



# Spektroskopia i obrazowanie Ramana





# LLSM \_Laboratorium Laserowej Spektroskopii Molekularnej



# <u>Laboratorium Laserowej</u> <u>Spektroskopii Molekularnej</u>







Pracownia spektroskopii Ramana *Ramanor U 1000 (Jobin Yvon), 488-514nm*  Pracownia obrazowania ramanowskiego

*Mikroskop Raman/AFM/SNOM/TERS* 



*Millennia, Tsunami, Empower30, Spitfire Ace, Topas (Spectra Physics)* 



www.mitr.p.lodz.pl/raman



### Widmo oscylacyjne

Zręby atomowe w molekule wykonują oscylacje wokół położenia równowagi. Ruch ten można rozłożyć na 3n-6 w przypadku molekuł nieliniowych oraz 3n-5 w przypadku molekuł liniowych, stopni swobody

### Model oscylatora harmonicznego

Oscylacje można rozpatrywać wykorzystując modele mechaniczne, posługując się prawami mechaniki klasycznej i dodając kwantowanie energii. Drgania zrębów atomowych w pierwszym przybliżeniu można rozpatrywać na modelu oscylatora harmonicznego.



W czasie drgania wychylenie q zmienia się periodycznie

q=Qcos2πνt

gdzie: v jest częstością drgania oscylatora, a Q jest amplitudą wychylenia.

Oscylator harmoniczny to taki oscylator, który spełnia prawo Hooke'a. Wynika z tego, że:

F = -fq

czyli, że siła jest proporcjonalna do wychylenia. Współczynnik proporcjonalności f nazywamy stałą siłową. Stała siłowa jest wielkością charakteryzującą " sprężystość" sprężyny i jest równa sile przypadającej na jednostkę wychylenia [N/m].

### **Energia oscylatora**

Ruch drgający opisuje równanie Lagrange'a:

$$\frac{d}{dt}\left(\frac{dT}{d\dot{q}}\right) + \frac{dU}{dq} = 0$$

po podstawieniu:

$$T=\frac{1}{2}m_{red}\ddot{q^2}$$

otrzymujemy:

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{f}{m_{red}}}$$
 [Hz]  $v = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{f}{m_{red}}}$  [cm<sup>-1</sup>]

$$m_{red} = \frac{m_1 \times m_2}{m_1 + m_2} \quad [kg]$$

### Energia oscylacji molekuł

Energia oscylacji zrębów atomowych w molekule jest skwantowana

$$E_{osc} = h\nu\left(\nu + \frac{1}{2}\right)$$
kwantowa liczba oscylacji
$$E_{osc} = \frac{h}{2\pi}\sqrt{\frac{f}{m_{red}}} \left(\nu + \frac{1}{2}\right)$$
kwantowa
liczba oscylacji
dla
$$\nu = 0$$

$$E_{osc} = \frac{1}{2}h\nu$$
kwant
połówkowy
oscylacje zrębów atomowych
NIE USTAJĄ !
$$\Delta E_{osc.} = \hbar\sqrt{\frac{f}{m_{red}}}$$

### **Oscylator anharmoniczny**

Oscylator anharmoniczny nie spełnia prawa Hooke'a.

Gdy nie znamy matematycznej postaci funkcji U(q) rozwijamy funkcję w szereg Taylora lub, jeśli to możliwe, w szereg Maclaurina.

$$U(q) = U_{q=0} + \frac{1}{1!} \left(\frac{dU}{dq}\right)_{q=0} q + \frac{1}{2!} \left(\frac{d^2U}{dq^2}\right)_{q=0} q^2 + \frac{1}{3!} \left(\frac{d^3U}{dq^3}\right)_{q=0} q^3 + \cdots$$

oscylatora annarmon

8.10<sup>-19</sup>  

$$(1 - e^{191/r - r_{0}})^{2}$$
  
 $(1 - e^{191/r - r_{0}})^{2}$   
 $(1 - e^{191/r - r_{0}})^{2}$ 

$$E_{osc.anh.} = h\nu\left(\nu + \frac{1}{2}\right) - h\nu x\left(\nu + \frac{1}{2}\right)^{2}$$

$$\Delta E_{osc.anh.} = h\nu[1 - 2x(\nu + 1)]$$

### Drgania molekuł

Drgania własne:

drgania, które nie powodują przemieszczenia środka masy molekuły ani jej obrotu

Drgania normalne:

jednoczesny ruch wszystkich zrębów atomowych molekuły odbywający się z jednakową częstością i zgodnie w fazie



### rodzaje drgań normalnych

#### Rozpraszanie promieniowania

#### Czy promieniowanie elektromagnetyczne, w którym nie ma fotonów pasujących do odstępów między poziomami energetycznymi, w ogóle nie oddziałuje z molekułami ?

Molekuła jest zbiorem ładunków elektrycznych dodatnich i ujemnych. Składowa elektryczna promieniowania elektromagnetycznego musi z nimi oddziaływać. Indukuje ona w molekule moment dipolowy proporcjonalny do natężenia E składowej elektrycznej pola, przy czym współczynnikiem proporcjonalności jest polaryzowalność molekuły.

$$\mu_{ind} = \alpha E \tag{1}$$

$$E = E_0 cos 2\pi v_0 t \tag{2}$$

$$\mu_{ind} = \alpha E_0 cos 2\pi v_0 t \tag{3}$$

$$I \sim M_{ind}^2 \nu_0^4 \tag{4}$$

### Opisane zjawisko nazywamy rozpraszaniem promieniowania



#### Spektroskopia i obrazowanie Ramana

#### Widmo RAMANA

Teoria polaryzowalności Placzka

polaryzowalność: potencjalna zdolność przemieszczania się elektronów względem jąder w polu elektrycznym

(2)

$$\alpha(q) = \alpha_{q=0} + \frac{1}{1!} \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_{q=0} q + \frac{1}{2!} \left(\frac{d^2\alpha}{dq^2}\right)_{q=0} q^2 + \cdots$$
 (3)

 $\mu_{ind} = \alpha E_0 cos 2\pi \nu_0 t \quad (1)$ 

 $q = Q\cos 2\pi \nu t \qquad (4)$ 

$$\alpha(q) = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 Q\cos 2\pi \nu t \qquad (5)$$

polaryzowalność zmienia się z częstością drgania normalnego, ale tylko wtedy gdy pochodna polaryzowalności po współrzędnej drgania nie jest równa zero ostatecznie można pokazać, że:

$$\mu_{ind} = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi \nu_0 t + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 Q E_0 \cos 2\pi (\nu_0 - \nu) t + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 Q E_0 \cos 2\pi (\nu_0 + \nu) t$$
 (6)



rozpraszanie Rayleigha rozpraszanie Ramana skladowa stokesowska rozpraszanie Ramana skladowa antystokesowska

# ZASTOSOWANIA SPEKTROSKOPII RAMANA



# **CEL BADAŃ**

Obecnie stosowane metody analizy układów biologicznych obrazowania są bardzo często ograniczone ze względu na niedostateczną czułość, swoistość, a także rozdzielczość przestrzenną, czasową oraz spektralną.



# **CEL BADAŃ**



# IDENTYFIKACJA ZMIAN NOWOTWOROWYCH RÓZNYCH NARZĄDÓW CZŁOWIEKA: MÓZGU, PIERSI, PRZEWODU POKARMOWEGO, ORANÓW GŁOWY-SZYI.





Nowotwory to schorzenia w głównej mierze osób starszych, przy starzejącym się społeczeństwie trzeba być przygotowanym na wzrost liczby zachorowań

# IISM MAR

Współczynnik zachorowań na nowotwory złośliwe na 100 tys. mieszkańców w roku 2011



## Spektroskopia i obrazowanie RAMANA





### Spektroskopia i obrazowanie RAMANA















pacjent P115

Halina Abramczyk<sup>\*</sup>, Beata Brozek-Pluska

Mammaglobin, palmitic acid and sphingomyelin

Lodz University of Technology, Institute of Applied Radiation Chemistry, Laboratory of Laser Molecular Spectroscopy, Wroblewskiego 15, 93-590 Lodz,

New look inside human breast ducts with Raman imaging. Raman

candidates as diagnostic markers for breast cancer prognosis:

(E) CrossMark



arachidonic acid



sphingomyelin



oleic acid



collagen



palmitic acid



β-carotene



mammaglobin-A



stearic acid



ALCONTRACTOR SPECTROM	Contents lists available at ScienceDirect	12	
S Pier	Analytica Chimica Acta	識別	
ELSEVIER	journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca		

New look inside human breast ducts with Raman imaging. Raman candidates as diagnostic markers for breast cancer prognosis: Mammaglobin, palmitic acid and sphingomyelin



Halina Abramczyk<sup>\*</sup>, Beata Brozek-Pluska

Lodz University of Technology, Institute of Applied Radiation Chemistry, Laboratory of Laser Molecular Spectroscopy, Wroblewskiego 15, 93-590 Lodz, Poland



tkanka zmieniona nowotworowo ductal carcinoma in situ, G1 and G2 pacjent P115



New look inside human breast ducts with Raman imaging, Raman candidates as diagnostic markers for breast cancer prognosis: Mammaglobin, palmitic acid and sphingomvelin



Halina Abramczyk<sup>\*</sup>, Beata Brozek-Pluska

Lodz University of Technology, Institute of Applied Radiation Chemistry, Laboratory of Laser Molecular Spectroscopy, Wroblewskiego 15, 93-590 Lodz,





# tkanka o utkaniu prawidłowym pacjent P80



Raman microspectroscopy of noncancerous and cancerous human breast tissues. Identification and phase transitions of linoleic and oleic acids by Raman low-temperature studies<sup>†</sup>









tkanka zmieniona nowotworowo IDC. łac. carcinoma ductale infiltrans mammae pacjent P80



Raman microspectroscopy of noncancerous and cancerous human breast tissues. Identification and phase transitions of linoleic and oleic acids by Raman low-temperature studies†

Beata Brozek-Pluska,\* Monika Kopec, Jakub Surmacki and Halina Abramczyk



# Przeprogramowanie metaboliczne lipidów w komórkach nowotworowych

Przez wiele lat fenotyp lipidów był ignorowany przez środowisko naukowe, które skupiało się niemal wyłącznie na biosyntezie białek i profilu proteomu, czyli kompletnego zestawu białek danego organizmu (z ang. protein complement of the genome), kodowanych przez genom.



# Analiza przejść fazowy kwasu oleinowego (OA) i linolowego (LA)

Cite this: Analyst, 2015, 140, 2134



OA



Phase Transitions in Oleic Acid and in Human Breast Tissue As Studied by Raman Spectroscopy and Raman Imaging

Beata Brozek-Pluska,<sup>†</sup> Joanna Jablonska-Gajewicz,<sup>‡</sup> Radzislaw Kordek,<sup>‡</sup> and Halina Abramczyk\*<sup>,†</sup>

<sup>†</sup>Laboratory of Laser Molecular Spectroscopy, Institute of Applied Radiation Chemistry, Technical University of Lodz, Wroblewskiego 15, 93-590 Lodz, Poland

<sup>4</sup>Department of Pathology, Chair of Oncology, Medical University of Lodz, Paderewskiego 4, 93-509 Lodz, Poland

Raman microspectroscopy of noncancerous and cancerous human breast tissues. Identification and phase transitions of linoleic and oleic acids by Raman low-temperature studies<sup>†</sup>

# Obrazowanie Ramana ludzkich tkanek głowy i szyi analiza konformacji białek



Beata Brozek-Pluska,\*\* Monika Kopec,\* Izabela Niedzwiecka<sup>b</sup> and Alina Morawiec-Sztandera<sup>b</sup>

#### Przypisanie pasma Amidu I do różnych postaci struktury drugorzędowej białek

Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. & Ruysschaert, J.-M.

3	upu	en.	DIU	CILE	;

Struktura drugorzędowa	Położenie maximum [1/cm]	Zakres [1/cm]	
$\alpha$ -helisa	1654	1648-1657	
β-kartka	1633	1623-1641	
β-kartka	1684	1674-1695	
pętle	1672	1662-1686	
Forma nieuporządkowa na	1654	1642-1657 5 1.2- 1.2- 1.0- 1.0-	Ţ
		β-sheet/α-helix proteins o	noncancerous











#### Medulloblastoma, grade IV

Astrocytoma, grade II

# Obrazowanie Ramana linii komórkowych ludzkiego gruczołu piersiowego



MCF-7

**MCF-10A** 

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

Halina Abramczyk,\*\* Jakub Surmacki,\* Monika Kopeć.\* Alicja Klaudia Olejnik; Katarzyna Lubecka-Pietruszewska<sup>b</sup> and Krystyna Fabianowska-Majewska<sup>b</sup>

Analyst

#### **MDA-MB-231**

# Obrazowanie Ramana linii komórkowych ludzkiego gruczołu piersiowego





**Lipid droplets** (2820-2870 1/cm)



PAPER



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

Katarzyna Lubecka-Pietruszewska<sup>b</sup> and Krystyna Fabianowska-Majewska<sup>b</sup>

Halina Abramczyk,\*\* Jakub Surmacki,\* Monika Kopeć,\* Alicja Klaudia Olejnik,\*

CHEMISTRY



**Proteins/DNA** (2900-2980 1/cm)



1.819E5 CCD cts

0 CCD cts

Fluorescence of Red Oil O

# Obrazowanie Ramana linii komórkowych ludzkiego



Sum [1570 a.u. -> 1595 a.u.]



Sum [2840 a.u. -> 2900 a.u.]



Sum [1630 a.u. -> 1685 a.u.]





METODY REDUKCJI CHEMICZNEJ METODY MIKROEMULSYJNE METODY SONOCHEMICZNE ABLACJA LASEROWA METODY RADIACYJNE TERMICZNA DEKOMPOZYCJA



- Cząsteczki zaadsorbowane na chropowatych powierzchniach niektórych metali (Ag, Au, Cu) dają bardzo intensywny sygnał ramanowski.
- Wzmocnienie rozpraszania ramanowskiego w stosunku do zwykłych warunków rejestracji widma jest rzędu 10<sup>6</sup> lub większe.
- 1974- Pierwsza wzmianka o zaskakująco silnym rozproszeniu ramanowskim: Fleischmann *et al.* - rejestracja widm ramanowskich pirydyny zaadsorbowanej na elektrodzie srebrowej poddanej uprzednio kilkukrotnemu cyklowi utlenianie-redukcja
- 1977 Jeanmaire & Van Duyne oraz Albrecht & Creighton wykazują, że obserwowane w tych warunkach silne wzmocnienia sygnału ramanowskiego nie da się wyjaśnić zwiększoną powierzchnią adsorpcyjną metalu.



Obecnie przyjmuje się, że obserwowane wzmocnienie sygnału jest wypadkową dwóch mechanizmów: wzmocnienia chemicznego oraz wzmocnienia pola elektromagnetycznego.





 $NaBH_4 + 8AgNO_3 + 4H_2O \rightleftharpoons Na[B(OH)_4] + 8Ag + 8HNO_3$ 

400

600 7 wavelength (nm)

cytrynian sodu bromek potasu nadtlenek wodoru











# Obrazowanie Ramana ludzkich linii komórkowych SERS







# Widma Ramana soli czterosodowej tetrasulfonowanej ftalocyjaniny miedzi w roztworze wodnym i krwi ludzkiej



Available online 3 March 2005

Mechanizm fotochemiczny oddziaływania promieniowania laserowego wykorzystuje się do biostymulacji i w metodzie fotodynamicznej. Metoda terapii fotodynamicznej (PDT) polega na selektywnym utlenianiu materiału biologicznego tkanki nowotworowej przez tlen singletowy lub formy rodnikowe. Pozwala, najogólniej mówiąc, na wybiórcze niszczenie tkanek nowotworowych, chroniąc jednocześnie tkanki zdrowe. Metoda ta jest stosowana w leczeniu nowotworów skóry, dróg moczowo – płciowych, płuc, przełyku, języka, gardła, jelit, pęcherza moczowego.



# Obrazowanie Ramana tkanek ludzkiego gruczołu piersiowego zawierających ftalocyjaniny



Halina Abramczyk,\*\* Beata Brozek-Pluska,\* Jakub Surmacki,\* Jacek Musial<sup>b</sup> and Radzislaw Kordek<sup>b</sup>

# Obrazowanie Ramana tkanek ludzkiego gruczołu piersiowego zawierających porfiryny



Spectrochimica Acta Part A, 2016 submmited

# **Obrazowanie Ramana**





# **Obrazowanie Ramana**



Fig. 1. Raman spectroscopy system for intraoperative detection (A) Photograph of the handheld contact probe, with the attached neuronavigation tracking unit. (B) Illustration of the probe being used intraoperatively, with the neuronavigation system showing the location of the tip of the probe (cross hairs) on the preoperative MR images.

# **Obrazowanie Ramana**







AFM





http://www.witec.de/techniques/afm

#### Tryb kontaktowy Tryb bezkontaktowy Tryb kontaktu przerywanego



Strefy potencjału Lennarda-Jonesa wykorzystywanego przez podstawowe tryby pracy AFM-u

## **SNOM-** scanning optical near field microscopy





**AFM** 



9 μm





# adhezja

9 µm

sztywność









