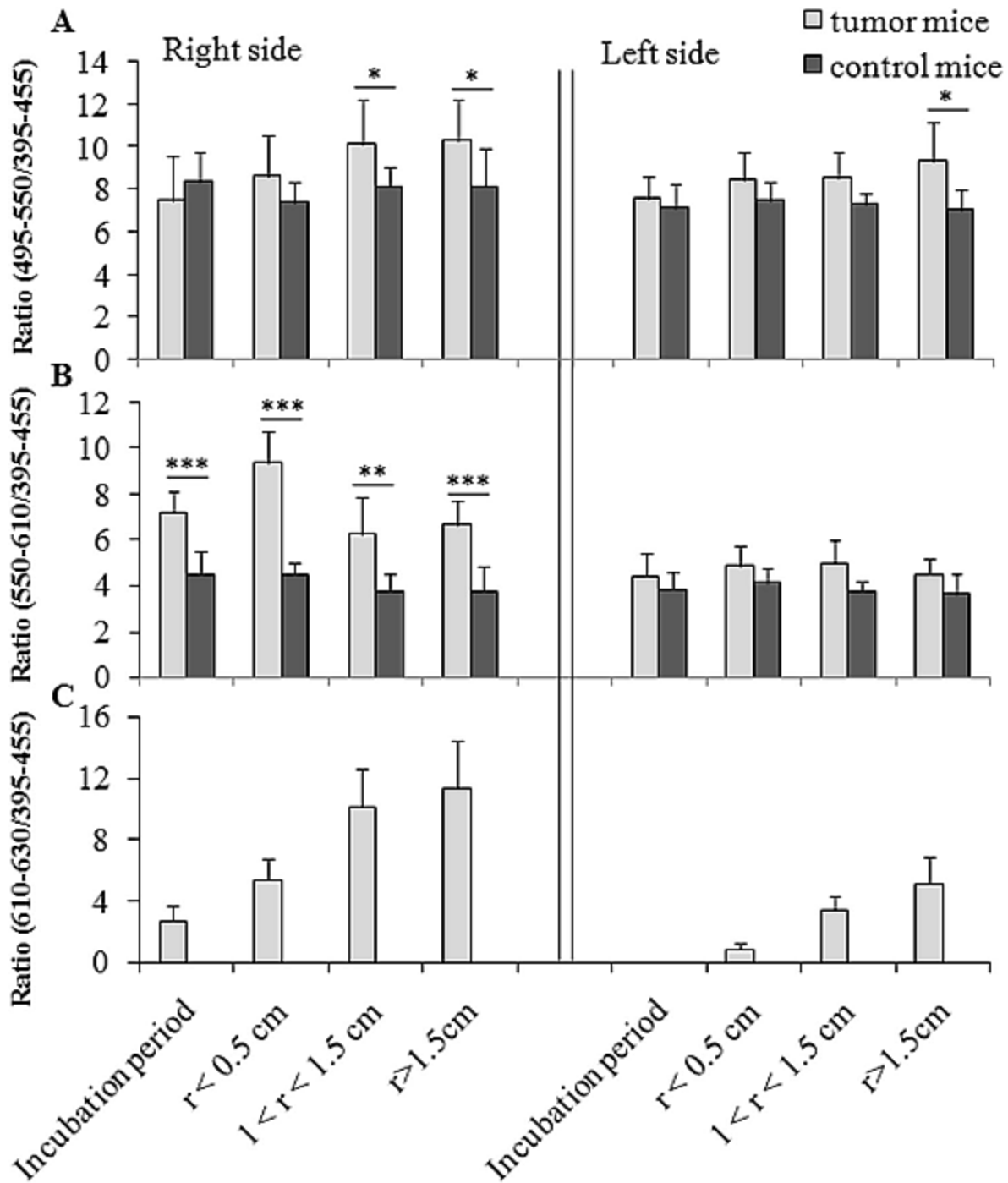
Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno



Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Figura 7 Spettro SPE da entrambi i lati dei topi tumorali e controlli quando i diametri tumorali erano maggiori di 1,5 cm. (A) Distribuzione spettrale nei siti di lesione destra nei topi tumorali (linea rossa) e stessi siti nei controlli (linea nera). (B) Distribuzione spettrale nei siti di sinistra, che corrispondeva ai siti di lesione dei lati destro nei topi tumorali (linea rossa) e stessi siti nei controlli (linea nera).

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno



Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Figura 8. Rapporto tra vari componenti spettrali e componente a 395–455 nm per topi tumorali e controlli in diversi stadi di crescita dei tumori. r , diametro del tumore. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Per eliminare le differenze individuali e ottenere dati più accurati per l'ulteriore esplorazione delle caratteristiche spettrali della SPE durante il processo di crescita del tumore, abbiamo calcolato il rapporto tra i vari componenti spettrali (495–550 nm, 550–610 nm e 610–630 nm) e il componente a 395–455 nm per topi tumorali e controlli in diversi stadi di crescita del cancro. I dati sono presentati in Fig.8.

A partire dai risultati in Fig. 8, si può concludere che la crescita delle cellule tumorali ha influenzato la distribuzione spettrale della SPE della superficie del corpo del topo durante il cambiamento delle dimensioni del tumore. I componenti spettrali di SPE a una gamma di 550–610 nm e 610–630 nm cambiarono persino prima che fossero visibili eventuali cambiamenti morfologici nel sito del trapianto, come mostrato in Fig.8B-C. I dati mostrati in Fig.8A e C illustrano che, anche i componenti spettrali di SPE a 495–550 nm e 610–630 nm dal sito sano (lato sinistro) dei topi tumorali sono cambiati quando i tumori si sono sviluppati ad un certo stadio, in particolare a 610–630 nm. Il rapporto tra 610–630 nm e 395–455 nm tendeva ad aumentare con l'aumentare delle dimensioni del tumore per entrambi i lati destro e sinistro del topo tumorale, come mostrato in Fig. 8C, ma questa funzione non è stata osservata in altri rapporti. Queste differenze potrebbero essere utilizzate per discriminare i topi tumorali da topi sani, anche se i tumori non erano evidenti e per identificare le fasi di crescita dei tumori in una certa misura.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Analisi di correlazione tra rapporto (610–630 / 395–455 nm) e volume del tumore. Seguendo il risultato in Fig. 8C, abbiamo analizzato la correlazione tra il rapporto dei componenti spettrali (610–630 / 395–455 nm) e il volume del tumore. I risultati rappresentati in Fig.9. hanno suggerito che il rapporto spettrale tra la lunghezza d'onda varia da 610 a 630 nm e 395–455 nm era positivamente correlato al logaritmo del volume del tumore per entrambi il lato destro ($R^2 = 0,947$; $p < 0,001$) e lato sinistro ($R^2 = 0,892$; $p < 0,001$) dei topi tumorali, sebbene il coefficiente di correlazione per il lato sinistro fosse relativamente basso.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

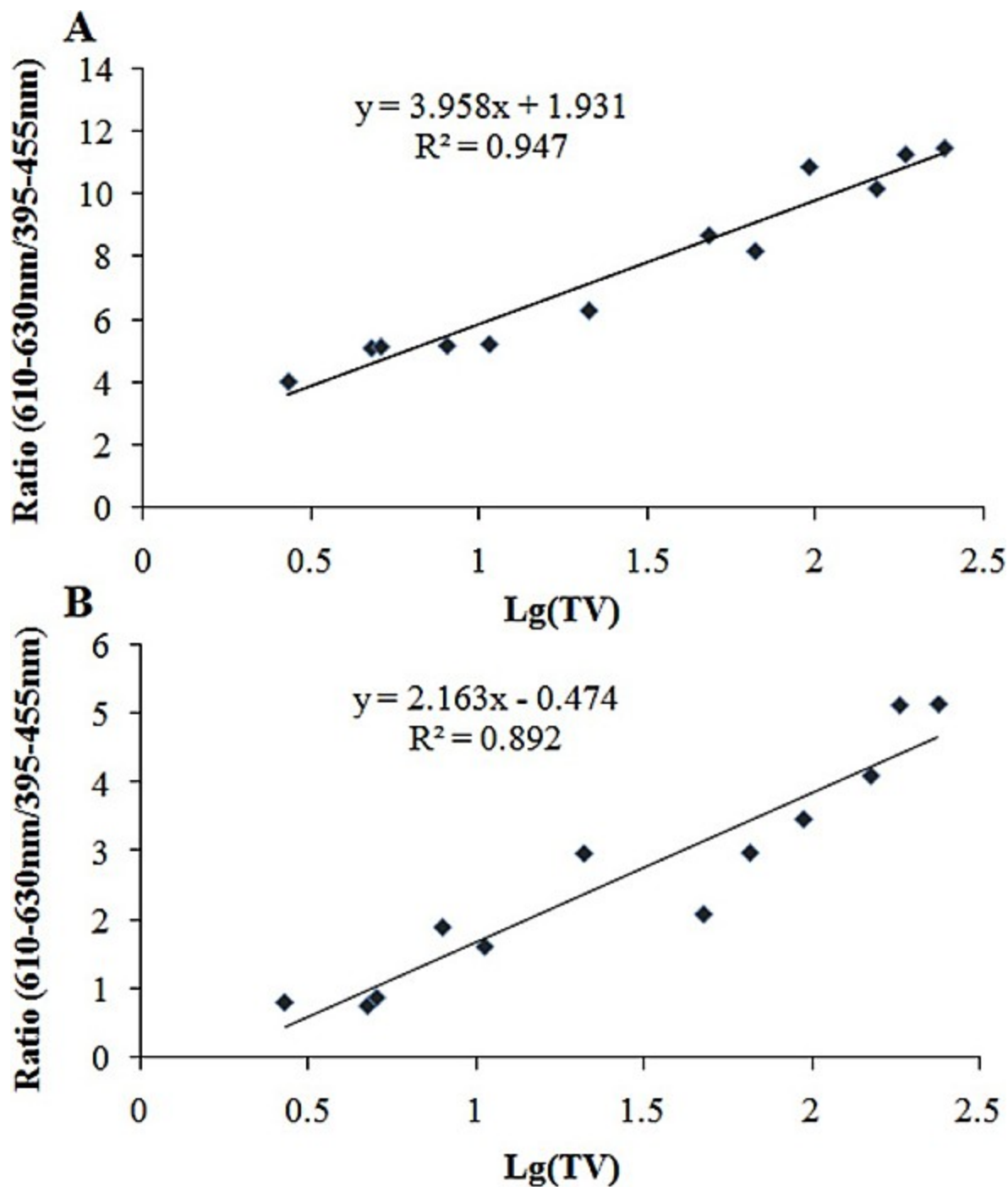


Figura 9 Analisi di correlazione tra rapporto dei componenti spettrali (610–630 / 395–455 nm) di SPE da destra

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

(A) e lato sinistro (B) dei topi tumorali e il loro volume tumorale. $Lg(TV)$, logaritmo del volume del tumore; l'unità è mm^3 . $P < 0,001$ sia per A che per B.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Discussione

È noto che i processi metabolici sono le reazioni biochimiche fondamentali nel sistema biologico e provocano la generazione di ROS, che è noto per svolgere un ruolo importante nella formazione di specie eccitate elettronicamente come carbonili di tripletto (${}^3R = O^*$), pigmenti eccitati (P^*) e ossigeno singoletto (1O_2). La SPE ha origine dal rilassamento di queste specie eccitate elettronicamente e ogni specie eccitata elettronicamente può emettere la sua energia come un fotone ad una particolare lunghezza d'onda. I fotoni dei gruppi carbonilici eccitati hanno lunghezze d'onda nelle regioni UVA vicine e blu-verde (350–550 nm), i pigmenti singoletti (${}^1P^*$) e i tripletti eccitati (${}^3P^*$) appaiono in verde-rosso (550–750 nm) e rosso -a prossimità delle regioni IR (750–1000 nm) e ossigeno singoletto si osserva nelle regioni rosse (634 nm e 703 nm) e vicine IR (1270 nm)²³. In cellule animali, la generazione di ROS è correlata a reazioni enzimatiche nei mitocondri, citoplasma e perossisomi e la respirazione cellulare nei mitocondri è una fonte importante³⁷⁻³⁹. Quando i processi metabolici cambiano durante la progressione displastica, il tipo e il numero di specie eccitate elettronicamente cambiano di conseguenza, portando ad alterazioni delle caratteristiche ottiche di cellule, tessuti e organismi. La tecnologia di rilevazione SPE sensibile a queste alterazioni potrebbe essere utilizzata per riflettere i processi metabolici sottostanti nelle cellule e monitorare gli stati fisiologici e patologici dei sistemi biologici da una prospettiva ottica.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

A differenza delle cellule normali, che utilizzano principalmente la fosforilazione ossidativa come fonte di energia in condizioni aerobiche e glicolisi in anossia, le cellule tumorali usano la glicolisi come principale fonte di energia indipendentemente dal fatto che i livelli di ossigeno siano sufficienti⁴⁰⁻⁴³. Questa differenza nel metabolismo cellulare porta a cambiamenti in diverse reazioni biochimiche correlate, che si traducono in cambiamenti nei livelli di ROS delle cellule tumorali. Di conseguenza, la SPE delle cellule tumorali differisce da quella delle cellule sane, come descritto nell'introduzione. Tuttavia, la maggior parte delle ricerche si è concentrata su cellule o tessuti tumorali e pochi studi hanno studiato le caratteristiche in vivo della SPE di soggetti con cancro.

Nel nostro precedente studio, abbiamo scoperto che l'intensità della SPE dalla superficie corporea potrebbe distinguere significativamente i topi nudi portatori di cancro al seno dai controlli, indipendentemente dal fatto che i cambiamenti morfologici nei tumori fossero evidenti e che la SPE cambiasse con le dimensioni del tumore³⁵. In questo articolo, abbiamo ulteriormente studiato le caratteristiche spettrali della SPE dalla superficie corporea dei topi portatori di carcinoma mammario umano e controlli sani durante l'intero processo di crescita del carcinoma mammario per esplorare più approfonditamente la relazione tra le componenti spettrali della SPE e gli stadi tumorali. I nostri risultati hanno mostrato una notevole differenza nella distribuzione spettrale della SPE tra i topi tumorali e i controlli. Nei topi di controllo, il picco massimo della distribuzione spettrale di SPE era di 495-550 nm sia per il lato destro che per quello sinistro dei topi. Nei topi tumorali, lo spettro della SPE dalla superficie corporea è cambiato con lo stadio del tumore.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Per lo spettro della SPE dal lato del trapianto di tumore nei topi tumorali nel periodo di incubazione del tumore, sebbene il picco massimo spettrale fosse ancora a 495-550 nm, i livelli del segnale a 550-610 nm e 610-630 nm aumentano significativamente ($p < 0,001$) rispetto ai topi di controllo. Quando il tumore era evidente ma diametro era inferiore a 0,5 cm, il picco massimo spettrale ha mostrato uno spostamento sostanziale verso la parte rossa dello spettro da 450-550 nm a 550-610 nm, e anche i livelli del segnale a 610-630 nm sono aumentati.

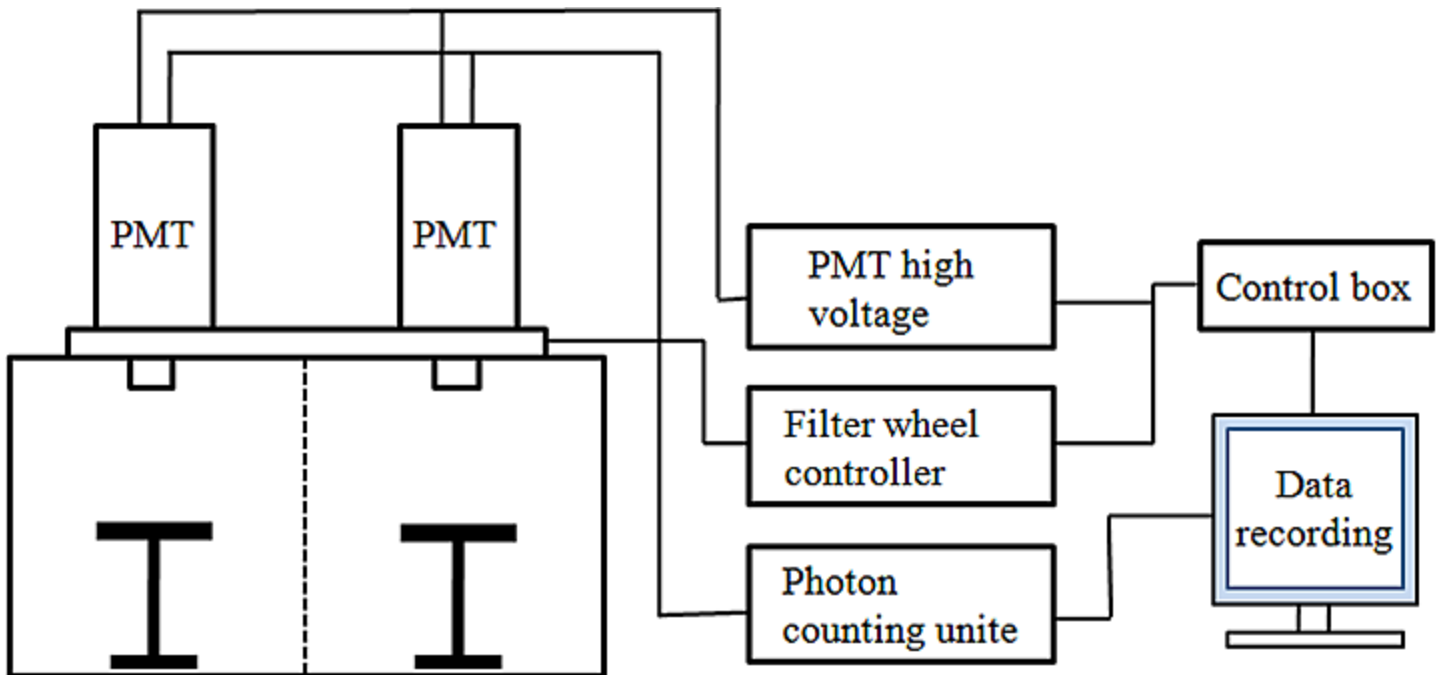


Figura 10 Rappresentazione schematica del sistema di rilevamento SPE a doppio PMT utilizzato in questo studio.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Inoltre, i livelli del segnale a 495-550 nm e 610-630 nm aumentarono ancora di più quando le dimensioni del tumore aumentarono ulteriormente e apparvero due picchi nello spettro della SPE: uno a 495-550 nm, come nei controlli; e un altro a 610-630 nm. Alcuni ricercatori hanno riferito che la melanina cutanea potrebbe avere alcuni effetti sulla SPE^{44,45}. Sulla base di questo, abbiamo eseguito un'analisi della melanina della pelle dei topi nudi usando il metodo di colorazione con argento Masson-Fontana. Abbiamo scoperto che la distribuzione della melanina cutanea nei topi nudi ha mostrato risultati negativi (vedi Fig. Supplementare S1). Questi risultati hanno suggerito che la melanina cutanea nei topi nudi era carente e non aveva alcun effetto sulla SPE dalla superficie corporea dei topi nudi. Rispetto alla lunghezza d'onda specifica emessa dalle specie eccitate elettronicamente, abbiamo ipotizzato che i cambiamenti nel carbossile eccitato di tripletta ($^3R = O^*$), nel pigmento eccitato di singoletto ($1P^*$) e nell'ossigeno singoletto ($1O^2$), che sono coinvolti in una serie di reazioni redox complesse, possono essere principalmente responsabili dei cambiamenti nella distribuzione spettrale della SPE dalla parte destra dei topi tumorali. L'aumento dei vasi sanguigni nel sito della lesione e i cambiamenti dei componenti attivi nel sangue causati da tumori possono anche influenzare la distribuzione spettrale della SPE, in una certa misura. Inoltre, con la crescita dei tumori, l'intensità del segnale a 495-630 nm ha mostrato una tendenza crescente, in particolare a 610-630 nm.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Per SPE dal lato senza tumore dei topi tumorali rispetto ai controlli, le loro caratteristiche spettrali erano simili quando il diametro del tumore era inferiore a 0,5 cm. Con l'ulteriore crescita del tumore, le intensità del segnale a 610–630 nm sono successivamente aumentate; quando il diametro del tumore era maggiore di 1,5 cm, lo spettro SPE mostrava un secondo piccolo picco a 610–630 nm e i livelli del segnale aumentavano significativamente a 495–550 nm ($p = 0,016$). Questi risultati possono essere correlati ai cambiamenti nel tipo e nel numero di specie eccitate elettronicamente nel sangue o a causa della metastasi del tumore. Diversi ricercatori hanno dimostrato che il tasso di produzione di ossigeno singoletto e perossido di idrogeno era misurabilmente più alto nel plasma dei pazienti con carcinoma mammario rispetto ai controlli^{14,46}. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi.

Un'altra scoperta interessante in questo studio è stata che, il rapporto spettrale tra la gamma di lunghezze d'onda 610–630 nm e 395–455 nm era positivamente correlato con il logaritmo del volume del tumore per entrambi il lato destro ($R^2 = 0,947$; $p < 0,001$) e il lato sinistro ($R^2 = 0,892$; $p < 0,001$) dei topi tumorali, come mostrato in Fig. 9. Ciò indica che i componenti spettrali della SPE dai topi tumorali hanno una stretta relazione con lo stato del tumore.

Conclusione

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Noi abbiamo riportato le caratteristiche spettrali della SPE dalla superficie corporea dei modelli di topi nudi portatori di cancro al seno umano durante tutto il processo di crescita del cancro al seno utilizzando un sistema di rilevamento SPE a doppio PMT ad alta sensibilità e una serie di filtri di cut-off. I nostri dati hanno mostrato che la distribuzione spettrale della SPE dal lato della lesione della superficie corporea dei topi tumorali era significativamente diversa da quella dello stesso lato dei controlli sani, indipendentemente dal fatto che fossero visibili cambiamenti morfologici nel sito della lesione. Con lo sviluppo del tumore al seno ($1 < r < 1,5$ cm in questo documento), anche la distribuzione spettrale della SPE dal lato sano dei topi tumorali differiva dai controlli. Inoltre, la differenza di spettro era correlata a diversi stati di crescita dei tumori. È interessante notare che c'era una correlazione positiva tra il rapporto spettrale (610–630 / 395–455 nm) e il logaritmo del volume del tumore per entrambi i lati destro e sinistro dei topi tumorali. Sebbene il meccanismo preciso della SPE dalla superficie corporea dei topi nudi non sia stato chiarito completamente, questi risultati indicano che lo spettro della SPE dalla superficie corporea contiene informazioni metaboliche abbondanti ed è strettamente correlato alla crescita del cancro al seno. La relazione tra il ROS nel sito della lesione, o siero nelle diverse fasi di crescita dei tumori, e le componenti spettrali della SPE dalla superficie corporea dovrebbe essere studiata successivamente. A nostro avviso, questi primi risultati preliminari sono interessanti. Tuttavia, è necessaria un'ulteriore acquisizione dei dati per giungere alla conclusione che gli spettri SPE potrebbero essere un potenziale indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno, in particolare nel loro primo stadio.

Metodi

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Sistema di rilevamento sperimentale. Una rappresentazione schematica del sistema di rilevamento SPE a doppio PMT è illustrata in Fig.10. I componenti principali del sistema di rilevamento includono due PMT (ET Enterprises, Gran Bretagna, 9235QA), un alimentatore ad alta tensione (Sens Tech PM20), una ruota filtro e un sistema di otturatori, due unità di conteggio dei fotoni (C9744), una scatola scura costituita da due camere, una centralina e un computer con software di misurazione e conteggio dei fotoni. Il sistema è stato collocato in una sala operatoria speciale per garantire la schermatura magnetica.

Due PMT sensibili nello spettro di 290-630 nm sono stati installati sulla parte superiore delle due camere della scatola oscura. Di fronte al PMT, è stato posizionato un sistema di ruote filtranti. L'analisi spettrale è stata eseguita utilizzando un set di filtri (Schott Glaswerke AG, Main, Germania) con lunghezze d'onda di taglio rispettivamente a 395 nm, 455 nm, 495 nm, 550 nm e 610 nm. Oltre ai filtri di cui sopra, nella ruota del filtro era inclusa un'apertura senza filtro. Le efficienze quantistiche del PMT per le diverse bande spettrali sono state del 27% (290-395 nm), 23% (395-455 nm), 15% (455-495 nm), 6% (495-550 nm), 3% (550-610 nm) e 2% (610-630 nm).

Per posizionare i topi e assicurarsi che la distanza tra il sito di rilevamento e la finestra PMT fosse la stessa (1,0 cm) per tutte le misurazioni, un supporto per campioni con altezza regolabile è stato posizionato in ciascuna camera della scatola scura. Lo speciale design di due camere e due PMT in un'unica scatola scura ci ha permesso di misurare due topi contemporaneamente. La temperatura nella sala operatoria è stata controllata a $25 \pm 1^\circ \text{C}$.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Linee cellulari. La linea cellulare di cancro al seno umano MDA-MB-231 utilizzata in questo studio è stata acquistata dalla banca cellulare dell'Istituto di biologia cellulare di Shanghai, Accademia cinese delle scienze. Le cellule sono state coltivate in DMEM integrato con 100 U / mL di penicillina, 100 µg / mL di streptomina e 10% di FBS e incubate a 37° C in un'atmosfera umidificata al 5% di CO₂ in aria come coltura monostrato in piastre di coltura plastica (100 mm di diametro). Le cellule venivano regolarmente sottocoltivate quando veniva raggiunta la confluenza dell'80%.

Trapianto di xenotrapianto sottocutaneo. Quaranta topi nudi femminili BALB/C (5 settimane) sono stati ottenuti dalla Beijing Bioscience Company di Pechino e sono stati randomizzati in tre gruppi: gruppo normale, n = 5; gruppo di controllo, n = 10; e gruppo di esperimenti, n = 25. Le cellule MDA-MB-231 con una buona crescita sono state tripsinizzate e sospese in soluzione fisiologica. Nel gruppo sperimentale, un totale di 5×10^6 cellule in 0,15 mL di soluzione fisiologica sono state iniettate per via sottocutanea nell'ascellare destro di ciascun topo nudo dopo una settimana di acclimatazione. Per i topi di controllo, il loro ascellare destro è stato iniettato solo con 0,15 mL di soluzione salina fisiologica. I topi normali sono rimasti liberi da eventuali iniezioni. Dopo l'iniezione, i topi sono stati tenuti in una struttura di isolamento priva di agenti patogeni sotto un ciclo luce/buio di 12 ore a 22-24 ° C e umidità del 50% con cibo e acqua disponibili ad libitum.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Metodo di misurazione. Ogni test è stato condotto tra le 14:00 e le 16:00 per ridurre l'influenza dei ritmi diurni⁴⁷. Per garantire la coerenza dell'esperimento, è stato osservato il seguente protocollo per tutte le misure. a): I topi sono stati ponderati e anestetizzati usando il 7% di sodio pentobarbital (70 mg/kg) per mantenere gli animali esattamente nella stessa posizione durante la misurazione. Dopo l'iniezione, i topi sono stati tenuti in una gabbia per 5 minuti e quindi collocati in una stanza completamente buia con temperatura controllata (25 ± 1 ° C) e umidità (50%) 20 minuti prima dell'inizio della misurazione per eliminare l'influenza di luce esterna. b): i segnali della camera vuota (BG) senza e con filtri in una sequenza da 395 nm a 610 nm in entrambi i PMT sono stati misurati per 3 minuti ad intervalli di 1 s prima di misurare i topi per garantire le prestazioni di rilevamento del sistema sperimentale e per analisi dei dati di follow-up. c): successivamente, due topi pretrattati sono stati posizionati sui due porta-campioni in diverse camere, rispettivamente. In questo modo, abbiamo ottenuto segnali da due topi, in modo sincrono. I segnali dal sito di trapianto del tumore sui lati destro dei due topi e lo stesso sito sui lati sinistro sono stati registrati in sequenza. La durata di ciascun filtro era di 3 minuti, con un tempo di intervallo di 1 s, e il tempo di registrazione per ciascun lato di un topo con un set completo di filtri impiegava circa 18 minuti; sono stati necessari circa 40 minuti per una misurazione completa. La misurazione successiva è stata eseguita immediatamente dopo. d): Infine, la BG senza e con i filtri è stata nuovamente misurata. Va sottolineato che, nonostante la piccola differenza tra i due PMT, i nostri dati sperimentali mostrano che la differenza dei segnali ottenuti dalle due PMT dallo stesso topo non erano significativi. La misurazione dei siti di trapianto di tumore è iniziata quando le cellule del cancro al seno erano nel periodo di incubazione, e le misurazioni sono state eseguite due volte alla settimana fino a quando i tumori erano evidenti (come mostrato in Fig. 2).

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Analisi dei dati. L'analisi statistica dei dati è stata eseguita con SPSS 18.0 (SPSS, USA). Le differenze sono state considerate significative in $p < 0,05$. I calcoli e la rappresentazione grafica dei dati sono stati eseguiti utilizzando Origin 9.1. L'analisi di correlazione di Pearson è stata utilizzata per valutare la correlazione tra SPE e il volume del tumore (TV) e la TV è stata calcolata con la seguente formula: $TV = 1/2ab^2$, dove "a" rappresenta la lunghezza del tumore e "b" - rappresenta la larghezza di esso.

Disponibilità dei dati. I set di dati generati durante e/o analizzati durante lo studio attuale sono disponibili dall'autore corrispondente su ragionevole richiesta.

Riferimenti

1. Torre, LA et al. Statistiche globali sul cancro, 2012. *Ca A Cancer Journal for Clinician*. 65, 87–108, <https://doi.org/10.3322/caac.21262> (2015).
1. Kala, S., Pantola, C., Agarwal, A., Pradhan, A. & Thakur, S. Spettroscopia ottica: uno strumento diagnostico promettente per le lesioni al seno. *Giornale di ricerca clinica e diagnostica*. 5, 1574-1577 (2011).

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

1. Carney, PA et al. Probabilità di ulteriori allenamenti tra le donne sottoposte a mammografia di screening di routine: l'impatto dell'età, della densità mammaria e dell'uso della terapia ormonale. *Prev Med.* 39, 48–55, <https://doi.org/10.1016/j.yjmed.2004.02.025> (2004).
2. Hata, T. et al. Imaging a risonanza magnetica per la valutazione preoperatoria del carcinoma mammario: uno studio comparativo con la mammografia ed ecografia. *J Am Coll Surg.* 198, 190–197, <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2003.10.008> (2004).
3. Hindle, WH, Davis, L. & Wright, D. Valore clinico della mammografia per donne sintomatiche di età pari o inferiore a 35 anni. *Am J Obstet Gynecol.* **180**, 1484-1490 (1999).
4. Ostrander, JH et al. Il rapporto ottico redox differenzia le linee cellulari di cancro al seno in base allo stato del recettore degli estrogeni. *Cancer Res.* **70**, 4759–4766, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2572> (2010).