



Φασματοσκοπία Ράμαν **(Raman Spectroscopy)**



• Professor Sir C.V. Raman

A New Type of Secondary Radiation

C. V. Raman and K. S. Krishnan,

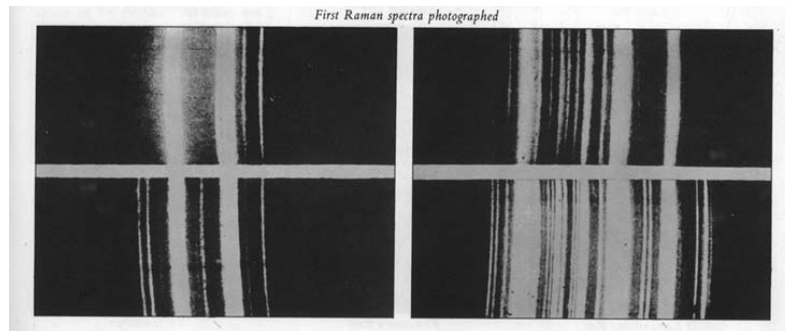
Nature, 121(3048): 501-502, March 31, 1928

Βραβείο Nobel στη Φυσική 1930

" για το έργο του σχετικά με τη σκέδαση του φωτός και για την ανακάλυψη του φαινομένου που φέρει το όνομά του "



1888-1970



Τα πρώτα φάσματα Raman

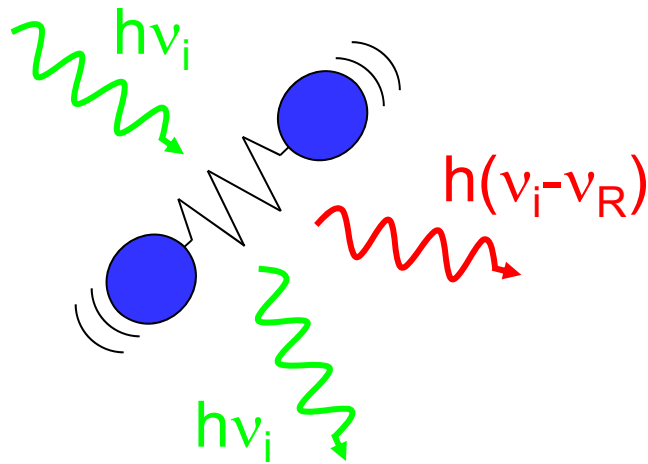


Bangalore, India

Εισαγωγή

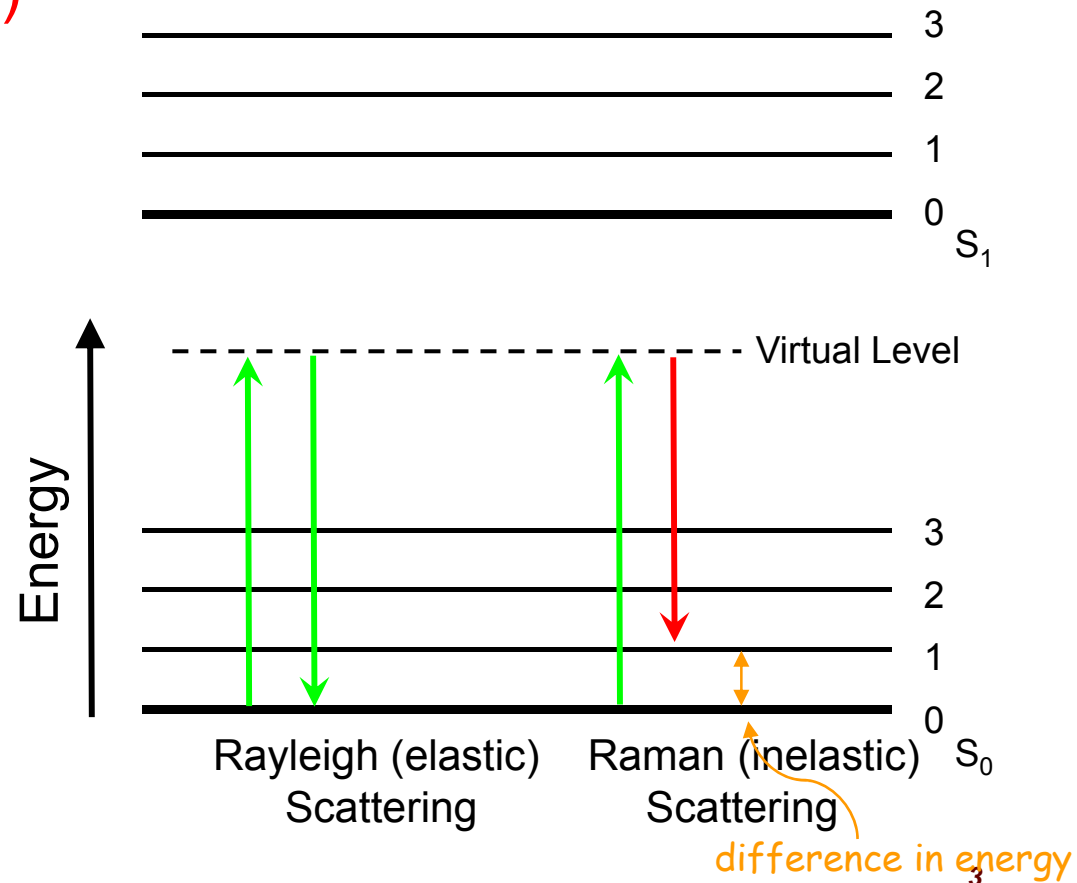


• Φαινόμενο Raman → Ανελαστική (inelastic) σκέδαση



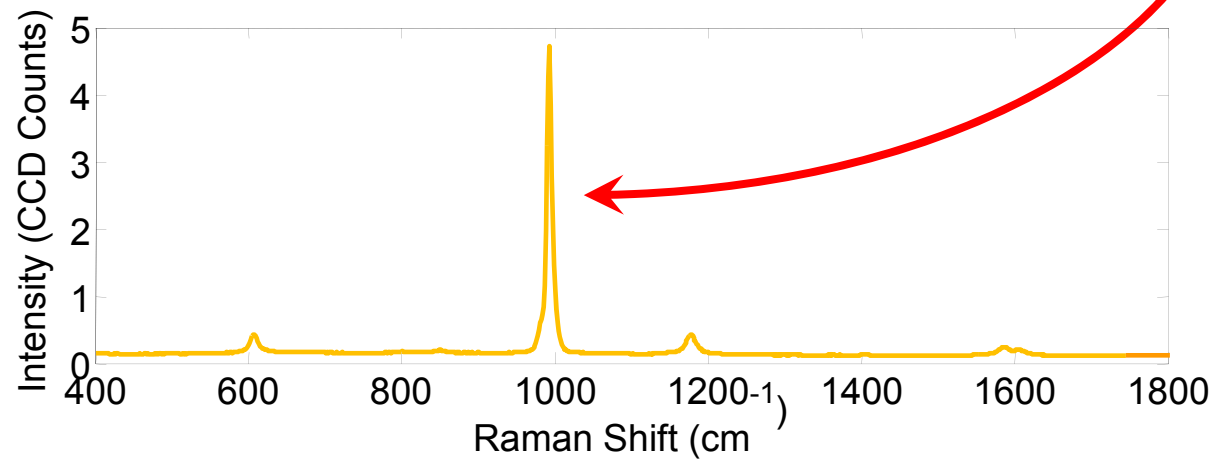
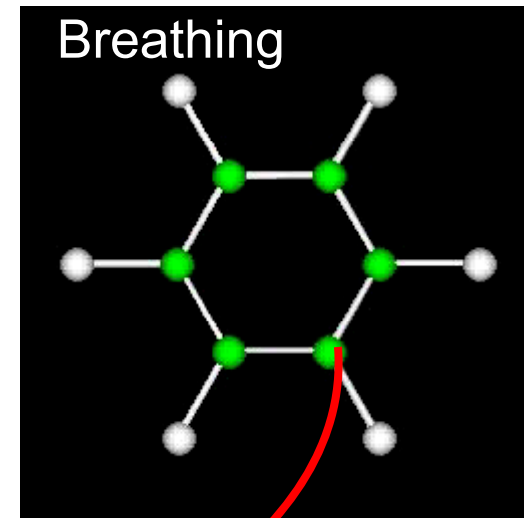
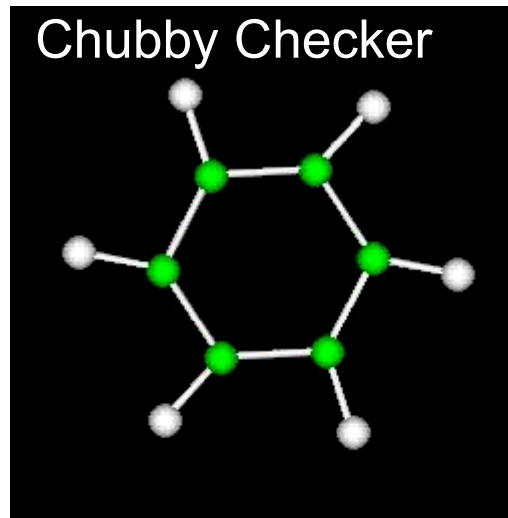
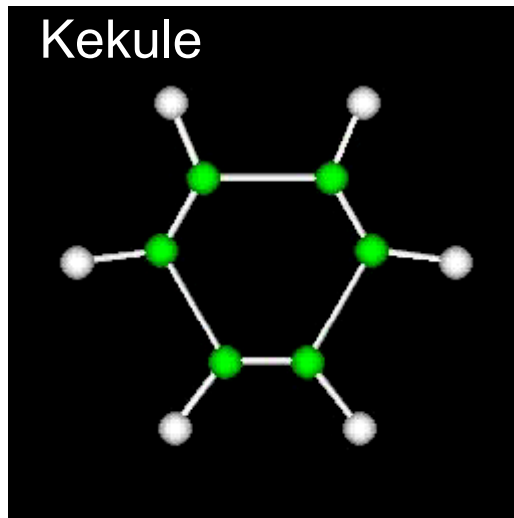
Ανελαστική Σκέδαση

- Ενέργεια μεταφέρεται από το προσπίπτον φως σε μοριακές δονήσεις
- Εκπομπή φωτός έχει μειωμένη ενέργεια ($\lambda_i < \lambda_R$)



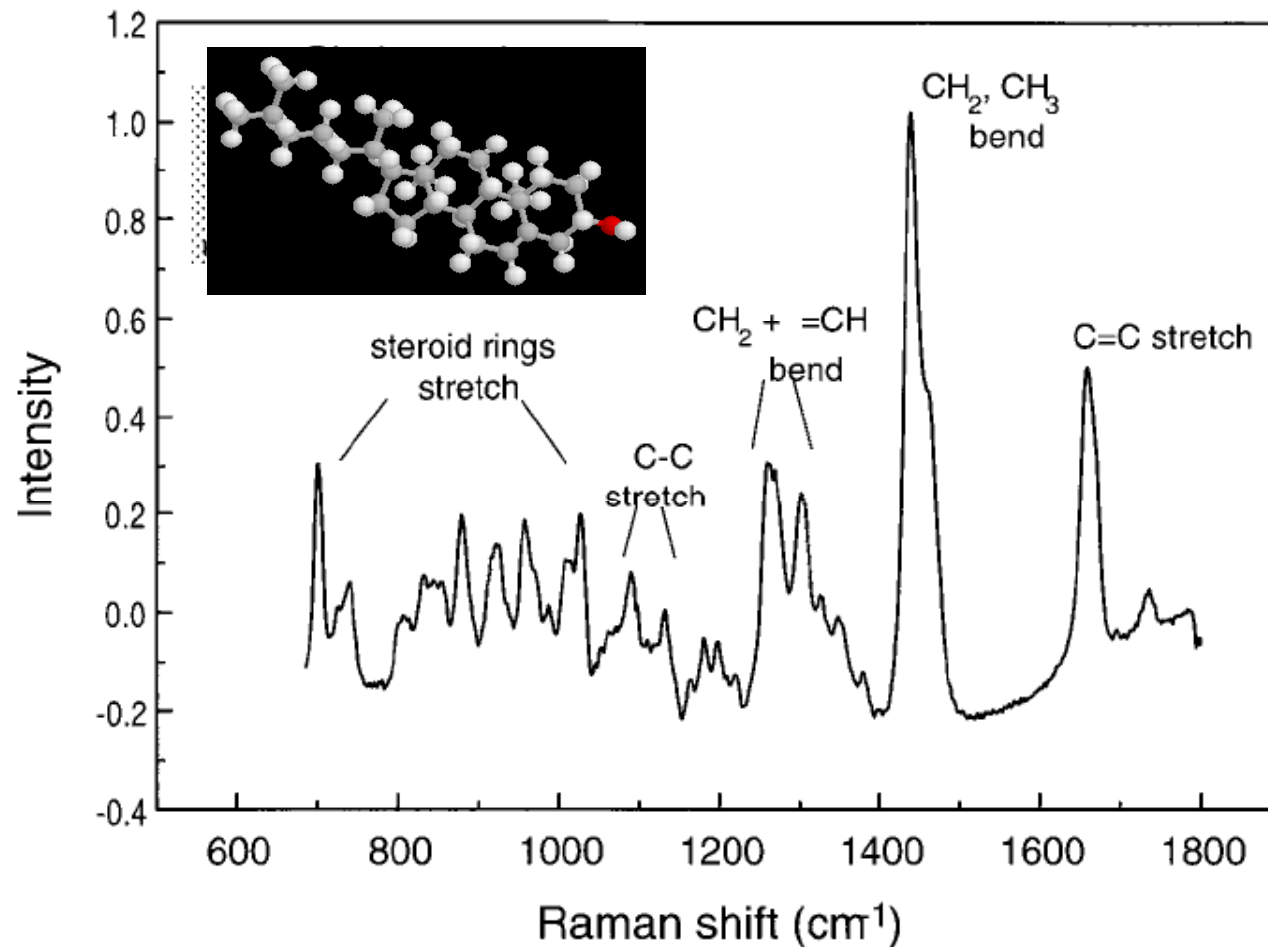


- Μερικές δονήσεις στο Βενζόλιο (Benzene)



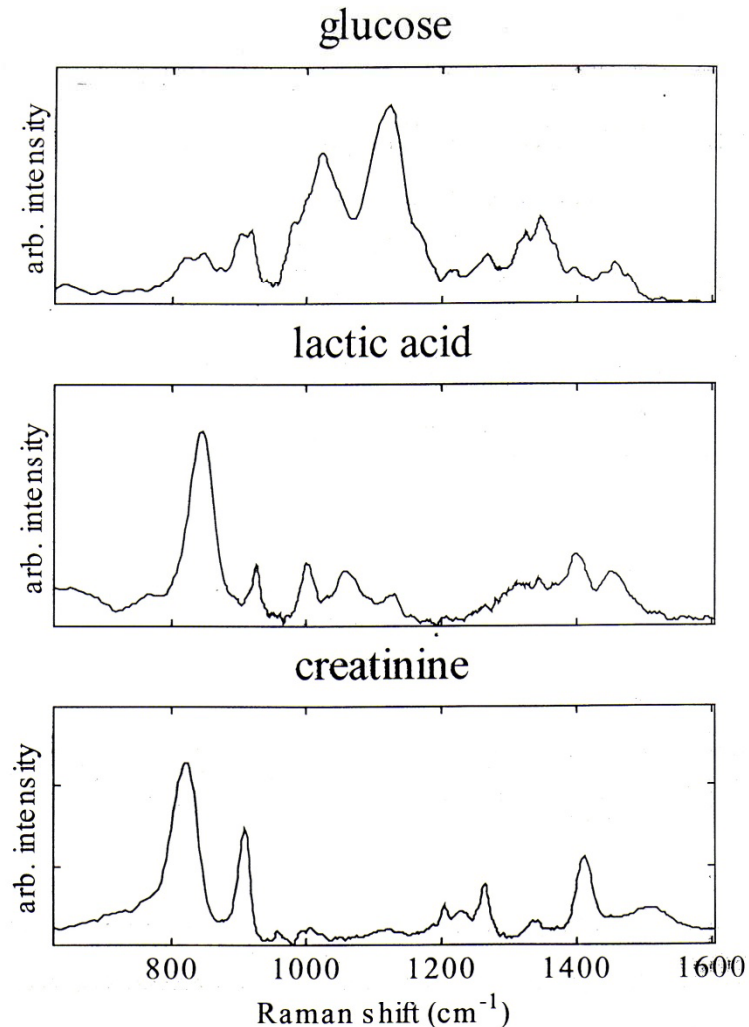


- Φάσμα Raman της Χοληστερίνης (Cholesterol)





- **Φάσματα Raman** → “**Δακτυλικό αποτύπωμα**” ενός μορίου
- **Τα φάσματα Raman**
 - Είναι χαρακτηριστικά του μορίου
 - Περιέχουν πληροφορίες για τα δονητικά επίπεδα του μορίου
 - Έχουν αιχμηρές κορυφές που επιτρέπουν την αναγνώριση ενός μορίου από το φάσμα του



Examples of analytes found in blood
which are quantifiable with Raman spectroscopy



Εξέλιξη της φασματοσκοπίας Raman

• 1928~1960

- Μικρή πειραματική πρόοδος

• 1960

- Εφεύρεση του λέιζερ
επεκτείνει το πεδίο
πειραματικών εφαρμογών

• 1980s: ραγδαία τεχνολογική πρόοδος

- Φασματοσκοπία
μετασχηματισμού Fourier
- Ανιχνευτές Charge Coupled
Device (CCD)
- Ολογραφικά και διηλεκτρικά
φίλτρα
- Λέιζερ υπέρυθρης (NIR)
εκπομπής

• Τέλος 1980s→1990s

- Βιοϊατρικές εφαρμογές
- Προηγμένοι φασματογράφοι

• 2000 →

- Εφαρμογές σε ζώντες
οργανισμούς (In vivo)
- Καθετήρες οπτικών ινών
- Μη-γραμμική (Non-linear)
φασματογραφία



- **Εφαρμογές της φασματογραφίας Raman**

- Δομική χημεία
- Μελέτη στερεάς κατάστασης
- Αναλυτική χημεία
- Εφαρμοσμένη ανάλυση υλικών
- Έλεγχος διαδικασιών
- Μικρο-φασματογραφία / απεικόνιση
- Παρακολούθηση του περιβάλλοντος
- Βιοϊατρική



Ιστορία των Βιολογικών Εφαρμογών Raman

- **1970:** Οι Lord και Yu καταγράφουν το πρώτο φάσμα από πρωτεΐνη λυσοζύμη (lysozyme) με λέιζερ HeNe
- **Εξέλιξη σε διέγερση NIR**
 - Μειωμένος φθορισμός, μεγαλύτερο βάθος διείσδυσης (mm)
- **1980s:**
 - FT Raman με Nd:YAG and ψυχόμενους ανιχνευτές InGaAs (μεγάλοι χρόνοι συλλογής (30 min))
 - Clarke (1987-1988): ορατή διέγερση του αρτηριακού υδροξυαπατίτη ασβεστίου και καρτενοειδών
- **1990s, πρόοδος σε:**
 - Λέιζερ, Ανιχνευτές, φασματόμετρα διασποράς, Φίλτρα
 - Χημειομετρία



- **Διαγνωστικά Πλεονεκτήματα της Φασματοσκοπίας Raman**

- Επιλογή μήκους κύματος (από υπεριώδες μέχρι IR)
- Δεν απαιτείται βιοψία
- Άμεση μέτρηση μορίων
 - μικρές συγκεντρώσεις
 - χημική σύνθεση
 - μορφολογική ανάλυση
- Ποσοτική ανάλυση
- In vivo διάγνωση



- **Αλληλεπίδραση ηλεκτρικών πεδίων προσπίπτοντος φωτονίου και μορίου**

- Το ηλεκτρικό πεδίο ταλαντώνεται σε συχνότητα f_i :

$$E_i = E_0 \cos(2\pi f_i t)$$

- Προκαλεί μοριακό ηλεκτρικό δίπολο (p):

$$\vec{p} = \alpha \vec{E}$$

- Ανάλογο με τη μοριακή πολωσιμότητα, α
 - ευκολία με την οποία το ηλεκτρόνιο νέφος γύρω από ένα μόριο μπορεί να παραμορφωθεί
- Η πόλωση προκαλεί πυρηνική μετατόπιση
$$q = q_0 \cos(2\pi \nu_R t)$$

Κλασσική Φυσική Raman



- Για μικρές παραμορφώσεις, η πολωσιμότητα είναι γραμμικά ανάλογη προς τη μετατόπιση

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 + \dots$$

- **Αποτέλεσμα το δίπολο:** Rayleigh Scattering

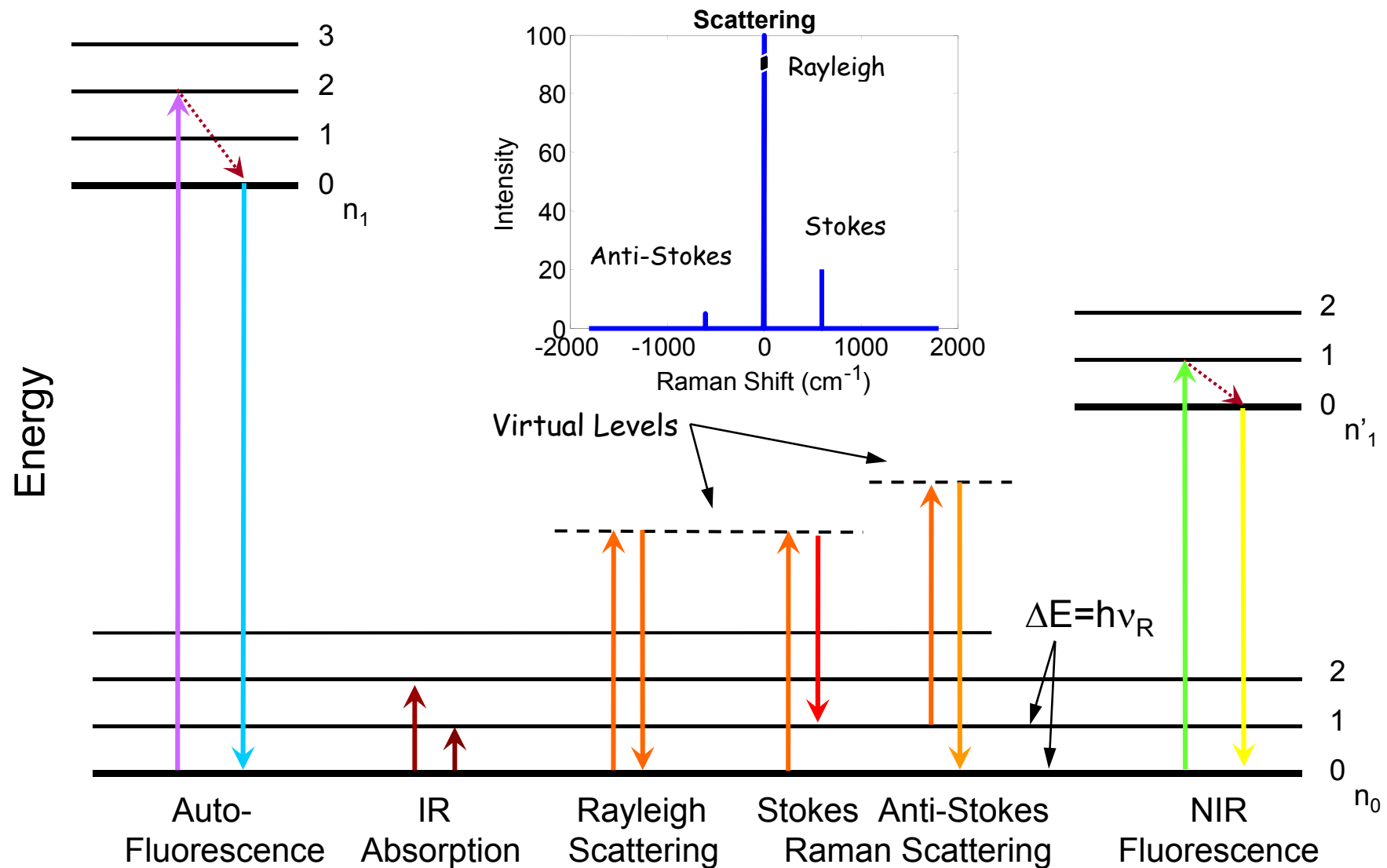
$$\vec{p} = \alpha \vec{E} = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_i t) +$$

$$\frac{1}{2} E_0 q_0 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 \left\{ \cos[2\pi(\nu_i + \nu_R)t] + \cos[2\pi(\nu_i - \nu_R)t] \right\}$$

Anti-Stokes Raman

Stokes Raman

Φωτο-μοριακή Αλληλεπίδραση



Χαρακτηριστικά της Σκέδασης Raman



- Όπως και άλλα σκεδαστικά φαινόμενα, παρουσιάζεται υπό μορφή διατομής (cross-section, σ [cm²]), ή πιθανότητας σκέδασης:

$$I = I_0 \sigma \rho l$$

- ρ : συγκέντρωση των μορίων, l : μήκος διαδρομής (pathlength)
- **Πολύ αδύναμο φαινόμενο**
 - Μόνο **1 στα 10⁷** φωτόνια σκεδάζεται με Raman
 - Ελαστική σκέδαση NIR σε ιστούς: $1/\mu'_s \approx 1mm$
 - Απορρόφηση NIR σε ιστούς: $1/\mu_a \approx 10cm$
 - Απορρόφηση Κόκκινου σε ιστούς ή νερό: $1/\mu_a \approx 5m$
 - Σκέδαση Raman σε ιστούς ή νερό: $1/\mu_R \approx 3km$
- **Πραγματική σκεδαστική διαδικασία**
 - Η εικονική κατάσταση (virtual state) είναι μια βραχύβια παραμόρφωση του νέφους ηλεκτρονίων που δημιουργεί μοριακές δονήσεις
 - $\tau < 10^{-14}$ s
- **Οι ισχυροί σκεδαστές Raman έχουν διανεμημένα σύννεφα ηλεκτρονίων**
 - C=C
 - π -bonds



- Οι φασματοσκοπικές συχνότητες αναφέρονται σε κυματαριθμούς [cm^{-1}], ανάλογους με την ενέργεια μεταπτώσεως:

$$\tilde{\nu} = \frac{E}{hc} = \frac{f}{c} = \frac{1}{\lambda}$$

$$\boxed{\begin{array}{l} E = hf \\ c = \lambda f \end{array}}$$

- Οι συχνότητες Raman είναι ανεξάρτητες από το μήκος κύματος διέγερσης μια και αναφέρονται ως σχετική διαφορά ενέργειας
 - Κυματαριθμοί σε σχέση με τη διέγερση:

$$\tilde{\nu}_R = \frac{1}{\lambda_i} - \frac{1}{\lambda_R} \quad \delta\lambda = \delta\nu\lambda_0^2$$



- **Παράδειγμα**

- Διέγερση NIR στα 830 nm: $12,048 \text{ cm}^{-1}$
- Τυπική μετατόπιση Raman: $\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$
 - $\lambda_R = 905 \text{ nm}$
- Πλάτος γραμμής από Raman βιολογικών μορίων
 $\sim 10 \text{ cm}^{-1}$ FWHM
 - $\delta\lambda_R = 0.69 \text{ nm}$

UV, Ορατή, και NIR Διέγερση



- **Επιλογή Μήκους Κύματος**

- Τα σήματα Raman έχουν σταθερή μετατόπιση $\rightarrow$ μπορούμε να μεταβάλουμε το μήκος κύματος διέγερσης και να πάρουμε τις ίδιες πληροφορίες

- **UV**

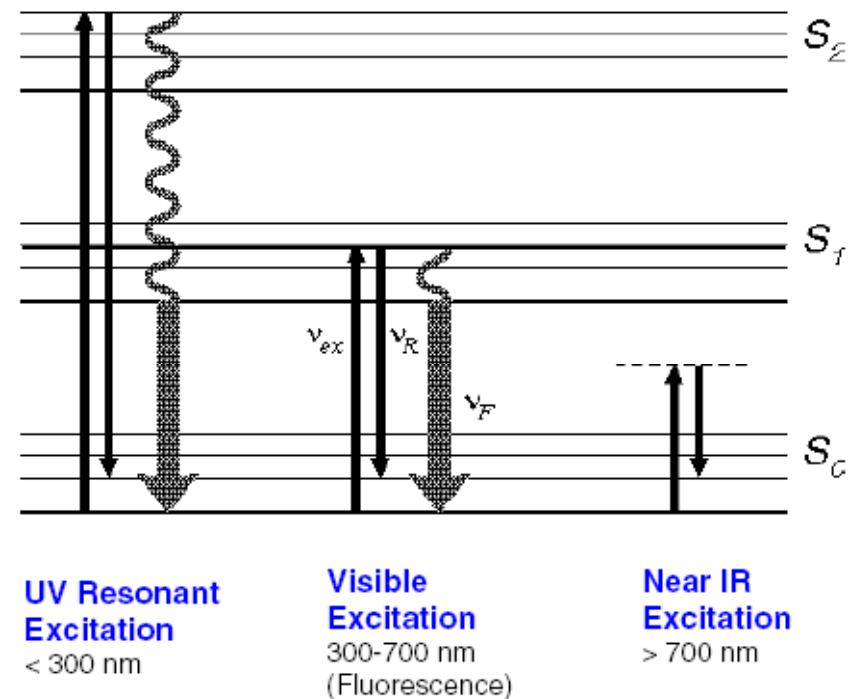
- + Ενίσχυση από συντονισμό (Resonance)
- + $\lambda_R < \lambda_F \rightarrow$ ο φθορισμός μπορεί να φιλτραριστεί
- - φωτο-βλάβες, μικρή διείσδυση

- **Ορατό**

- + Raman $\propto \lambda^{-4} \rightarrow \uparrow I_R$ vs. IR
- - ο φθορισμός επικαλύπτει το Raman

- **NIR:**

- + Χαμηλότερος φθορισμός
- + Μεγαλύτερη διείσδυση
- - Raman $\propto \lambda^{-4} \rightarrow \downarrow I_R$ vs. Vis



UV, Ορατή, και NIR Διέγερση



Εφαρμογές

• UVRR

- Βιολογικά μακρομόρια: νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, λιπίδια
- Οργανίδια, κύτταρα, μικροοργανισμούς, βακτηρίδια, νευροτοξίνες, φυτοπλαγκτόν, ιοί
- Κλινικά περιορισμένη: **φωτομεταλλαξιογόνο**

• Ορατή

- Κύτταρα (ελάχιστος φθορισμός)
- DNA στα χρωμοσώματα, χρωστικές ουσίες σε κοκκιοκύτταρα και λεμφοκύτταρα, ερυθρά αιμοσφαίρια, ηπατοκύτταρα
- Πρώτη μελέτες σε αρτηρία: υδροξυαπατίτης και καροτενοειδή (Clarke 1987, 1988)

• NIR

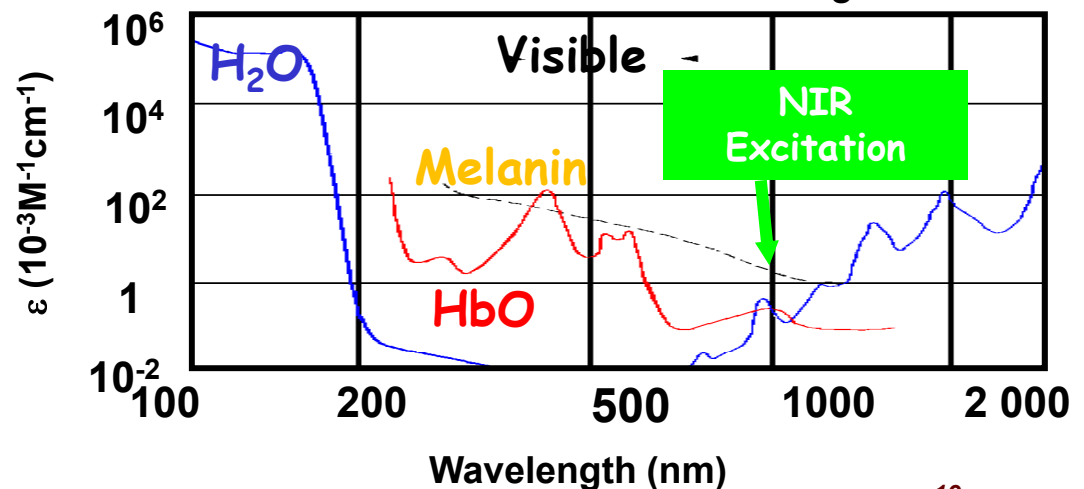
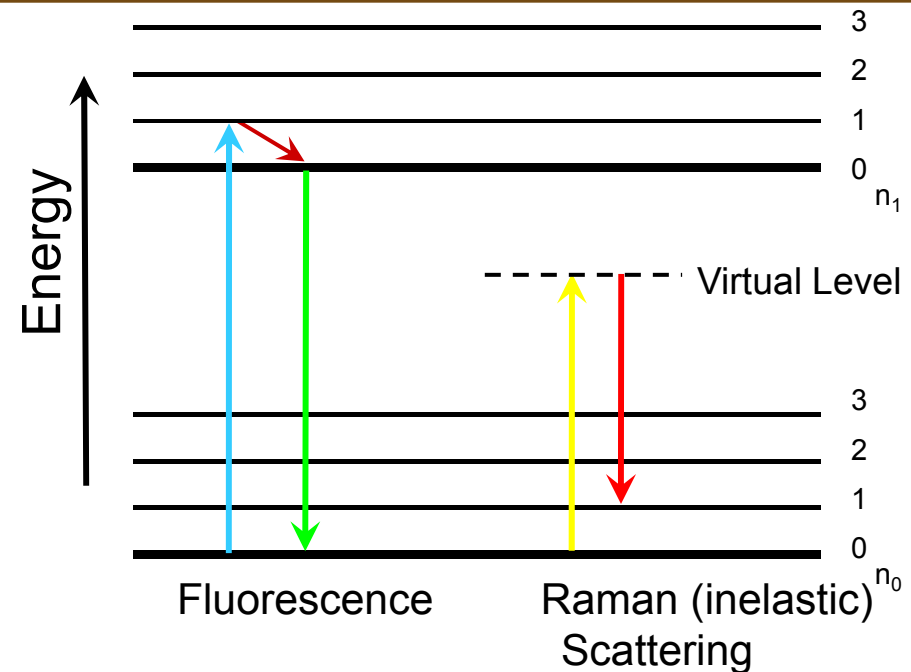
- Hirschfeld & Chase, 1986: FT-Raman
- Ιστοί: αρτηρία, τράχηλος της μήτρας, δέρμα, μαστός, αίμα, γαστρεντερικοί, οισοφάγος, όγκοι του εγκεφάλου, νόσος Alzheimer, προστάτης, οστά

UV, Ορατή, και NIR Διέγερση



- **Φασματοσκοπικά Πλεονεκτήματα της NIR Raman**

- Στενές ζώνες δόνησης, συγκεκριμένες χημικά και πλούσιες σε πληροφορίες
- Ευελιξία στην επιλογή μήκους κύματος διέγερσης
 - Ελαχιστοποίηση του ανεπιθύμητου φθορισμού των ιστών
 - Βελτιστοποίηση βάθους δειγματοληψίας
 - Χρήση τεχνολογίας CCD

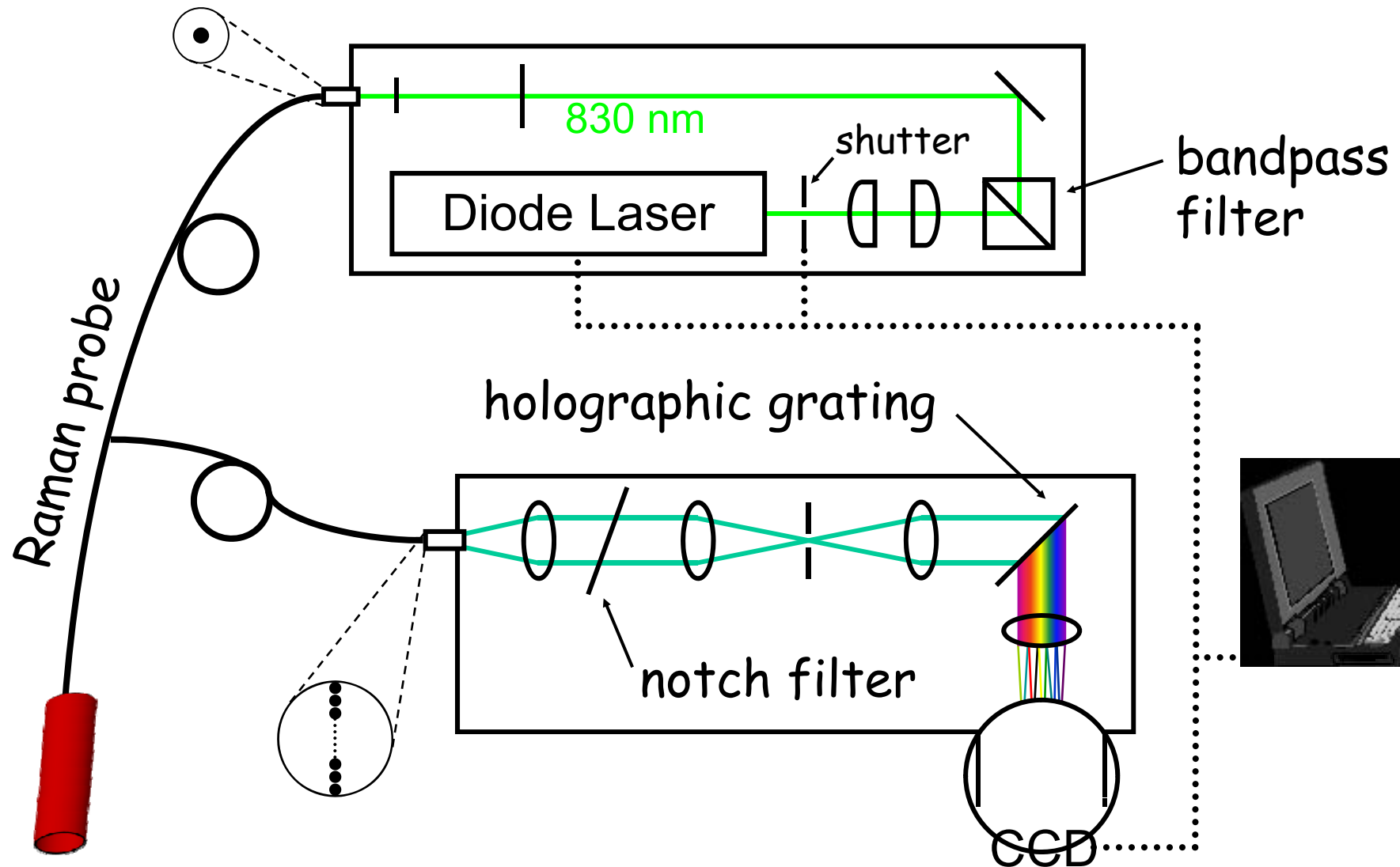


Τρέχουσα Τεχνολογία Raman



- **Λέιζερ Διόδων (Laser diodes)**
 - Συνεπτυγμένο μέγεθος (Compact), Σταθερές λεπτές γραμμές, NIR
- **Φασματογράφοι ψηλής απόδοσης (f/1.8)**
- **Ολογραφικά Στοιχεία**
 - Ζωνοπερατά (Bandpass) φίλτρα (αφαιρούν αυτογενείς (spontaneous) εκπομπές του υλικού του λέιζερ)
 - Φίλτρα αποκοπής (Notch) (10^6 απόρριψη του λέιζερ με Rayleigh σκέδαση)
 - Πλέγματα μετάδοσης με μεγάλη επιφάνεια και ψηλή απόδοση
- **Ανιχνευτές CCD**
 - Ψηλή κβαντική απόδοση (QE)
 - Χαμηλός θόρυβος (ψύξη με LN_2)
 - Ανίχνευση πολλαπλών καναλιών
- **Καθετήρες οπτικών ινών ψηλής απόδοσης με φίλτρα**
- **Τα συστήματα NIR FT και PMT δεν χρησιμοποιούνται πια**

Κλινικά Συστήματα Raman

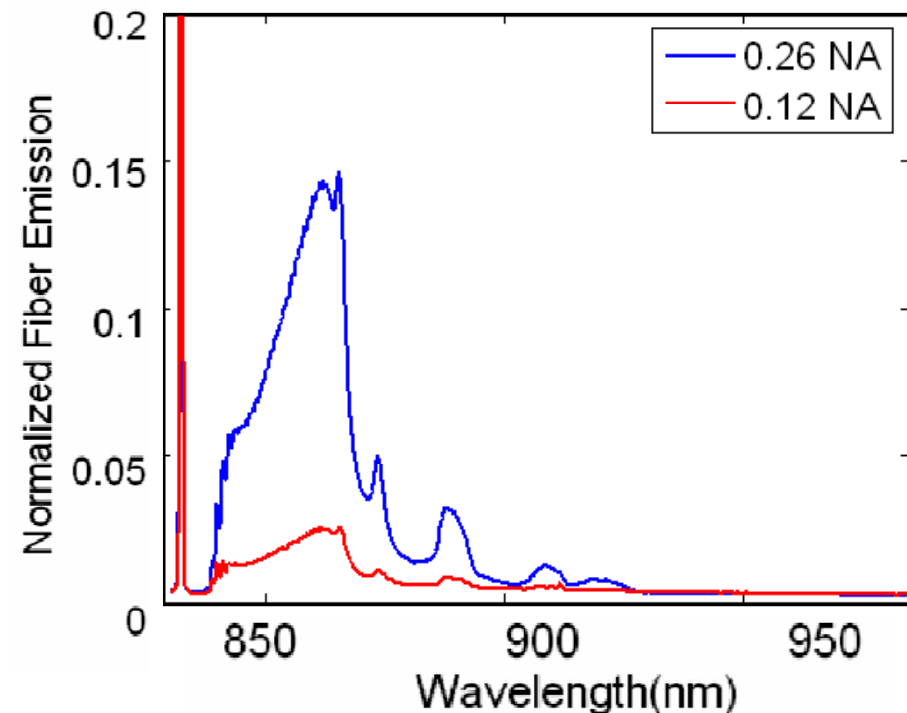




Πρόβλημα

- **Εκπομπή από τις Οπτικές Ίνες**
 - Αλλοιώνει το σήμα
 - Προσθέτει θόρυβο βολής (shot-noise)
- **Χαμηλή συλλογή σήματος**
 - Το φαινόμενο Raman είναι αδύνατο
 - Οι ιστοί σκεδάζουν πολύ

Fiber background $\propto \text{NA}^2$



Καθετήρες Raman με Οπτικές Ίνες

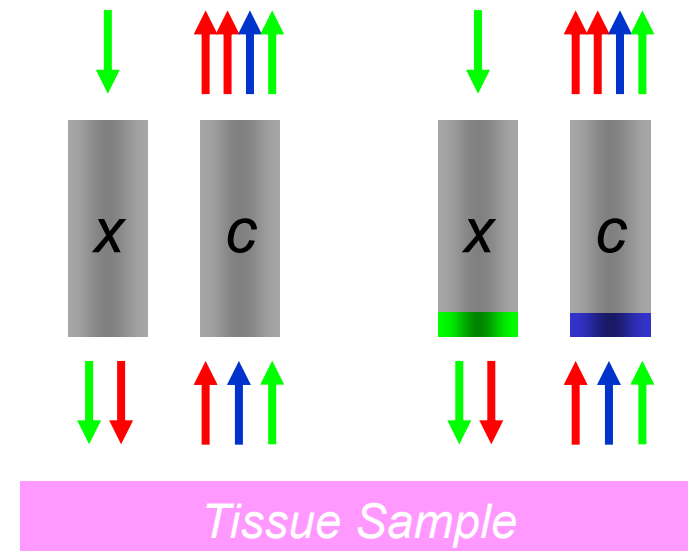


- Μείωση της εκπομπής από τις ίνες
 - Εκπομπή εξίσου στις ίνες διέγερσης και συλλογής
 - Λέιζερ διέγερσης → Σκέδαση Raman από τους ιστούς
 - Σκέδαση Raman από ίνα, μεταφέρεται από την ίνα διέγερσης*
 - Σκέδαση Raman από την ίνα σκεδάζεται ελαστικά από τον ιστό (και συλλέγεται από την ίνα συλλογής)
 - Λέιζερ διέγερσης σκεδάζεται ελαστικά (και συλλέγεται από την ίνα συλλογής)
 - Σκέδαση Raman από την ίνα συλλογής*

$$^* \propto NA^2$$

— Excitation laser
— Tissue Raman
— Fiber background

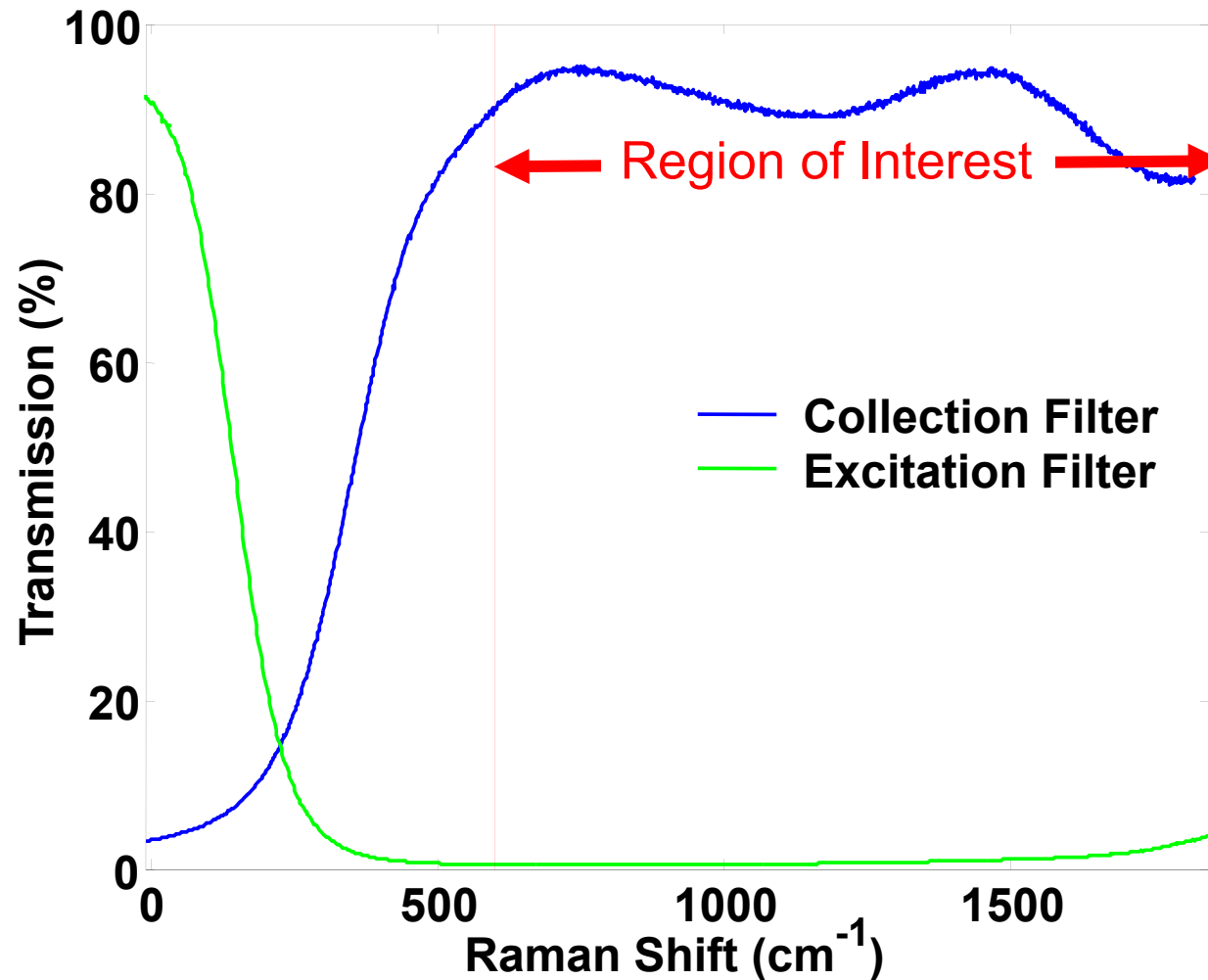
From McCreery RL
“Raman Spectroscopy for Chemical Analysis,” 2000.



Καθετήρες Raman με Οπτικές Ίνες



- Μετάδοση Φίλτρων





Πρόβλημα

- **Εκπομπή από τις Οπτικές Ίνες**
 - Αλλοιώνει το σήμα
 - Προσθέτει θόρυβο βολής (shot-noise)
- **Χαμηλή συλλογή σήματος**
 - Το φαινόμενο Raman είναι αδύνατο
 - Οι ιστοί σκεδάζουν πολύ

• Λύσεις

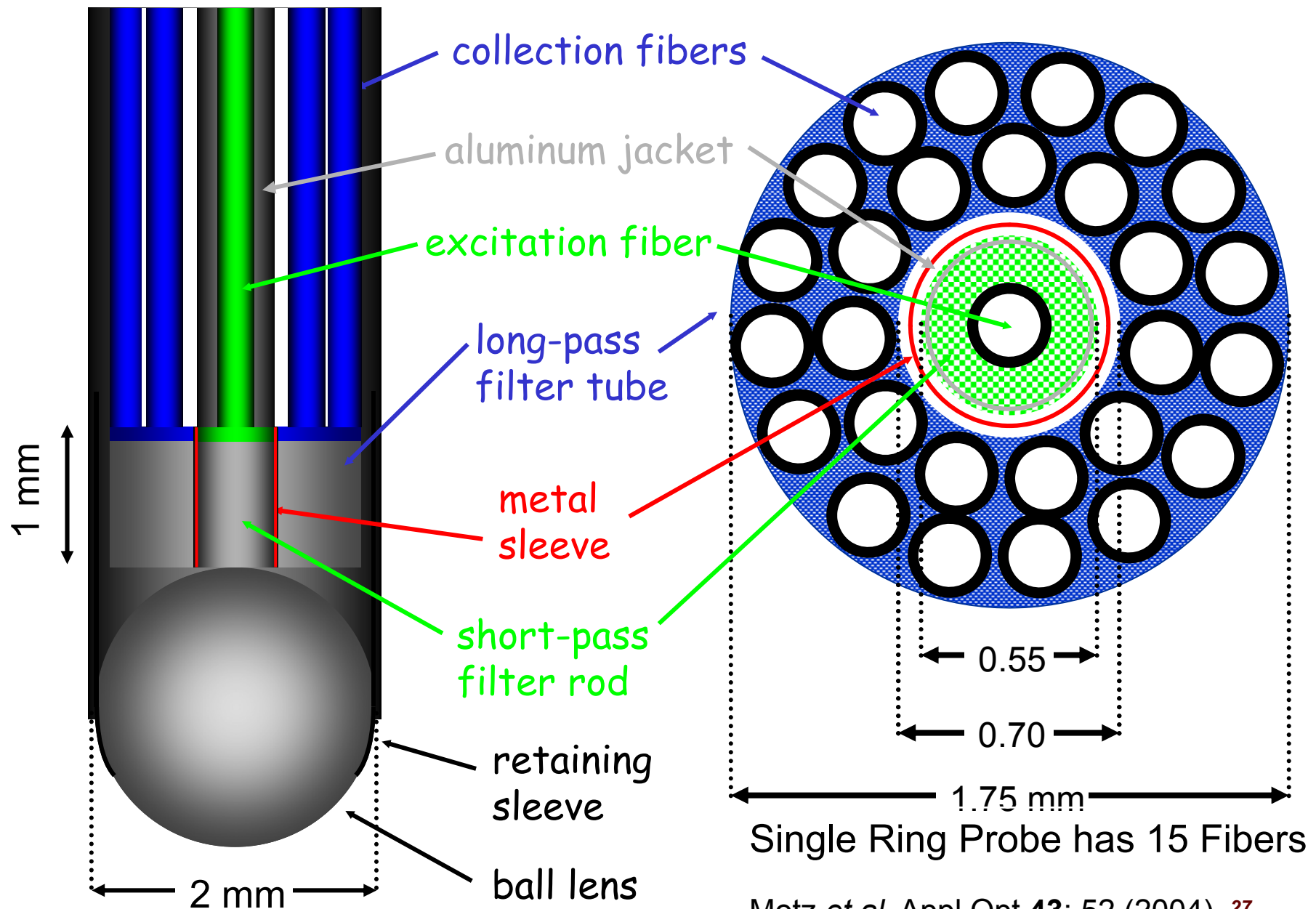
- **Μικρο-οπτικά φίλτρα**
 - βραχυ-περατό φίλτρο διέγερσης
 - Μακρυ-περατό φίλτρο συλλογής
- **Βελτιστοποίηση της οπτικής διάταξης**
 - Χαρακτηρισμός της κατανομής του φωτός Raman στους ιστούς
 - Καθορισμός βέλτιστης γεωμετρίας
 - Σχεδιασμός οπτικής συλλογής



Στόχοι Σχεδιασμού

- **Περιορισμένη γεωμετρία για κλινική χρήση**
 - Σύνολο διαμέτρου ~ 2 χιλιοστά για πρόσβαση σε στεφανιαίες αρτηρίες
 - Εύκαμπτος
 - Ικανός να αντέχει αποστείρωση
- **Σχεδιασμένος να λειτουργεί με 830 nm διέγερση**
- **Ψηλής απόδοσης**
 - Συσσώρευσης δεδομένων σε 1 ή 2 δευτερόλεπτα
 - Ασφαλή επίπεδα ισχύος
 - SNR παρόμοια με εργαστηριακά συστήματα Raman
 - Ακριβής εφαρμογή μοντέλων

Καθετήρες Raman με Οπτικές Ίνες



Καρδιαγγειακές Παθήσεις



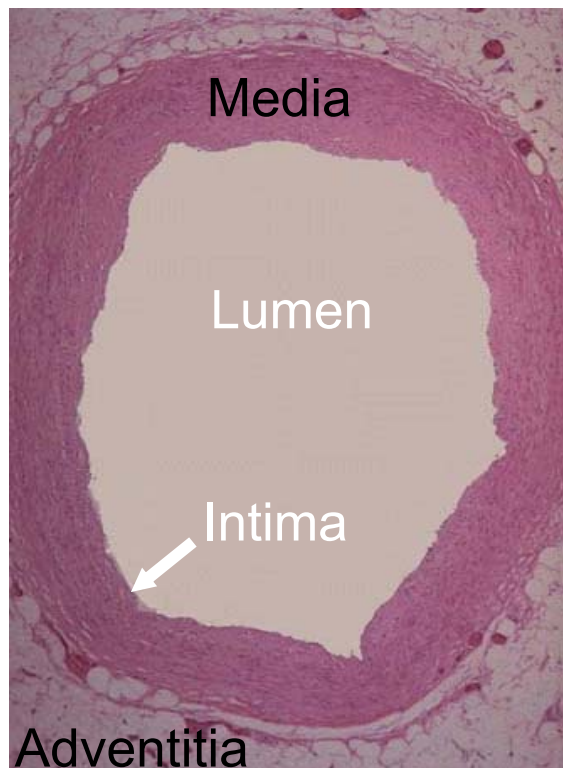
- **Η επιβάρυνση από τις καρδιαγγειακές παθήσεις †**
 - 71.300.000 άνθρωποι στις Ηνωμένες Πολιτείες πάσχουν από ΚΑΠ
 - 910.600 θάνατοι ετησίως
 - 1 στους 2,7 θανάτους
- **Στεφανιαία νόσος στοιχίζει 653.000 ζωές ετησίως**
 - 1 στους 5 θανάτους
 - Οικονομικό κόστος: μεγαλύτερο από 142,5 δισ. δολάρια

Καρδιαγγειακές Παθήσεις

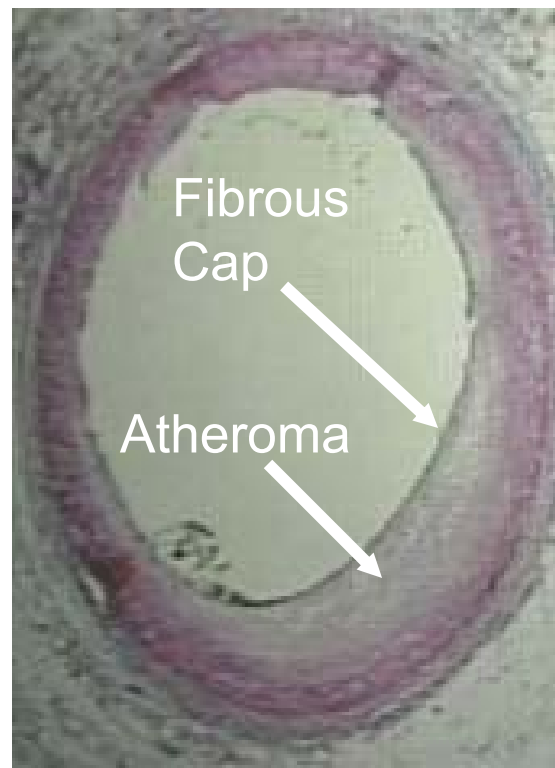


• Ανατομία της αρτηρίας

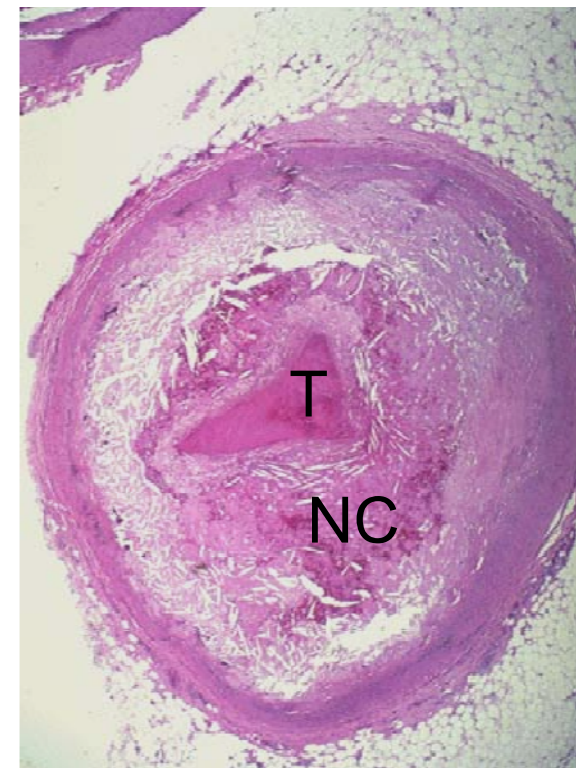
Normal



Mildly Atherosclerotic Plaque



Ruptured Plaque



T: thrombus
NC: necrotic core



- **Μερικές Τρέχουσες Προκλήσεις στην Καρδιολογία**

- Αξιολόγηση και ανάπτυξη θεραπευτικών μεθόδων
- Αιτιολογία της αθηροσκλήρωσης
- Μηχανισμοί της εκ νέου στένωσης
 - Μετά την αγγειοπλαστική
 - Αγγειοπάθεια μεταμοσχεύσεων
- Ανίχνευση των ευάλωτων αθηρωματικών πλακών
 - Πρόβλεψη / πρόληψη των καρδιακών επεισοδίων

Καρδιαγγειακές Παθήσεις



Ευάλωτες αθηρωματικές πλάκες

- Ευθύνονται για την πλειοψηφία του αιφνίδιου καρδιακού θανάτου
- Συχνά συμβαίνουν σε κλινικά ασυμπτωματικά αγγεία
 - <50% στένωση
- Δεν υπάρχουν αποτελεσματικές θεραπείες
- Χαρακτηρίζονται από:
 - Βιοχημικές μεταβολές
 - Αφροκύτταρα (Foam cells)
 - Συσώρευση λιπιδίων (Lipid pool)
 - Φλεγμονώδη κύτταρα
 - Λεπτό ινώδες κάλυμμα (<65 μm)
- Σήμερα είναι μη ανιχνεύσιμα



Συνήθεις διαγνωστικές τεχνικές

- **Αγγειογραφία**

- Σοβαρότητα της στένωσης, θρόμβωση, πυκνή ασβεστοποίηση
- Δεν παρέχει βιοχημικές πληροφορίες

- **Αγγειοσκοπία (Angioscopy)**

- Χαρακτηριστικά της επιφάνειας της πλάκας, συμπεριλαμβανομένου του χρώματος
- Δεν υπάρχουν πληροφορίες των υπο-επιφανειακών χαρακτηριστικών

- **Ιστοπαθολογία**

- Βιοχημικές και μορφολογικές πληροφορίες
- Απαιτεί εκτομή ιστού



• Νέες διαγνωστικές ΤΕΧΝΙΚΕΣ

- Μαγνητική τομογραφία
- Εξωτερικό υπερηχογράφημα
- Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων
- Υπολογιστική τομογραφία δέσμης ηλεκτρονίων
- Θερμογραφία
- Ελαστογραφία

Μη-Επεμβατικές

- Ενδο-αγγειακό υπερηχογράφημα
 - Μικροδομή (100 μm)
- Οπτική τομογραφία συνοχής
 - Μικροδομή (10 μm)
- Φασματοσκοπία φθορισμού
 - Περιορισμένες χημικές πληροφορίες
 - Πλατιά φασματικά χαρακτηριστικά
- Φασματοσκοπία Raman
 - Ποσοτικά στοιχεία βιοχημικών
 - Μορφολογική ανάλυση

Καρδιαγγειακές Παθήσεις



- Φάσματα Raman παθολογικής αθηροσκλήρωσης



calcified plaque



lipid-rich plaque



normal artery

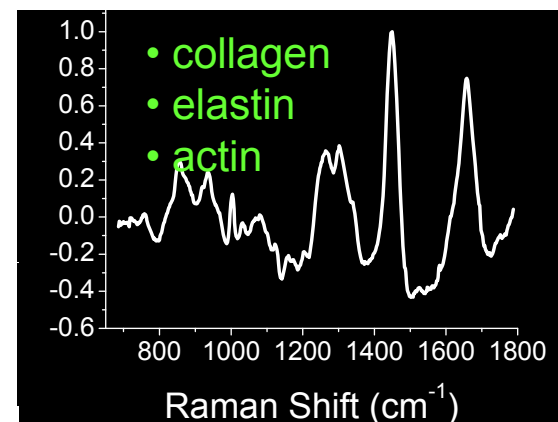
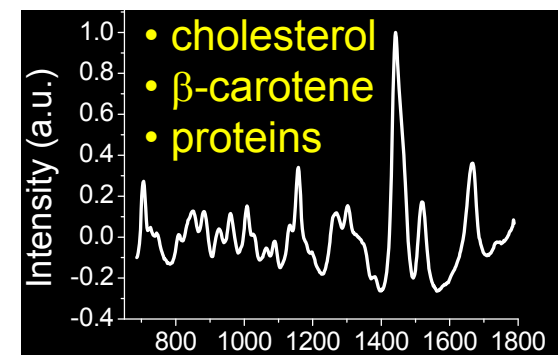
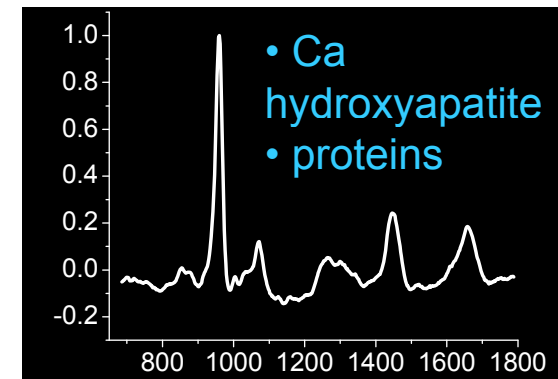
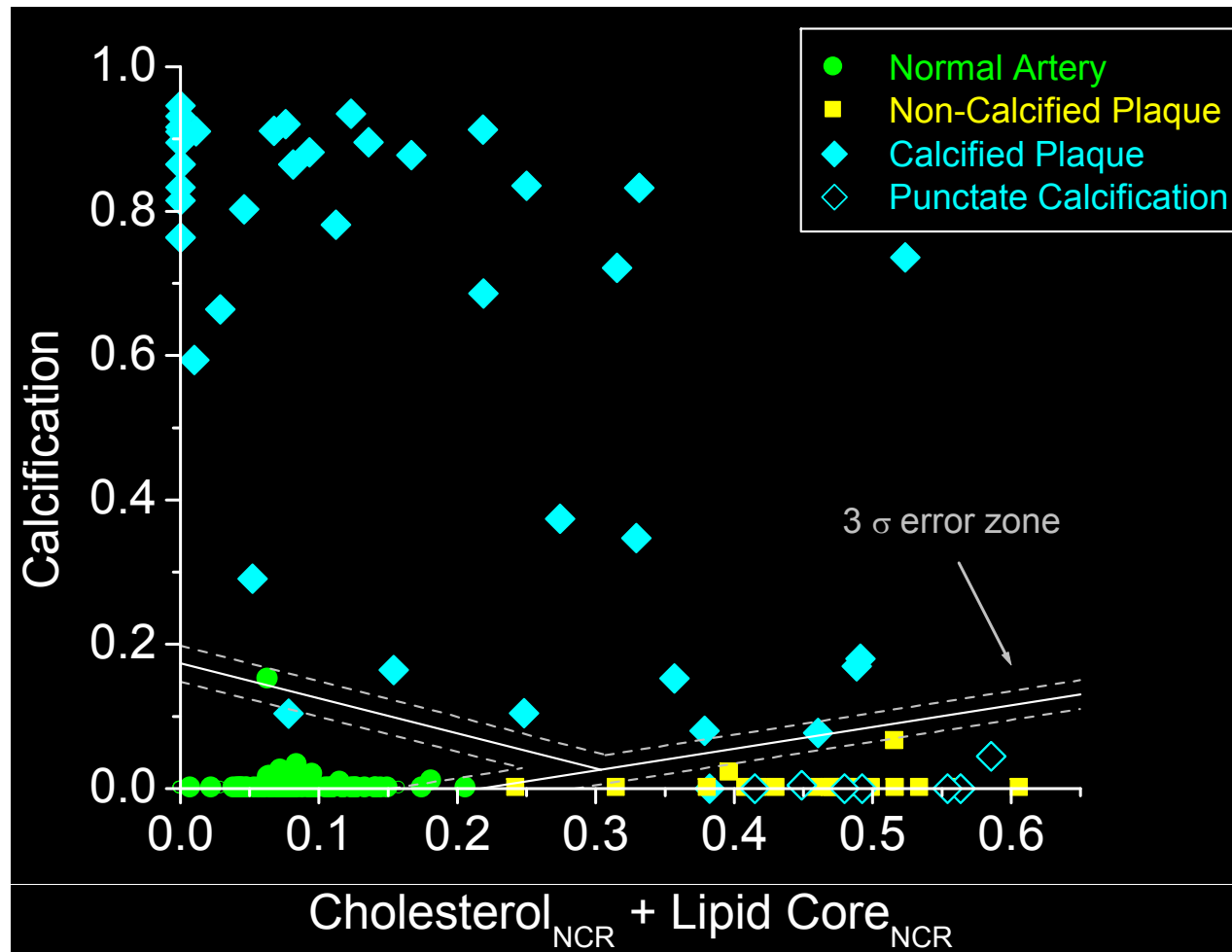


Image from medstat.med.utah.edu/WebPath/webpath.html

Καρδιαγγειακές Παθήσεις



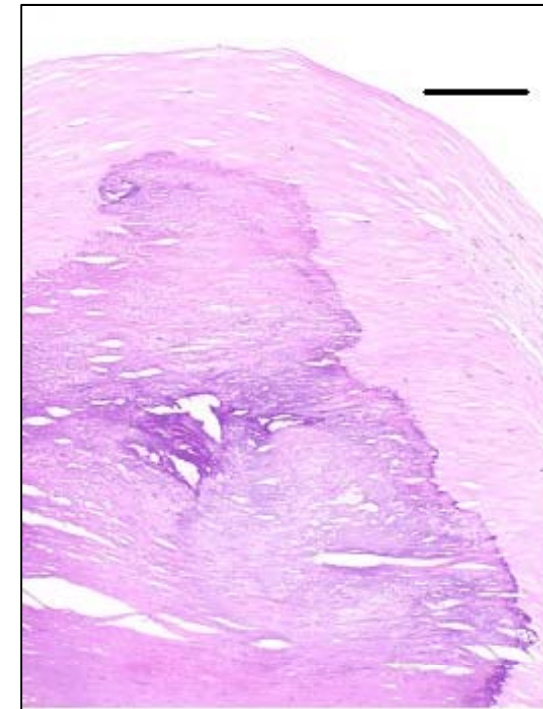
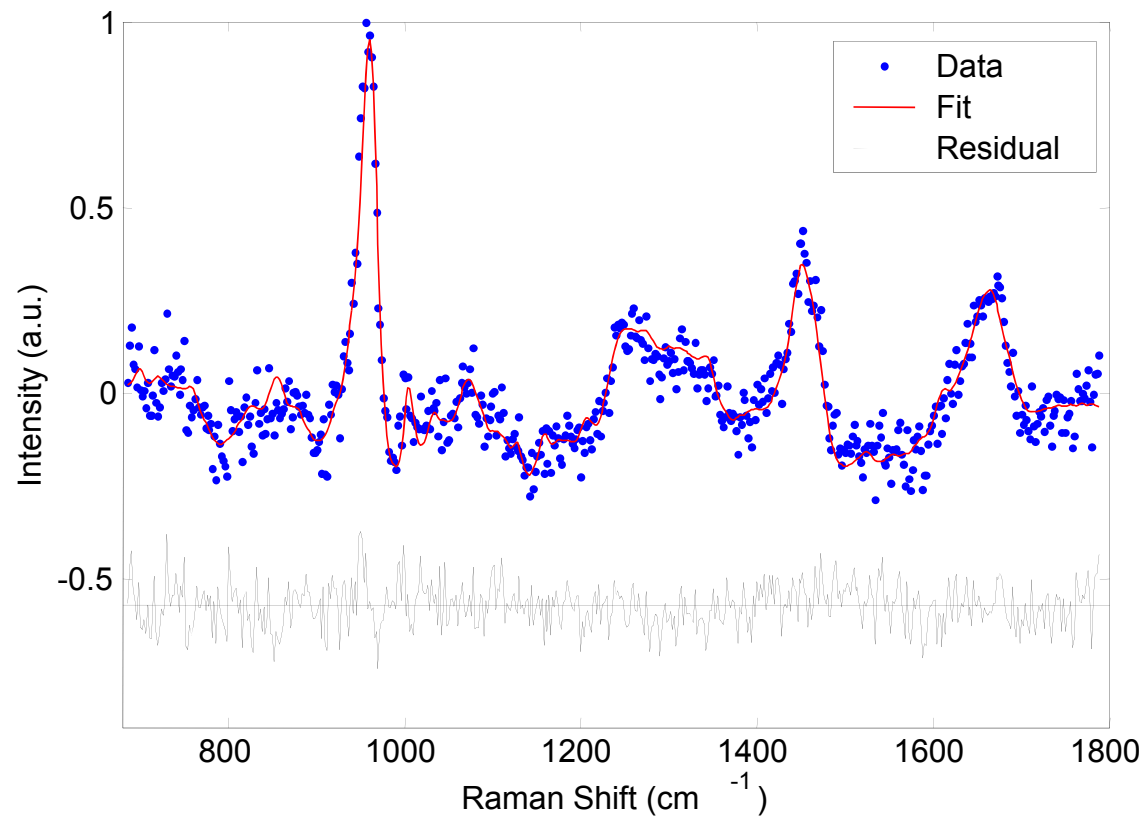
- Ασβέστωση στη Στεφανιαία Νόσο: Μια προγνωστική (Prospective) Μελέτη



Καρδιαγγειακές Παθήσεις



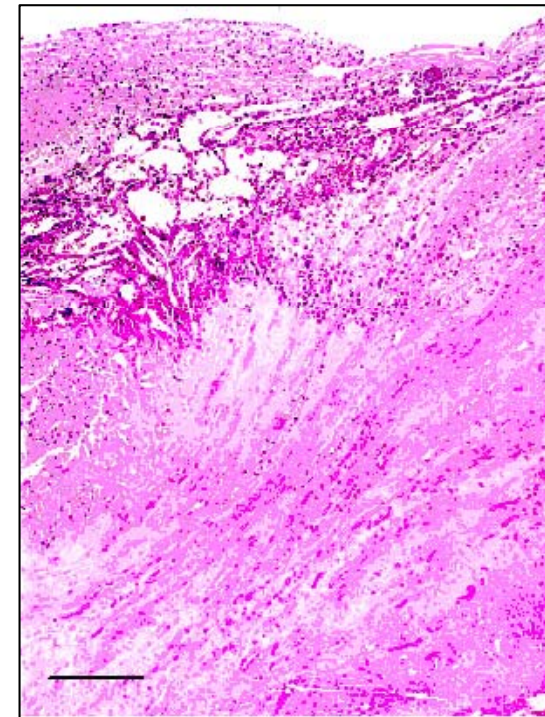
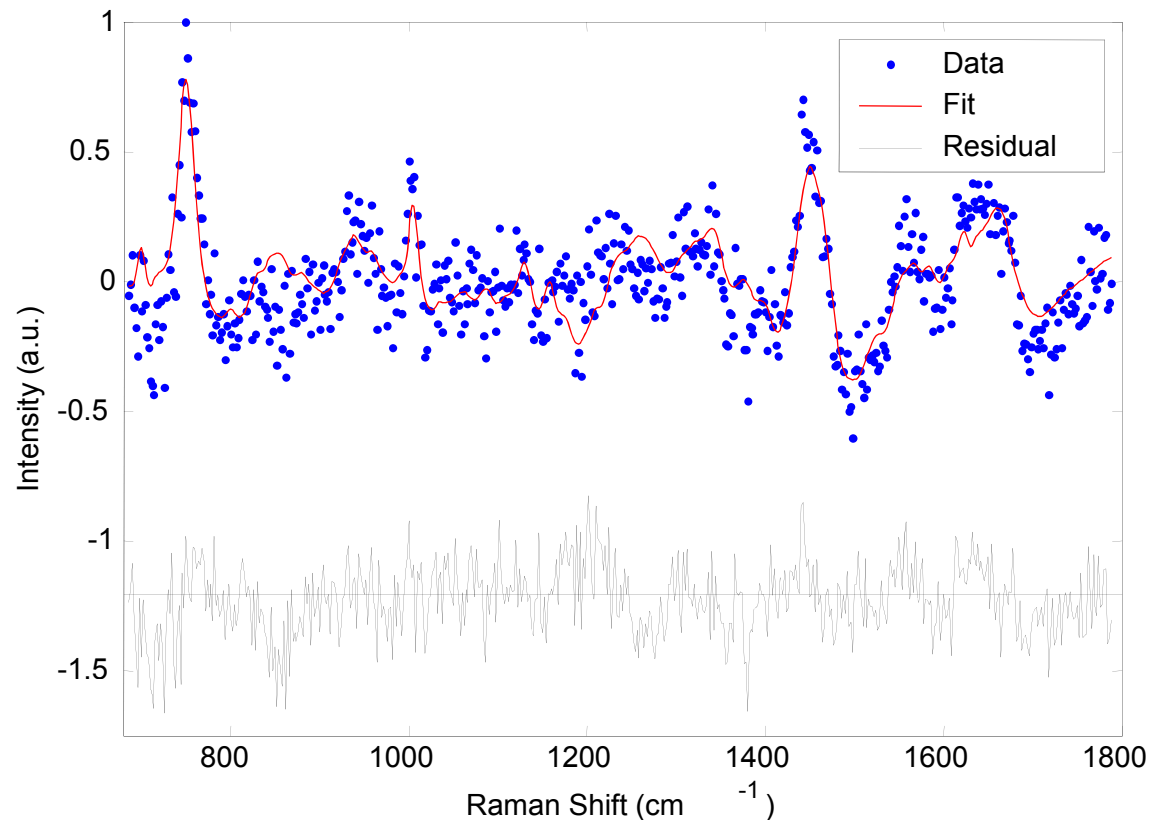
- In Vivo Κλινικά Δεδομένα: Ασβεστωμένη (Calcified) πλάκα



Καρδιαγγειακές Παθήσεις



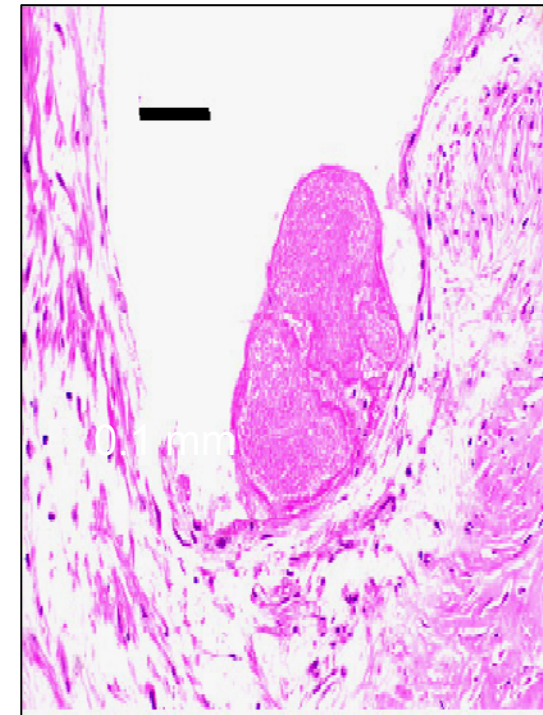
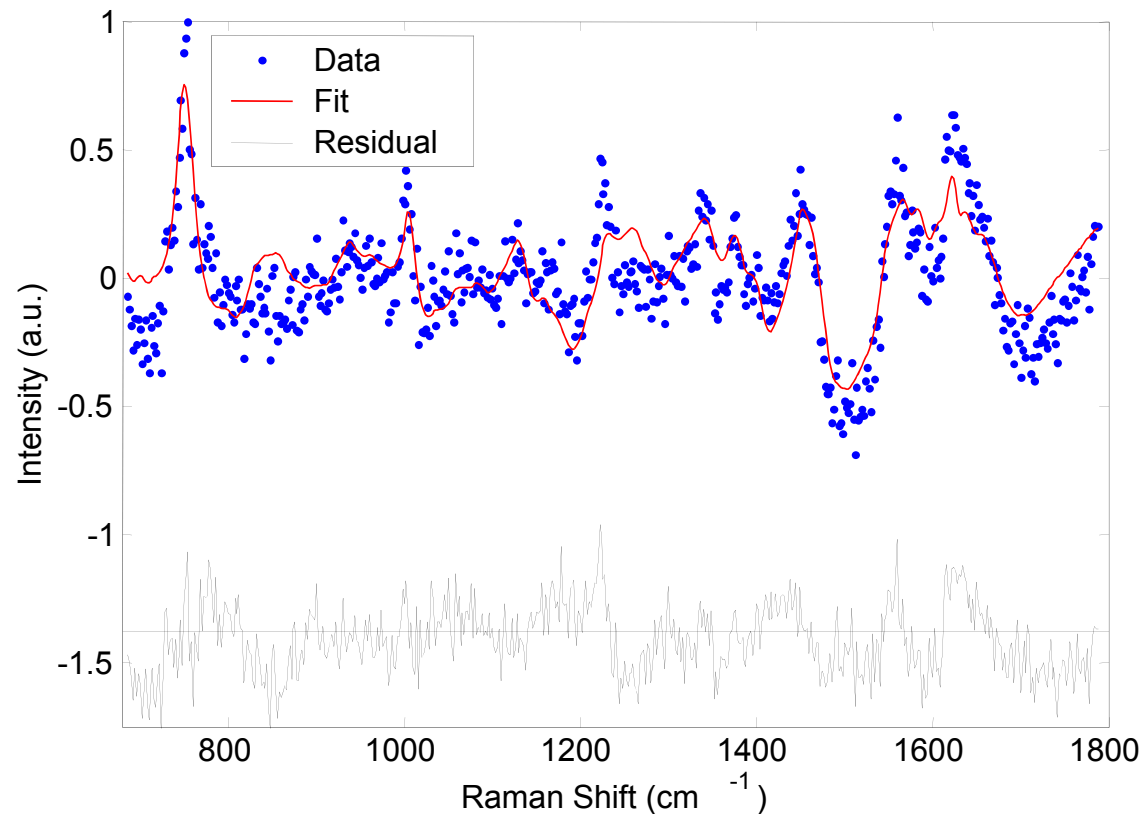
- In Vivo Κλινικά Δεδομένα: Ρήξη (Rupture) πλάκας



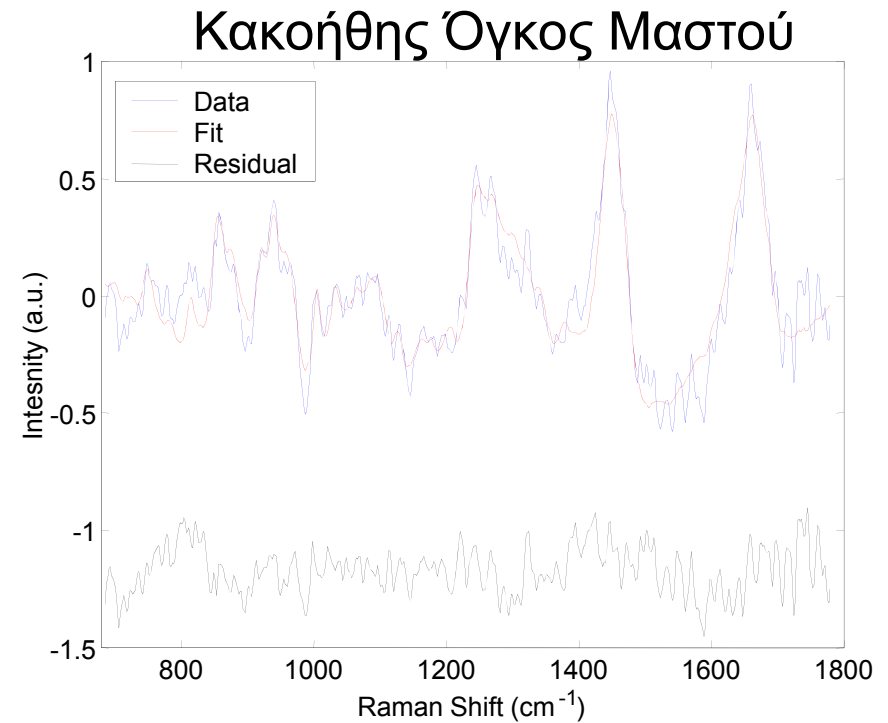
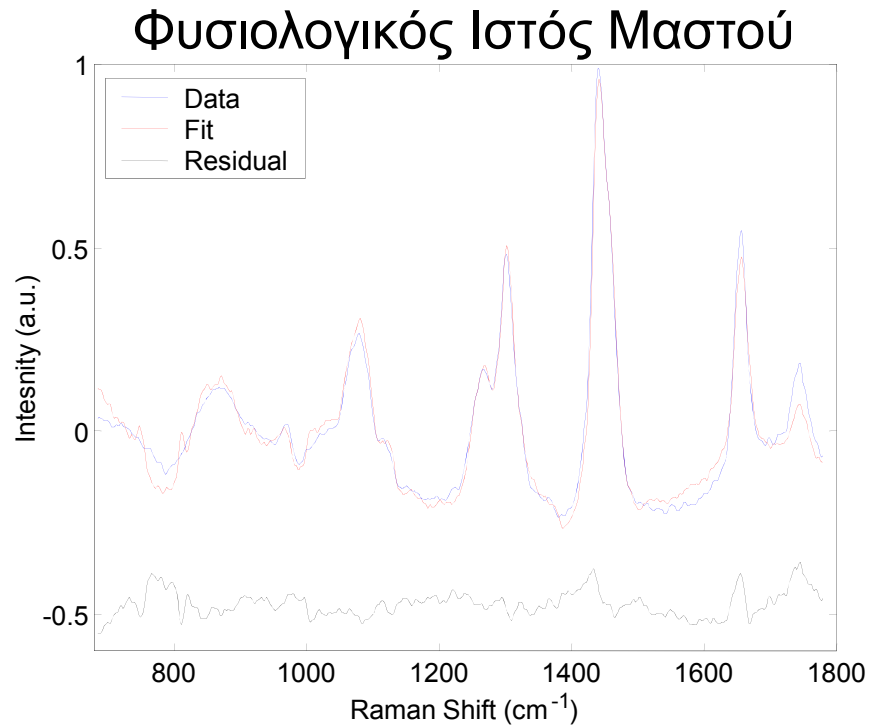
Καρδιαγγειακές Παθήσεις



- In Vivo Κλινικά Δεδομένα: Θρόμβωση (thrombosis) πλάκας



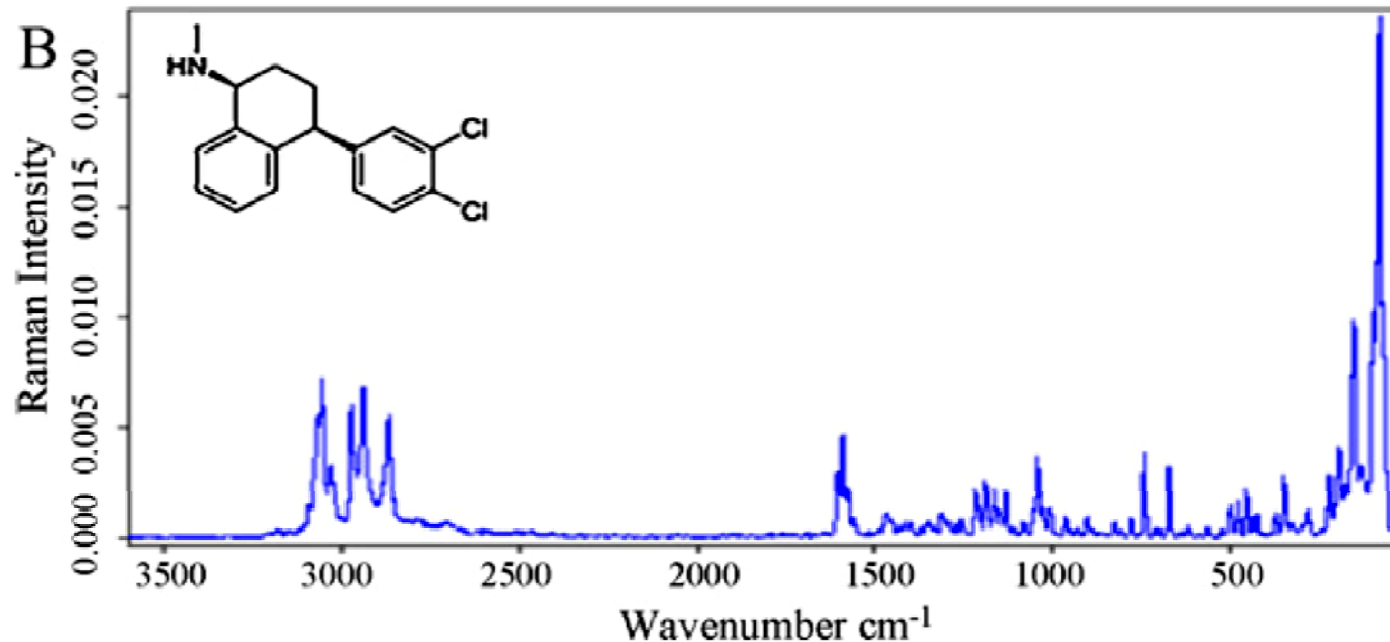
Εφαρμογές σε άλλες ασθένειες



100 mW excitation, 1 second collection



• High-Wavenumber Raman



Προτερήματα

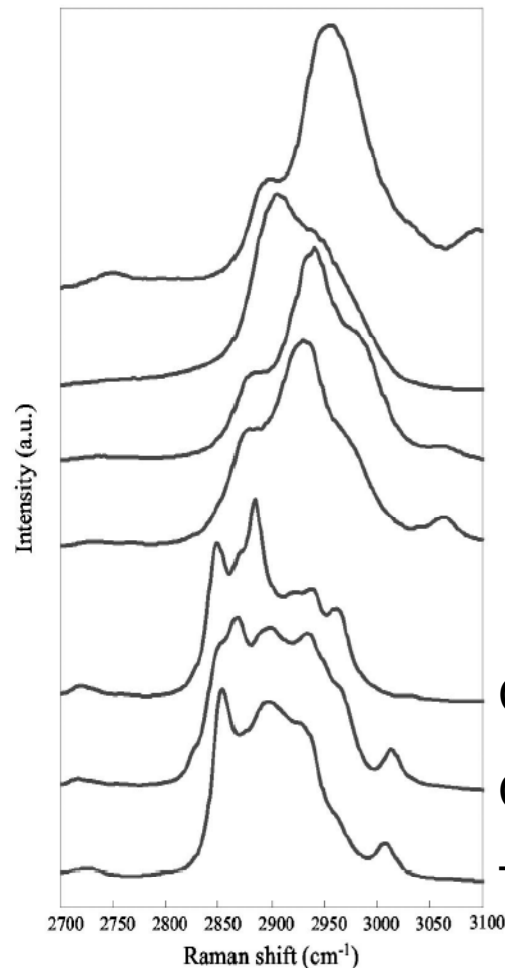
- Ψηλό σήμα Raman
- Χαμηλός φθορισμός
- Καθόλου εκπομπή από ίνες
- Διακρίνει εστέρες της χολιστερίνης

Μειονεκτήματα

- Φαρδύτερες κορυφές
- Μικρότερο φασματικό εύρος
- Κυρίως λιπίδια
- Δεν υπάρχει σήμα ασβέστωσης



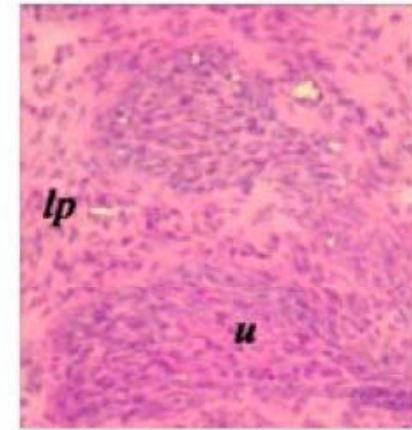
• High-Wavenumber Raman



Normal Bladder



High-Wavenumber



H&E

lp: lamina propria
u: urothelium



- Μοριακά “δακτυλικά αποτυπώματα” φασματοσκοπίας Raman από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φωτονίων και μοριακών δονήσεων
- Εγγύς υπέρυθρη διέγερση προτιμάται για βιοϊατρικές εφαρμογές
- Πρόσφατες εξελίξεις στους καθετήρες οπτικών ινών επιτρέπουν την ακριβή και σε πραγματικό χρόνο ανάλυση in vivo
- Νέοι τομείς της έρευνας είναι ελπιδοφόροι για ευρεία κλινική εφαρμογή



- **McCreery RL. Raman Spectroscopy for Chemical Analysis. Wiley-Interscience, New York, 2000.**
- **Ferraro JR, Nakamoto K, and Brown CW. Introductory Raman Spectroscopy 2nd ed. Academic Press, Boston, 2003.**
- **Hanlon EB, et al. “Prospects for in vivo Raman spectroscopy,” Phys Med Biol 45: R1-R59 (2000).**
- **Mahadevan-Jensen A and Richards-Kortum R. “Raman spectroscopy for the detection of cancers and precancers,” J Biomed Opt 1:31-70 (1996).**
- **Utzinger U and Richards-Kortum R. “Fiber optic probes for biomedical spectroscopy,” J Biomed Opt 8: 121-147 (2003).**