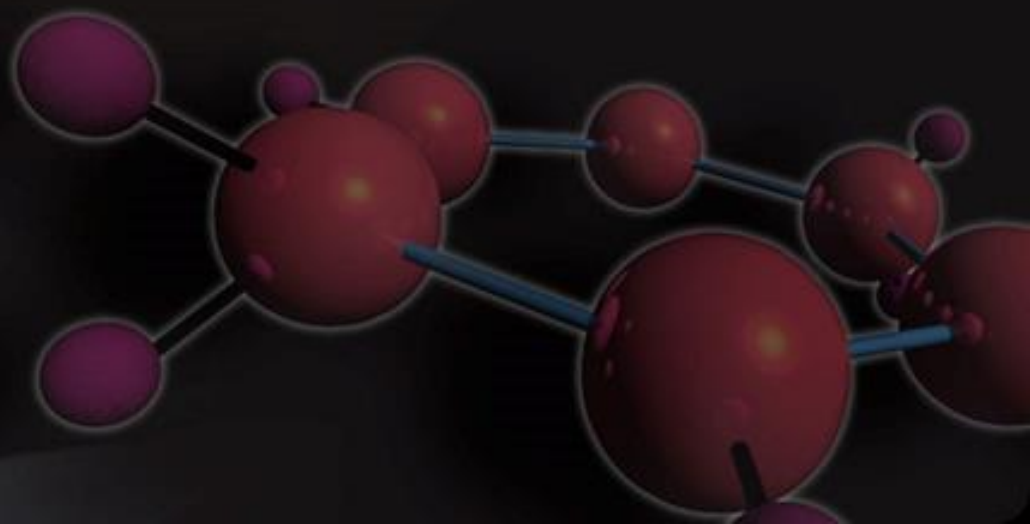



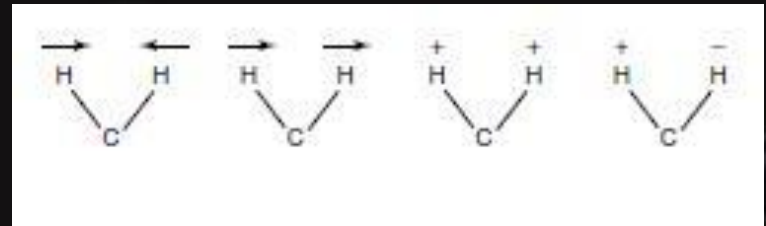
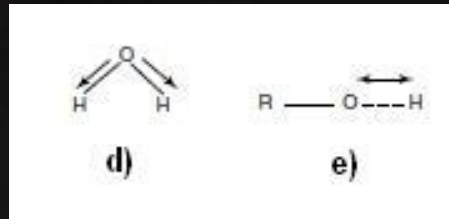
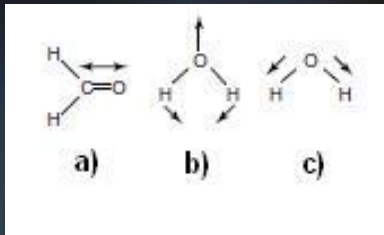
**Примена инфрацрвене и раманске спектроскопије
у биологији и медицини**



- 
- Основни принципи ИЦ и раманске спектроскопије
 - Специфичности ИЦ и раманске спектроскопије у анализи биолошких/медицинских узорака
 - Инструменталне технике и методе анализе добијених спектра
 - Примене

Flashback 1. Инфрацрвена спектроскопија

- Базирана на интеракцији ЕМЗ из ИЦ области са вибрацијама молекула
- Да би неки вибрациони прелаз био запажен у спектру, неопходно је да при вибрацији долази до промене диполног момента молекула



- Правило избора

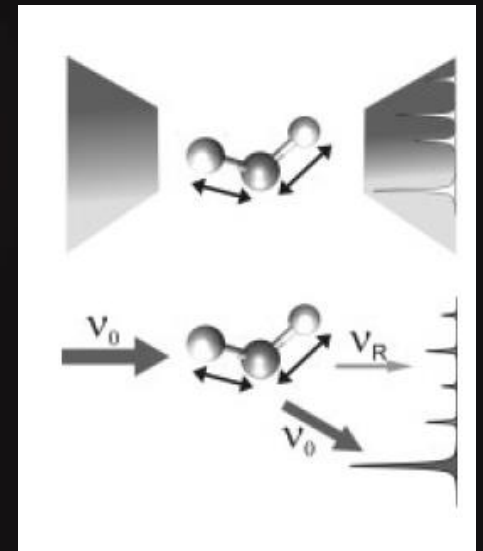
$$R_v = \int \Psi_{v1}^* \mu \Psi_{v2}$$

$$\Delta v = \pm 1$$

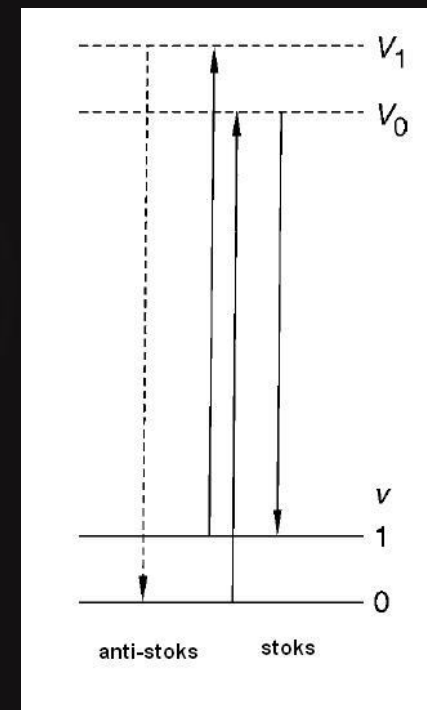
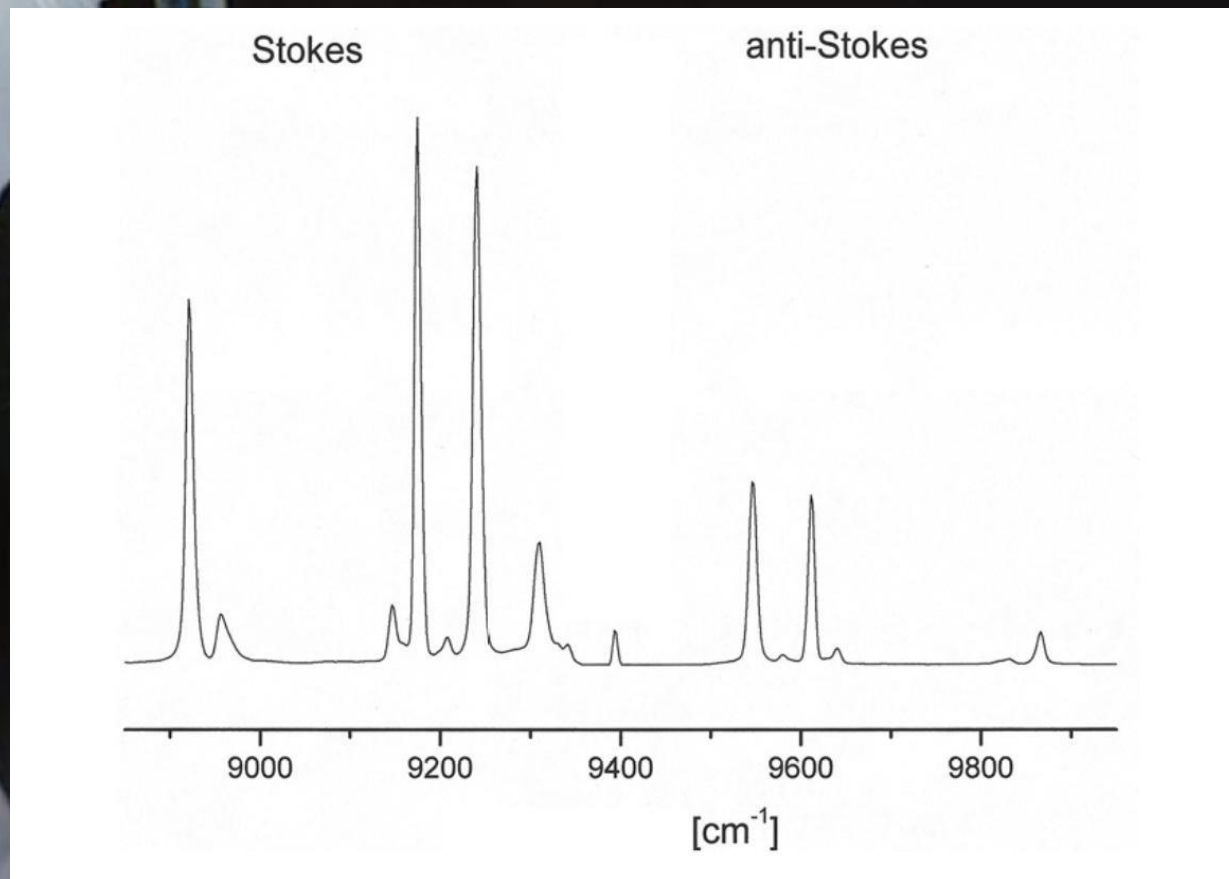
- Код молекула са већим бројем веза може се говорити о скелетним вибрацијама, односно постојању *fingerprint* региона.

Flashback 2. Раманска спектроскопија

- Ефекат је открио Раман 1928.
- у спектрима расејања молекула са леве и десне стране ексцитационе линије јавља низ правилно распоређених линија слабог интензитета.



Стоксове и антистоксове линије

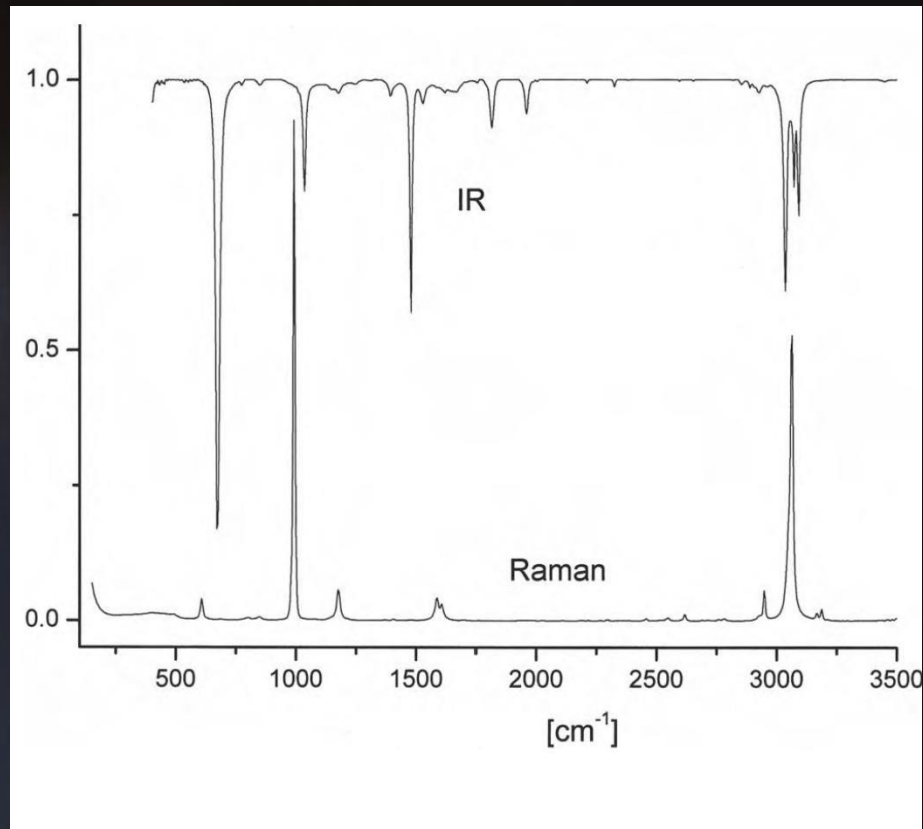


$$\Delta\nu = \pm 1$$

- У раманским спектрима интензивне су линије које имају слаб интензитет или се не јављају у вибрационим спектрима: -C-C-, -C=C-, -S-S- итд. и обрнуто
- спектри расејања су слабог интензитета - да би се добили употребљиви спектри неопходни су ласери
- Вода не смета
- Проблем флуоресценције узорка

• Услов за појаву линија у раманском спектру
промена
поларизабилности

Компарација...



Специфичности ИЦ у анализи биолошких/медицинских узорака

- Проблем јака апсорпција воде
- лоша продорност ИЦ у биолошким узорцима – изузетак блиска инфрацрвена област
- Узорци у облику:
 - танких филмова (суспензија или размаза ћелија)
 - секција ткива.
- Спектри потичу од комбинационих трака и не дају директну информацију о појединачним вибрацијама

Раманска спектроскопија у анализи биолошких/медицинских узорака

- Скоро да не захтева или уопште не захтева припрему узорка
- Биолошки узорци имају јаку флуоресценцију која се може елиминисати субтракционим алгоритмима или коришћењем ласера који емитују у блиској инфрацрвеној области (780, 1033 nm)

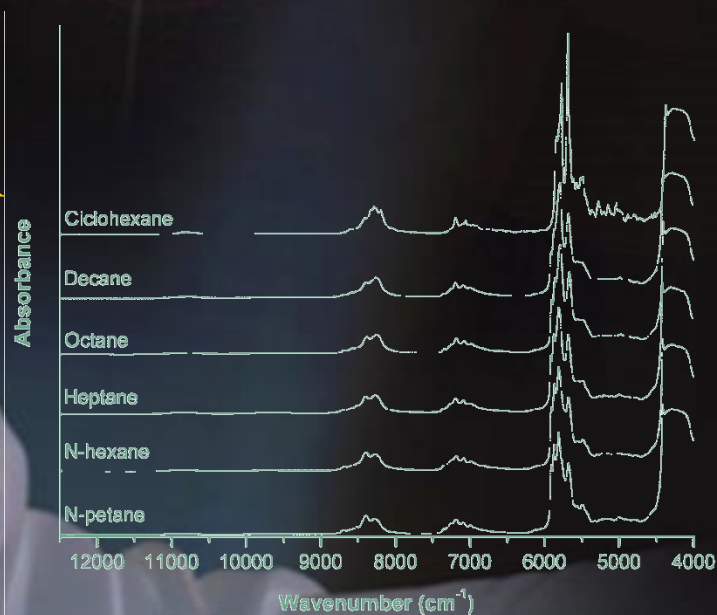
Технике ИЦ и Раманске спектроскопије у анализи биолошких узорака

| Инфрацрвена спектроскопија | Раманска спектроскопија |
|----------------------------|----------------------------|
| Средњег региона | Стоксовска спектроскопија |
| Блиског региона | Резонантна |
| АТР | Површински појачана (SERS) |
| | Кохерентна анти-стоксовска |
| | |

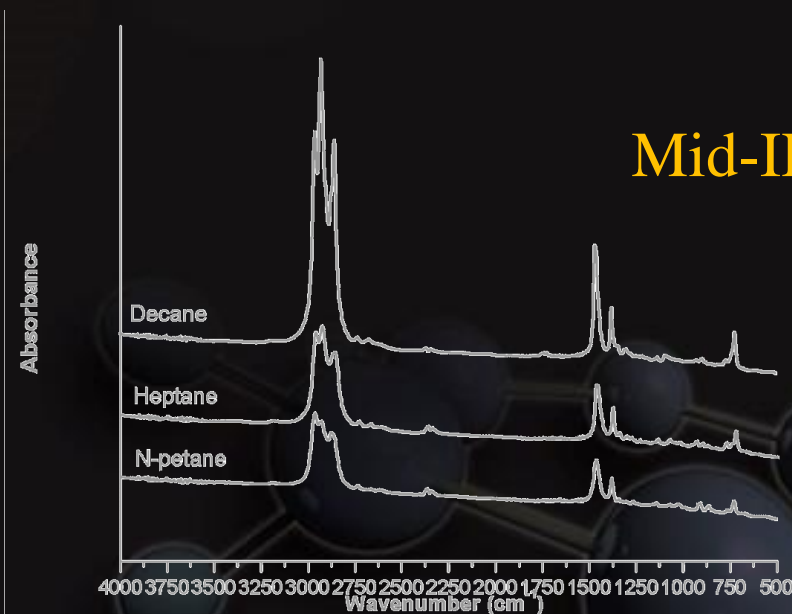
Блиски vs средњи регион

| Блиска ИЦ област | Средња ИЦ област |
|----------------------------------|---------------------------|
| 13000-4000 cm^{-1} | 4000-400 cm^{-1} |
| Вода није проблем | Присуство воде је проблем |
| Овертонови и комбинациони модови | Основни модови вибрација |
| Слаб интензитет спектра | Јак интензитет спектра |

NIR

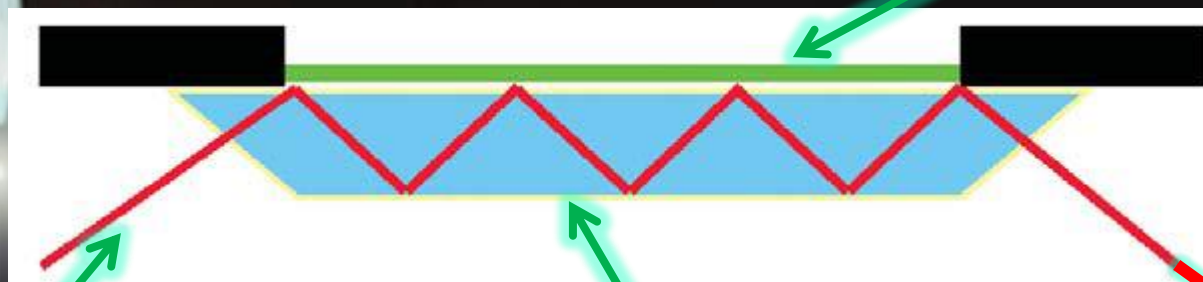


Mid-IR



Тотална ослабљена рефлектанца (ATR)

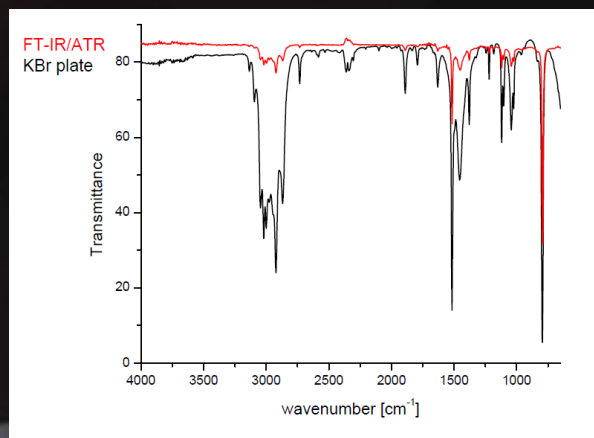
узорак



Сноп ИЦ зрачења

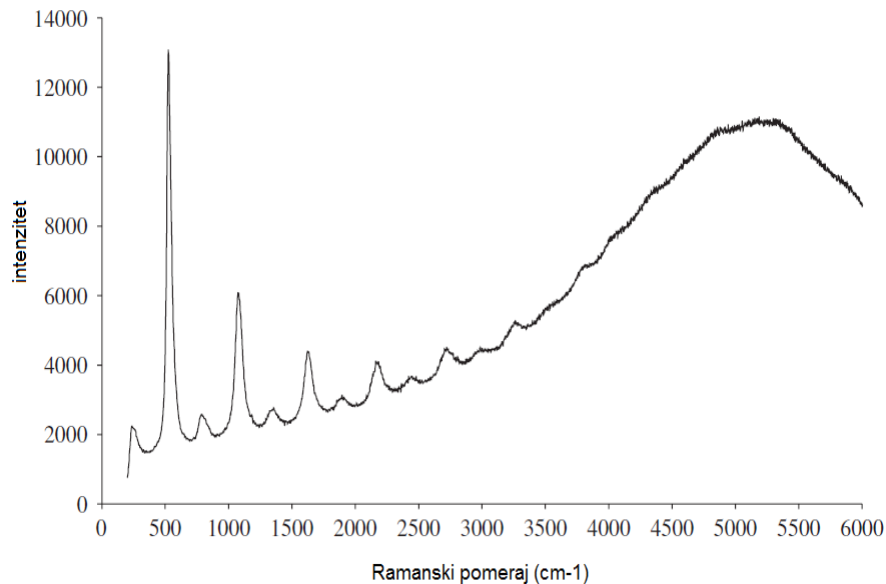
ATR кристал

ка спектрометру



Резонантна раманска спектроскопија

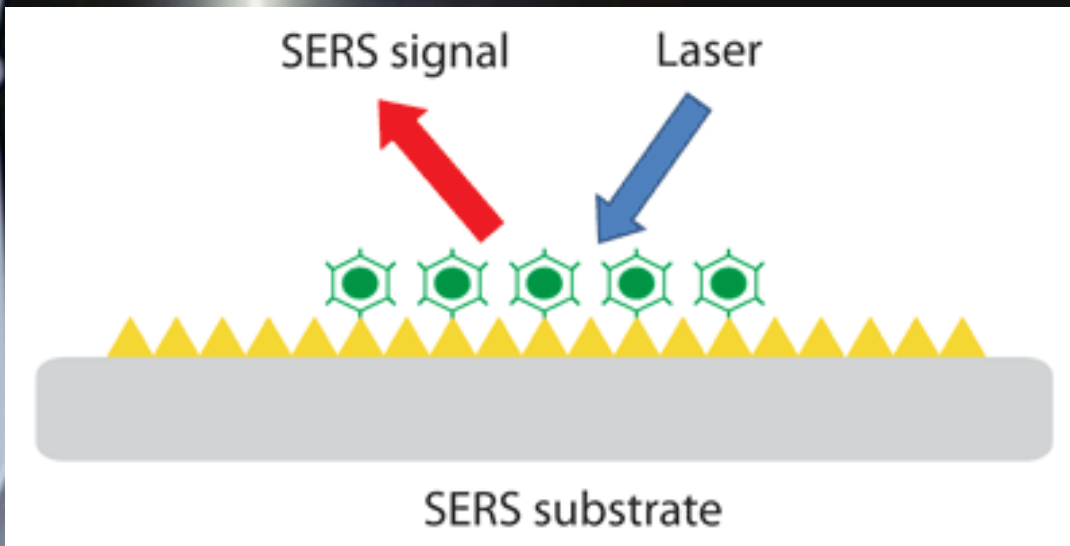
- За ексцитацију се користи ласер чија таласна дужина одговара прелазу између два електронска нивоа



- Појачање од $100-1E6$
- Појачање индивидуалне линије зависи од удаљености њеног положаја од ексцитационе линије

Површински појачана спектроскопија (SERS)

- Ефекат потиче од ефективног спрезања ЕЛМ поља и колективних вибрација „слободних“ електрона-спољашње зрачење индукује диполни момент у сфери



$$\vec{E}_{\text{tot}}(\nu_0) = \vec{E}_0(\nu_0) + \vec{E}_{\text{ind}}(\nu_0)$$

$$F_E(\nu_0) = \frac{|\vec{E}_0(\nu_0) + \vec{E}_{\text{ind}}(\nu_0)|}{|\vec{E}_0(\nu_0)|} = |1 + 2g_0|$$

$$g_0 = \frac{\tilde{\epsilon}_r(\nu_0) - 1}{\tilde{\epsilon}_r(\nu_0) + 2}$$

Појачање интензитета 10000 пута

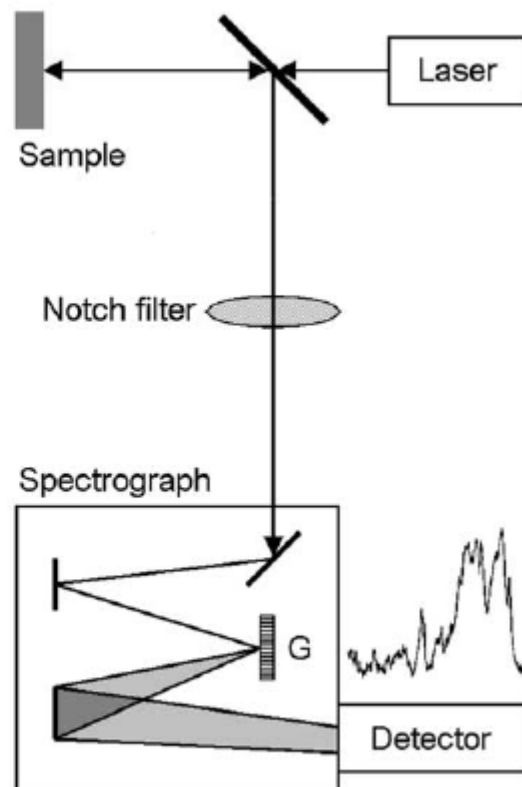
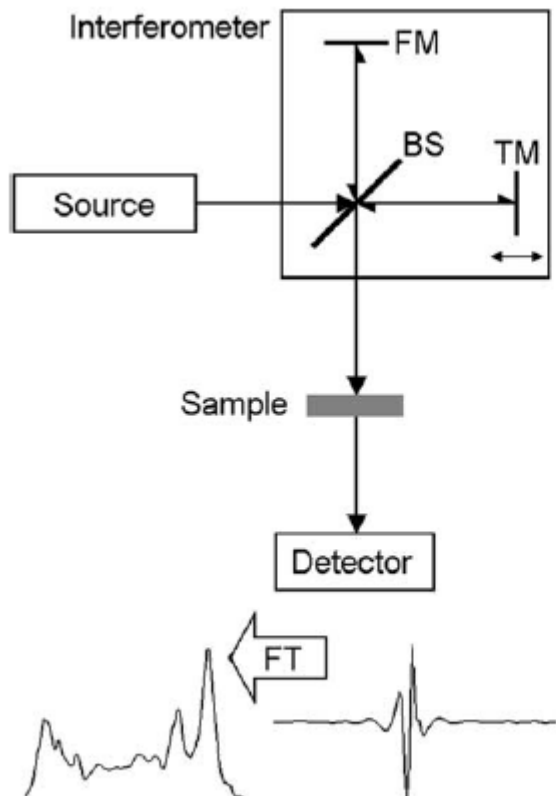
in vivo ИЦ и раманска микроскопија

- комбинује ИЦ /раман спектроскопску технику са оптичким микроскопом
- ИЦ микроскопија -бројни проблеми
 - слаба продорност- јака апсорпција зрачења из средишње области инфрацрвеног спектра.
 -
- Код раманске спектроскопије проблеми друге врсте
 - деградација узорка под дејством ласера
 - флуоресценција у узорку.
- У зависности од начина припреме, узорци прављени за стандардну микроскопију, могу/не могу се користити за ИЦ микроскопију.

A hand in a white glove holds a test tube containing a glowing blue liquid. The background is dark with a molecular model in the bottom right. The word "Инструментација" is written in white text in the center.

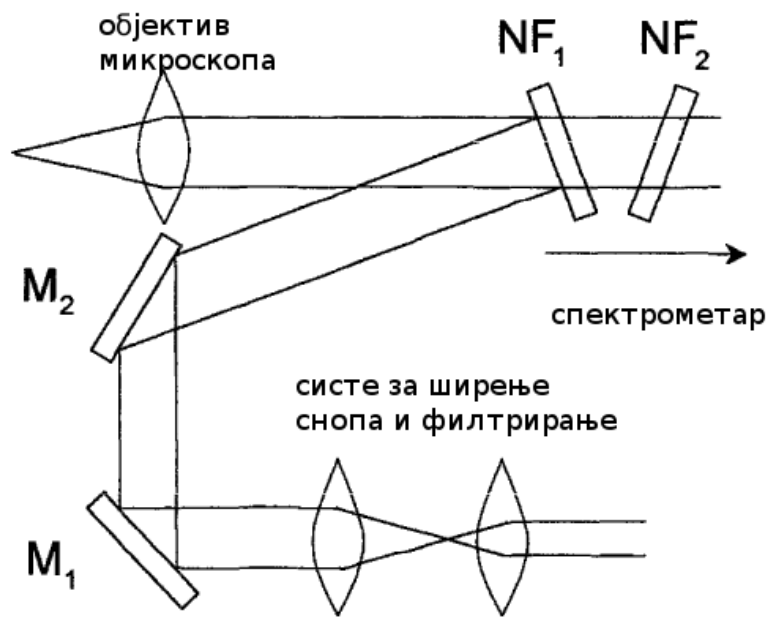
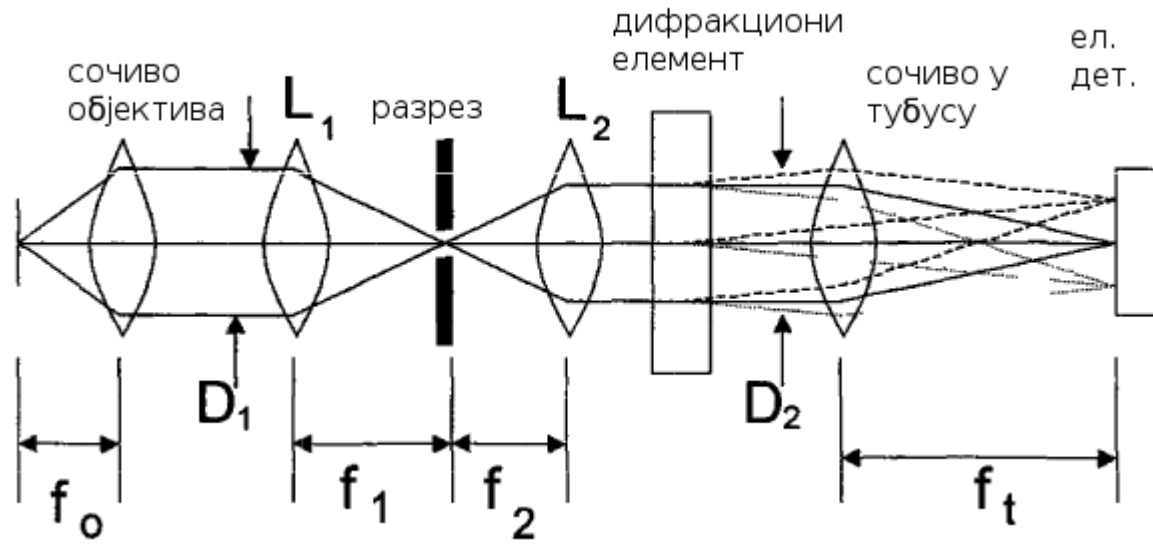
Инструментација

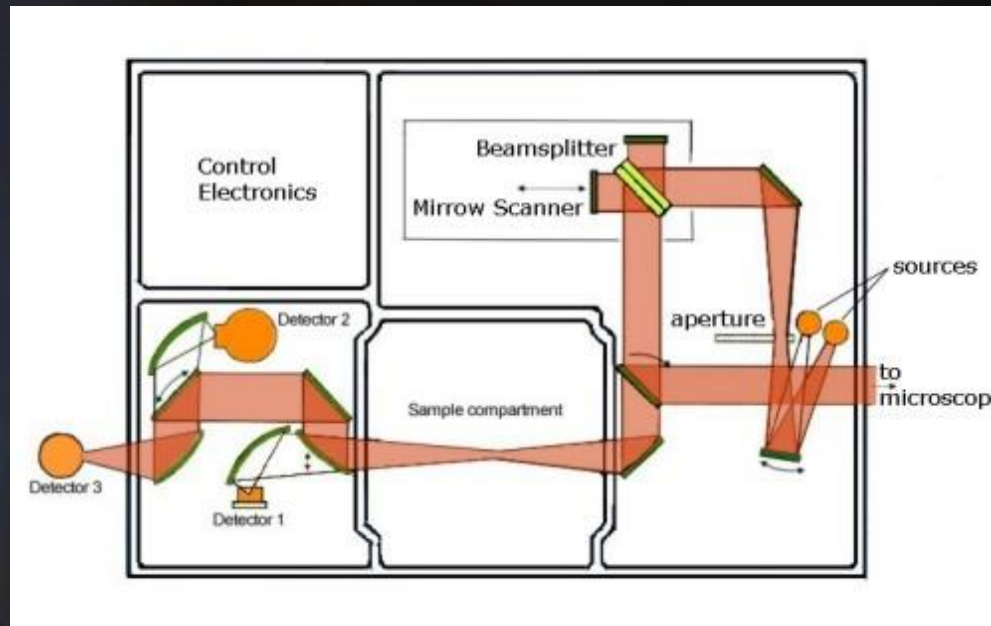
Инфрацрвени и рамански спектрометар



Раманска микроскопија

- Спрега оптичког микроскопа и раманског спектрометра
- Спектри се добијају из области узорка димензија реда микрона
- Однос Раман/Рејли при снимању таквих објеката је реда $1/1 \cdot 10^{12}$





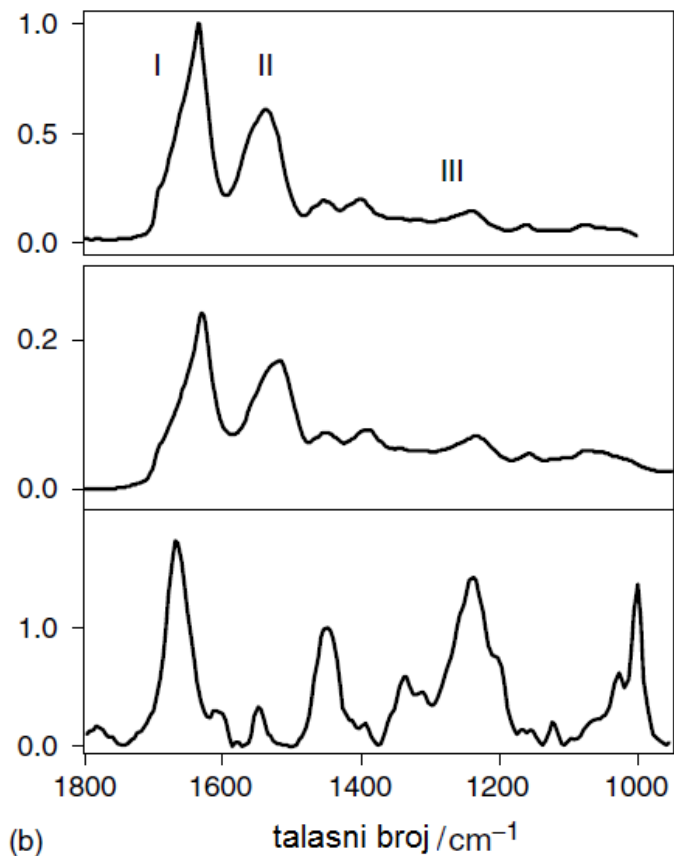
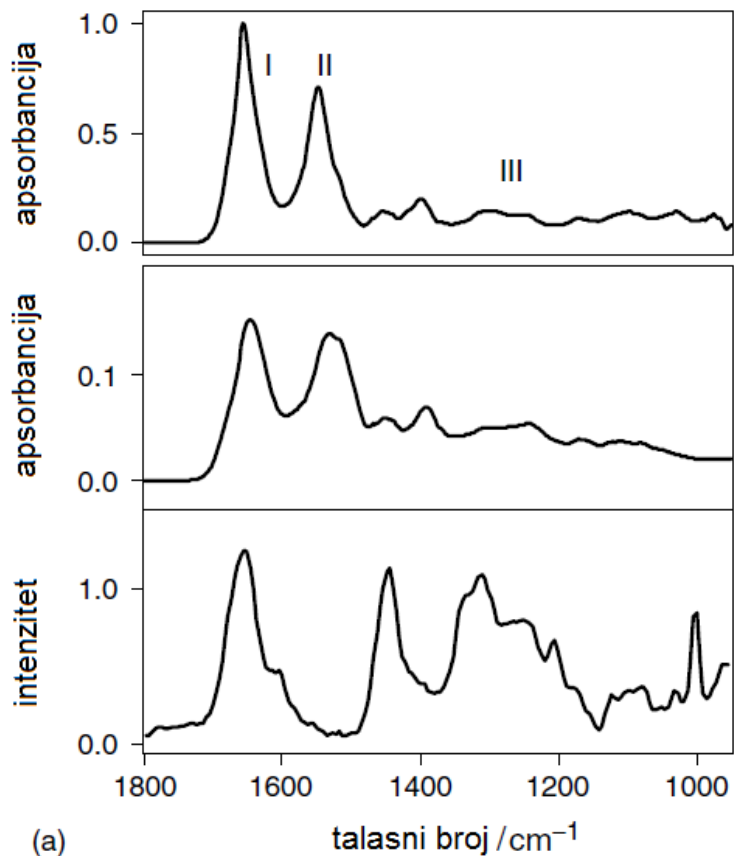
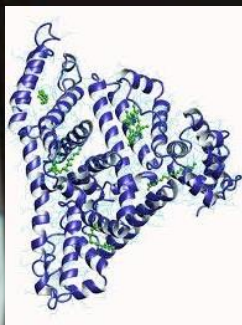


**ИЦ И РАМАНСКА СПЕКТРОСКОПИЈА
ОСНОВНИХ КОНСТИТУЕНАТА
БИОЛОШКИХ СИСТЕМА**

Протеини

- 1600–1700 cm^{-1} амидна I трака која великим делом води порекло од C=O истежућих вибрације у полипептидном ланцу
- 1480–1575 cm^{-1} амидна II трака која потиче од спрезања C–N истежуће вибрације и савијајуће вибрације N–H групе у равни (јака у ИЦ, веома слаба у Раманским спектрима)
- 1230–1300 cm^{-1} амидна III трака која потиче од спрезања C–N истежуће и N–H савијајуће вибрације (слаба у ИЦ, јака у Раманским спектрима)

ИЦ спектри протеина

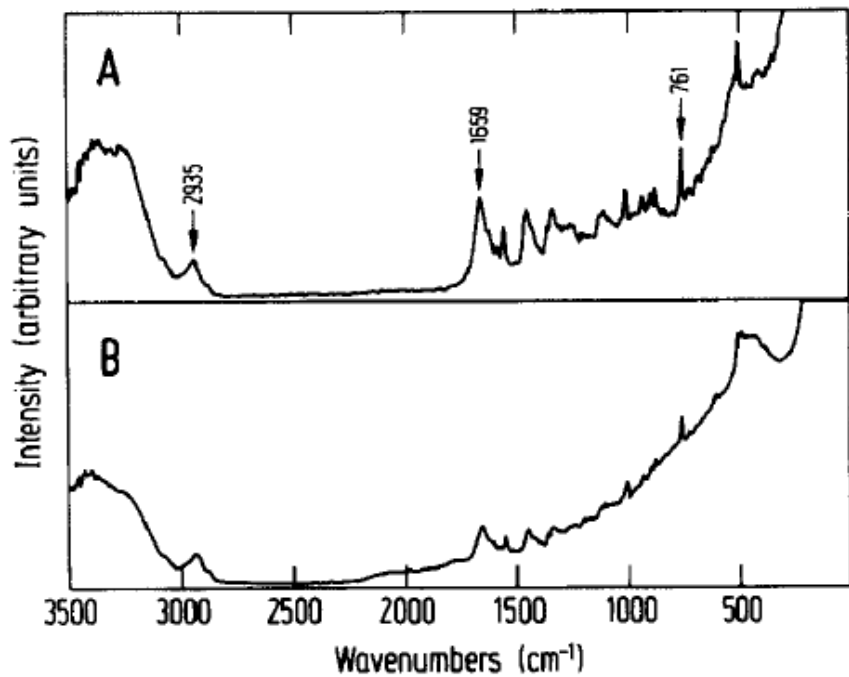


ИЦ спектри

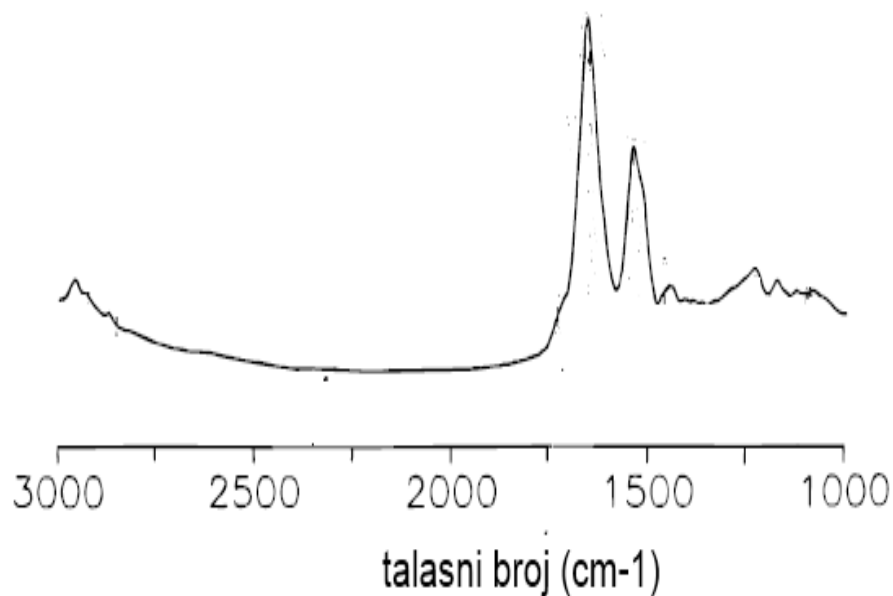
2 % и 0,1 М фосфатном
пуферу

5 % и 0,1 М фосфатном
пуферу

Рамански спектри протеина

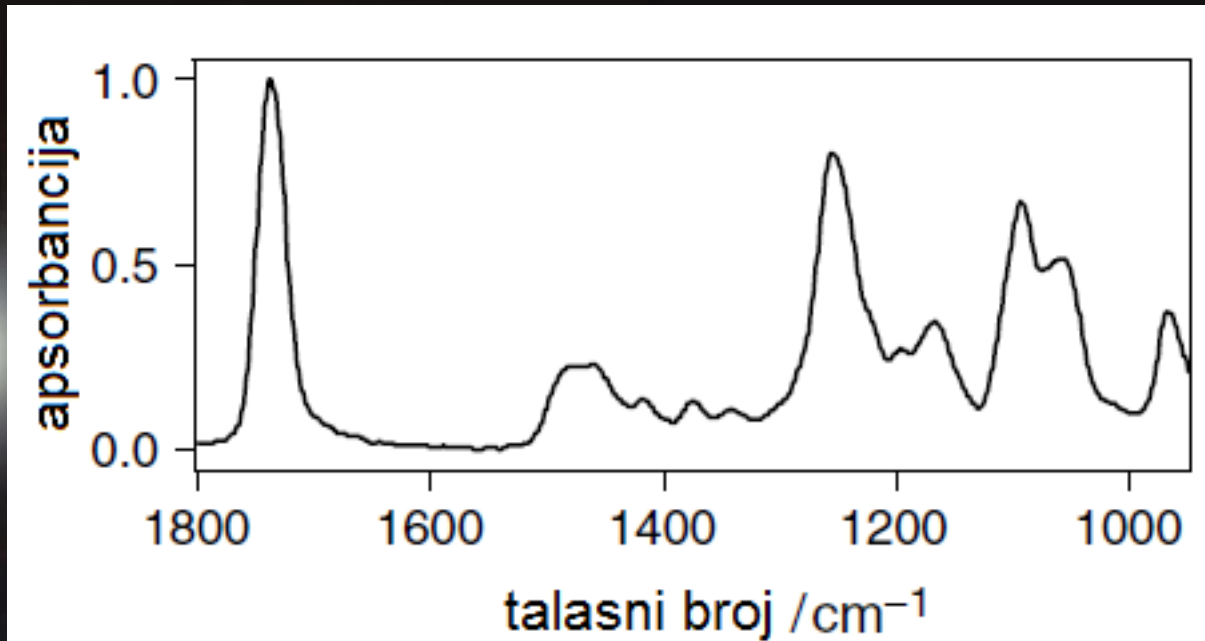


ЛИЗОЗИМ



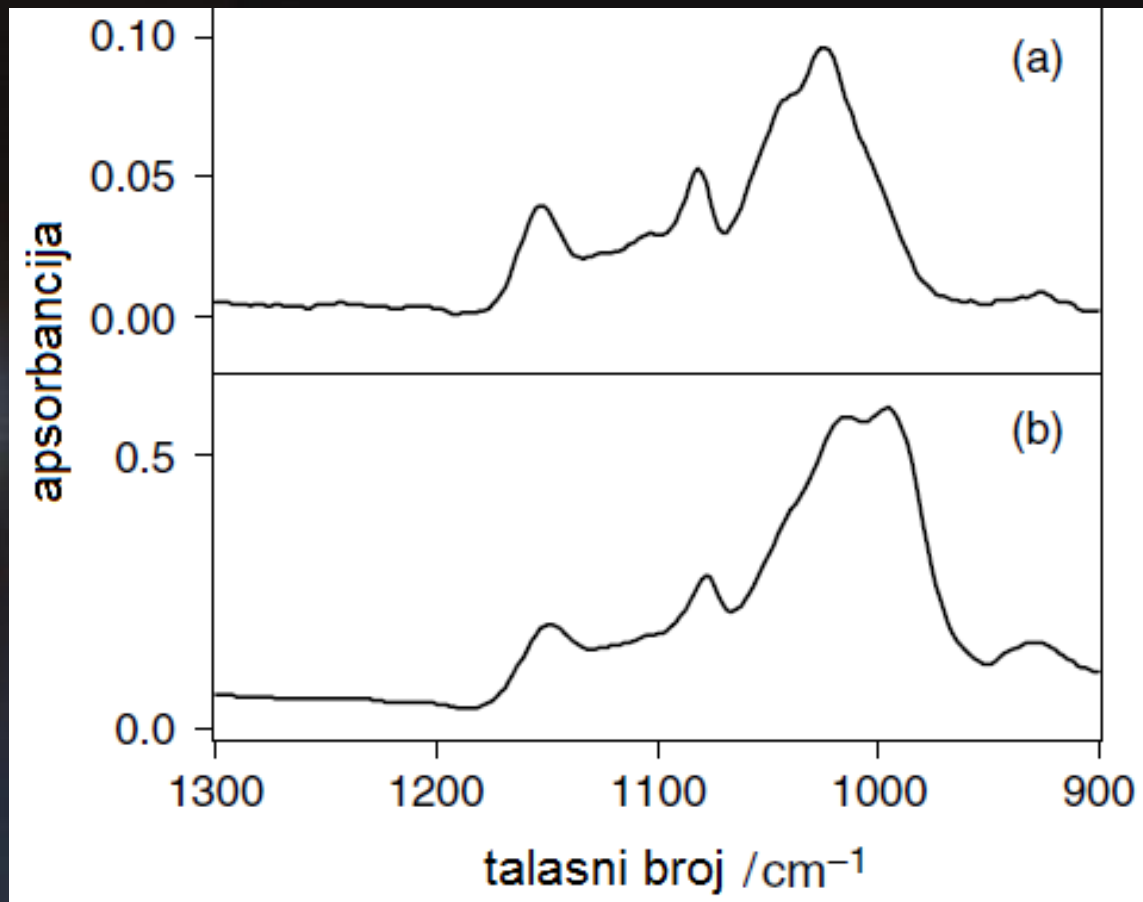
ГОВЕЋИ СЕРУМ АЛБУМИН

ИЦ спектри липида



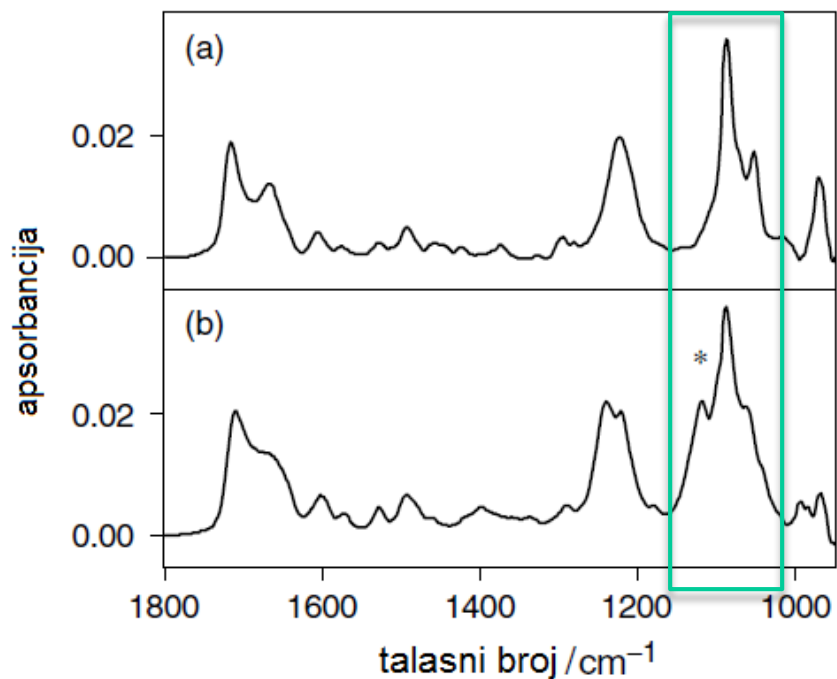
- 1730 cm⁻¹ C=O истежућа вибрација
- 1465 cm⁻¹ CH₂ маказаста вибрација
- 1255 cm⁻¹ CH₂ љуљајућа вибрација
- 1168 cm⁻¹ CO-O-C асиметрична истежућа
- 1095 cm⁻¹ симетрична истежућа PO₂⁻
- 1057 cm⁻¹ истежућа C-O-P
- 968 cm⁻¹ (CH₃)₃N⁺ асиметрична истежућа

Угљени хидрати

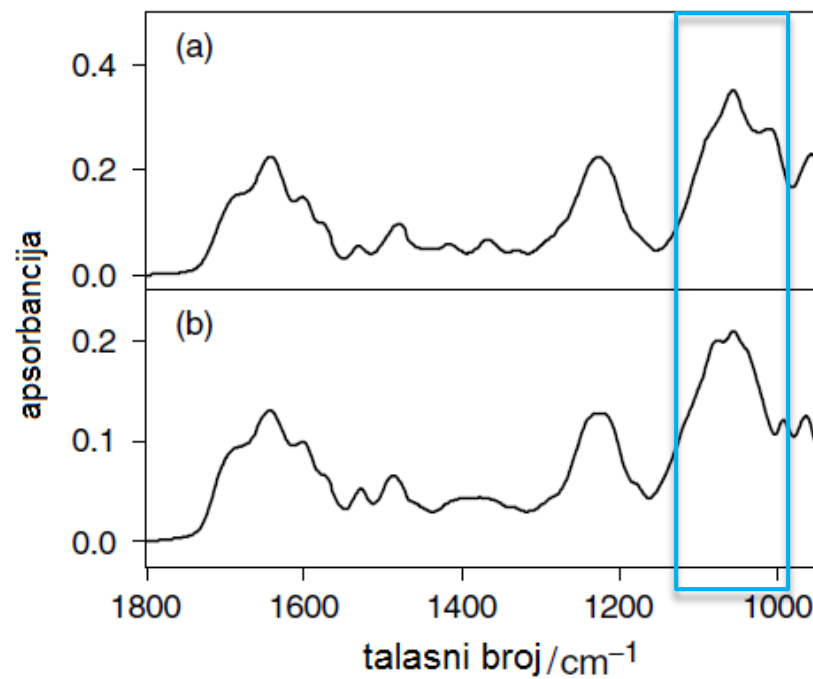


DNK&RНК

IR



ATR



- 1750–1620 cm⁻¹ траке вибрација двоструких веза у азотним базама
- 1230 cm⁻¹ i 1090 cm⁻¹ траке антисиметричних и симетричних истежућих вибрација фосфатних група
- 1120 cm⁻¹ C–O трака из рибозе

Типови узорака

- Крв
- Урин
- Зној
- Пљувачка
- Серум
- Синусијални флуид
- Амниотска течност
- Изоловане ћелије
- Брисеви
- Апсирати
- Узорци ткива
- Бактеријске културе


Припрема биолошких препарата за ИЦ

- Флуиди (синувијални, амниотска течност...)
 - субтракција спектра воде
 - брзо сушење препарата
 - АТР
- Ћелије, брисеви ћелија,аспирати
 - субтракција спектра воде
 - монослојеви ћелија
 - АТР
- Ткива
 - Компресовање препрата између погодних супстрата
 - За ИЦ микроскопију слично као и за обичну

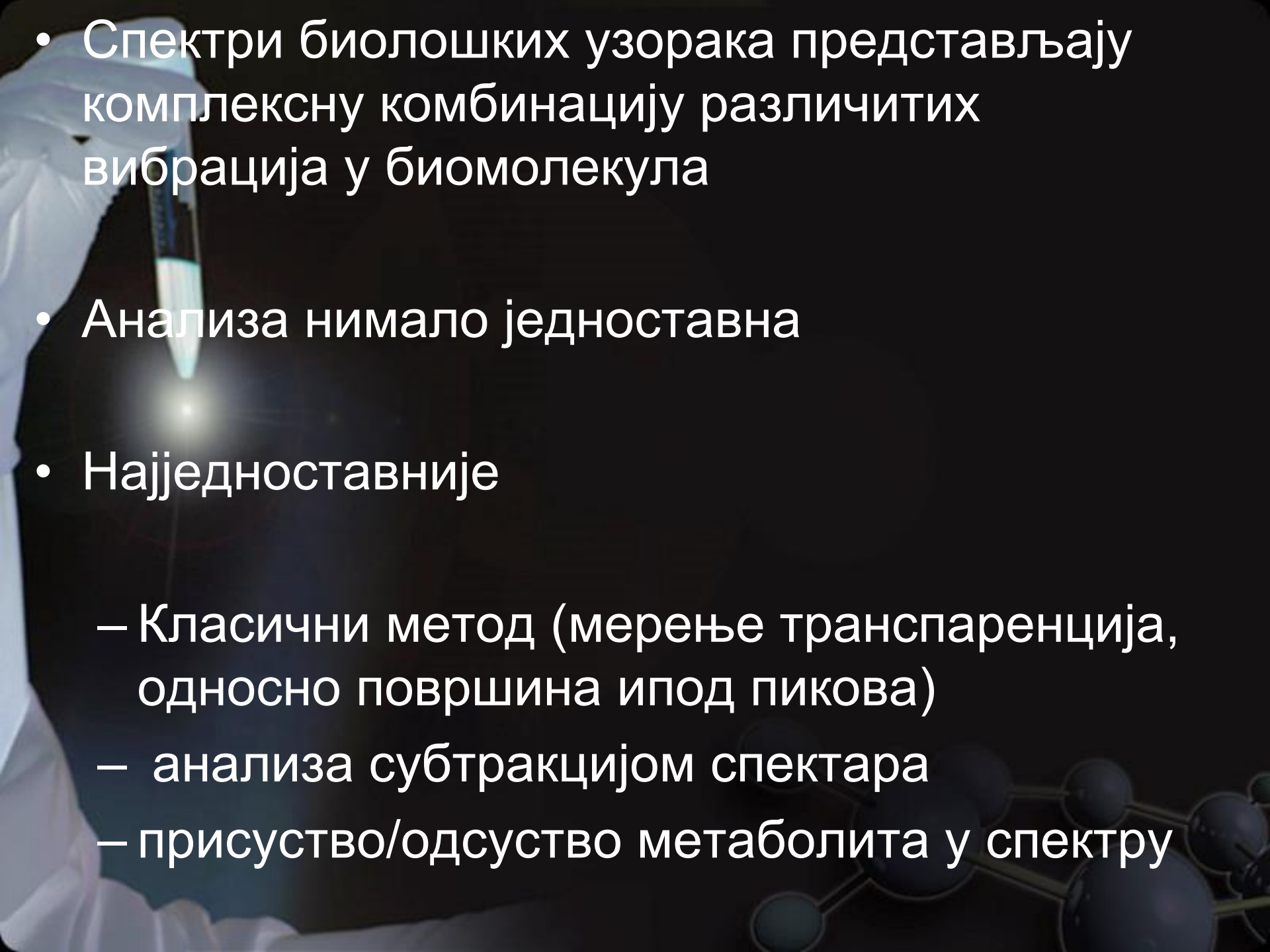
Узорци за раманску спектроскопију

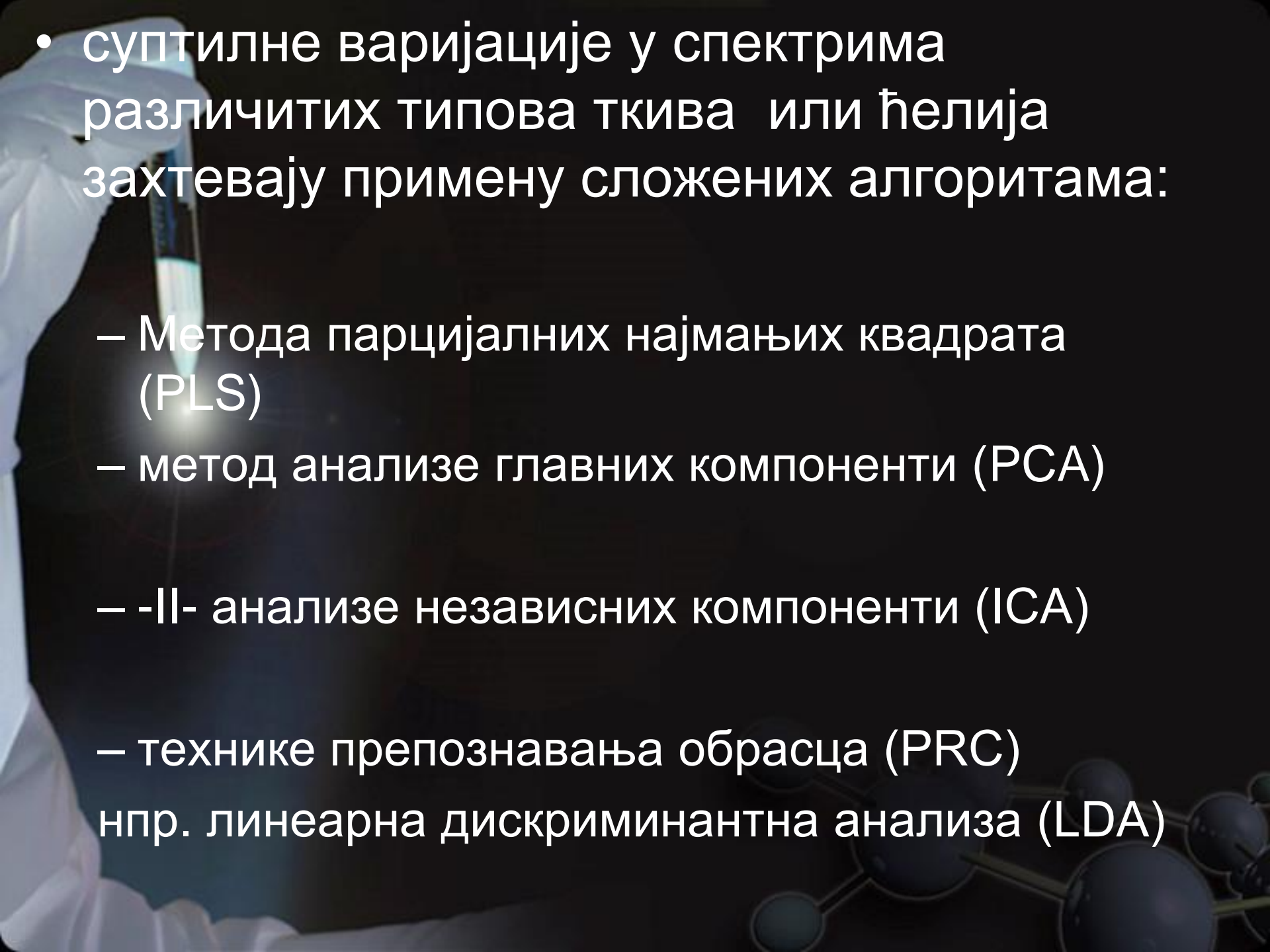
- Скоро да не захтева припрему узорка
- Исти типови узорака као и за ИЦ спектроскопију
- Непожељни узорци који јако флуоресцирају



A hand in a white glove holds a test tube containing a blue liquid. The background is dark with a molecular model of a chain of atoms (red and purple spheres) at the bottom right. The text is centered in white.

Методе анализе добијених спектара

- 
- Спектри биолошких узорака представљају комплексну комбинацију различитих вибрација у биомолекула
 - Анализа нимало једноставна
 - Најједноставније
 - Класични метод (мерење транспаренција, односно површина ипод пикова)
 - анализа субтракцијом спектара
 - присуство/одсуство метаболита у спектру



- суптилне варијације у спектрима различитих типова ткива или ћелија захтевају примену сложених алгоритама:

- Метода парцијалних најмањих квадрата (PLS)

- метод анализе главних компоненти (PCA)

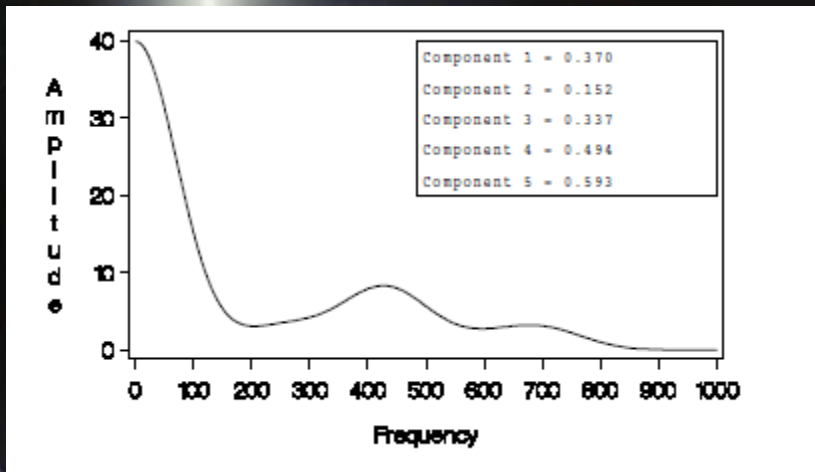
- -II- анализе независних компоненти (ICA)

- технике препознавања обрасца (PRC)

- нпр. линеарна дискриминантна анализа (LDA)

PLS


- Претпоставка:
- Спектар биолошког узорка је уравнотежена сума спектра вибрационо активних конституената



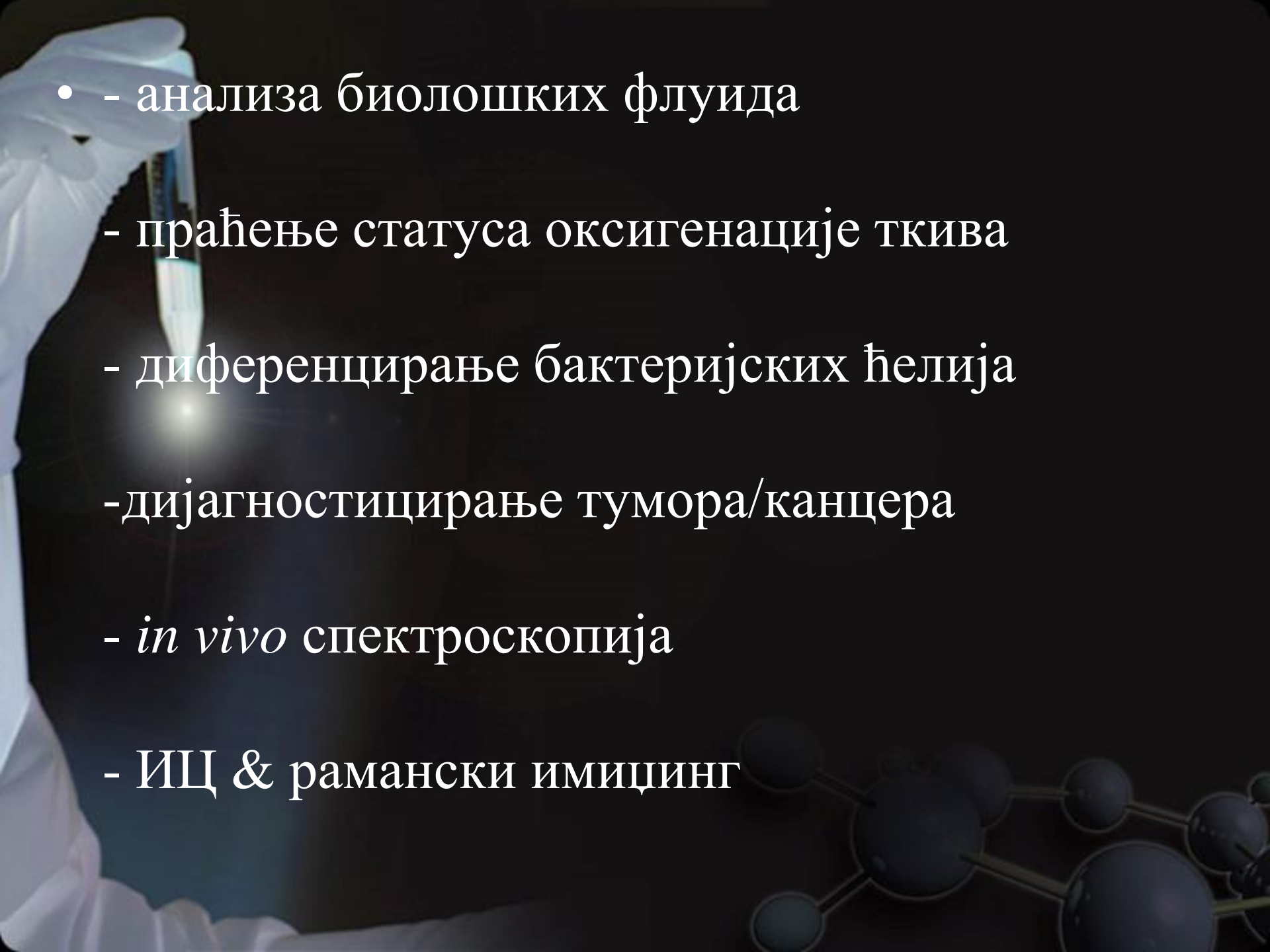
| Number of PLS Factors | Percent Variation Accounted For | | | |
|-----------------------|---------------------------------|-------|-----------|--------|
| | Factors | | Responses | |
| | Current | Total | Current | Total |
| 0 | | | | |
| 1 | 39.35 | 39.35 | 28.70 | 28.70 |
| 2 | 29.93 | 69.28 | 25.57 | 54.27 |
| 3 | 7.94 | 77.22 | 21.87 | 76.14 |
| 4 | 6.40 | 83.62 | 6.45 | 82.59 |
| 5 | 2.07 | 85.69 | 16.95 | 99.54 |
| 6 | 1.20 | 86.89 | 0.38 | 99.92 |
| 7 | 1.15 | 88.04 | 0.04 | 99.96 |
| 8 | 1.12 | 89.16 | 0.02 | 99.98 |
| 9 | 1.06 | 90.22 | 0.01 | 99.99 |
| 10 | 1.02 | 91.24 | 0.01 | 100.00 |

Метода препознавања обрасца

- Класификациони алгоритам који захтева познавање неке квалитативне информације о систему (рецимо нормално-абнормално, тип патологије...).
- Спектри таквих система користе се за тренинг алгоритма за класификацију спектра о чијој припадности немамо информацију.
- Може се комбиновати са тзв алгоритмом који издваја регионе са највећом варијацијом.



Примери примене ИЦ и
раманске спектрометрије

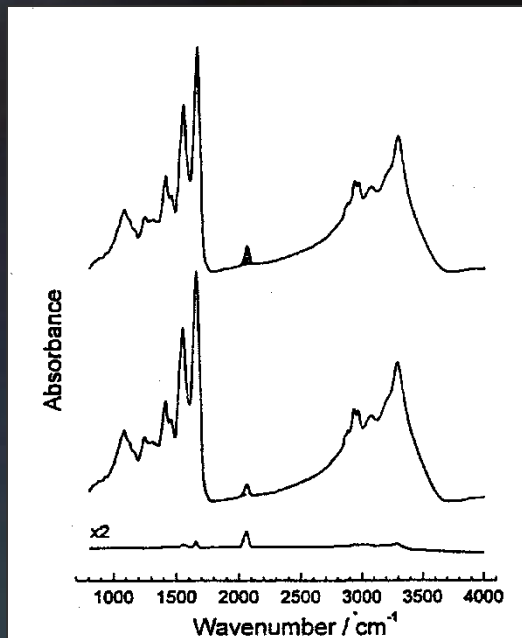
- 
- - анализа биолошких флуида
 - праћење статуса оксигенације ткива
 - диференцирање бактеријских ћелија
 - дијагностицирање тумора/канцера
 - *in vivo* спектроскопија
 - ИЦ & рамански имиџинг

A gloved hand in a white lab coat holds a test tube containing a glowing blue liquid. The background is dark with a bright light source creating a lens flare effect. In the bottom right corner, there is a faint, dark molecular structure.

АНАЛИЗА БИОЛОШКИХ ФЛУИДА

Тиоцијанат у пљувачки пушача

- Одређивање тиоцијаната у пљувачки
- Повећана концентрација тиоцијаната код пушача



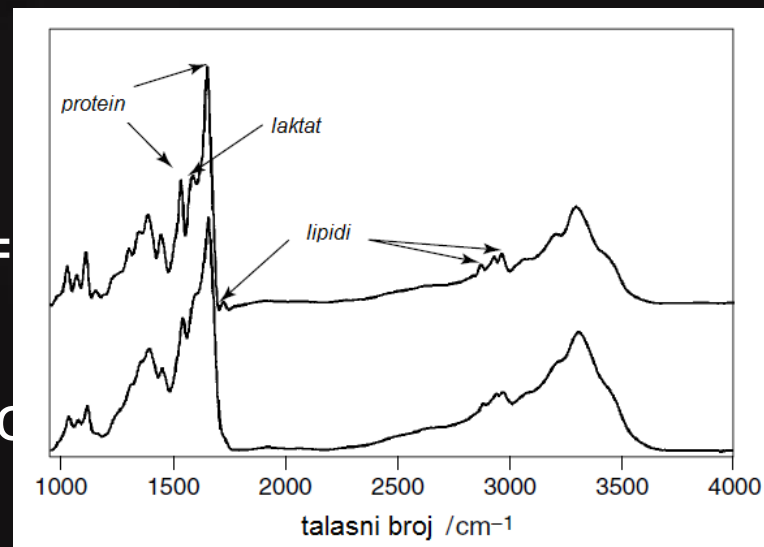
После подне

Пре подне

разлика

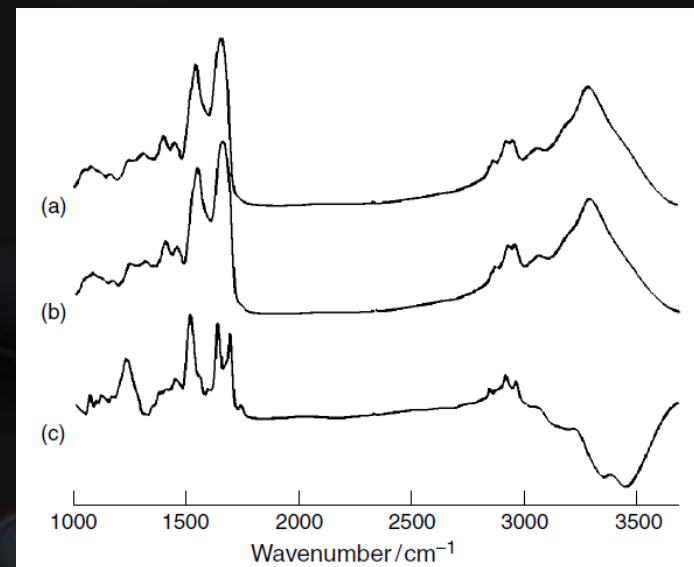
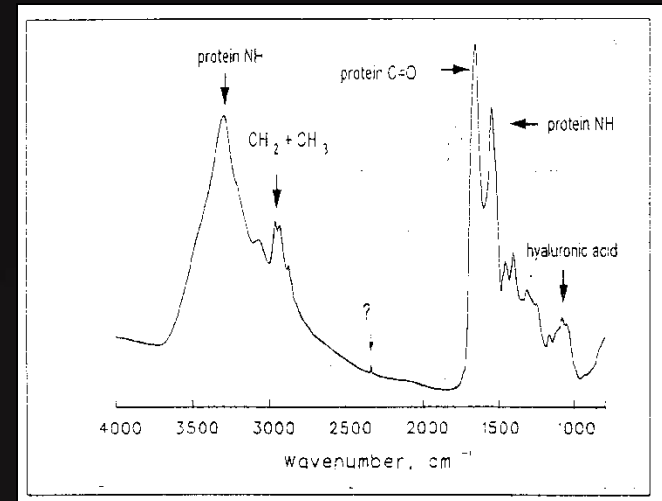
Одређивање зрелости плућа фетуса на основу анализе амниотске течности

- Процена зрелости плућа фетуса приликом одлучивања о превременом порођају је од есенцијалног значаја
- лецитин / сфингомијелин. Л/С > 2 = зрела плућа
- Пошто су апсорпције масти добре видљиве у ИЦ спектрима, однос ова два метаболита је могуће пратити применом ове технике.



Анализа синувијалног флуида у дијагностицирању артритиса (ИЦ)

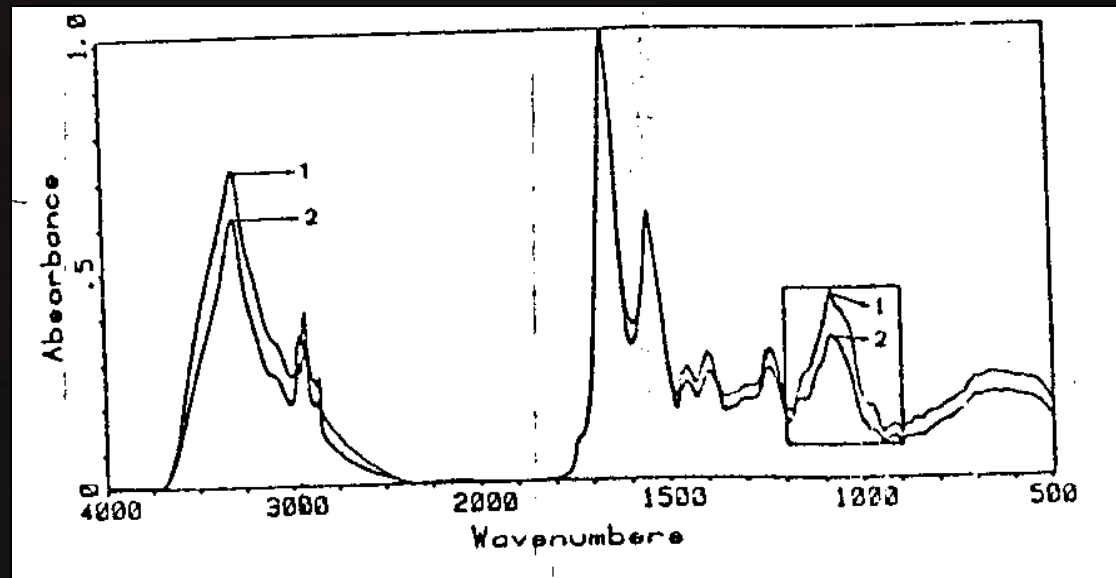
- Синувијални флуид је филтрат крвне плазме уз додатни састојак хијалуронску киселину, коју лучи синувијална мембрана
- Мултиваријантна анализа омогућава да се разликују специфичне промене у саставу ове течности код артритиса



Диференцирање бактеријских ћелија (ИЦ)

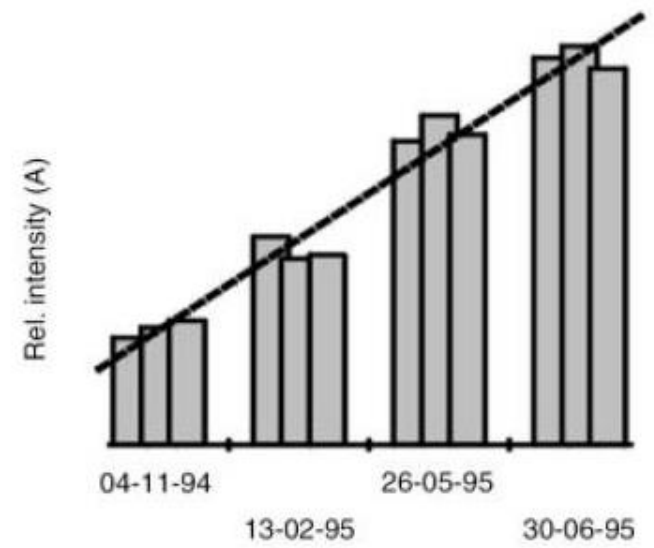
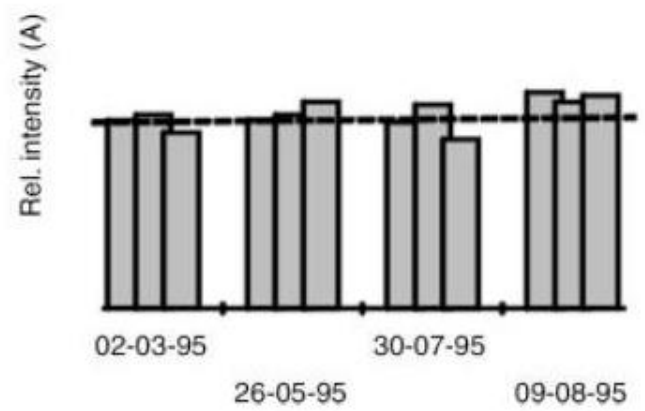
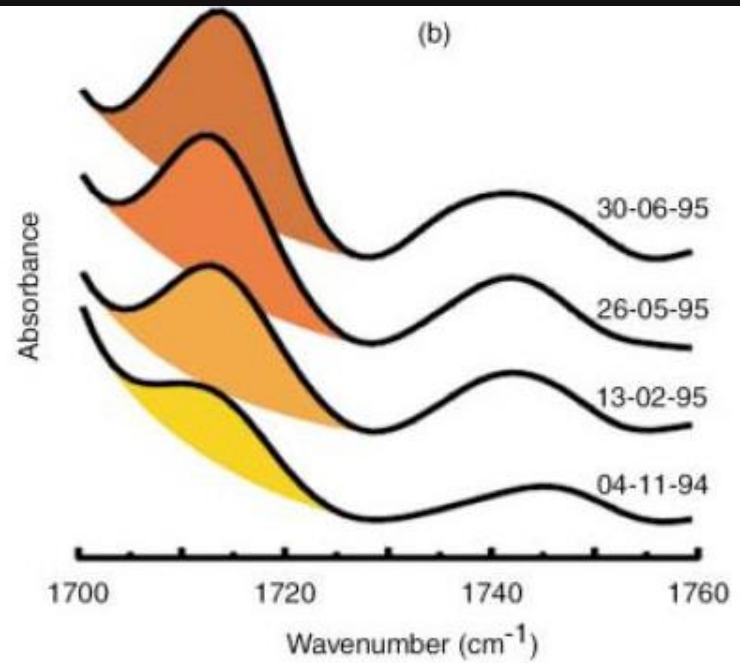
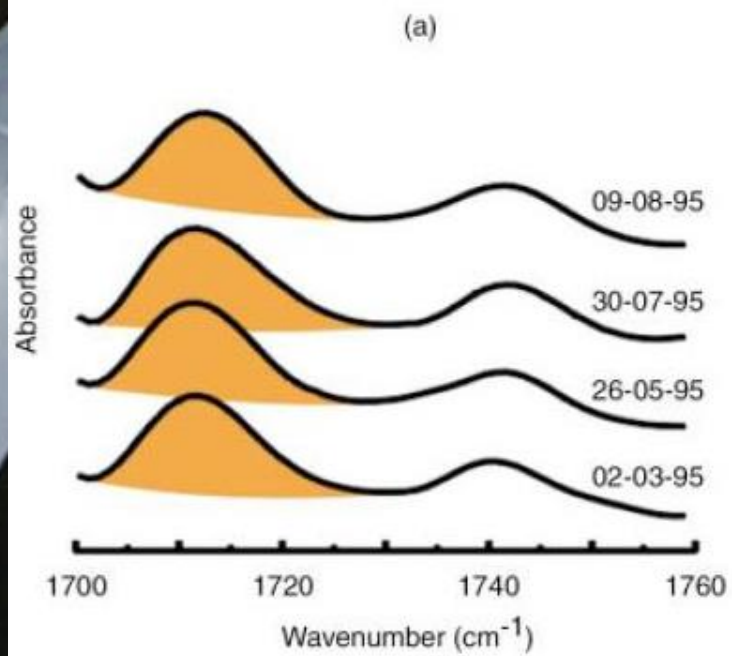
- Анализа у делу спектра $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ да би се добио диференцијациони индекс који је обрнуто пропорционалан степену сродности између бактерија

Мултиваријантна анализа дела спектра који одговара апсорпцијама липида омогућава диференцијацију Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија



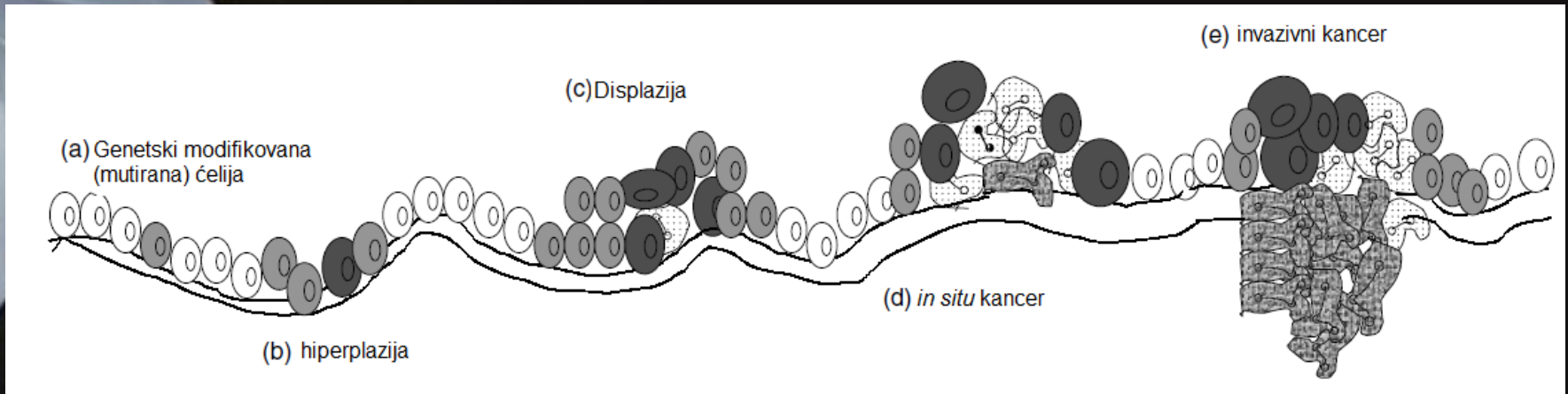
Диференцијација између прогресивне и стационарне CLL

- На основу ИЦ спектра могуће је разликовати патолошки измењене (незреле) лимфоците од нормалних лимфоцита и чак одредити агресивност болести.
- Код CLL могуће је разликовати стационарну и прогресивну болест на основу разлика у апсорционим тракама PO_2^- вибрација које потичу из DNK.





ИЦ и Раманска спектроскопија ТКИВА



(a) Breast

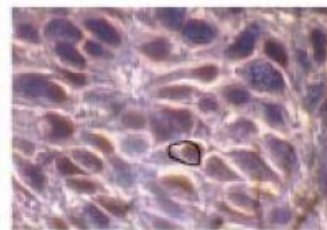
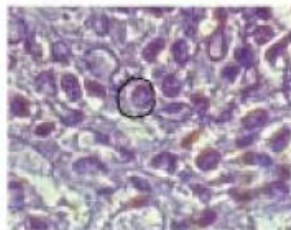
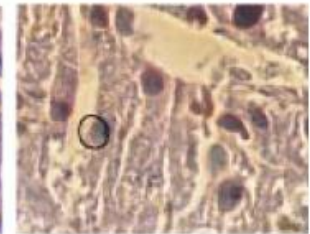
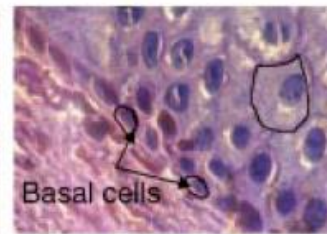
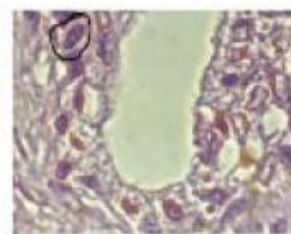
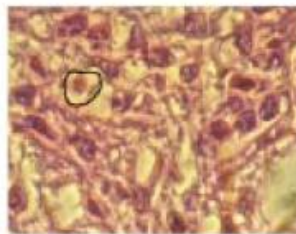
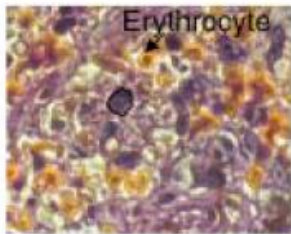
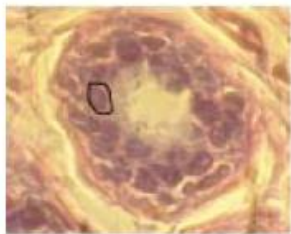
(b) Colon

(c) Bladder

(d) Prostate

(e) Cervix

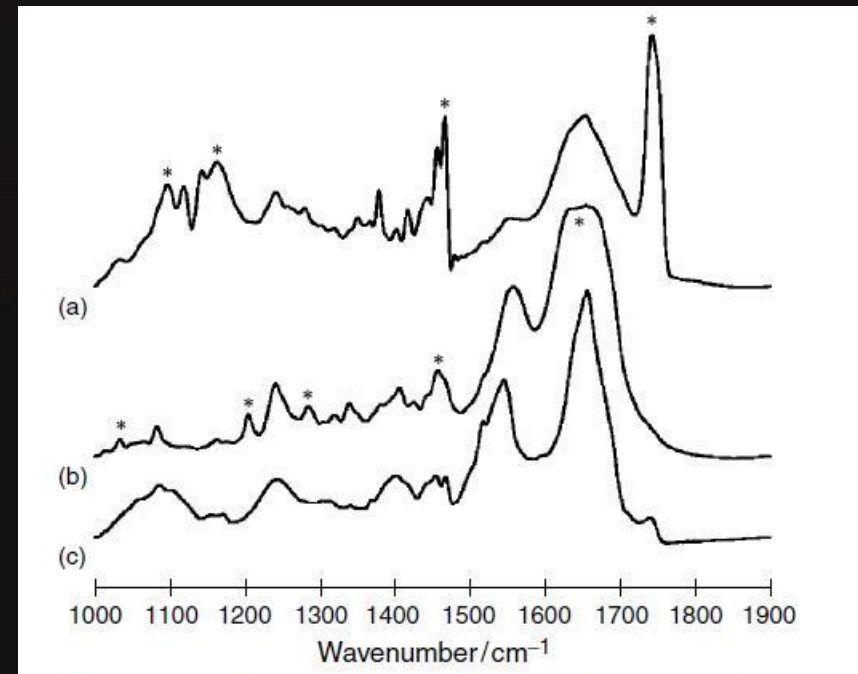
(f) Liver



Тумори дојке

- Високе концентрације колагена и липида, као и њихова варијација унутар ткива дојке отежавају изолацију специфичних промена у спектру које карактеришу туморе дојке

Неопходна примена ЛДА да би се издвојиле области спектра које се разликују у ткиву захваћеном тумором, као и да би се извршила класификација у групе које одговарају степену агресивности тумора.



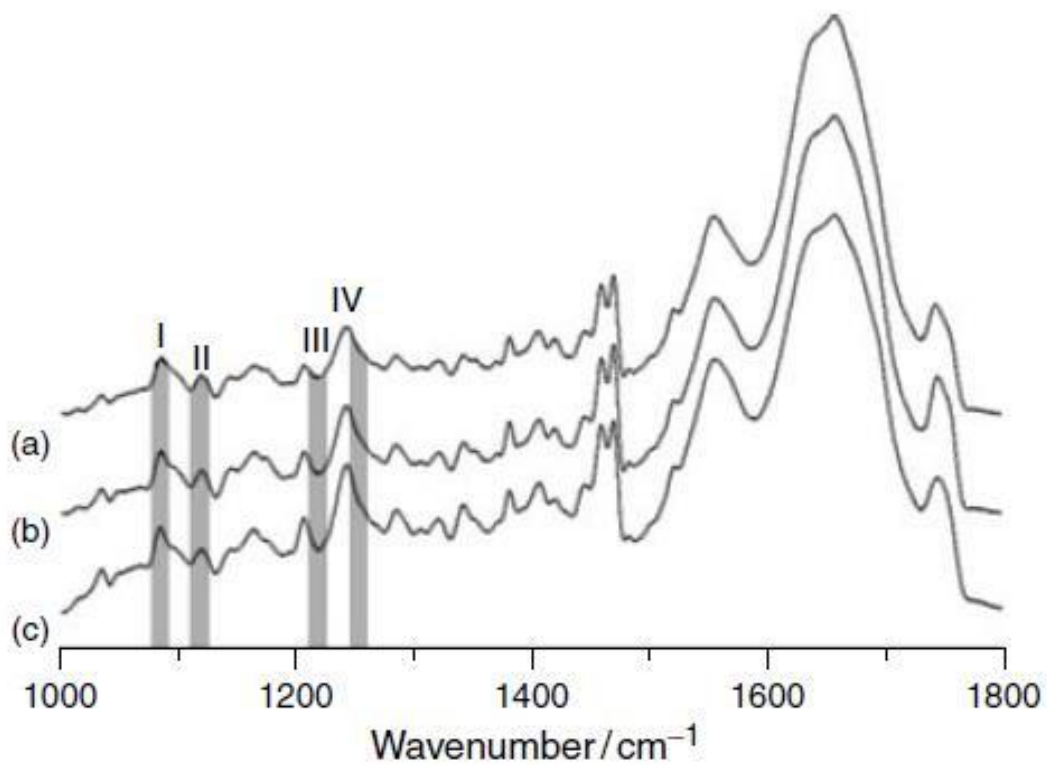
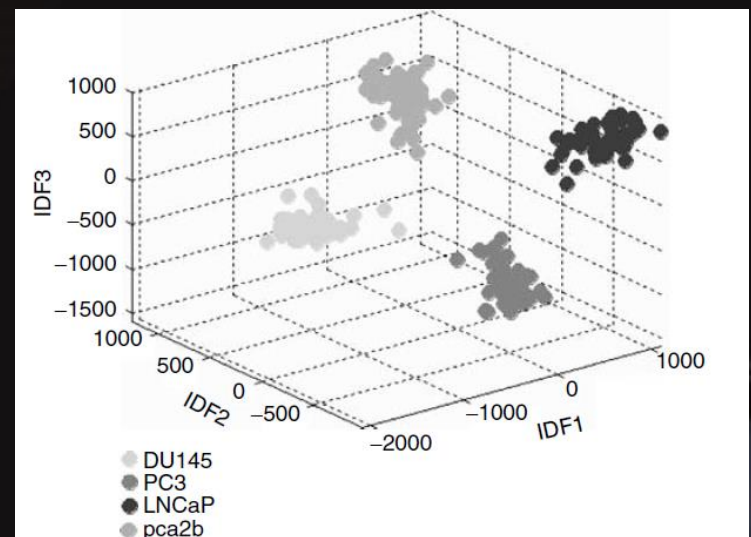
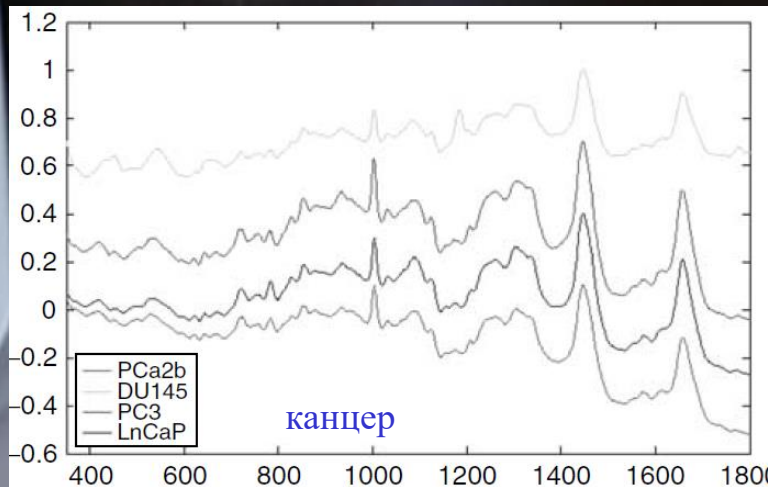
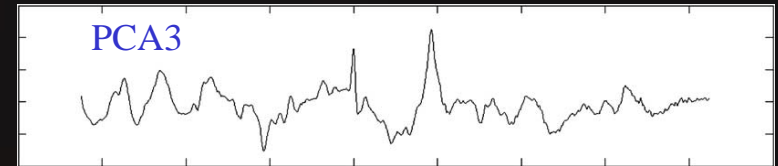
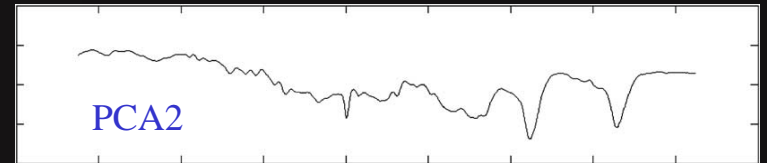
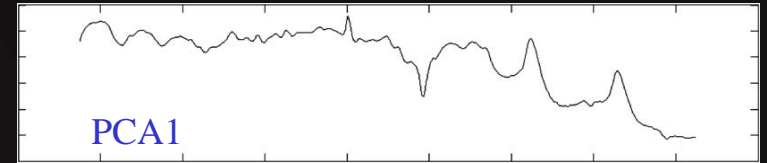


Table 1. Results of LDA classification of breast tumor spectra by grade.

| | L | I | H | % Accuracy | SP (%) | PPV (%) |
|---|----|----|----|------------|--------|---------|
| L | 19 | 1 | 1 | 90.5 | 100 | 100 |
| I | 0 | 26 | 8 | 76.5 | 97.6 | 94.1 |
| H | 0 | 0 | 22 | 100 | 85.9 | 77.9 |

Разликовање различитих ћелијских линија карцинома простате (Раман)





in vivo спектроскопија Раманска спектроскопија коже

- Уколико постоји екстерна оптичка проба повезана са спектрометром, могуће је добити и спектре коже *in situ*.
-
- Праћење дејства козметичких препарата
- Праћење пигментације коже
- Дијагностификовање канцера коже

Примене ИЦ микроскопије

- Детекција канцера коже (BCC и SCC карцином)

Разлика у интензитетима трака које одговарају вибрацијама фосфатних група у молекулима ДНК

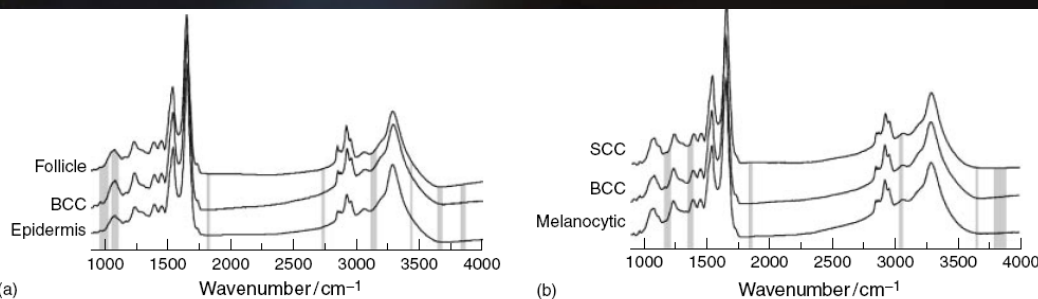
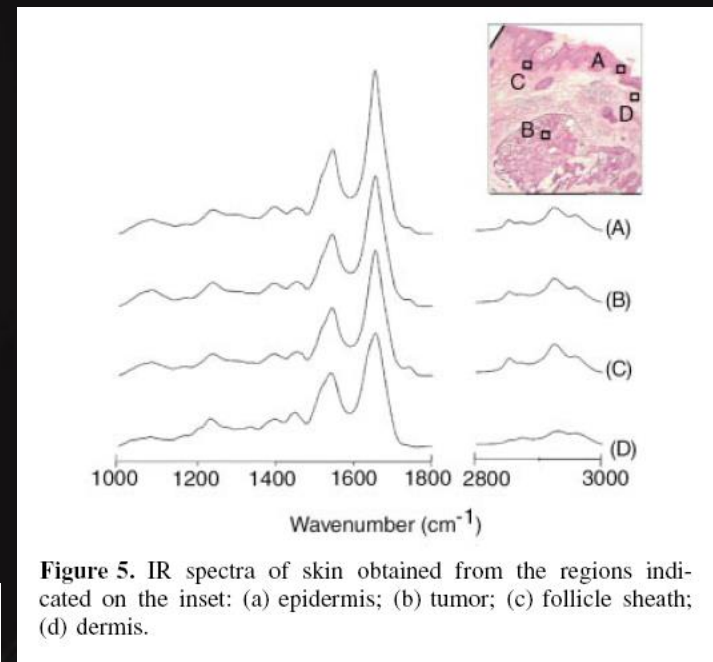
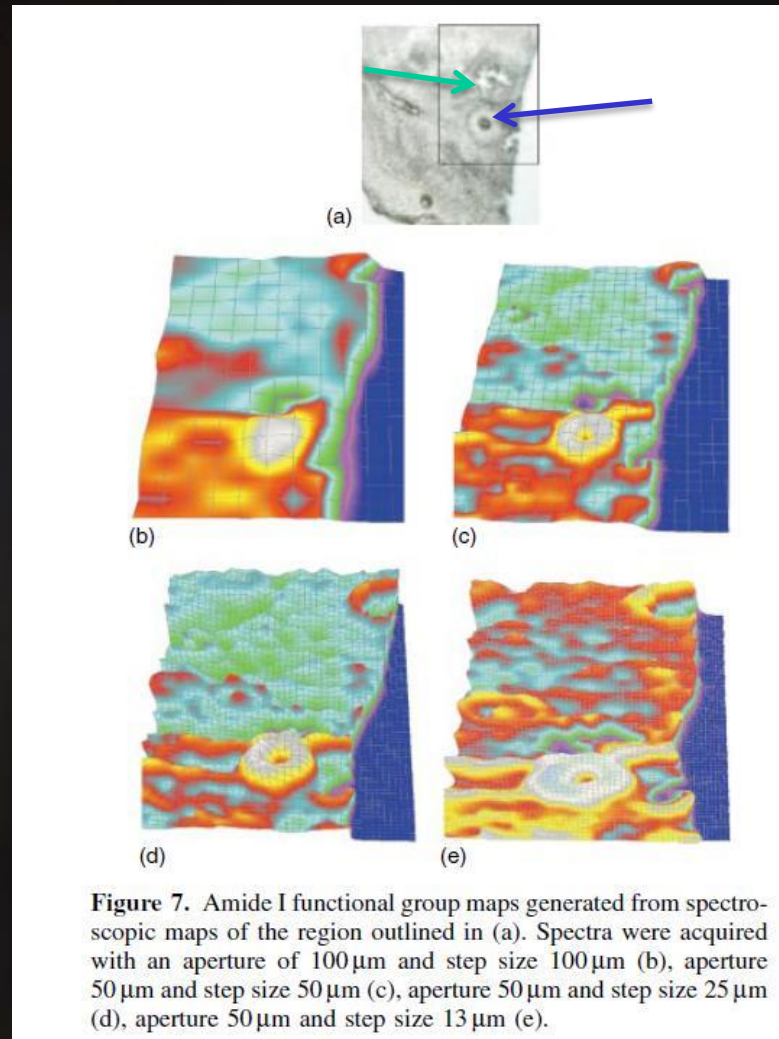


Figure 6. (a) Class average spectra of follicle sheath, BCC and epidermis. (b) Class average spectra of BCC, SCC and melanocytic lesions. Shaded areas are those selected by optimal region selection for classification.

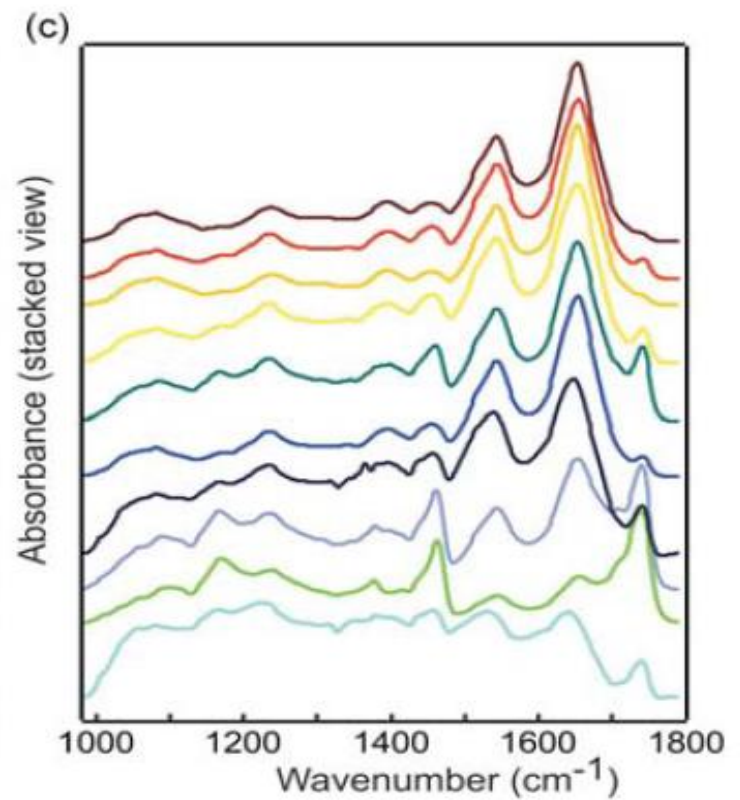
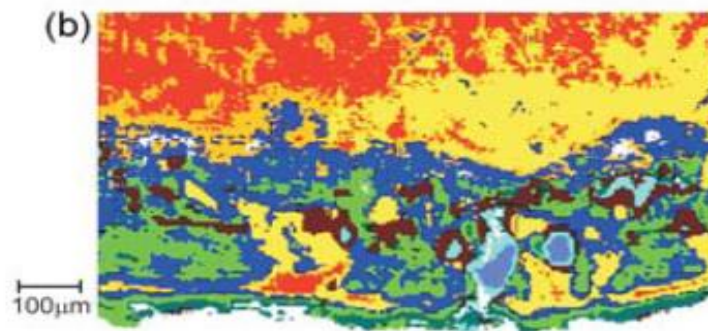
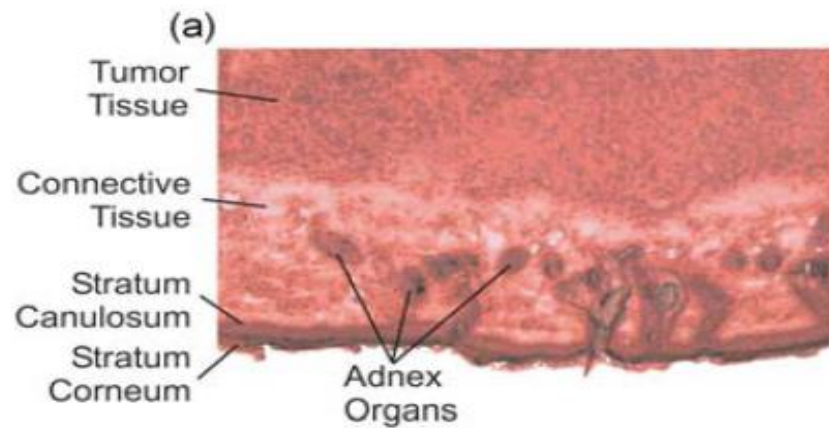
ИЦ и рамански имиџинг (2D-IR 2D- рамански спектри)

- Принцип ИЦ и раманског имиџинга се састоји у прикупљању спектара са одређене површине узорка (стандард 50x50 микрона)
- Овом методом добија велика количина података, што захтева доста времена за њихову анализу.
- Уместо тога примењује се мапирање интензитета одређених вибрација – као што је амидна I вибрација.

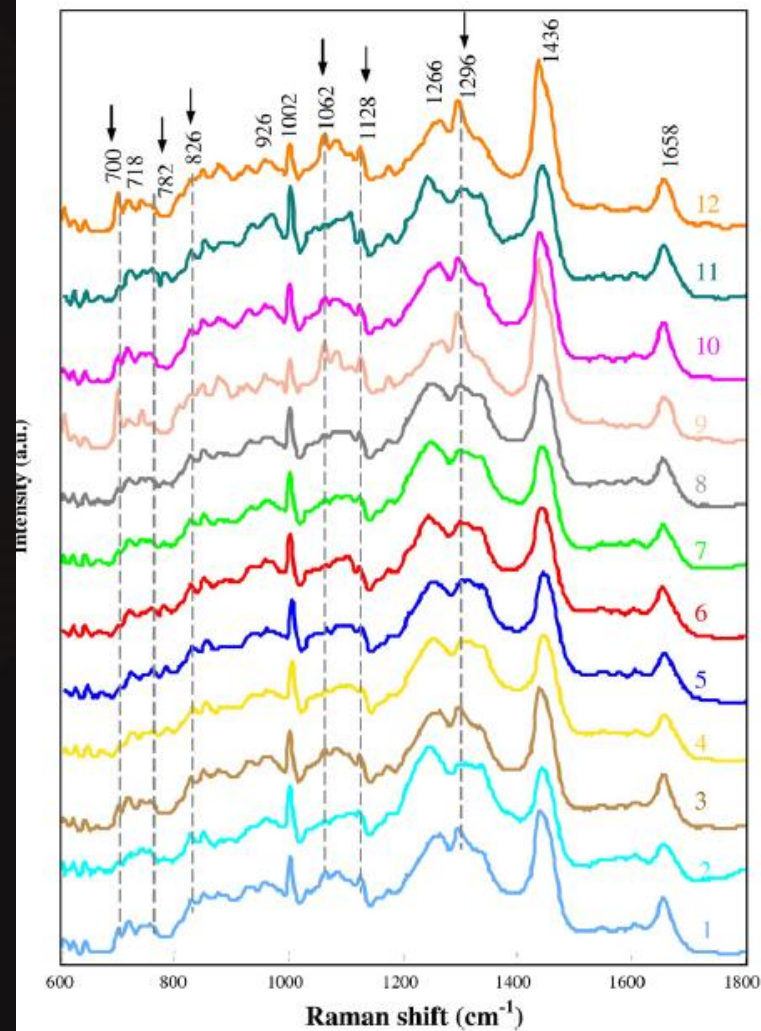
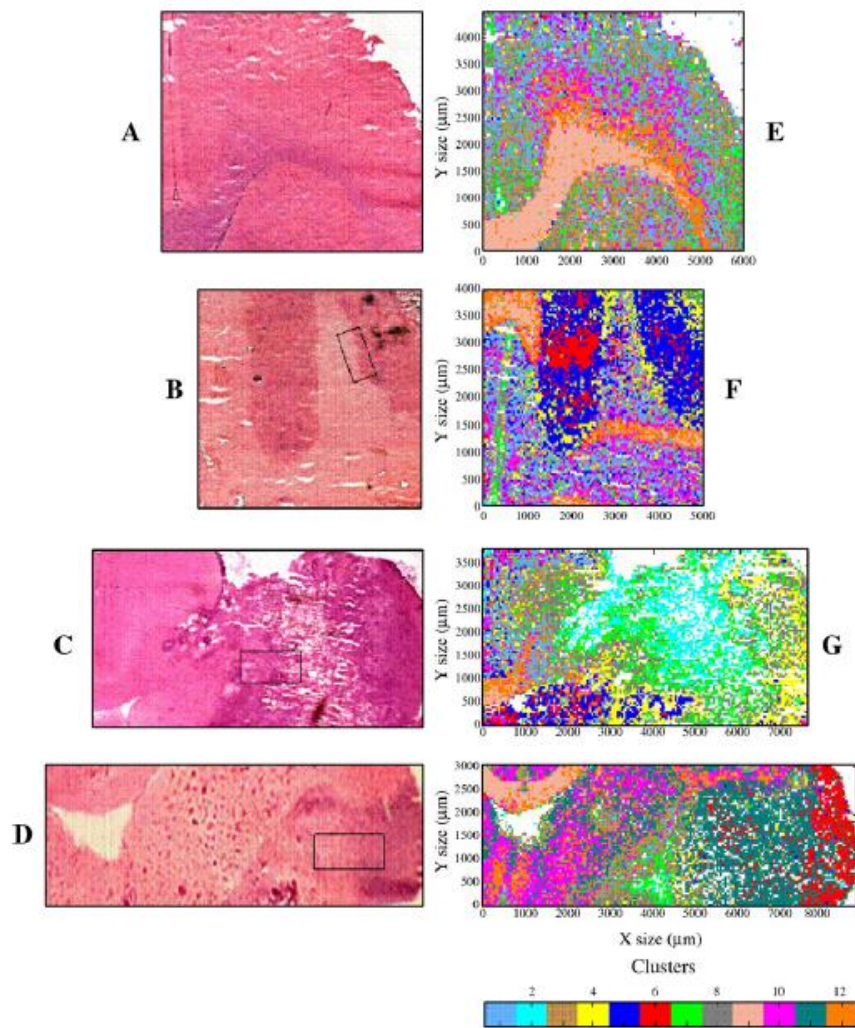
2D рамански имиџинг коже



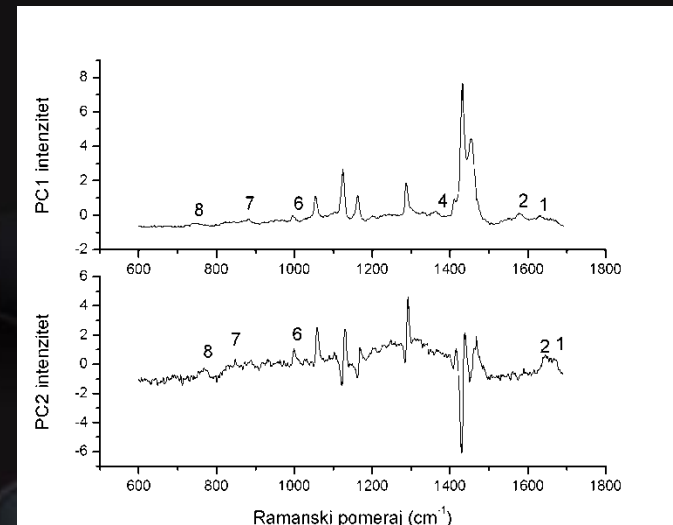
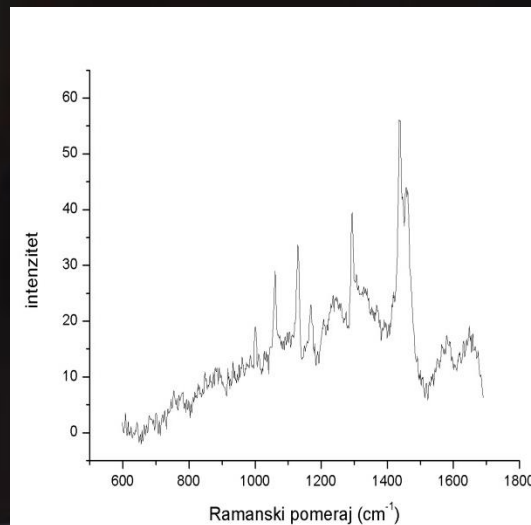
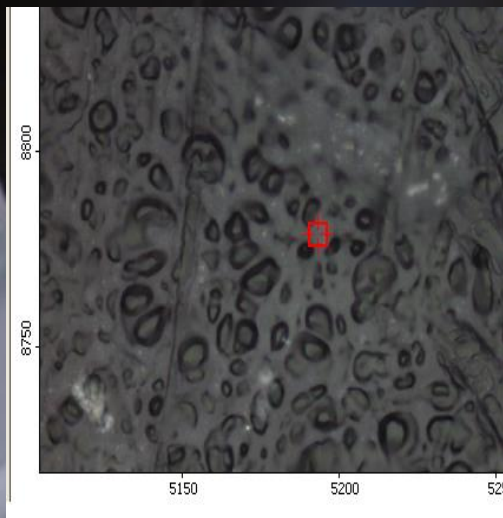
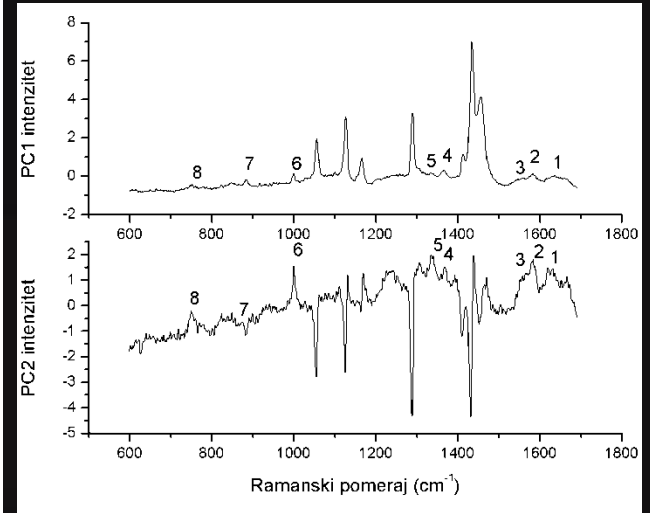
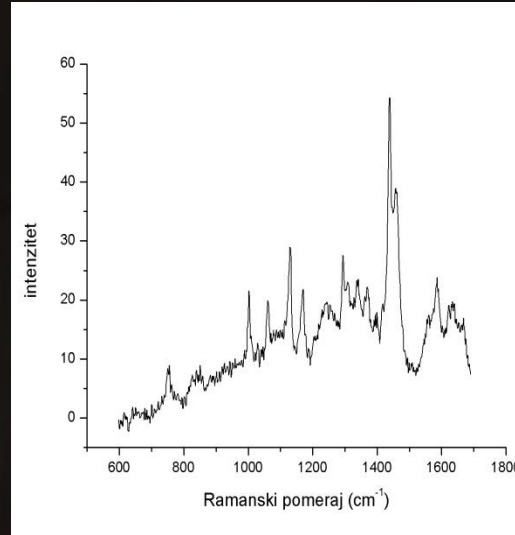
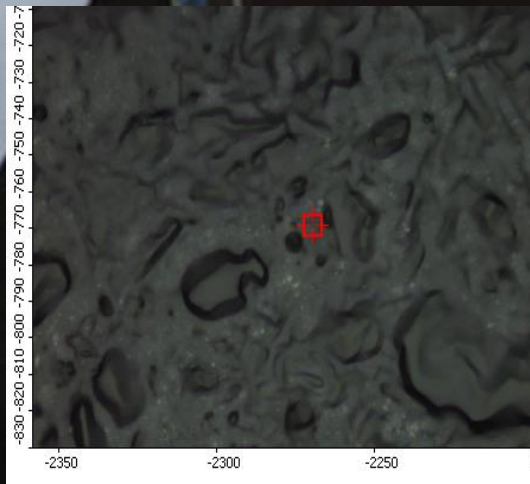
Тумор коже FTIR имидинг



Разликовање здравог ткива од тумора



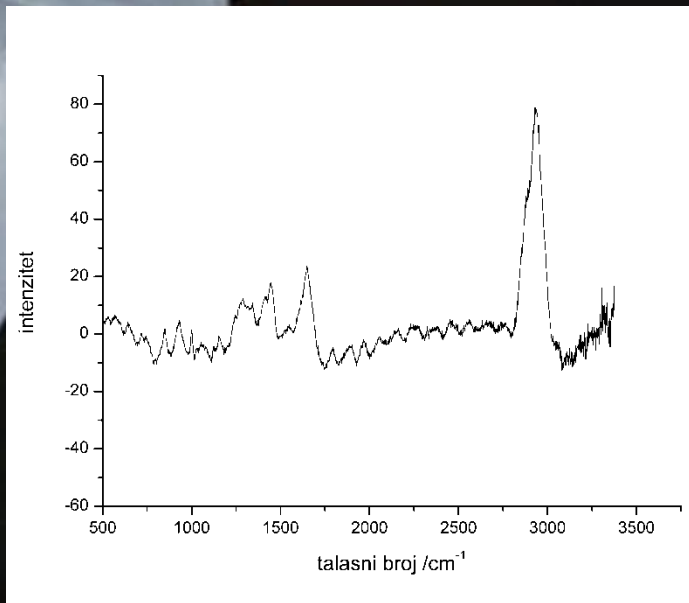
Раманска микроскопија парафинских препарата тумора мозга



М
Е
Т

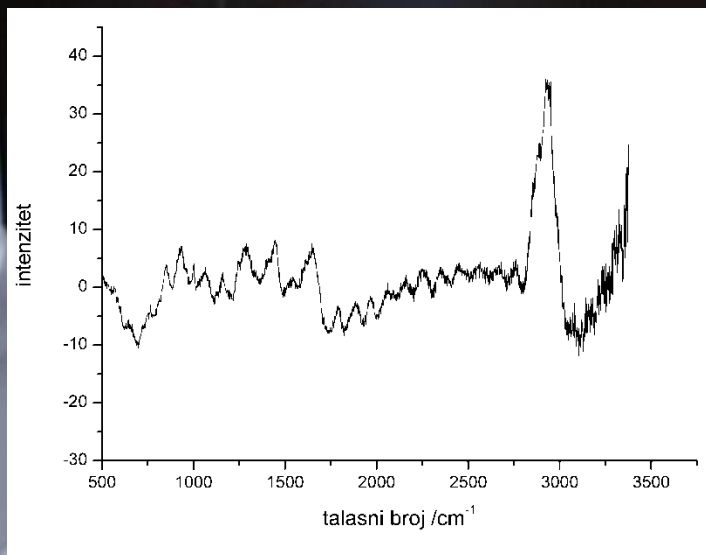
Г
В
М

In vivo Раманска спектроскопија коже (ексцитација 780 nm)



Ж

| особина | Успешност класификације |
|------------|-------------------------|
| Пол | 78,96 % |
| Боја очију | 60 % |
| Боја косе | 70.5 % |
| | |



М



In vivo праћење раста глиобластома

