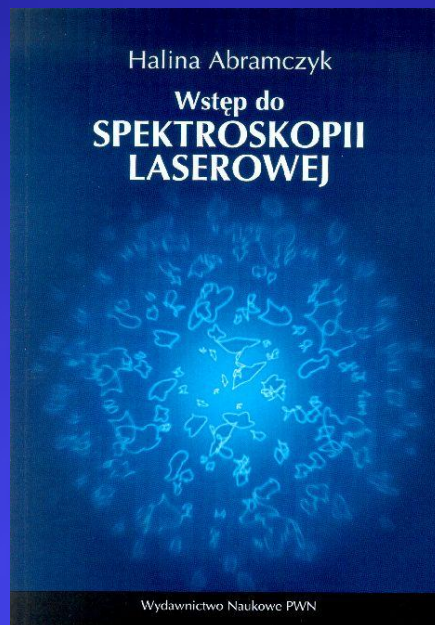




WYKŁAD 9

• *Prof. dr hab. Halina Abramczyk*

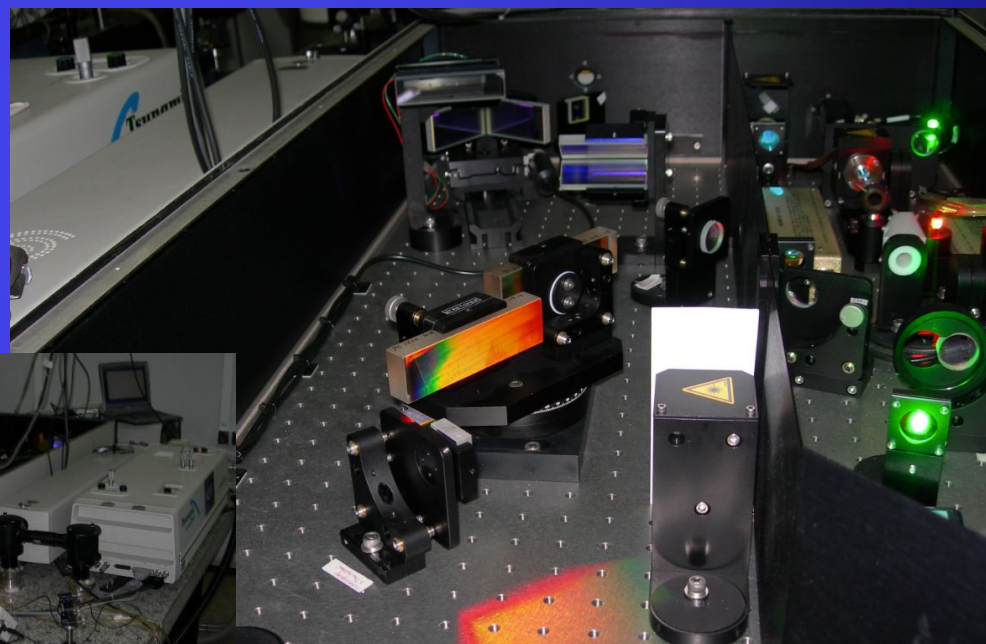
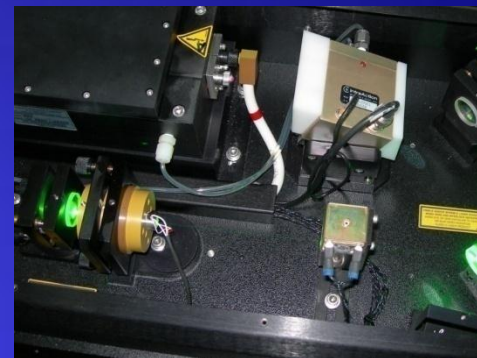
POLITECHNIKA ŁÓDZKA

• *Wydział Chemiczny, Instytut Techniki Radiacyjnej*

• *Laboratorium Laserowej Spektroskopii Molekularnej*

LABORATORIUM LASEROWEJ SPEKTROSKOPII MOLEKULARNEJ

Politechnika Łódzka
Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej
93-590 Łódź
Wróblewskiego 15
tel: (48-42) 6313175, 6313162, 6313188
fax: (48-42) 6840043
<http://www.mitr.p.lodz.pl/raman>



WYKŁAD 9

- ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII IR I
SPEKTROSKOPII RAMANA W
MEDYCYNIE

**NANO-, PIKO- FEMTO-
TECHNOLOGIE LASEROWE**

SPEKTROSKOPIA RAMANA

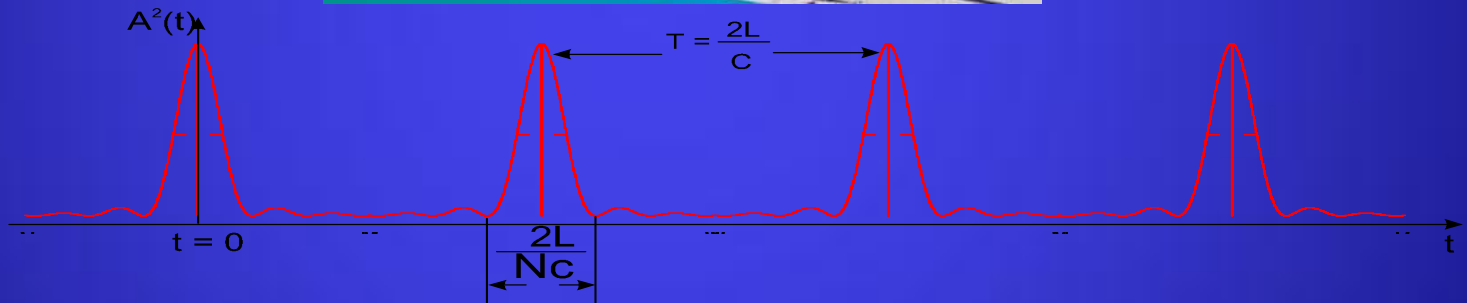
**NANODIAGNOSTYKA
MEDYCZNA**

Technologia laserowa

- telekomunikacja
- diagnostyka medyczna
- optoelektronika
- fotonika
- inżynieria materiałowa
- technologia światłowodowa

FEMTOLAND

$$1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$$



Small but mighty—the power of concentration

Parametry

moc szczytowa– 0.12 MW ; elektrownia EC-2 00 MW

moc szczytowa po wzmacnieniu– 10 GW ;

elektrownia Bełchatów 4 GW

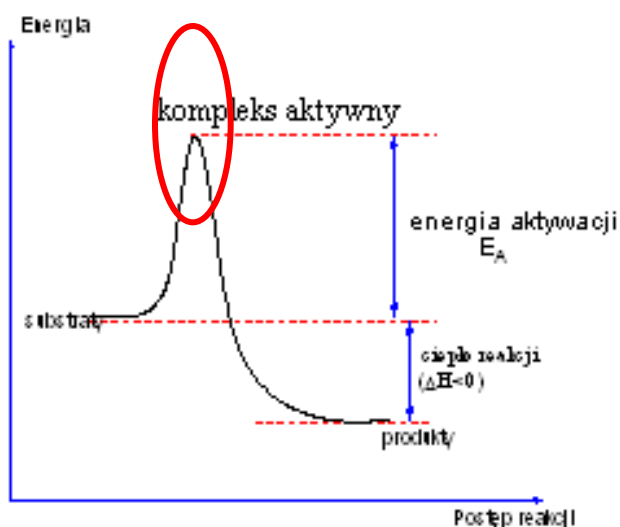
gęstość energii– 10^8 W/cm^2

po wzmacnieniu– 10^{11} W/cm^2

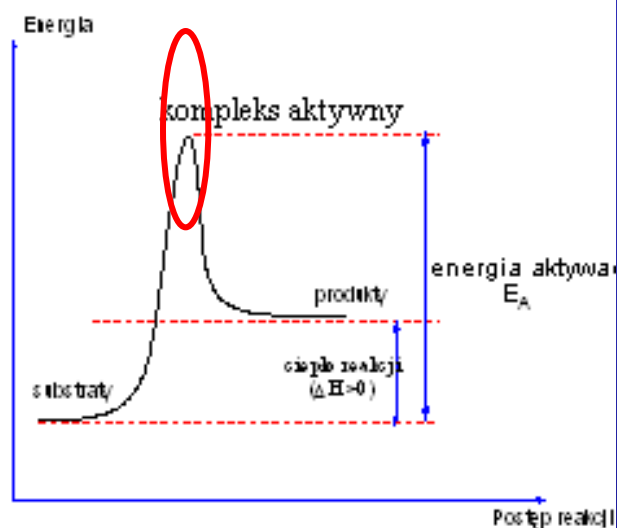
Jak możemy wykorzystać tak krótkie impulsy?

Możemy fotografować reakcje chemiczne

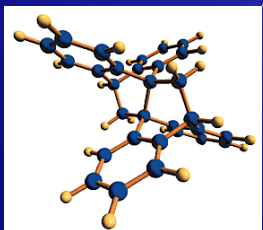
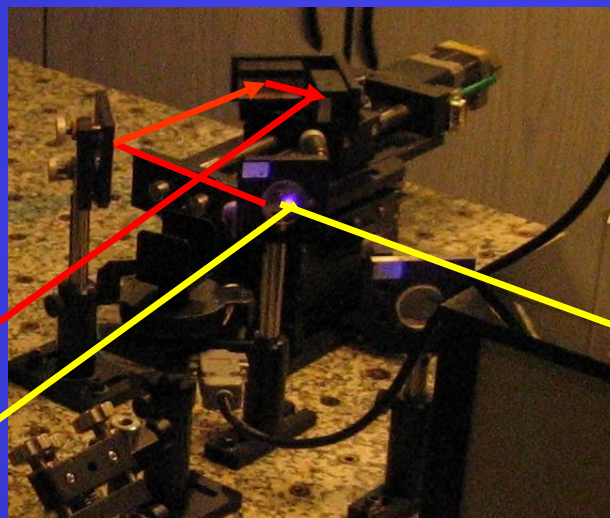
Reakcja egzotermiczna



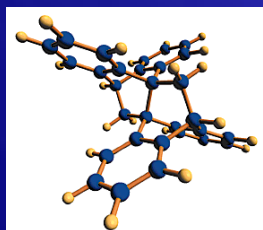
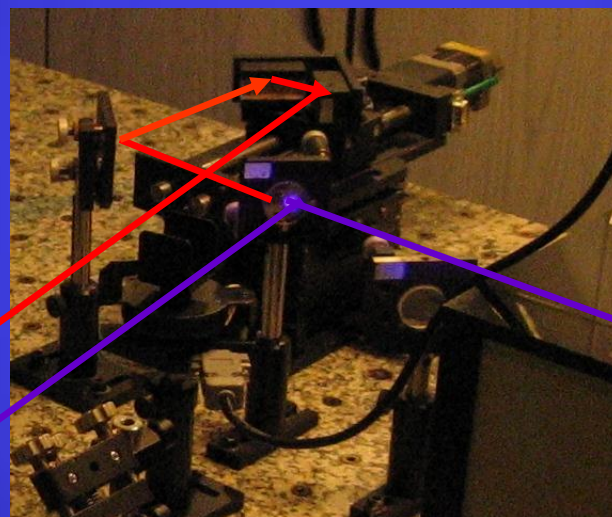
Reakcja endotermiczna



Jak możemy monitorować tak szybkie procesy?
Metoda pump-probe



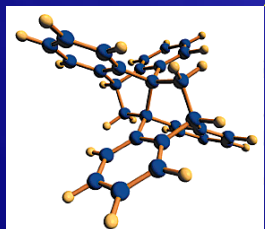
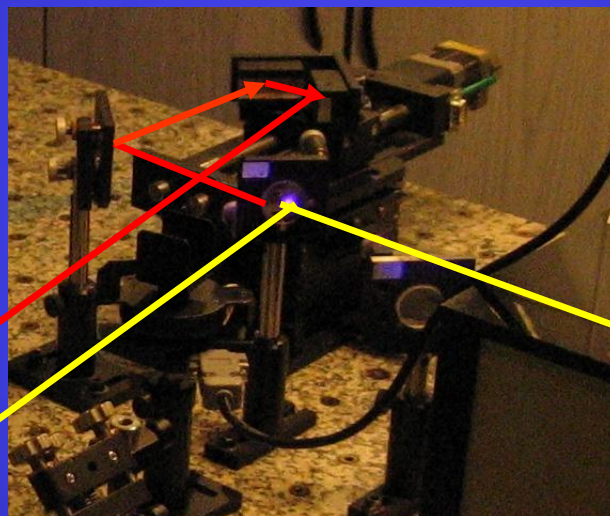
Jak możemy monitorować tak szybkie procesy? Metoda pump-probe



Jestem pierwsza.
Wzbudzę
elektrony!

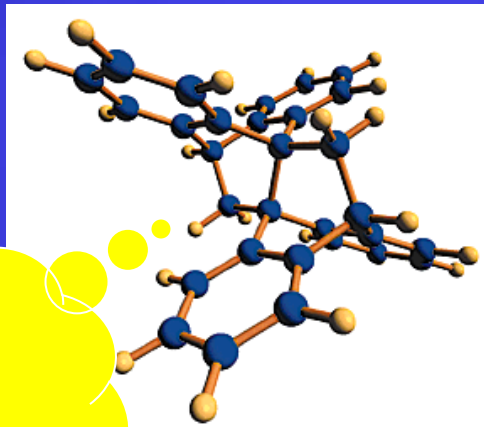
Jak możemy monitorować tak szybkie procesy? Metoda pump-probe

Nadchodzę po
kilku
femtosekundach



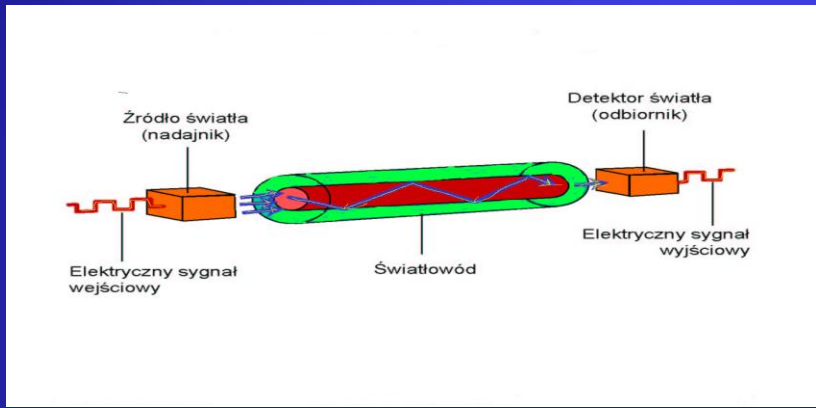
Jestem pierwsza.
Wzbudzę
elektrony!

Zółta zmieniła
moją absorpcję!
Jak?
Zmierzy to wiązka
czerwona!



Pa, PA !

Jak możemy wykorzystywać w praktyce tak krótkie impulsy?



Time frame	WDM Type	Channels	Wavelength	Channel Spacing
1980's	Wideband	2	1310nm, 1550nm	-
Early 90's	Narrowband	2 - 8	C-band	200-400 GHz
Mid 90's	Dense	16 - 40	C-band	100-200 GHz
Late 90's	Dense	64 - 160	C-band	25-50 GHz
Current	Dense	160 - 320	C/L-Band	12.5-25 GHz

- Fast optical networks utilizing the wavelength multiplexing technologies WDM, DWDM, UWDM are one of the greatest beneficiaries of the modern laser technology in building of complete optical platforms that includes
 - optical fibers
 - lasers, modulators, reflectometers
 - optical amplifiers
 - multiplexers and demultiplexers
 - switches and teracommutators

PLAN WYKŁADU

- Przegląd głównych rutynowych technik medycznego obrazowania (MRI, X, CT, PET, ultradźwięki)
- Podstawy mikroskopii konfokalnej
- Liniowe i nieliniowe rozpraszanie Ramana (spontaniczne rozpraszanie Ramana, CARS, wymuszone rozpraszanie Ramana (SRS), femtosekundowe wymuszone rozpraszanie Ramana (FSRS)
- Inne metody optyki nieliniowej z zastosowaniem laserów femtosekundowych (2-fotonowa fluorescencja (two photon excited fluorecence TPEF) oraz zastosowania II i III harmonicznej (SHG, THG)
- Najnowsze wyniki z Laboratorium Laserowej Spektroskopii Molekularnej PL - Diagnostyka nowotworu gruczołu piersiowego metodą spektroskopii Ramana i obrazowania Ramana

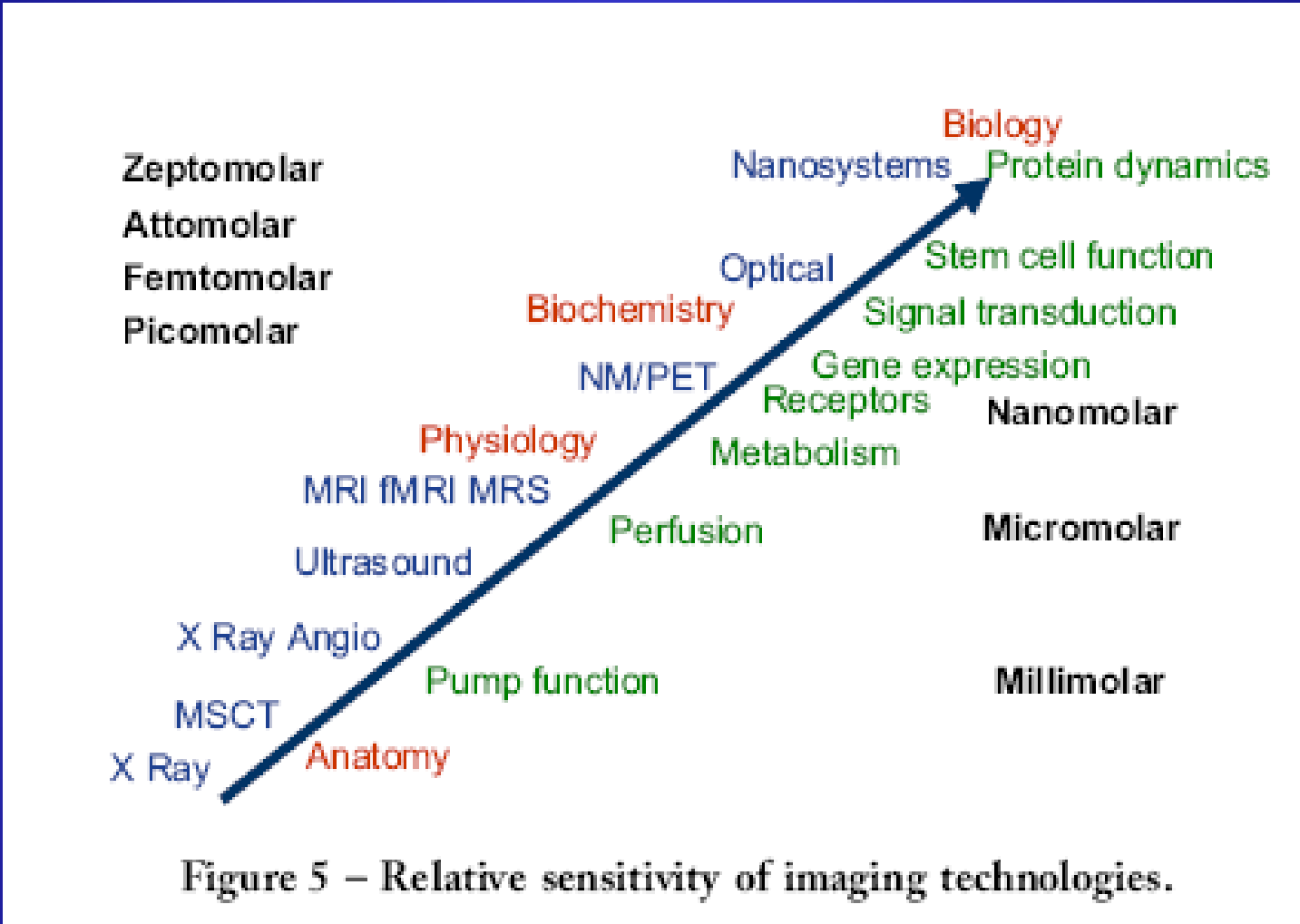


Figure 5 – Relative sensitivity of imaging technologies.

Cancer is a multifactorial disease and imaging is able to demonstrate the various mechanisms and phases of pathogenesis. The combination of information using different modalities, various imaging agents and various biomarkers will improve the sensitivity and specificity. As a result there has been an increased use of imaging of biomarkers demonstrating metabolism, cell proliferation, cell migration, protein expression, gene expression, signal transduction, hypoxia, apoptosis

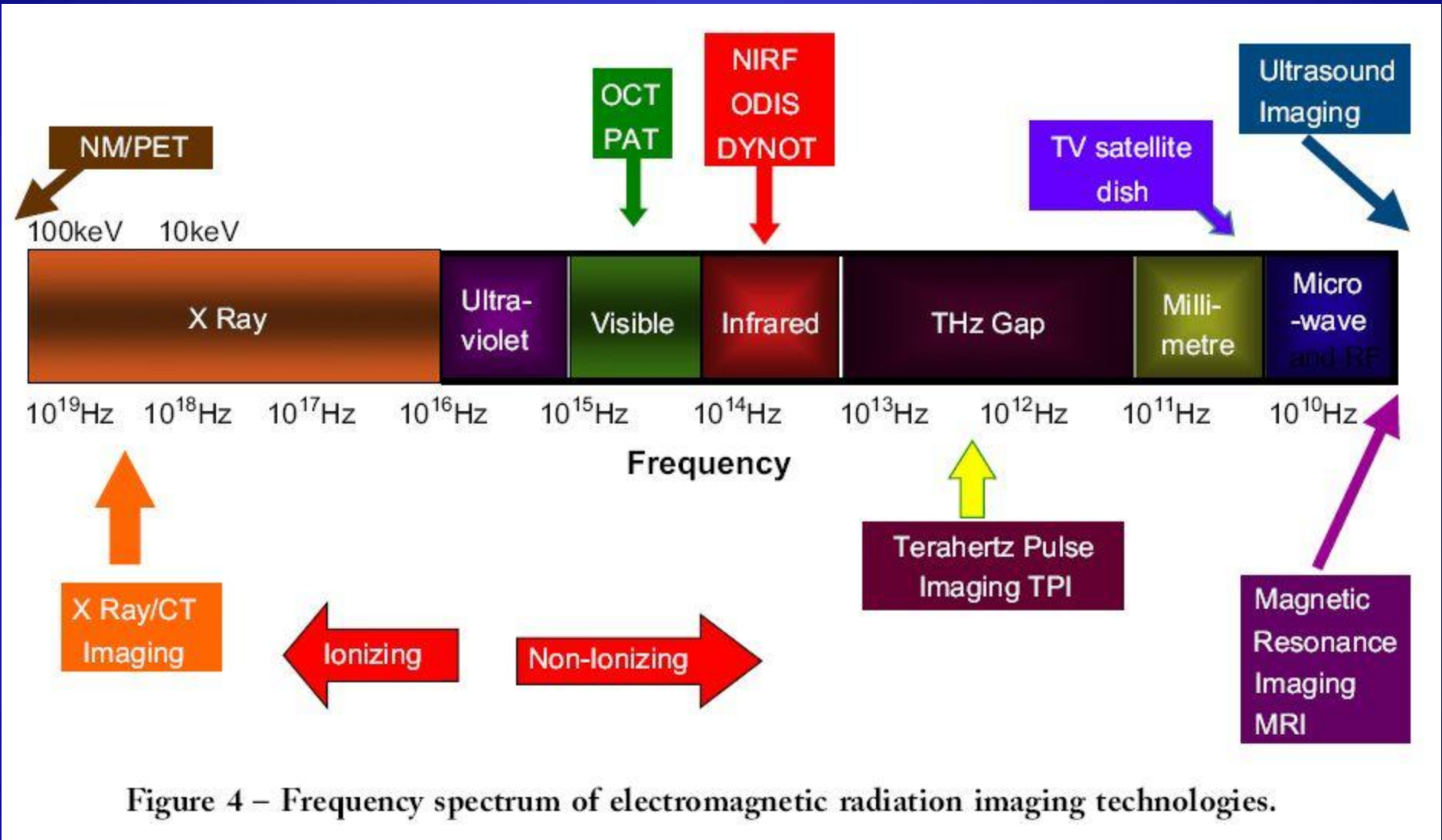


Figure 4 – Frequency spectrum of electromagnetic radiation imaging technologies.

Obrazowanie nie jest metodą leczenia samą w sobie, ale może ono pomóc w wyborze najkorzystniejszego sposobu leczenia. Niektóre metody obrazowania mogą być przydatne również w diagnozowaniu chorób nowotworowych, mogą one pomagać w określeniu jak zaawansowana jest choroba, jak działają dostarczane do organizmu leki i jak efektywna jest zastosowana procedura leczenia.

Zastosowanie obrazowania

➤ **Badania przesiewowe nowotworów**

Obrazowanie może być wykorzystywane w celu sprawdzenia czy w organizmie pacjenta występują podejrzanе struktury mogące mieć charakter nowotworowy.

Mammografie są przykładem bardzo dobrze znanej metody obrazowania używanej do badania raka piersi. Badania przesiewowe są szczególnie polecane osobom z grup podwyższonego ryzyka (ze względu na wiek, historię zachorowań w rodzinie czy też styl życia) w celu zdiagnozowania różnych typów nowotworów.

➤Diagnostyka

Obrazowanie może być wykorzystywane do określenia gdzie zlokalizowany jest nowotwór i jaki jest stopień rozwoju choroby. W tym sensie obrazowanie może pomóc w określeniu stopnia zaawansowania choroby i stwierdzeniu czy nowotwór jest umiejscowiony w środku, na zewnątrz czy też w pobliżu ważnych organów wewnętrznych lub naczyń krwionośnych. Jeśli konieczna jest biopsja (pobranie małego fragmentu z guza do celów diagnostycznych) obrazowanie jest przydatne w precyzyjnej lokalizacji nowotworu i pobraniu wycinka do analizy.

➤Dobór metody leczenia

Obrazowanie może być także przydatne w kontekście sterowania leczeniem by było one jak najmniej inwazyjne i skupione na tkance nowotworowej. Np. ultrasonografia, MRI czy CT mogą być używane do bardzo dokładnego zlokalizowania guza dzięki czemu leczenie może obejmować prawie wyłącznie tkanki guza jak najmniej uszkadzając tkanki otaczające.

➤ **Nadzorowanie efektywności podjętego leczenia**

Obrazowanie może także pozwolić na śledzenie postępów stosowanej terapii. Dzięki obrazowaniu można śledzić czy guz ulega zmniejszeniu czy też rozrasta się. Zastosowanie znajdują tutaj, wykonywane regularnie badania technikami takimi jak: prześwietlenia promieniami X, MRI czy CT. PET i inne techniki medycyny nuklearnej są wykorzystywane do badań mających stwierdzić czy guz atakuje najważniejsze życiowe narządy. MNR jest zaś stosowany do badań mających na celu śledzenie zmian chemicznych zachodzących w nowotworach.

➤ **Monitorowanie nawrotów choroby nowotworowej**

Obrazowanie może być używane także do diagnozowania nawrotów choroby nowotworowej i śledzenia jej rozprzestrzeniania się w organizmie.

KONTRAST OBRAZOWANIA

Endogenne mechanizmy:

- Absorpcja, odbicie, transmisja
- Podatność magnetyczna
- Relaksacja magnetyczna
 - Dyfuzja wody
 - Spin magnetyczny
 - utlenianie
 - Rozkład widmowy
 - Temperatura
 - Elektryczna impedancja
- Przesunięcie częstości akustycznej
 - elastyczność mechaniczna
- Rozpraszanie Raman (indukowana polaryzowalność)

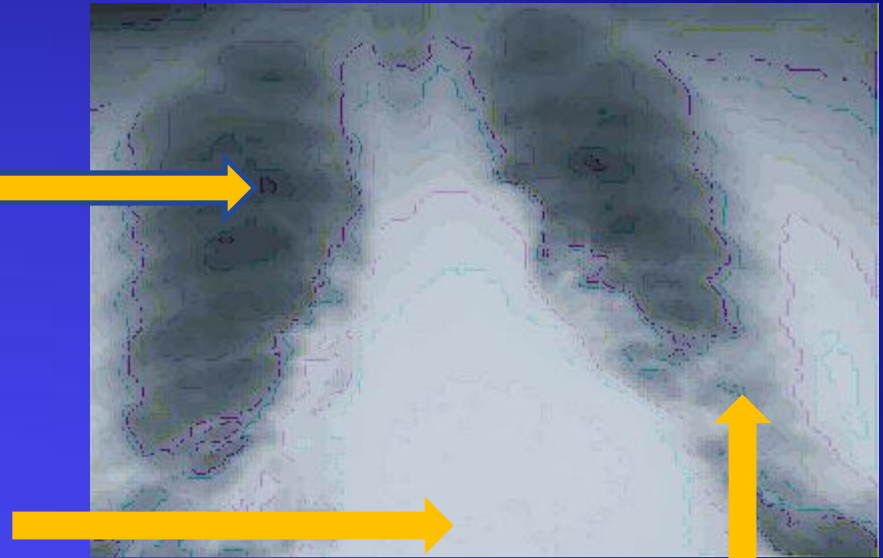
KONTRAST OBRAZOWANIA

- Egzogenne mechanizmy:

- Absorpcja, odbicie, transmisja
 - Hiperpolaryzacja spinu
 - Relaksacja magnetyczna
 - Podatność magnetyczna
- Transfer namagnesowania
 - Transfer nasycenia
 - Izotopy
 - Fluorescencja
 - Bioluminescencja
 - komórkowe pH
- Niedotlenienie (Hypoxia)

Obrazowanie promieniowaniem X (X-ray imaging)

Prześwietlenie promieniowaniem X jest najprawdopodobniej jedną z najpopularniejszych metod obrazowania



Obrazy powstają podczas prześwietlenia na skutek odmiennej absorpcji promieniowania przez różne typy tkanek. Wapń zawarty w kościach absorbuje promieniowanie najsilniej i dlatego kości widoczne na zdjęciu są białe. Tłuszcz oraz inne tkanki absorbują słabiej i dlatego mają kolor szary. Najslabiej promieniowanie absorbują płuca z tego powodu odpowiada im kolor czarny.

Najpopularniejszym zastosowaniem prześwietlenia rentgenowskiego jest badanie złamanych kości. Metoda ta ma jednak zastosowanie również w badaniu nowotworów. Analiza zdjęć pozwala bowiem na stwierdzenie czy guz występuje, a jeśli tak to czy rozrasta się w płucach lub innych obszarach klatki piersiowej.

Mammografia wykorzystuje promieniowanie X do wyszukiwania guzów i obszarów podejrzanych o charakter nowotworowy w piersiach.

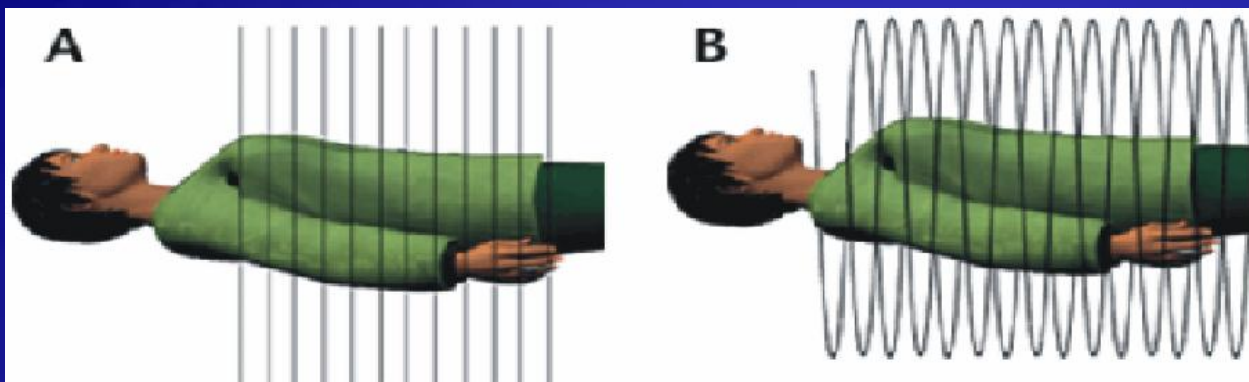
Tomografia komputerowa CT (computed tomography)



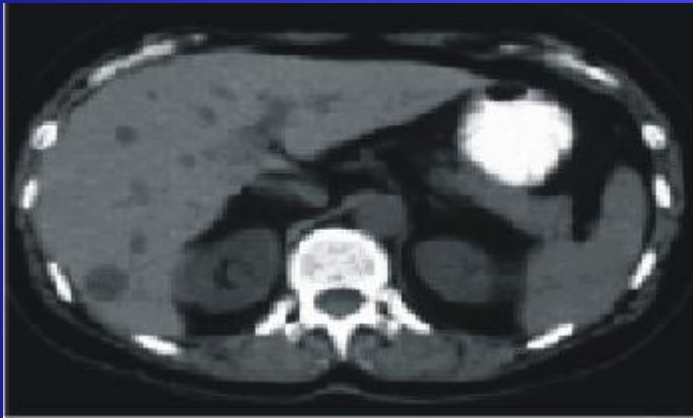
A. P. Reeves, Cornell University

Tomografia komputerowa (CT lub CAT) wykorzystuje komputerowo kontrolowane promieniowanie X do kreowania obrazów ciała. Zastosowanie promieniowania X zbliża CT do prześwietlenia rentgenowskiego jednakże zdjęcie rentgenowskie i skany CT pozwalają pozyskać całkiem odmienne informacje. Chociaż doświadczony radiolog potrafi również ze zdjęcia rentgenowskiego wywnioskować o trójwymiarowej lokacji guza prześwietlenia rentgenowskie w przeciwieństwie do CT są z natury dwuwymiarowe.

Prześwietlenia rentgenowskie ramienia lub klatki piersiowej nie są w stanie dostarczyć informacji jak głęboko penetrujemy ciało w poszukiwaniu zmian. Skany CT są trójwymiarowe. Dzięki zarejestrowaniu i zanalizowaniu trójwymiarowych „plastrów” ciała pacjenta lekarz nie tylko może stwierdzić obecność guza, ale także jak głęboko jest on umiejscowiony. Skany CT są trójwymiarowe, ponieważ obrazowanie następuje nie na płaskiej kliszy a w pamięci komputera.



A- konwencjonalna CT
B- spiralna CT



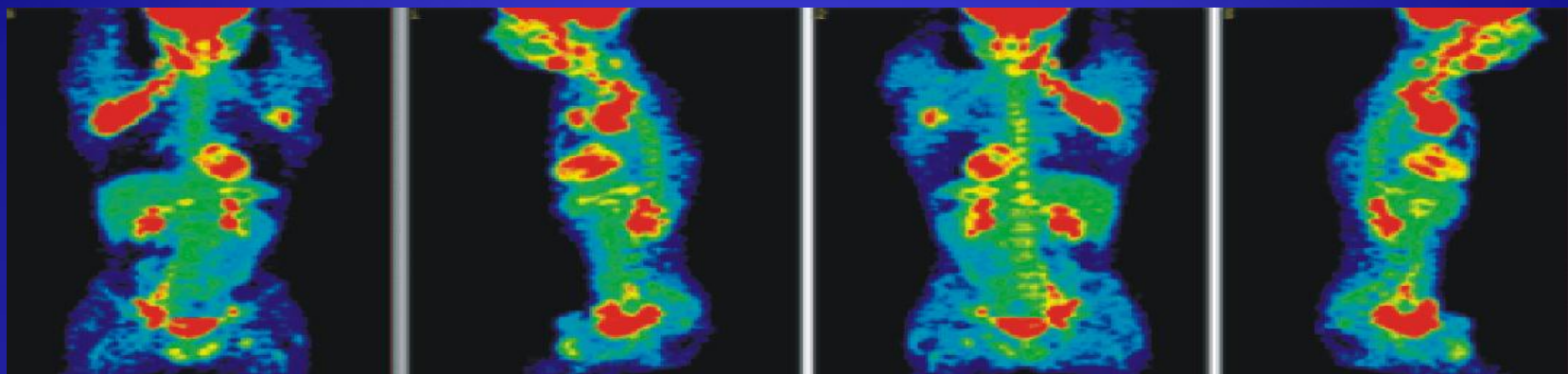
Konwencjonalny skan CT bez kontrastu ukazujący guz wątroby.



Konwencjonalny skan CT z kontrastem tego samego pacjenta ukazujący guz wątroby.

Autor:Dr. Peter Choyke,
Department of Radiology, Clinical Center, National Institutes of Health

OBRAZOWANIE JĄDROWE (PET i SPECT)



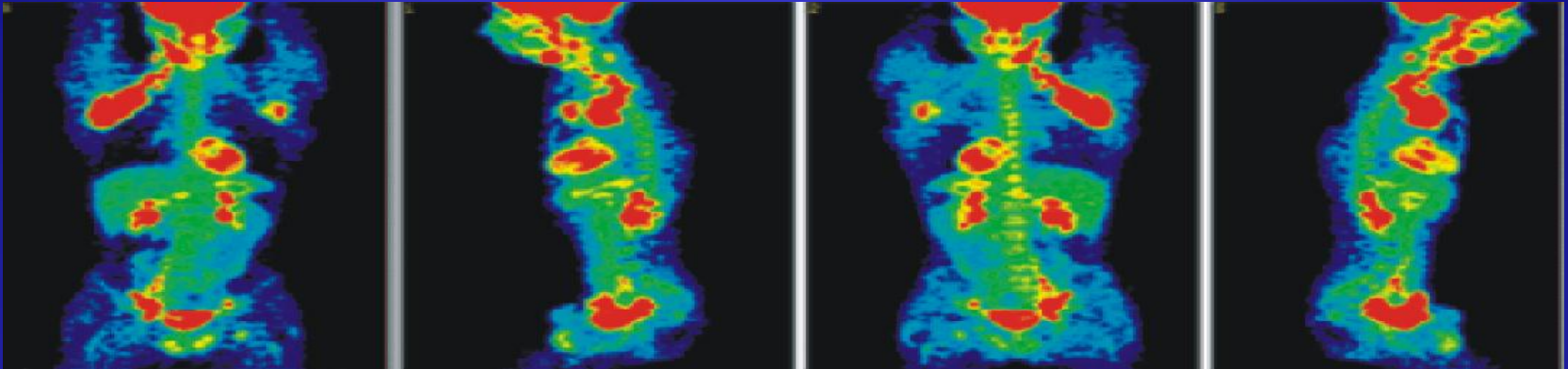
Obrazowanie jądrowe (PET and SPECT)

Obrazowanie jądrowe wykorzystuje małe dawki znaczników radioaktywnych, które zostają wprowadzone do ciała pacjenta. Odpowiednio skonstruowana aparatura śledzi następnie gdzie i kiedy następuje koncentracja znacznika. Najpopularniejsze metody z tej grupy to **PET i SPECT**.

Pozytonowa tomografia emisyjna (PET)

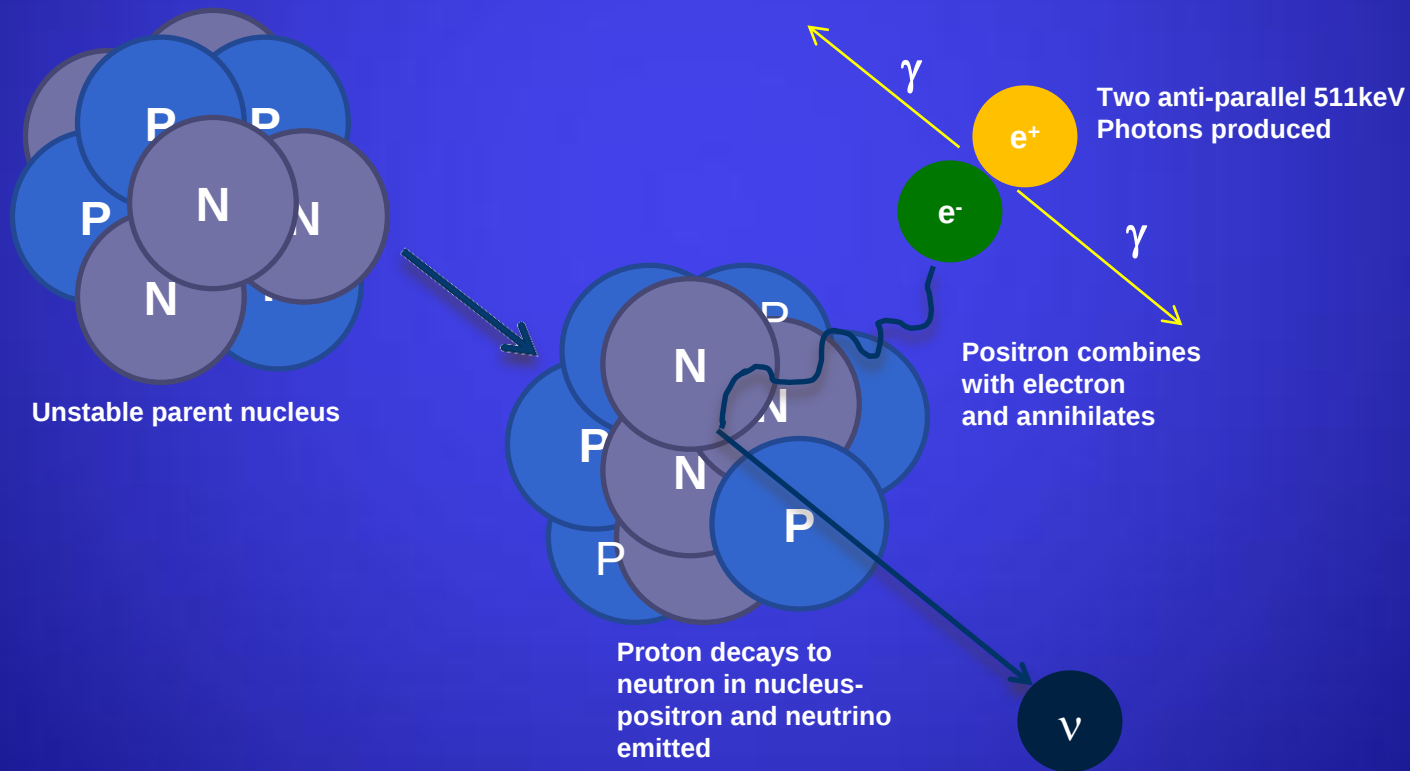
rejestruje komputerowe obrazy zmian metabolizmu cukrów, jakie mają miejsce w tkankach. Standardowo pacjent otrzymuje zastrzyk substancji będącej połączeniem cukru i cukru znaczonego izotopowo. Cukier znaczone izotopowo pozwala na zlokalizowanie guza ponieważ komórki guza pochłaniają cząsteczki cukru efektywniej niż inne tkanki organizmu. Po otrzymaniu cukru znaczonego izotopowo pacjent leży przez około 60 min podczas gdy znaczony cukier krąży w jego ciele. Jeśli w organizmie występuje guz cukier powinien efektywnie się w nim zakumulować.

Pozytonowa tomografia emisyjna (PET)



Następnie pacjent umieszczony na stole stopniowo wprowadzany jest do skanera PET 6-7 razy w ciągu 45-60min. Skaner PET używany jest do określenia rozmieszczenia cukru w guzie i innych tkankach ciała. Dzięki analizie skanów CT i PET można osiągnąć lepszą zdolność opisu guza. Obraz obrobiony komputerowo analizowany jest przez radiologa. PET może wykryć guz nawet gdy inne techniki wskazują na normalny charakter tkanki. PET pozwala także na diagnostykę wznowień nowotworowych i określenie efektywności leczenia-gdy guz zmniejsza się jego komórki metabolizują coraz mniej cukru.

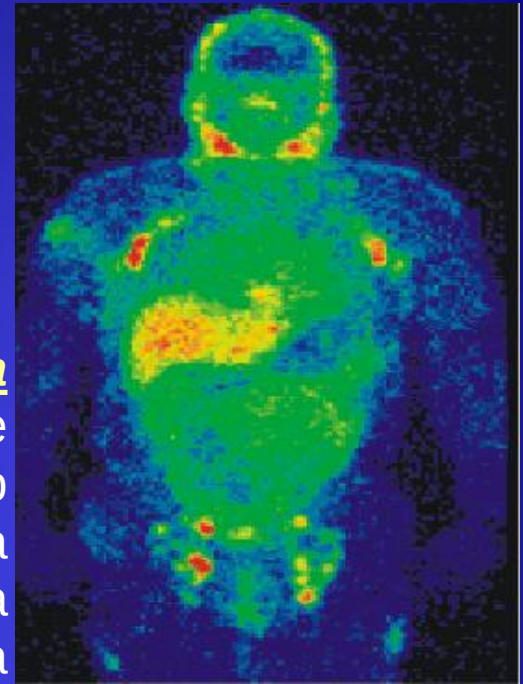
. The detector records pair of gamma rays emitted by a positron-emitting radioactive substance. To recall, proton-rich isotopes like are may decay via positron emission, in which a proton in the nucleus decays to a neutron, a positron (positive electron) and a neutrino. Understanding this phenomenon of detection requires recalling that there is antimatter in the universe, and when antimatter (positron) meets matter (electron), then both kinds of matter are annihilated, and pure energy (gamma radiation) is formed. PET radioactive substance emits positrons which annihilate with electrons up to a few millimeters away, causing two gamma photons to be emitted in opposite directions



SPECT

Podobna do techniki PET komputerowa tomografia emisyjna pojedynczego fotonu SPECT wykorzystuje radioaktywne znaczniki i skaner do rejestrowania dwu- lub trójwymiarowych obrazów ciała. Mała porcja radioaktywnego znacznika podawana jest dożylnie, a następnie wykonywane jest skanowanie ciała pacjenta podczas gdy znacznik jest wchłaniany przez tkanki. **SPECT** może dostarczyć informacji o przepływie krwi w tkankach i metabolizmie zachodzącym w ciele pacjenta.

W procedurze tej antyciała mogą być połączone z substancją radioaktywną. Gdy w ciele pacjenta występuje guz antyciała mogą łatwo przyłączyć się do komórek nowotworowych. Skany SPECT pozwalają więc na lokalizację guza.



Ultradźwięki

Ultrasonografia wykorzystuje fale dźwiękowe o częstościach powyżej wykrywalnych przez ucho ludzkie. Przetwornik wytwarza fale, które przenikają do ciała badanego pacjenta i ulegają odbiciu od organów oraz tkanek pozwalając na wytworzenie obrazu organów wewnętrznych. Ultradźwięki mogą być wykorzystywane do lokalizacji nowotworów i są pomocne podczas wykonywania biopsji



Ultrasound image of the liver; dark areas by arrows show possible tumors. Image courtesy of Dr. Thomas Shawker, National Cancer Institute.

Magnetic Resonance Imaging (MRI)

Obrazowanie jądrowym rezonansem magnetycznym



MRI scan without contrast showing possible tumor in the liver.

MRI scan of the same patient using contrast. Images courtesy of Dr. Peter Choyke, Clinical Center, NIH.

Obrazowanie rezonansem magnetycznym wykorzystuje fale radiowe do badania pacjentów umieszczonych w silnym polu magnetycznym, a uzyskany obraz powstaje w oparciu o fale radiowe wyemitowane przez badane tkanki.

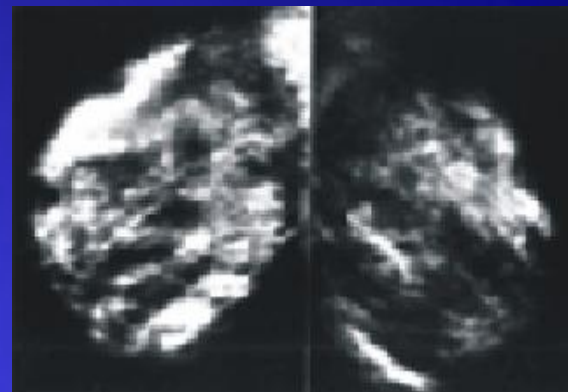
Różne tkanki włączając także guzy emitują mniej lub bardziej intensywne sygnały w zależności od ich chemicznego otoczenia, a obraz ciała pacjenta może zostać zapisany w postaci danych komputerowych. Obrazowanie rezonansem magnetycznym podobnie jak CT dostarcza obrazów dwu- i trójwymiarowych czasem jest jednak o wiele czulszą metodą szczególnie w rozróżnianiu tkanek miękkich.

Mammografia cyfrowa

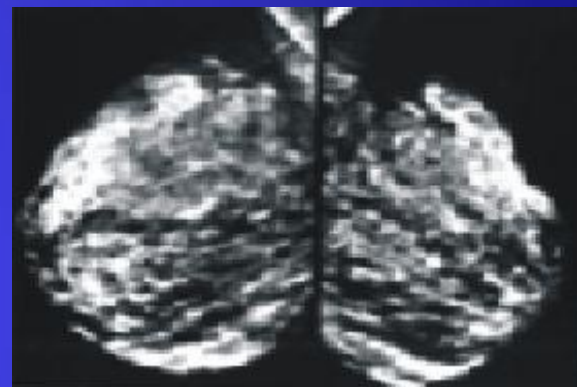
Mammografia konwencjonalna wykorzystuje promieniowanie X w celu identyfikacji zmian nowotworowych lub obszarów podejrzanych o charakter nowotworowy w piersi.

Mammografia cyfrowa również wykorzystuje promieniowanie X, ale dane gromadzone są w pamięci komputera zamiast na kliszy fotograficznej. Pozwala to na komputerowe opracowywanie obrazów w tym ich wzmacnianie czy też powiększanie.

A



B



A- konwencjonalna
mammografia piersi.

B- mammografia
cyfrowa
tej samej pacjentki.

Autor Dr. Laurie Fajardo,
Johns Hopkins
Medical Institutions

Table of Links

1

[http://dev1.cancer.gov/imaginginformation/
CancerImagingClinicalTrials](http://dev1.cancer.gov/imaginginformation/CancerImagingClinicalTrials)

2

<http://www.radiologyinfo.org/index.cfm?bhcp=1>

3 <http://www.medicalimaging.org>

4

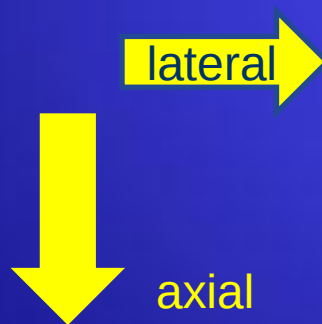
<http://www.cc.nih.gov/drd/colonoscopy.html>

5

[http://digestive.niddk.nih.gov/ddiseases/pu
bs/colonoscopy/index.htm](http://digestive.niddk.nih.gov/ddiseases/pubs/colonoscopy/index.htm)

LASEROWA KONFOKALNA MIKROSKOPIA FLUORESCENCYJNA

- Laserowa konfokalna mikroskopia fluorescencyjna stała się standardem dla obrazowania optycznego oferując możliwość konstrukcji trójwymiarowych obrazów o rozdzielczości określonej przez kryterium Rayleigha, które określa lateralną rozdzielczość jako równą długości fali λ światła próbkującego, zaś rozdzielczość aksjalną jako 2λ
- Typowa próbkowana objętość w zakresie widzialnym wynosi więc około $500 \text{ nm} \times 500 \text{ nm} \times 1000 \text{ nm}$



$500 \text{ nm} \times 500 \text{ nm} \times 1000 \text{ nm}$

MIKROSKOPIA KONFOKALNA

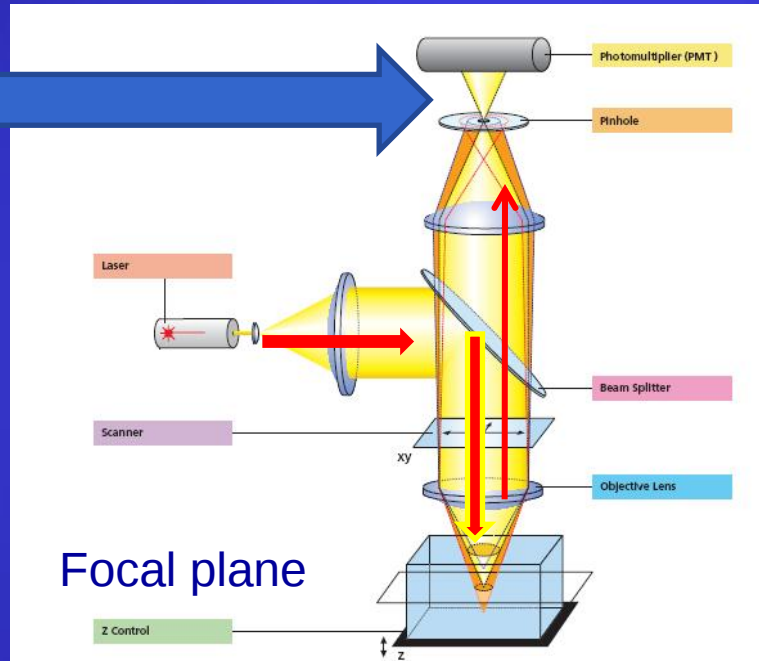
$$\delta_{lat} = 0.61 \lambda / NA$$

lateral

$$\delta_{ax} = 2 \lambda n / (NA)^2$$



axial



3D imaging and deep profiling
due to confocal configuration

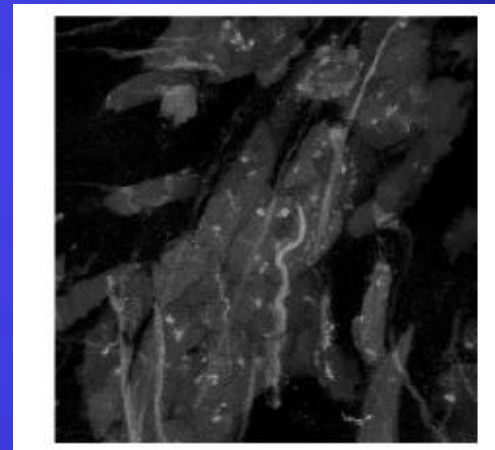
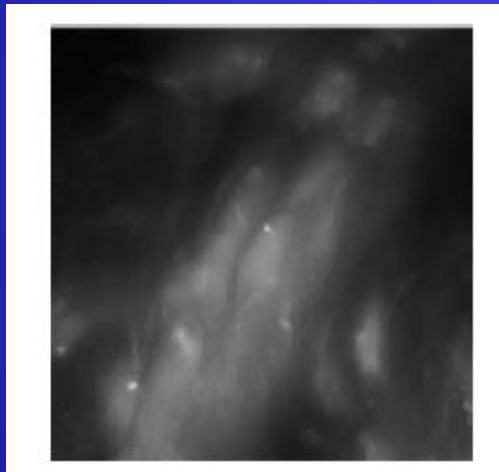
The lateral and axial spatial resolution, δ_{lat} and δ_{ax} , are determined by the diffraction limit, as discussed before:

$$\delta_{lat} = 0.61 \lambda / NA$$

$$\delta_{ax} = 2 \lambda n / (NA)^2$$

where λ is the wavelength of exciting light, n the refractive index, and NA the numeric aperture of the objective.

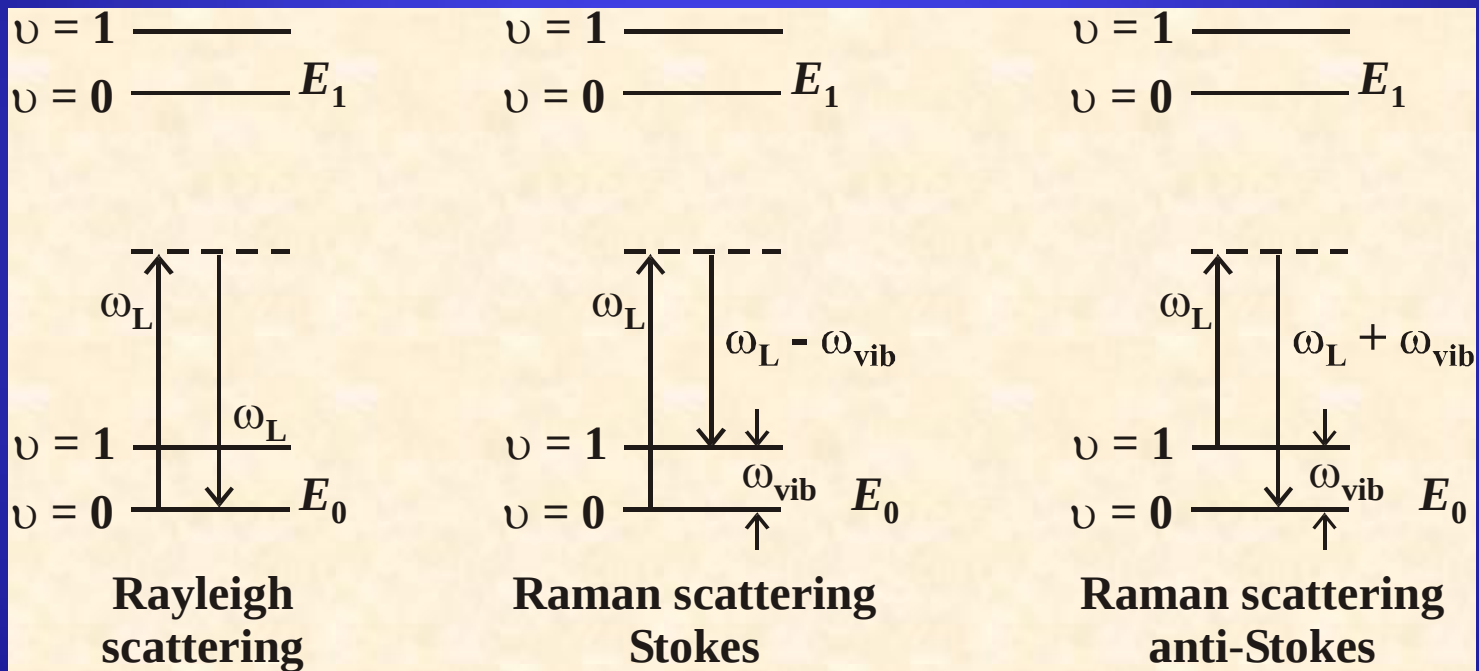




http://www.hopkinsmedicine.org/micfac/refman/Zeiss/LSM510Meta/Principles_of_Confocal_Microscopy.pdf

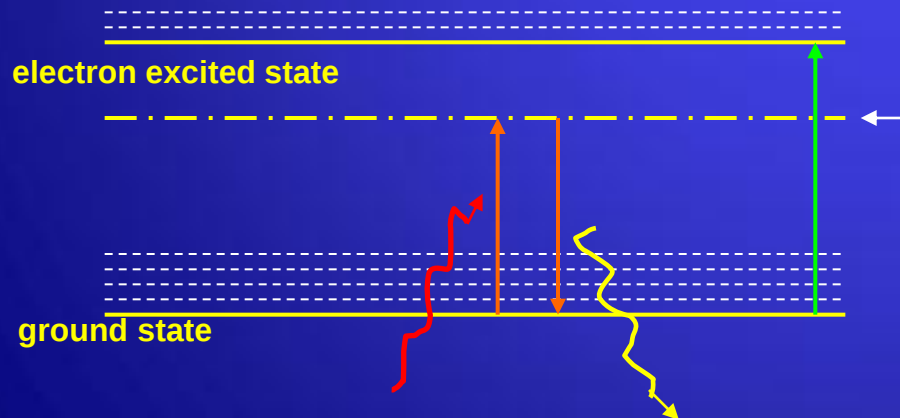
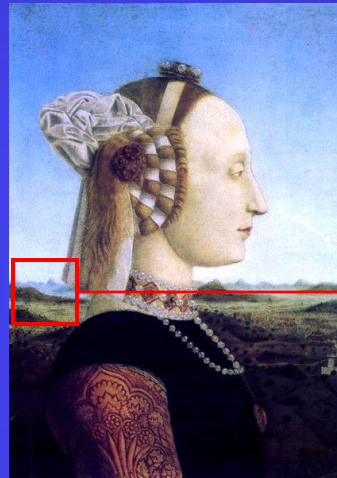
RAMAN IMAGING

OBRAZOWANIE RAMANA

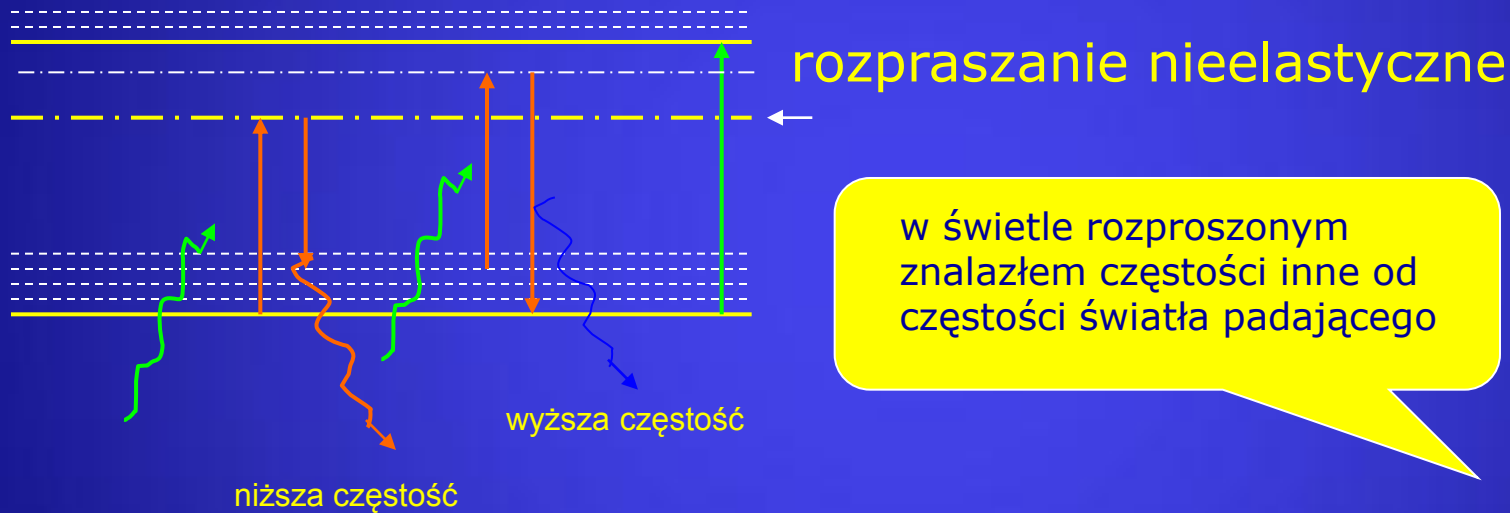


Rozpraszanie RAYLEIGH

Rozpraszanie elastyczne



Jednakże światło może się rozpraszać i w inny sposób- rozpraszanie Ramana



w świetle rozproszonym
znalazłem częstota inne od
częstota światła padającego



Chandrasekhara
Venkata Raman 37

Jednakże światło może się rozpraszać także w inny sposób –rozpraszanie Ramana

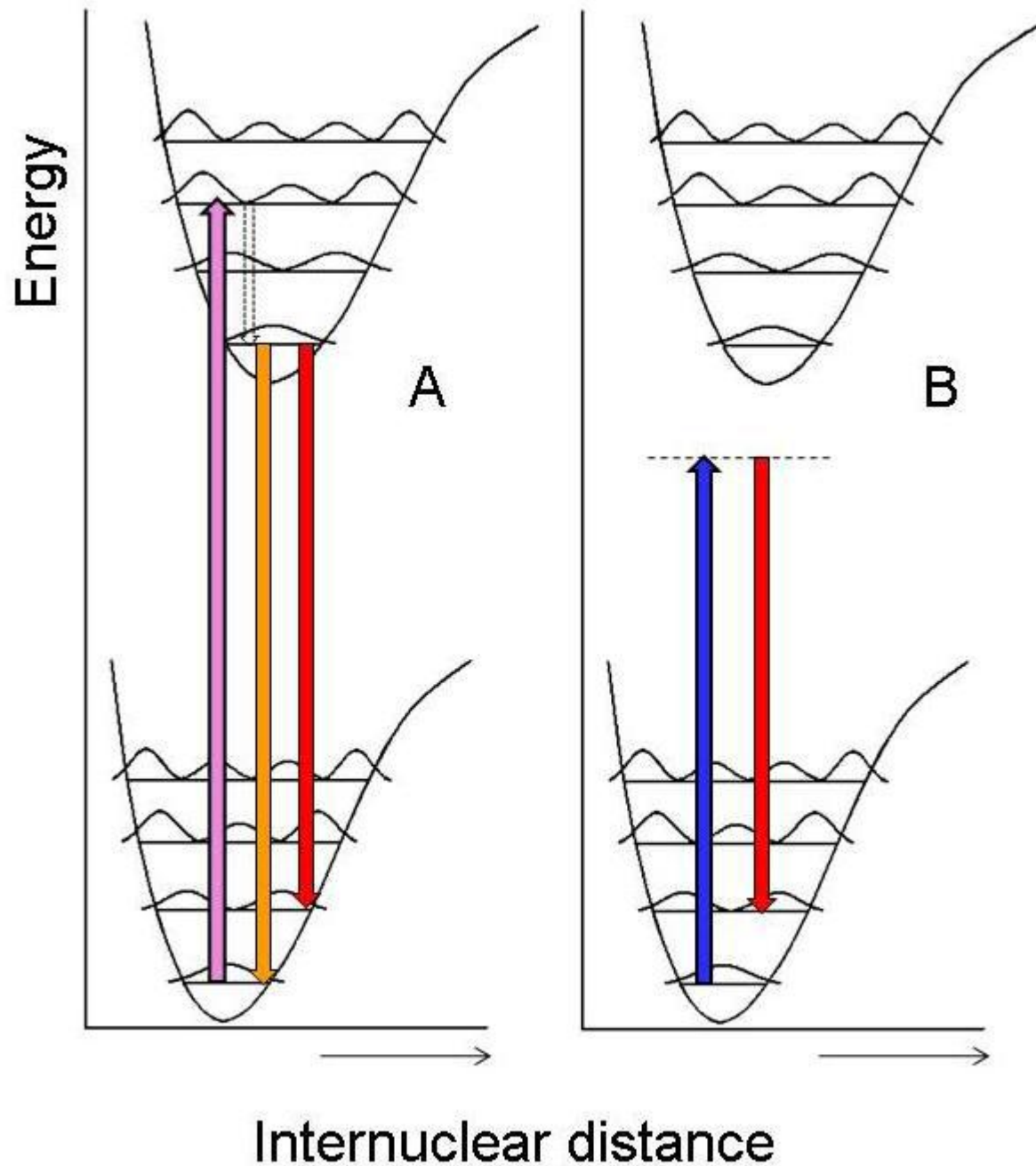


W świetle rozproszonym
znalazłem częstości inne od
częstości światła padającego



Chandrasekhara
Venkata Raman

**mierząc różnicę energii między
światłem padającym a rozproszonym
otrzymujemy informacje o drganiach
cząsteczek.**



$$\mu_{ind} = \alpha E_0 \cos 2\pi \nu_0 t \quad (3)$$

$$I \sim M_{ind}^2 \nu_0^4 \quad (4)$$

Opisane zjawisko nazywamy **rozpraszaniem promieniowania**



Ilustracja rozpraszania

Spektroskopia RAMANA

Teoria polaryzowalności Placzka

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

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

$$\alpha = f(q) \quad (2)$$

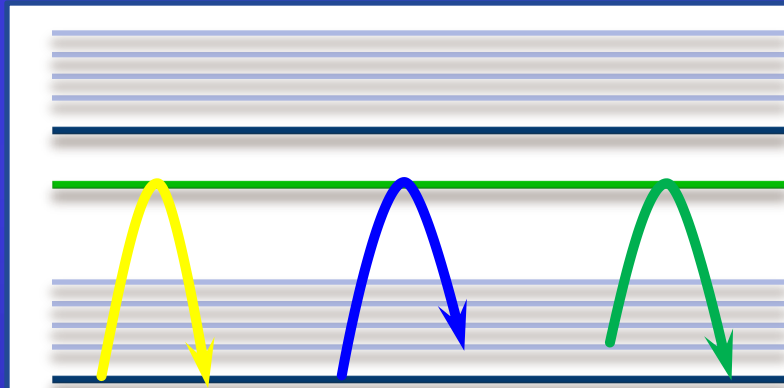
$$\alpha(q) = \alpha_{q=0} + \frac{1}{1!} \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_{q=0} q + \frac{1}{2!} \left(\frac{d^2\alpha}{dq^2} \right)_{q=0} q^2 + \dots \quad (3)$$

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

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

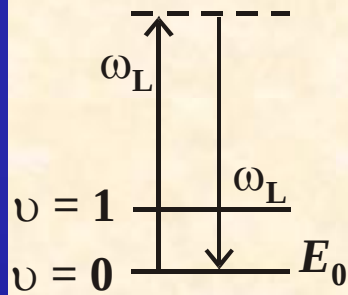
polaryzowalność zmienia się z częstością drgania normalnego, ale tylko wtedy gdy pochodna polaryzowalności po współrzędnej drgania nie jest równa zero ostatecznie można pokazać, że:

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



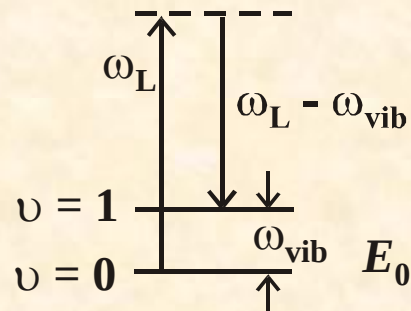
rozpraszanie Rayleigha rozpraszanie Ramana składowa Stokesowska rozpraszanie Ramana składowa antystokesowska

$$\begin{array}{l} \nu = 1 \text{ —————} \\ \nu = 0 \text{ —————} E_1 \end{array}$$



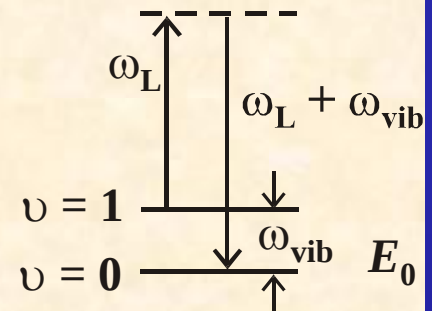
**Rayleigh
scattering**

$$\begin{array}{l} \nu = 1 \text{ —————} \\ \nu = 0 \text{ —————} E_1 \end{array}$$



**Raman scattering
Stokes**

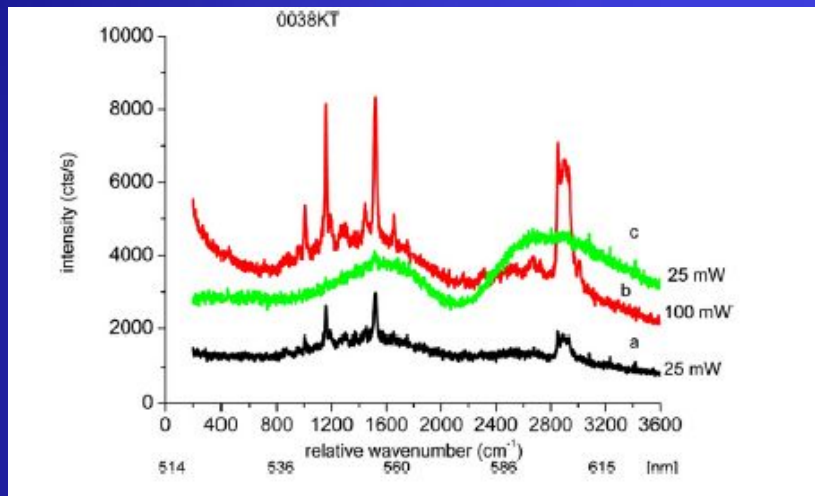
$$\begin{array}{l} \nu = 1 \text{ —————} \\ \nu = 0 \text{ —————} E_1 \end{array}$$



**Raman scattering
anti-Stokes**

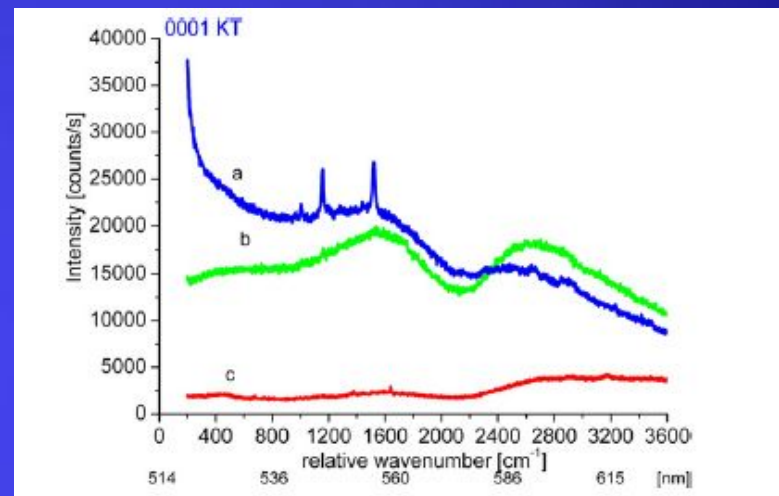
3. Analiza układów biologicznych

3A. Zastosowanie spektroskopii Ramana w badaniu nowotworów



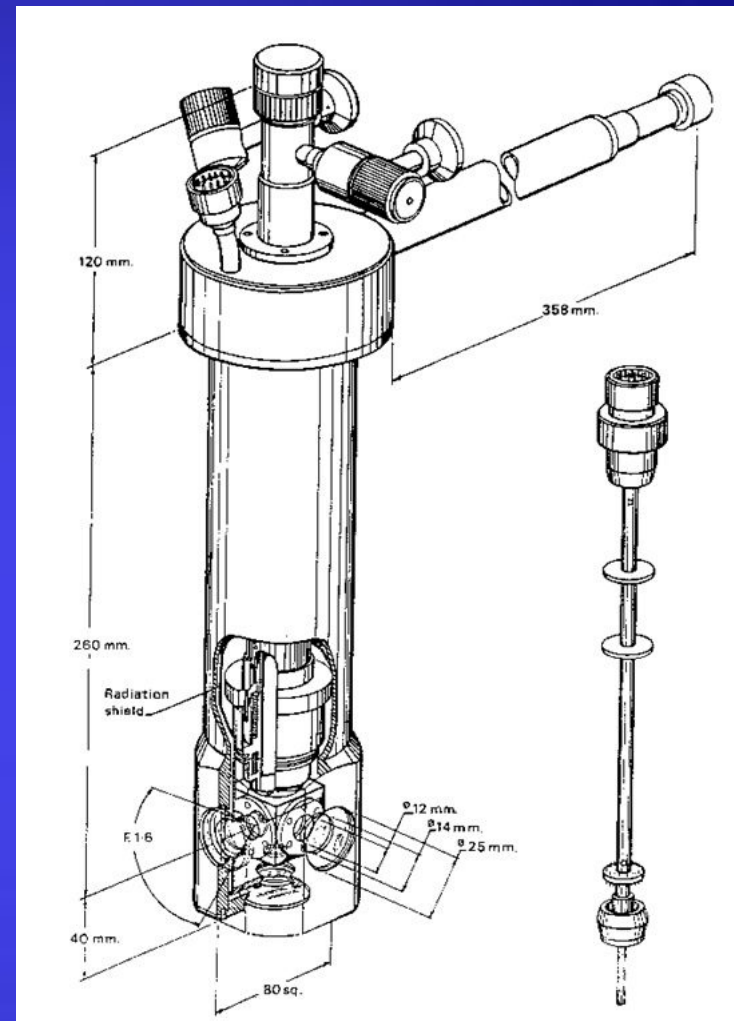
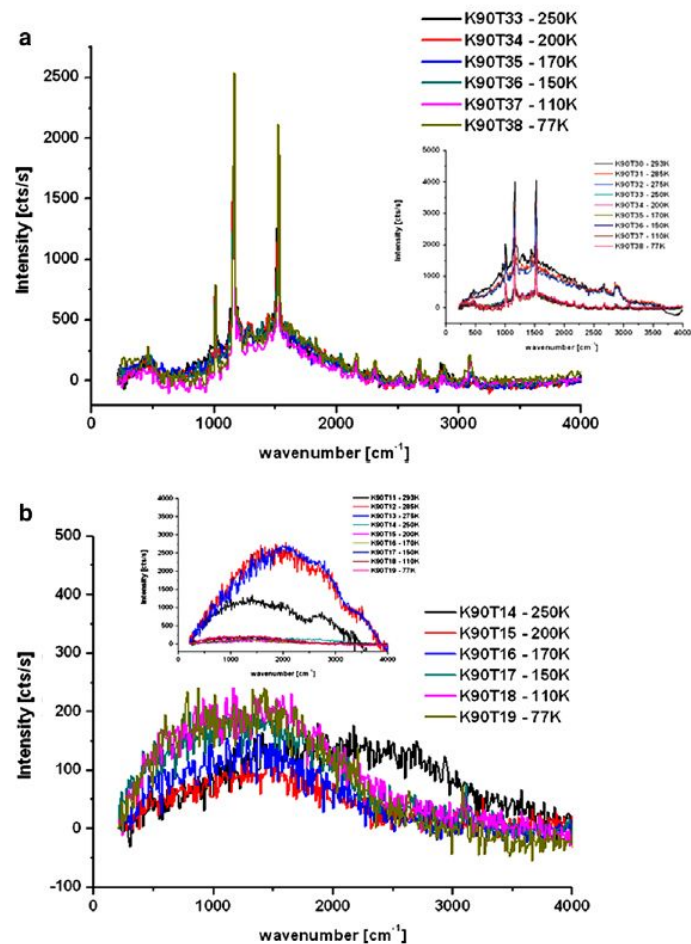
Widma Ramana

- a) i b) tkanka zdrowa
- c) tkanka nowotworowa



Widma Ramana

- a) tkanka zdrowa
- b) tkanka nowotworowa
- c) krew obwodowa



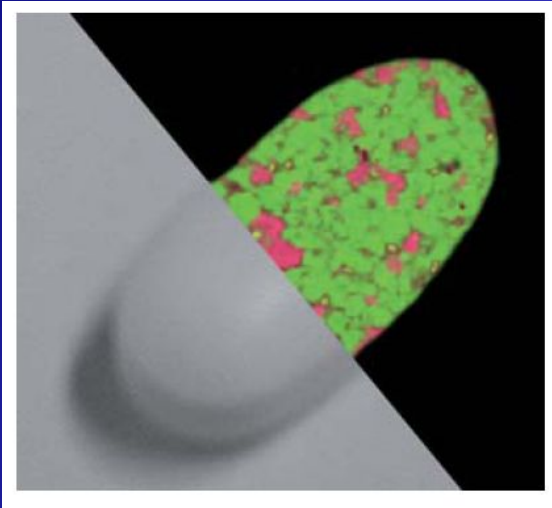
Niskotemperaturowe widma Ramana

a) tkanka zdrowa

b) tkanka nowotworowa

kriostat

6. Analizy farmaceutyczne



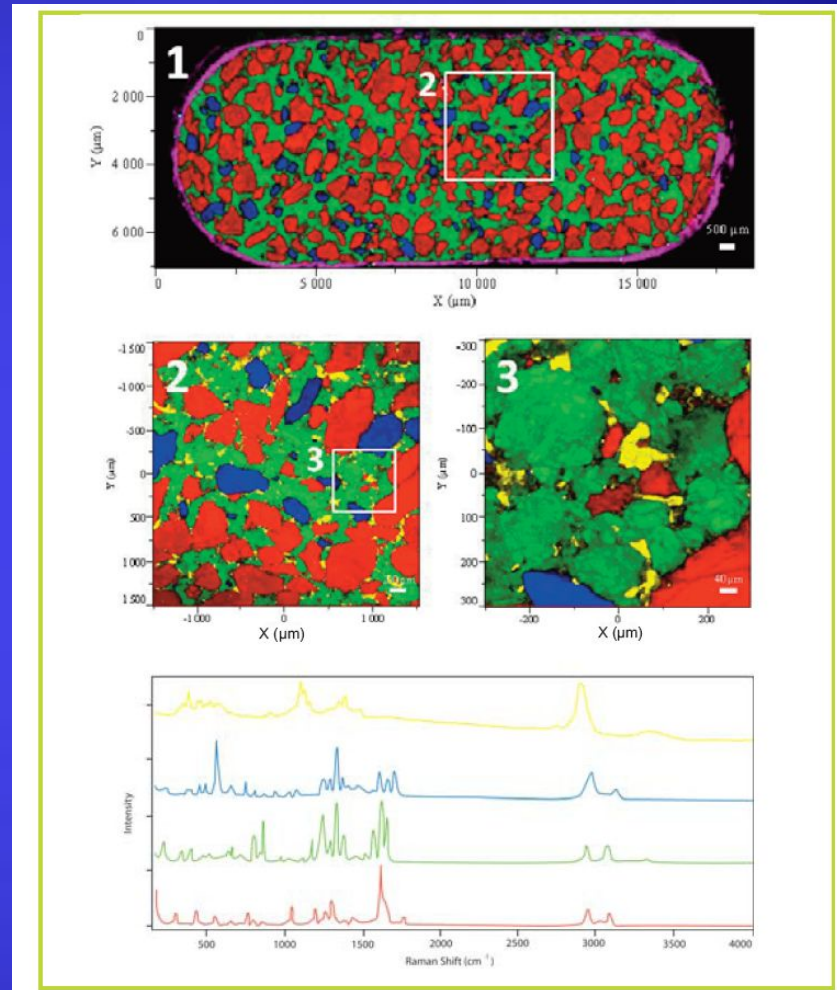
kofeina

kwasy acetylosalicylowy

paracetamol- *N*-(4-hydroksyfenylo)acetamid

widma Ramana
składników tabletki

<http://www.horiba.com>



5. Konfokalna mikroskopia Ramana

alpha300 series - measurement results

WITec
focus innovations

1. Healthy tissue (from surgery)

Figure 1

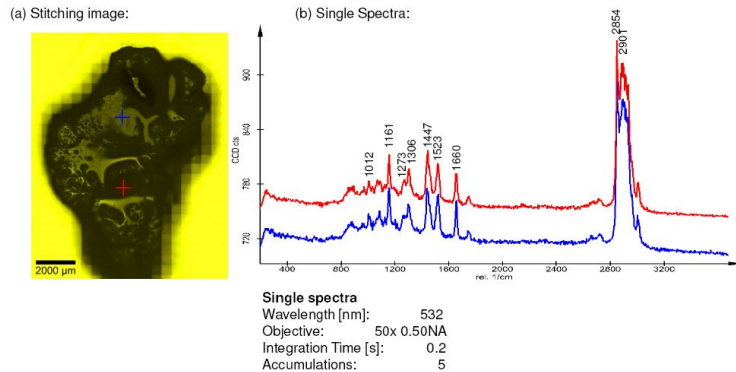


Figure 1.a. shows a stitching image composed of hundreds of video images for a larger overview of the sample. Two single spectra, Fig.1.b., were achieved at the positions marked in the stitching image, Fig.1.a., with a integration time of 0.2 s.

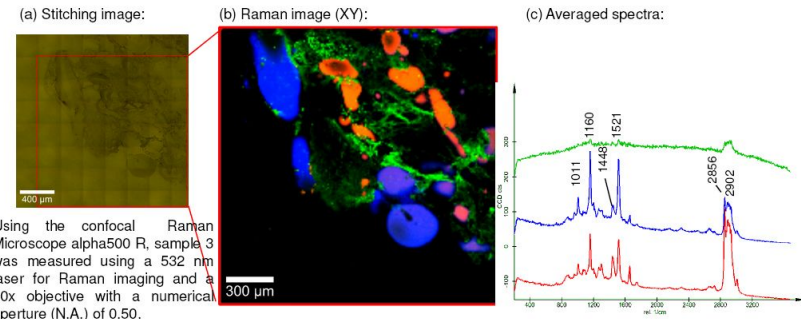
5a. Analiza tkanek gruczołu piersiowego ex-vivo

alpha300 series - measurement results

WITec
focus innovations

3. Healthy tissue (histopathological sample)

Figure 4



Using the confocal Raman Microscope alpha500 R, sample 3 was measured using a 532 nm laser for Raman imaging and a 50x objective with a numerical aperture (N.A.) of 0.50.

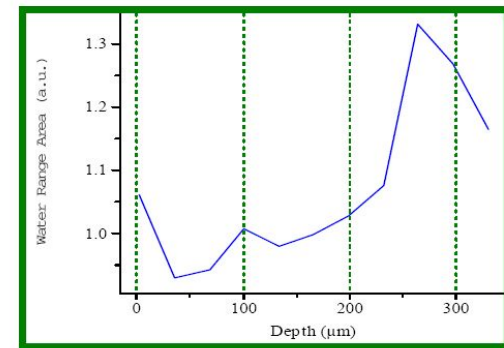
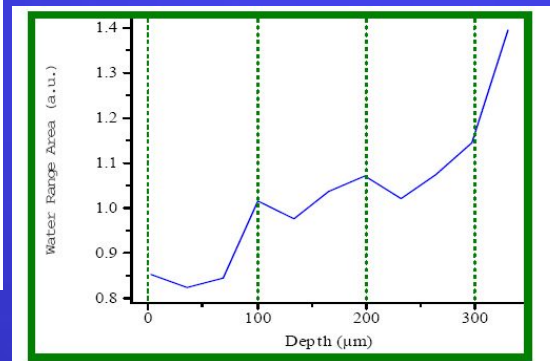
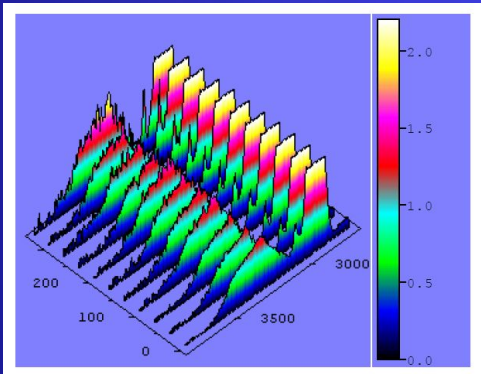
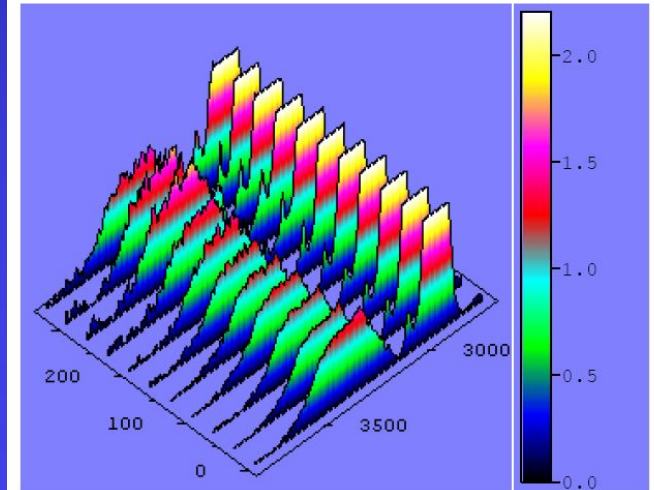
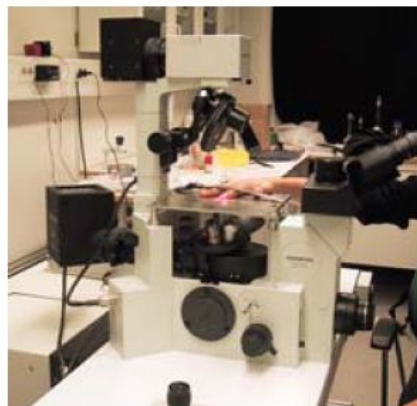
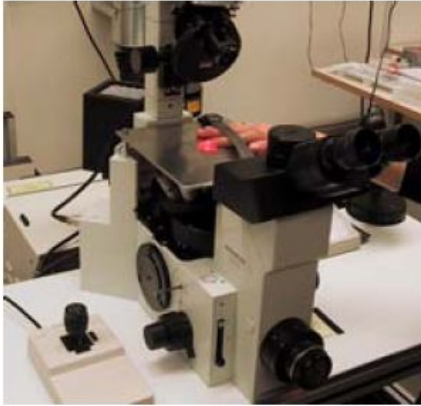
Figure 4. (a) shows the stitching image (2x2 mm) of sample 3 composed of hundreds of single video images. (b) The Raman image (1.75x1.75 mm) of the region marked in (a) obtained by basis analysis from the average spectra, is shown in (c). These three spectra were averaged from three different areas in the sample. The spectra blue and red show differences in relative intensities of some Raman bands. The colors of the spectra correspond to the colors in the image. Mixed areas are displayed as mixed colors.

Image Scan (XY):
Points per Line: 175
Lines per Image: 175
Scan Width [µm]: 1750
Scan Height [µm]: 1750
Integration Time [s]: 0.2

<http://www.mitr.p.lodz.pl/raman>

<http://www.witec.de>

5b. Analiza komórek skóry in-vivo

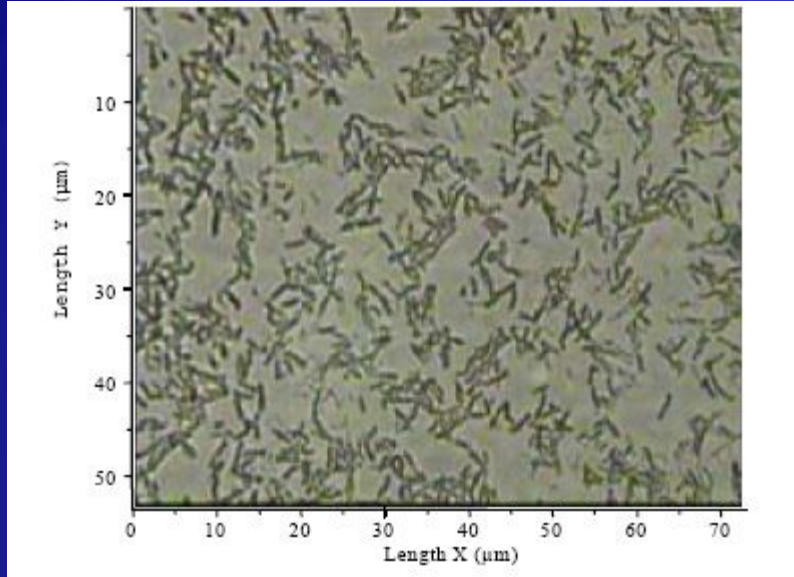


<http://www.horiba.com>

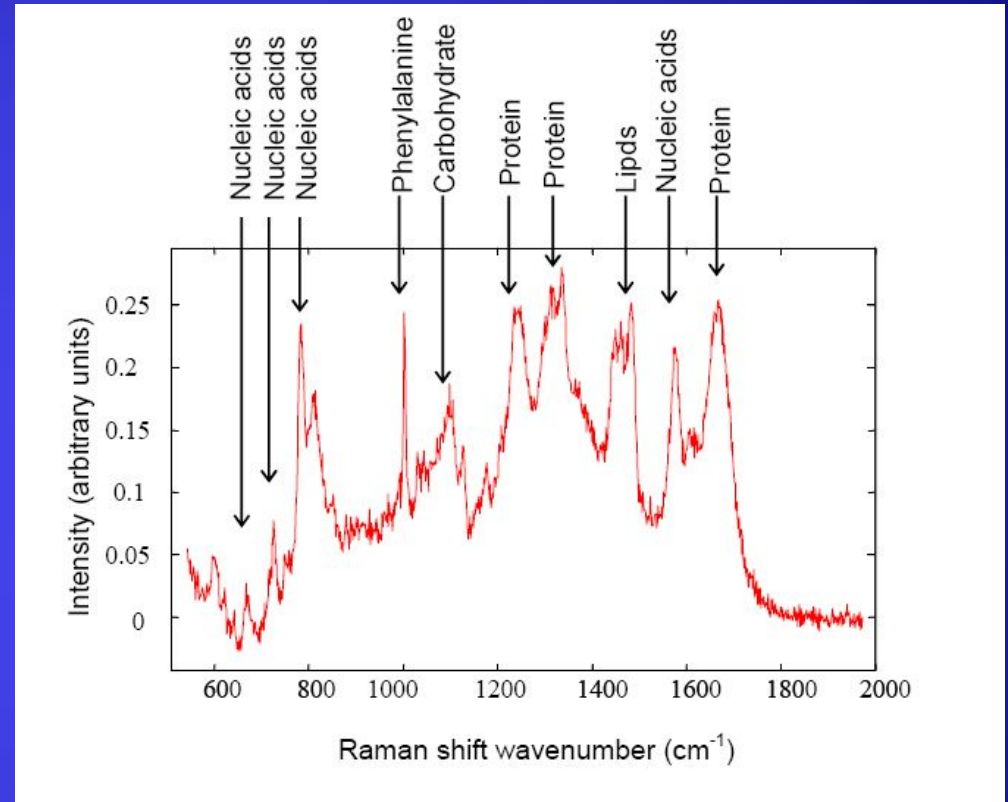
skóra sucha

skóra nawilżona

5c. Widma komórek bakterii

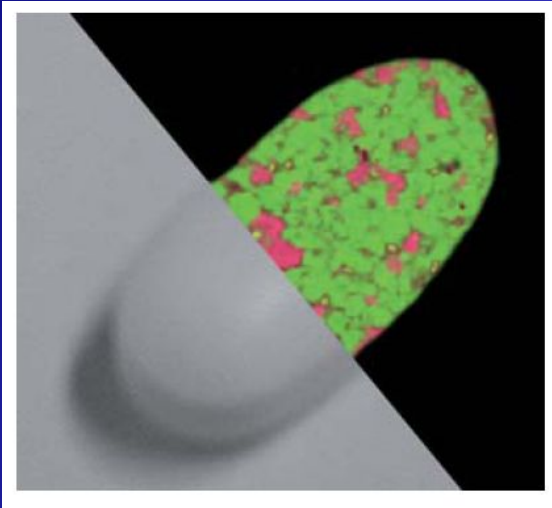


widok kolonii bakterii



widmo Ramana pojedynczej komórki bakterii

6. Analizy farmaceutyczne



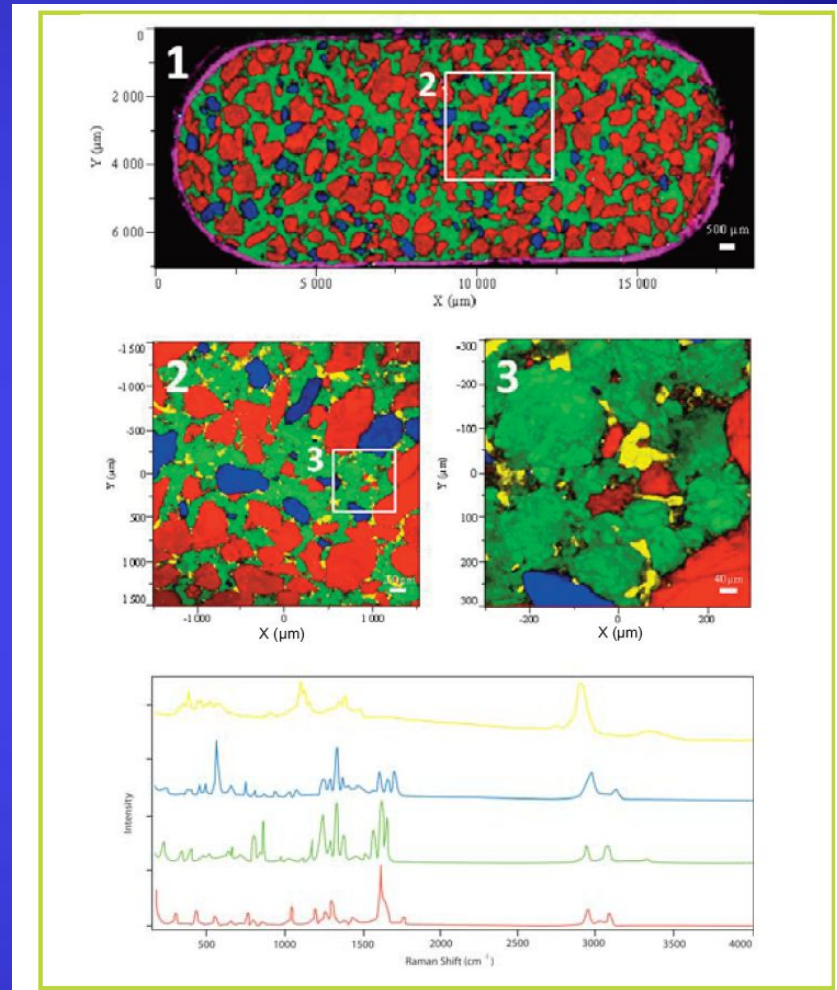
kofeina

kwas acetylosalicylowy

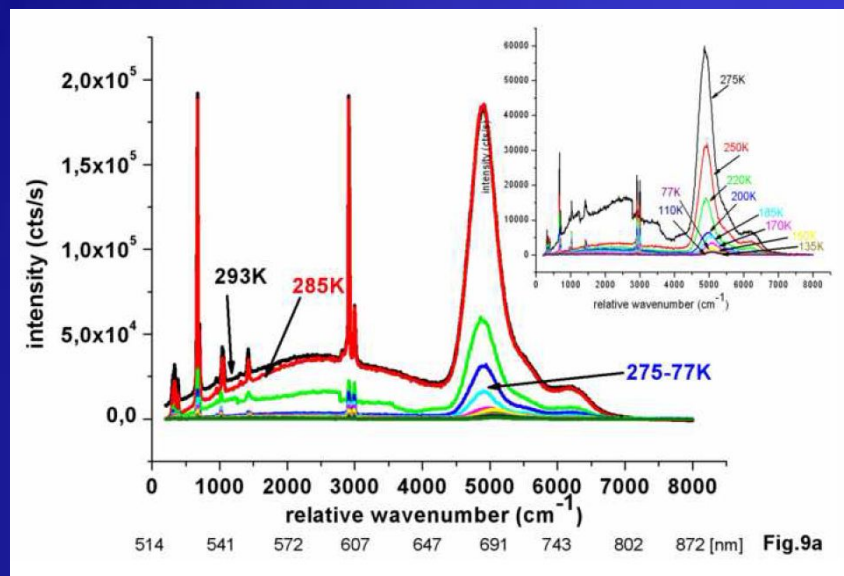
paracetamol- *N*-(4-
hydroksyfenylo)acetamid

widma Ramana
składników tabletki

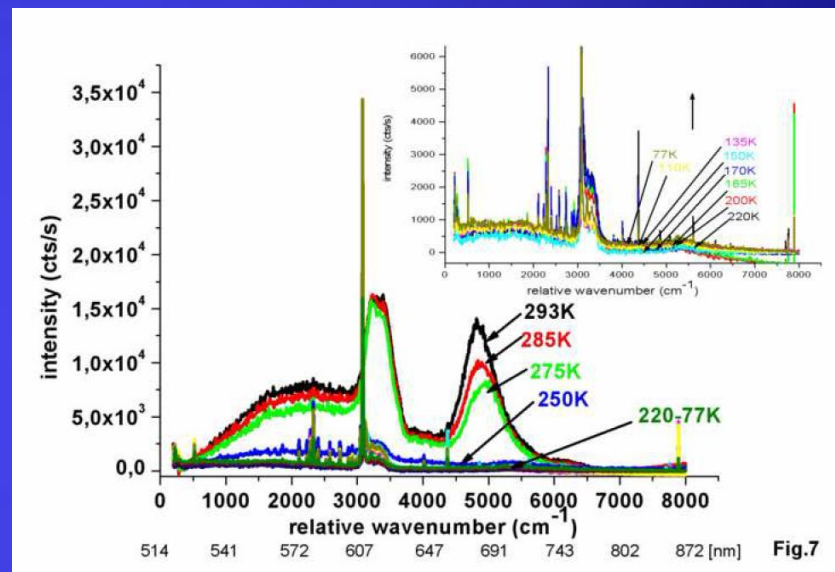
<http://www.horiba.com>



7. Analiza fotouczulaczy



Niskotemperaturowe widma Ramana
ZnPcS₄-DMSO

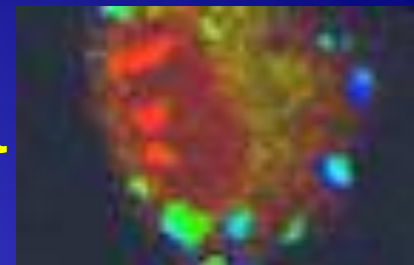


Niskotemperaturowe widma Ramana
ZnPcS₄-H₂O

OPTYCZNA BIOPSJA W WALCE Z RAKIEM – MARZENIE CZY RZECZYWISTOŚĆ?

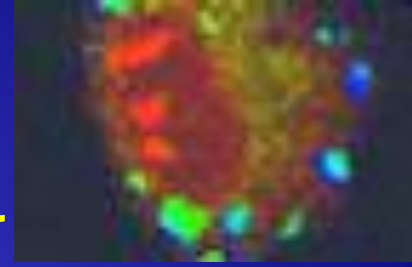


Obrazowanie Ramana

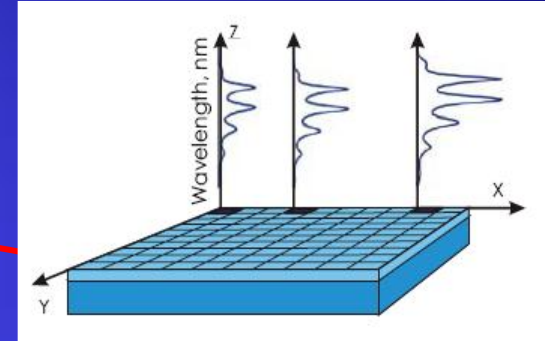


- Mikroskopia Ramana
- Konfokalna mikroskopia Ramana
- Zebranie przestrzennie rozdzielonych danych metodą skanowania zogniskowanej wiązki laserowej, albo przesuwanie próbki za pomocą mikroskopowego stolika translacyjnego
- Otrzymane dane zostają wykorzystane do zbudowania obrazu spektralnego
- Ulepszenie obrazów spektralnych metodami statystycznymi Principal Component analysis (PCA), Vertex Component Analysis (VCA), Hierarchical Cluster Analysis (HCA)

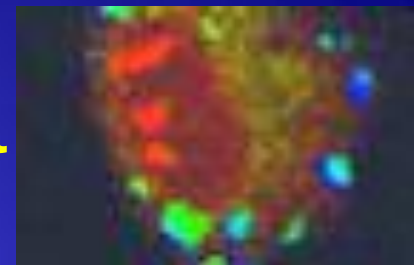
Obrazowanie Ramana



- Mikroskopia Ramana
- Konfokalna mikroskopia Ramana
- Zebranie przestrzennie rozdzielonych danych metodą skanowania zogniskowanej wiązki laserowej, albo przesuwanie próbki za pomocą mikroskopowego stolika translacyjnego
- Otrzymane dane zostają wykorzystane do zbudowania obrazu spektralnego
- Ulepszenie obrazów spektralnych metodami statystycznymi Principal Component analysis (PCA), Vertex Component Analysis (VCA), Hierarchical Cluster Analysis (HCA)

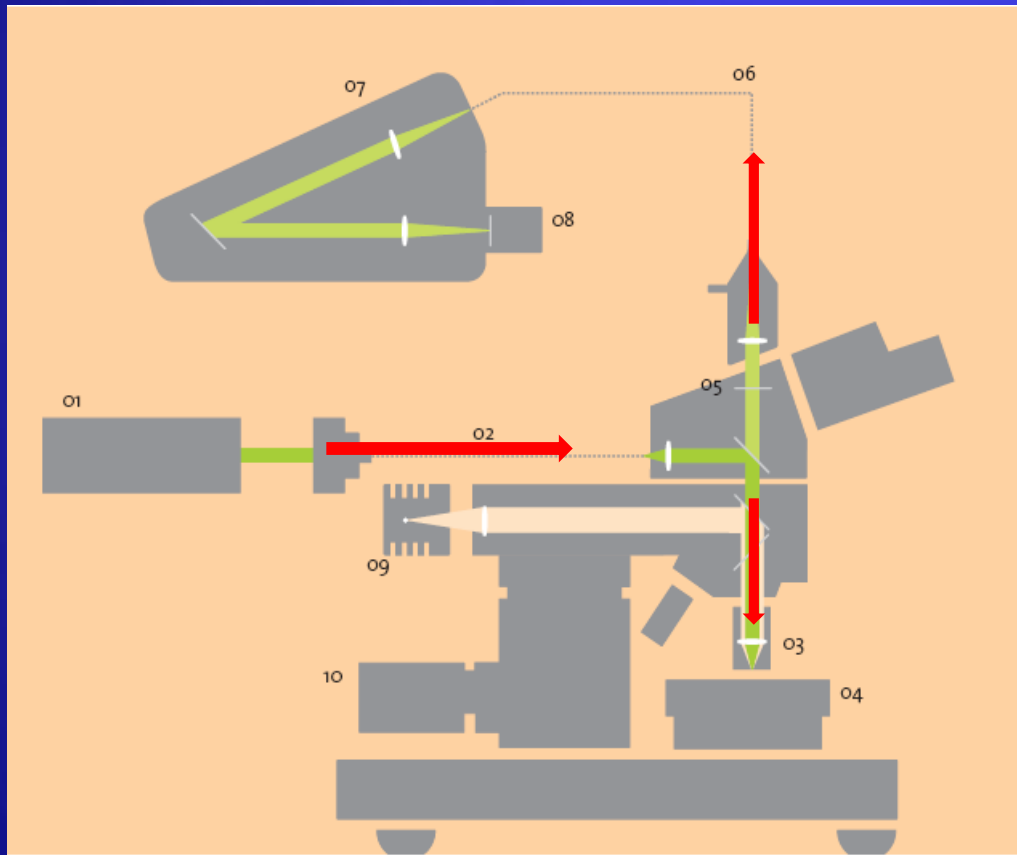


Obrazowanie Ramana



- Mikroskopia Ramana
- Konfokalna mikroskopia Ramana
- Zebranie przestrzennie rozdzielonych danych metodą skanowania zogniskowanej wiązki laserowej, albo przesuwanie próbki za pomocą mikroskopowego stolika translacyjnego
- Otrzymane dane zostają wykorzystane do zbudowania obrazu spektralnego
- Ulepszenie obrazów spektralnych metodami statystycznymi Principal Component analysis (PCA), Vertex Component Analysis (VCA), Hierarchical Cluster Analysis (HCA)

<http://www.witec.de/en/download/Raman/alpha300Rflyer.pdf>



alpha300 R Beam Path

01. laser

02. single mode fiber

03. objective

04. scan table

05. filter

06. multi mode fiber

07. lense based spectroscopy system UHTS 300

08. CCD detector

09. white light illumination

10. Z-stage for focusing

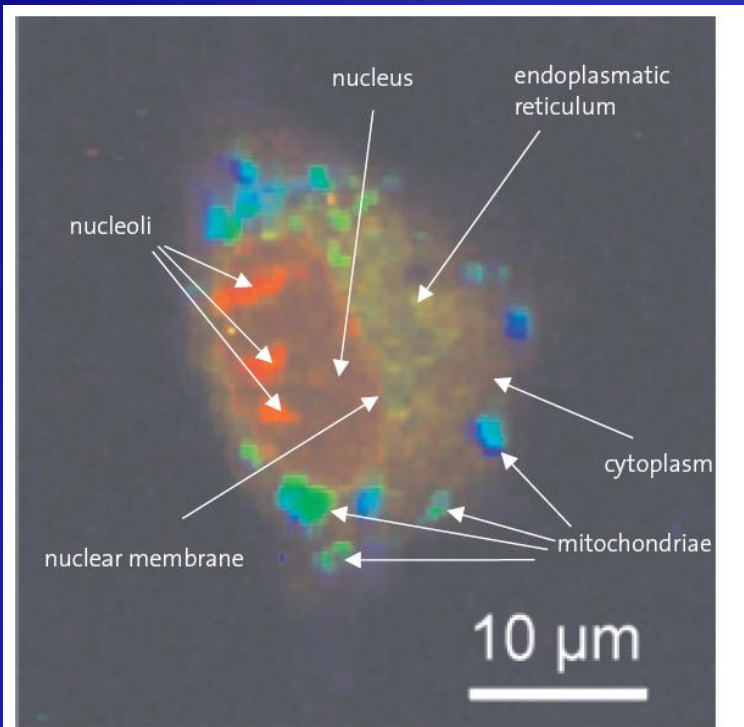
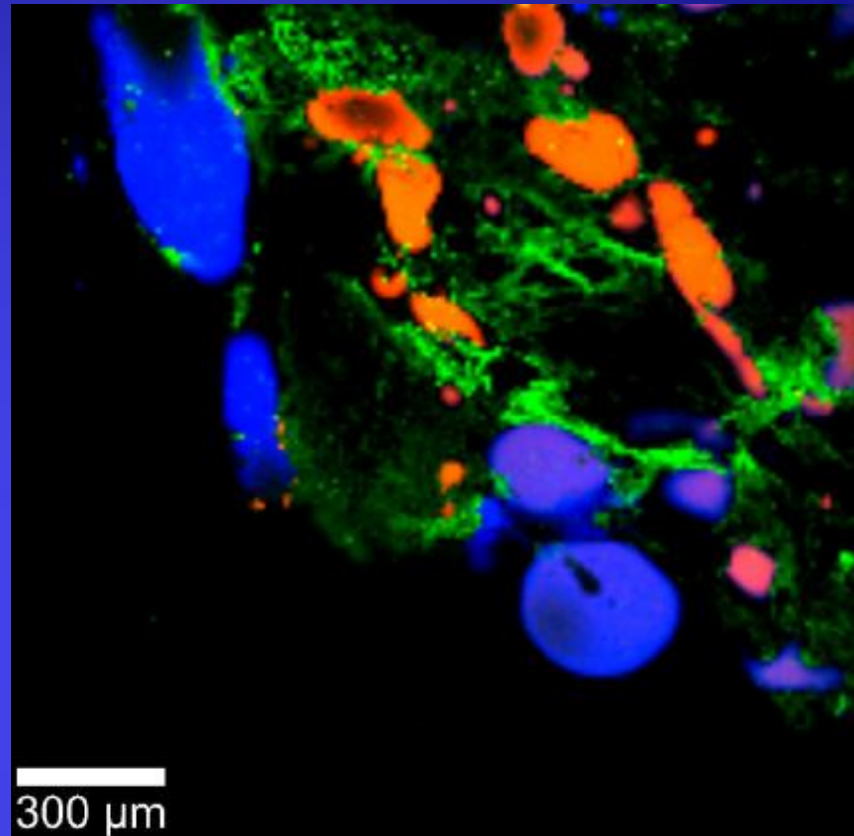


Fig. 5: Color- coded image of the different regions of the cell.
Using the CRM 200 and its software tools, it is not necessary to dye the sample in advance.

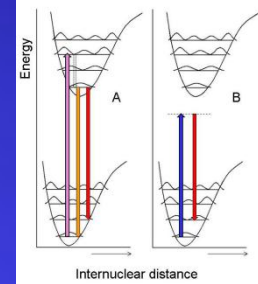


Raman human breast tissue image-
Raman „optical histopathology” image

alpha 700 RA (Witec)

Typically, the sample in Raman imaging is illuminated with ca. 10 mW of the laser power focused into a spot of ca. 200 nm radius that gives a power density of 10^7 W/cm² which is about a limit of damage for the biological tissue.

Rezonansowe obrazowanie Ramana

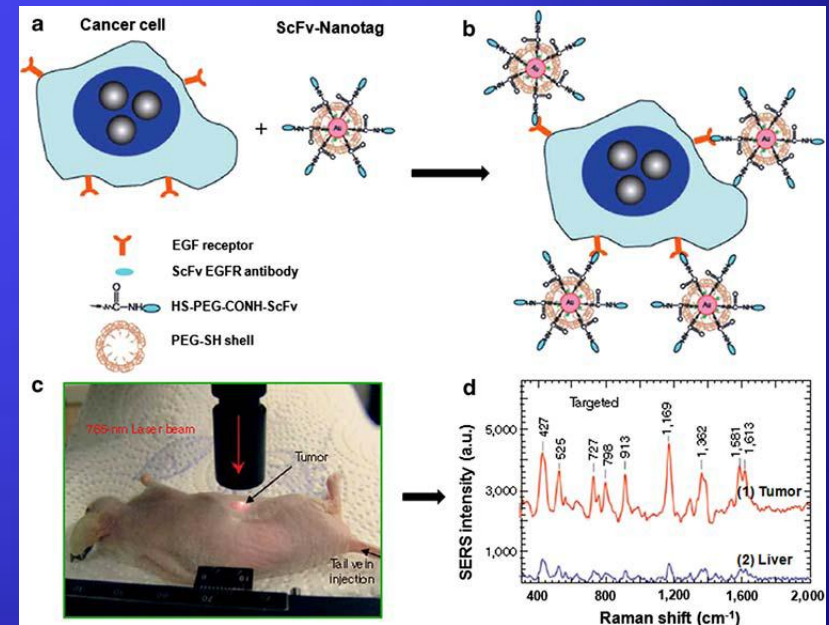
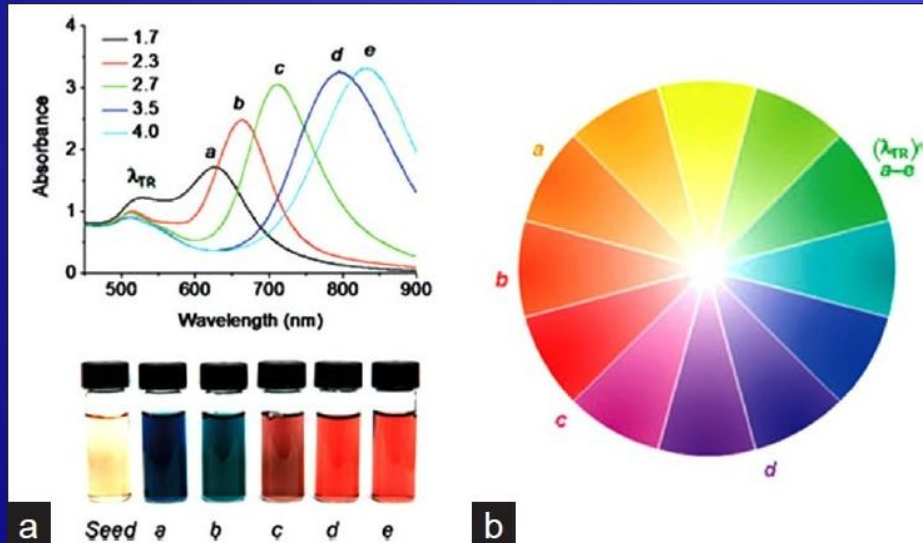
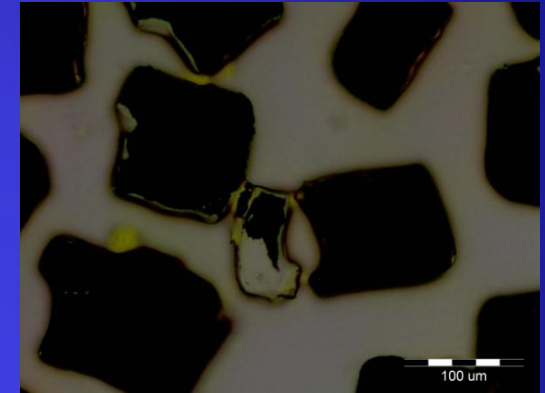
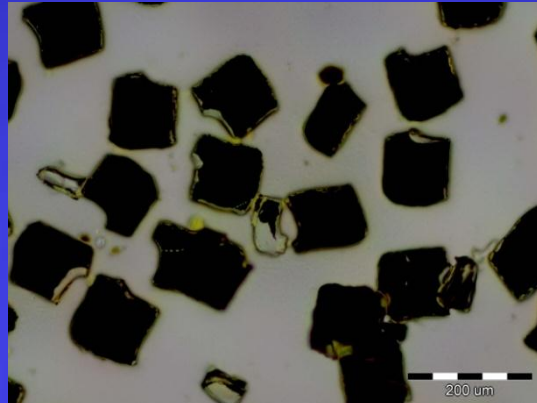
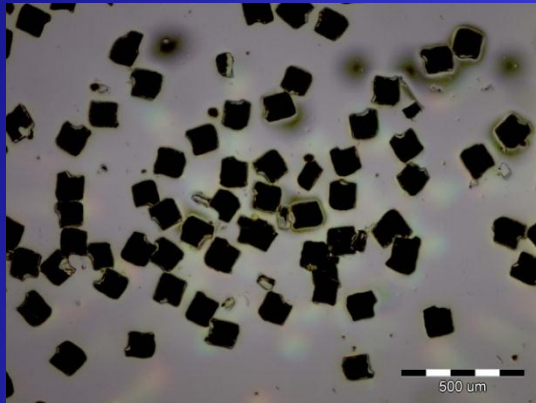


Optyczne efekty nieliniowe

SERS (surface enhanced
Raman spectroscopy)

Nanoparticles

NANOPARTICLES



Mikroskopia nieliniowego obrazowania

- Ponieważ efekty nieliniowe zachodzą tylko w objętości zogniskowanej wiązki laserowej obrazowanie 3D osiąga się bez konieczności stosowania konfokalnej apertury
- Nie ma nakładania się fluorescencji z różnych warstw próbki
- nieliniowe efekty laserów femtosekundowych osiągnięte są dzięki wysokiej mocy szczytowej. Energie pojedynczych impulsów są jednak małe (kilka nJ) i próbki biologiczne nie ulegają uszkodzeniu
- Wykorzystanie laserów femtosekundowych z zakresu IR (800 nm) pozwala na głęboką penetrację w tkance ze względu na niską absorpcję podstawowych składników komórki (woda, białka)

mikrospektroskopia CARS

wymuszone rozpraszanie Ramana
(SRS)

femtosekundowe wymuszone
rozpraszanie Ramana (FSRS)

CARS IMAGING

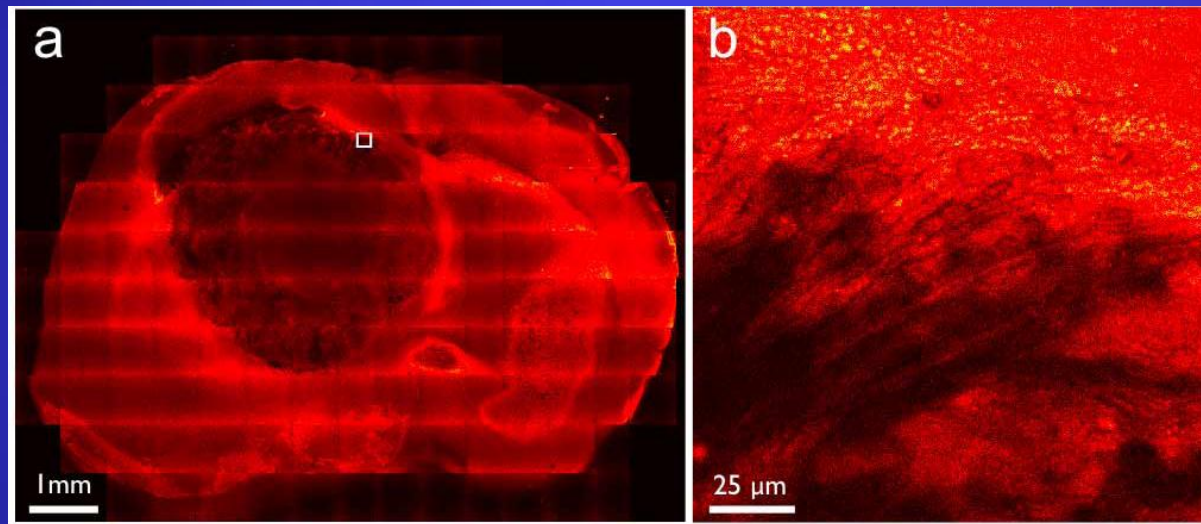
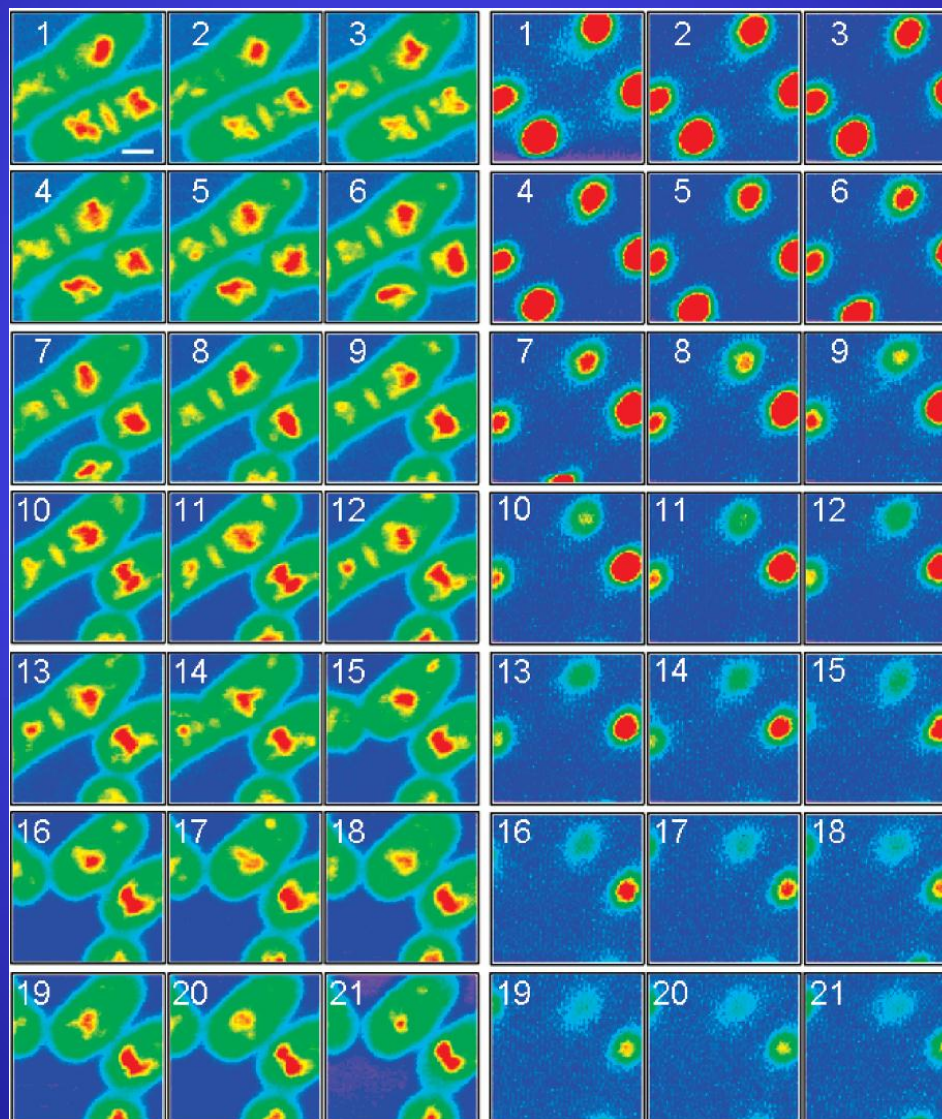


Figure 20: CARS microscopy as a contrast mechanism for imaging tumors in brain tissue of a SCID mouse. By making use of differences in lipid density between tumor tissue and healthy tissue, brain tumor margins can be seen with subcellular spatial resolution in fresh, unstained tissue [44].

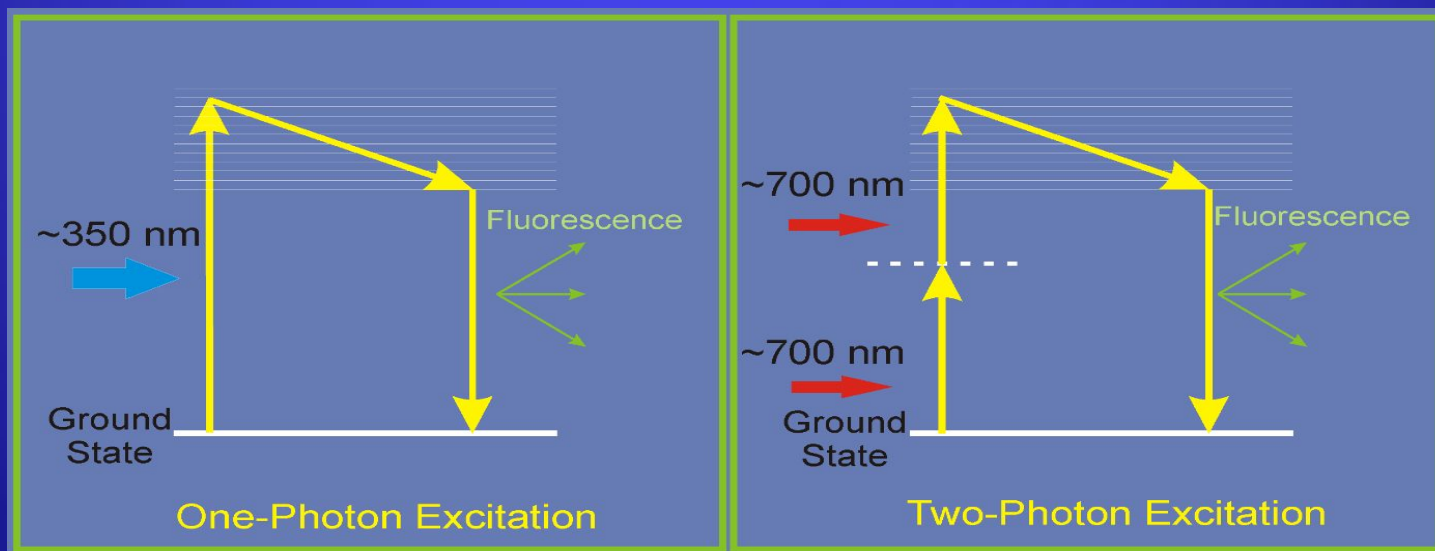
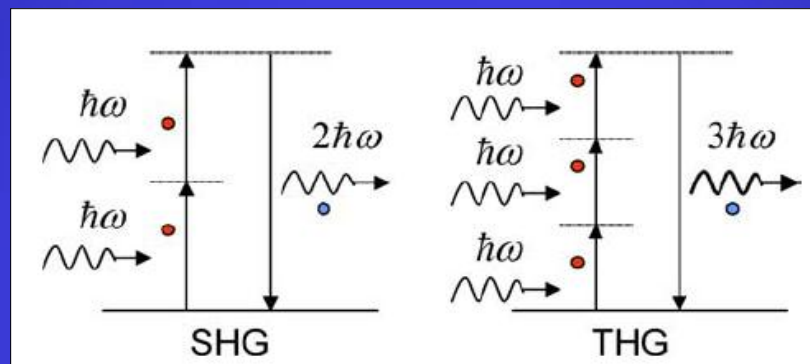
[44] C.L. Evans, X. Xu, S. Kesari, X.S. Xie, S. T.C. Wong, G. S. Young, Optics Express 15, (2007) 12076

CARS at the C-H stretching vibrational mode (a) and TPEF (b) images, respectively. The sample is a living yeast cell, whose nucleus is labeled by GFP. The scale bar corresponds to 2 μm . The number at the upper left shows the time course of the observation. Exposure time at each spatial point is 50 ms. Lateral (XY) images consist of 61 $\times$ 61 pixels and are measured in 3.8 min per one image.

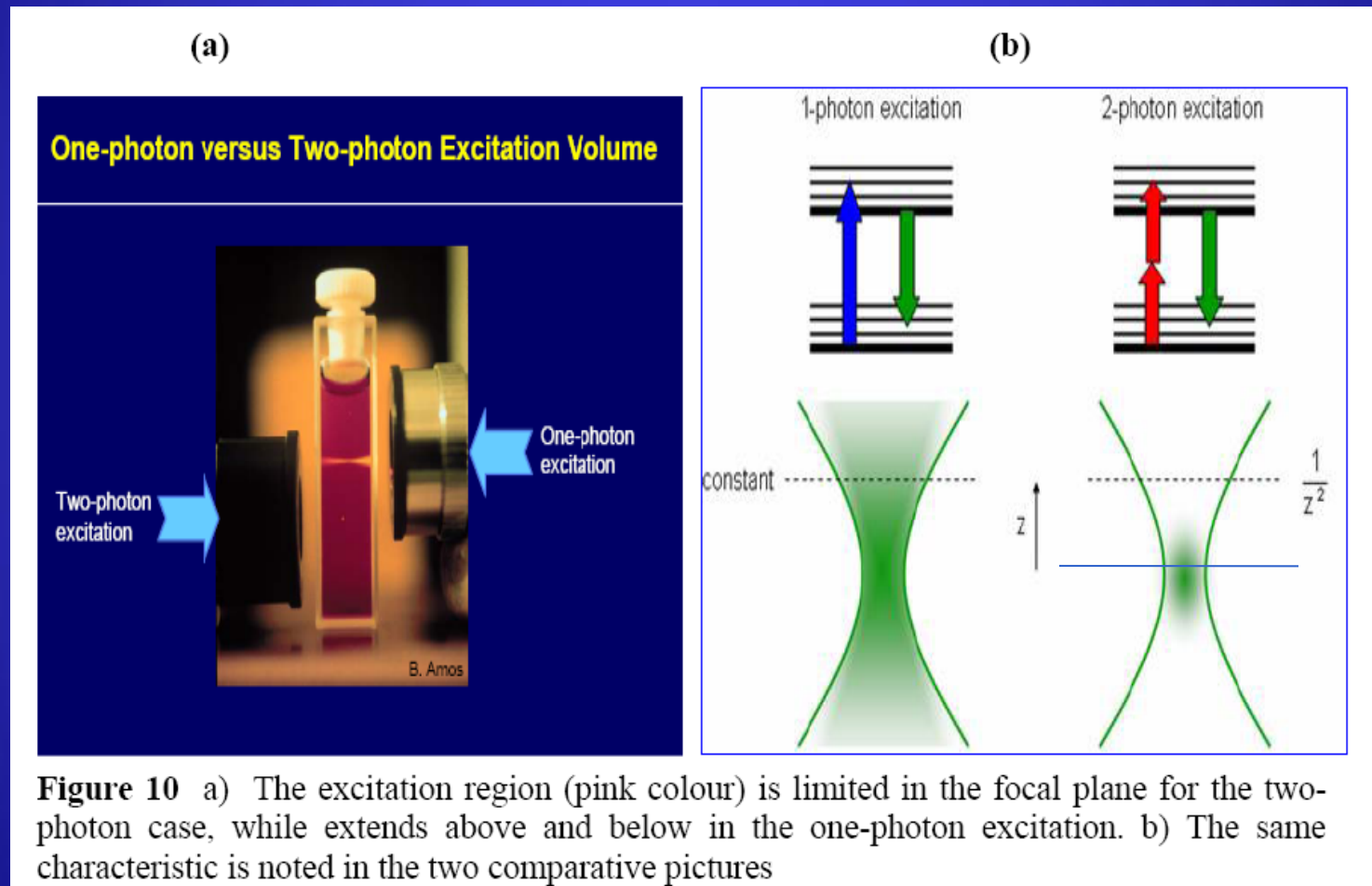
Kano, Hamaguchi
Anal. Chem. **2007**, **79**,
8967-8973



Obrazowanie z wykorzystaniem 2- i 3-fotonowej fluorescencji



For nonlinear phenomena we do not need pinhole to obtain the confocality



TPEF – SHG combined applications

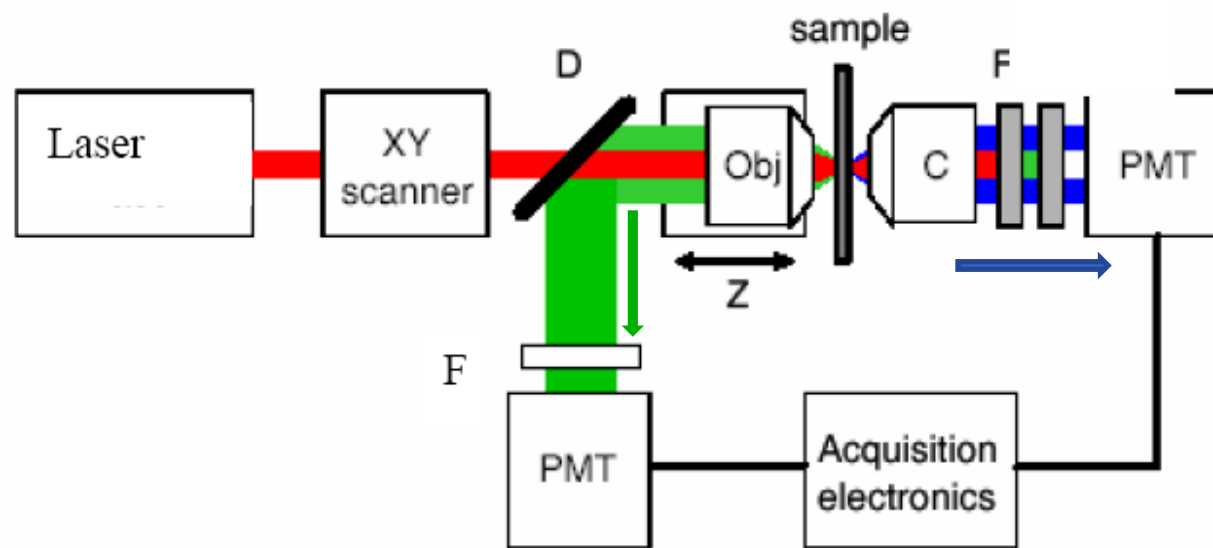
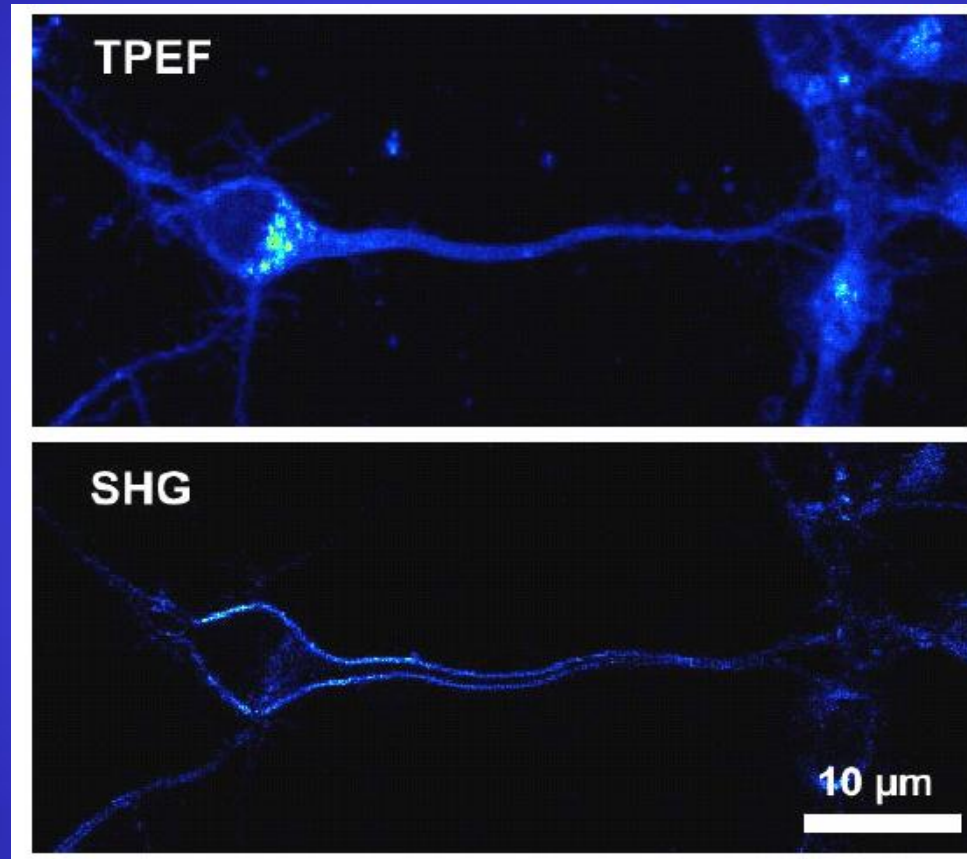


Figure 13 A combined scanning TPEF-SHG microscope. A pulsed femtosecond laser beam (red) is focused into a thin sample. The TPEF (green) is collected in the backward direction using a dichroic beam-splitter. SHG (blue) is collected in the forward direction, after blocking both transmitted laser light and fluorescence.

When TPEF and SHG combined in a single microscope, can reveal complementary informations. As a general principle, it can be said that TPEF gives information about the concentration of chromophores within biological specimens, while SHG provides informations about the global orientation of the chromophores. This principle arises from the coherent character of SHG, which is absent in TPEF. As an example, Figure 14 depicts two



$$P_i = \chi_{ij}^{(1)} E_j + \chi_{ijk}^{(2)} E_j E_k + \chi_{ijkl}^{(3)} E_j E_k E_l$$

Diagnostyka nowotworu gruczołu piersiowego metoda spektroskopii Ramana

H. Abramczyk, I. Placek, B. Brożek-Płuska, K. Kurczewski, Z. Morawiec, M. Tazbir, *Spectroscopy*, Vol. 22, no 2-3, 2008

H. Abramczyk, I. Placek, B. Brożek – Płuska, K. Kurczewski, Z. Morawiec, M. Tazbir Breast Cancer Diagnostics by Raman Spectroscopy. *J. Mol. Liquid*. 2008 141,145-148

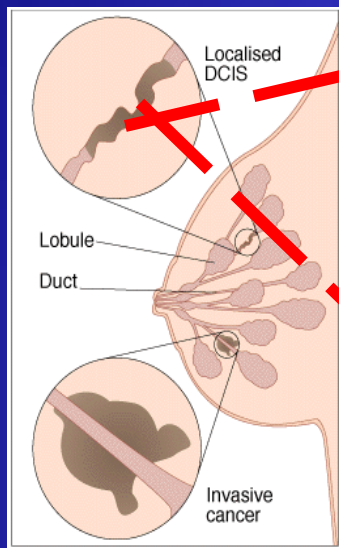
21

H. Abramczyk, J. Surmacki, B. Brożek – Płuska, Z. Morawiec, M. Tazbir, *The Hallmarks of Breast Cancer by Raman Spectroscopy*, J. Mol. Struc. 2009

Cel obrazowania Ramana ?

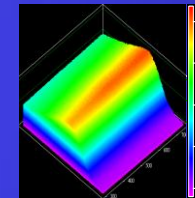
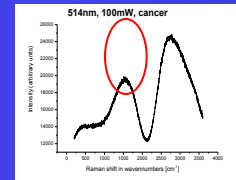
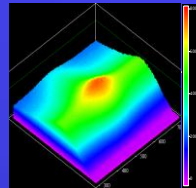
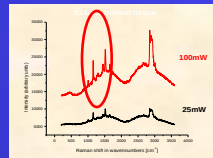
- bezpośrednia diagnoza in vivo
- redukcja liczby biopsji
- metoda biochemiczna – patologia zawsze jest związana z biochemią
- Kombinacja diagnozy biochemicznej i histopatologicznej dostarcza więcej informacji
- metoda ma potencjał wykluczenia ludzkiej interpretacji
- promieniowanie nieinwazyjne, niejonizujące
- wyjątkowo duża rozdzielczość przestrzenna (optical imaging)

Przygotowanie próbki



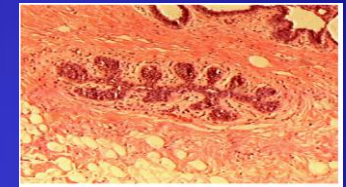
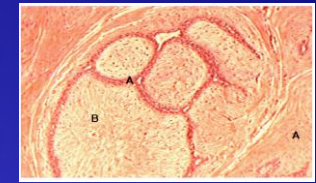
Histopathology

Raman



carcinoma mammae

fibroadenoma mammae



Biological tissues:

healthy breast tissue (*from surgery*)

cancer breast tissue (*from surgery*)

cancer breast tissue (*histopathological sample*)

4

©Medical University of Lodz, Department of Pathology, Chair of Oncology, Paderewskiego 4, 93-509 Lodz, Poland.

❖ Human specimens obtained from surgery. Upon removal during the operation, the ex vivo sample is divided by a doctor into two parts, one goes to our lab, the second goes to the pathology examination

❖ the ex vivo samples are neither frozen in liquid nitrogen for storage nor fixed in formalin, the fresh tissue is measured immediately after delivering from the hospital

❖ The samples for pathology measurements are passively thawed at room temperature and kept moist with PBS fixed in formalin

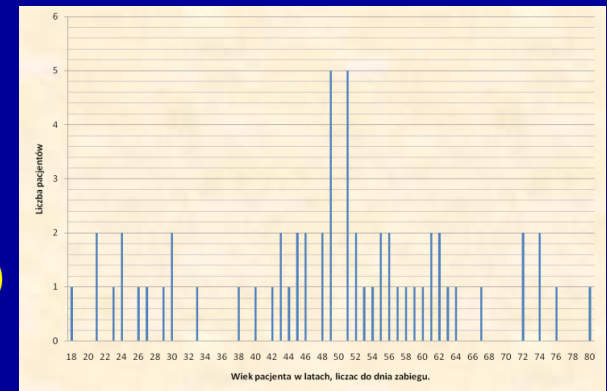
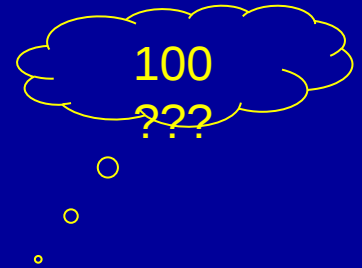
❖ Cut through the marked locations into 5-μm-thick sections, and stained with eosin

70

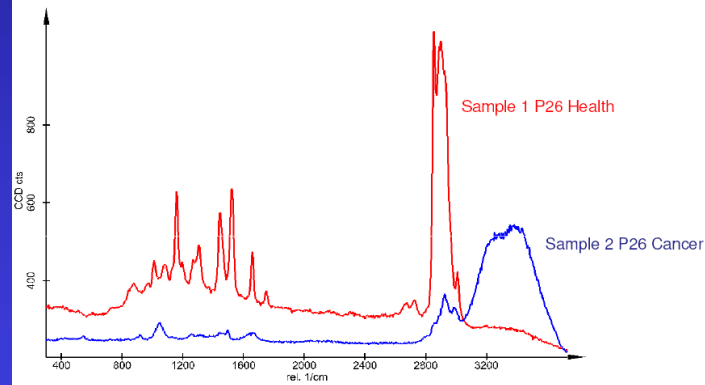
Patients Statistics

❖ **1500 spectra from 146 patients**

- fibroadenomas
- infiltrating carcinoma
- infiltrating ductal carcinoma (IDC)
- infiltrating lobular carcinoma (ILC)
- IDC+ILC
- multifocal carcinoma
- carcinoma microinvasive
- intracystic papillary carcinoma (noninvasive)
- carcinoma mucinosum
- carcinoma intraductal microinvasive
- benign dysplasia
- dysplasia benign dysplasia (cystes, apocrinal metaplasia, adenosis)
- ductal-lobular hyperplasia
- cystic mastopathy



Single Spectra:



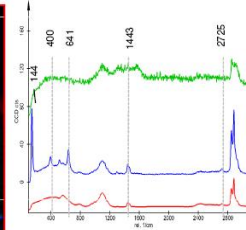
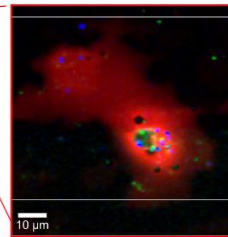
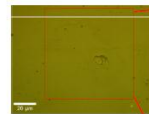
3. 37991/01 Cancer - Scan Area Imaging -

Figure 5

(a) Video image:

(b) Raman image (XY):

(c) Averaged spectra:

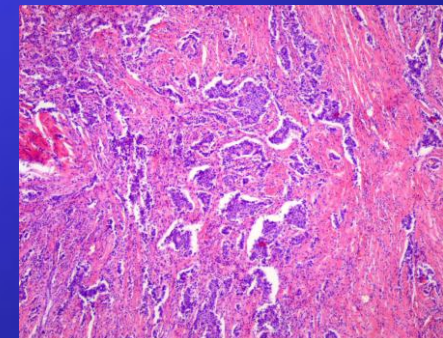
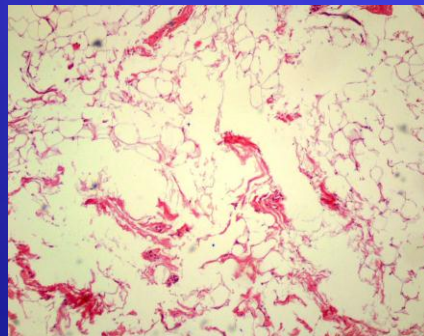
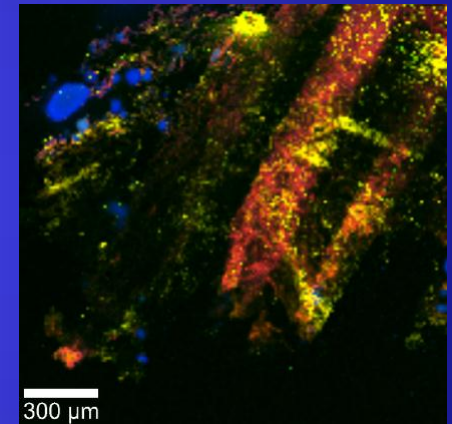
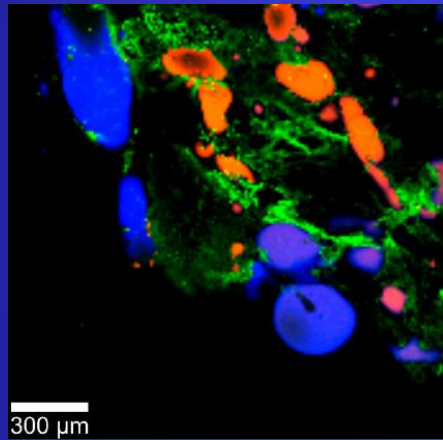


Using the confocal Raman Microscope alpha700 R, sample 3 was measured using a 532 nm laser for Raman imaging and a 50x objective with a numerical aperture (NA) of 0.50.

Figure 5. (a) shows the video image of sample 3 in a smaller area using a 100x100 μm piezo scanner. (b) The Raman image of the region (80x80 μm) marked in (a) obtained by basis analysis from the average spectra, shown in (c). These three spectra were averaged from three different areas in the sample. The Raman images reveal an inhomogeneous distribution of the different compounds in the sample. The colors of the spectra correspond to the colors in the image. Mixed areas are displayed as mixed colors.

Image Scan (XY):

Points per Line: 120
Lines per Image: 120
Scan Width [μm]: 80
Scan Height [μm]: 80
Integration Time [s]: 0.2



APARATURA

- Raman spectrometer Ramanor U1000 (Jobin Yvon), CCD, ion Ar (488, 514)

- alpha 700 RA (Witec, Germany), SHG NdYAG 532 nm

equipped with:

- an UHTS spectrometer,
- a Newton-CCD camera (operated in standard mode)
Raman acquisition modes used for these samples
- a frequency doubled NdYAG laser with 532 nm,
- a Olympus 50x (NA = 0.50) objective.

DV401_BU2:

Width [Pixels]: 1024

Height [Pixels]: 127

Temperature [°C]: -60

Read out: Full Vertical Binning

UHTS300:

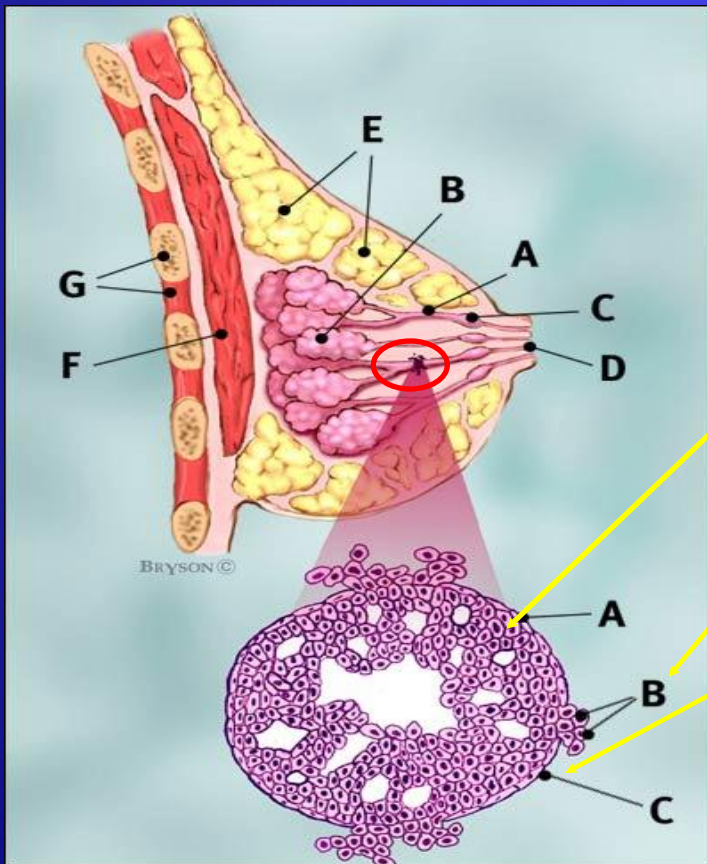
Excitation Wavelength [nm]: 532

Grating: T1: 600 g/mm BLZ=500nm

Center Wavelength [nm]: 595.337

Spectral Center [rel. 1/cm]: 2003.319

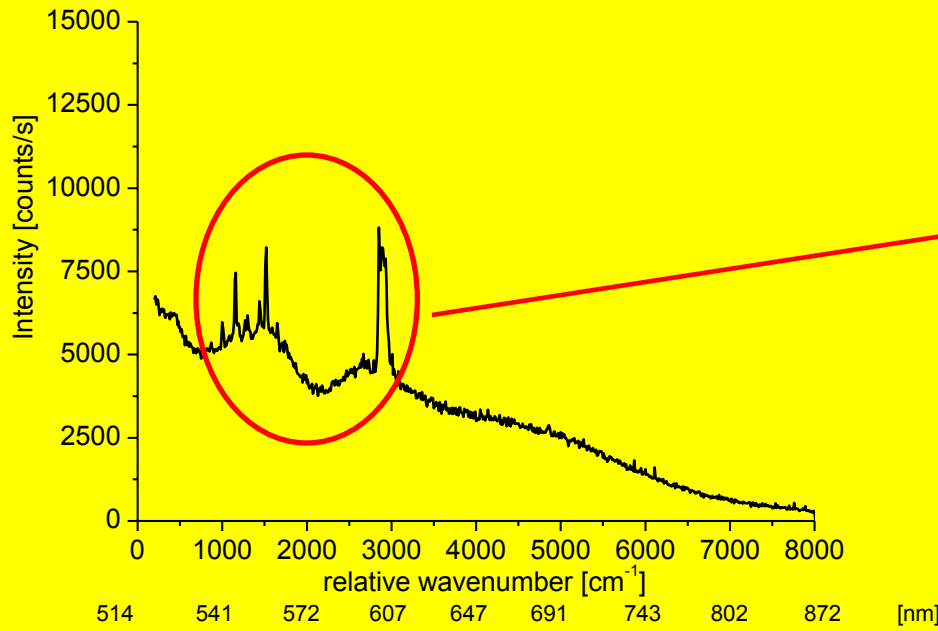
Comparison between the Raman spectra for normal and malignant tissue (infiltrating ductal carcinoma (IDC))



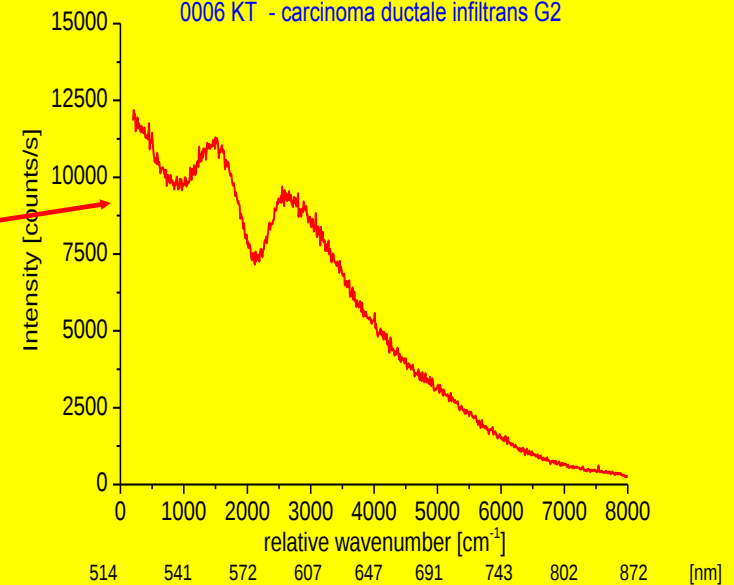
- A normal duct cells
- B ductal cancer cells breaking through the basement membrane
- C basement membrane

Comparison between the Raman spectra for normal and malignant tissue (infiltrating ductal carcinoma (IDC))

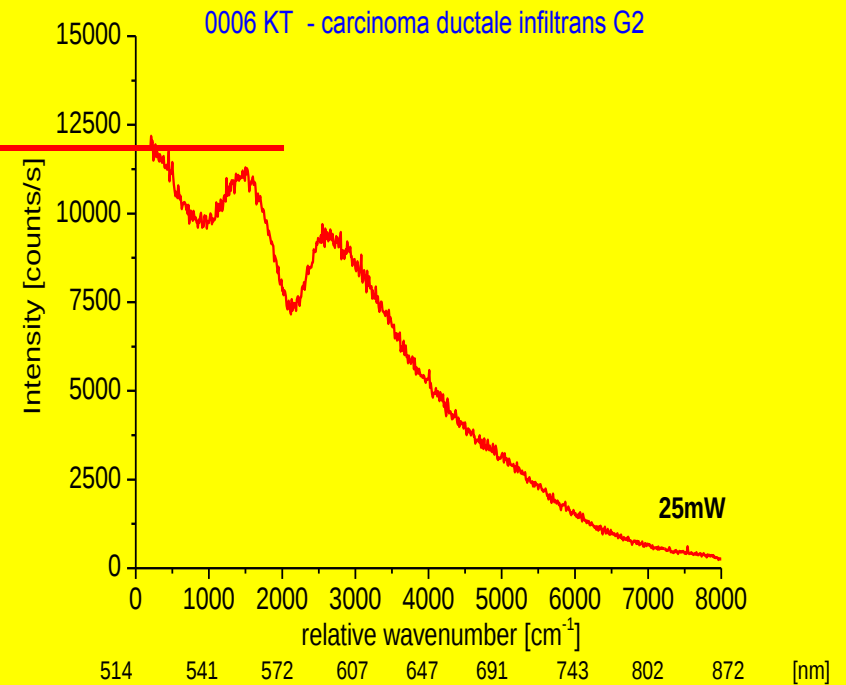
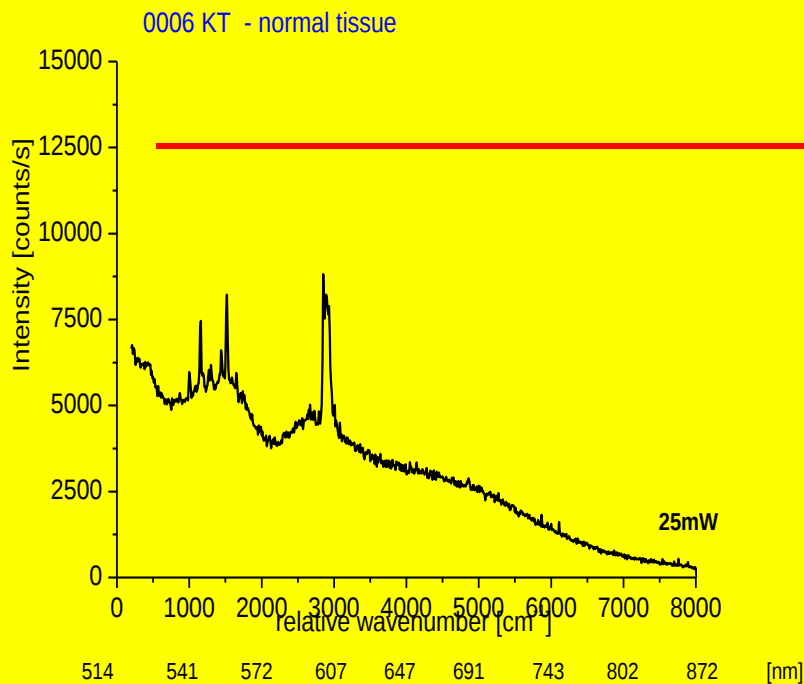
0006 KT - normal tissue



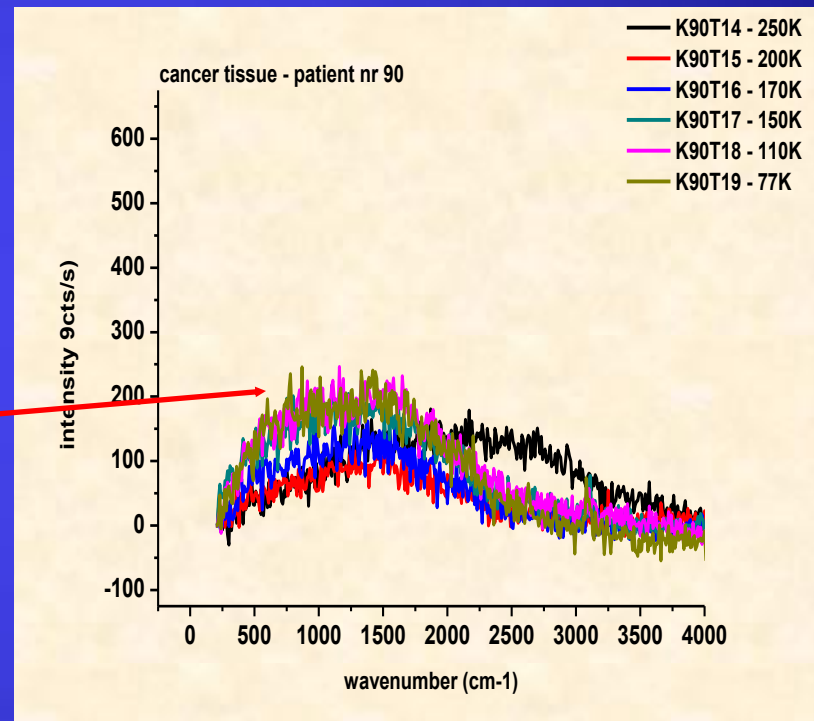
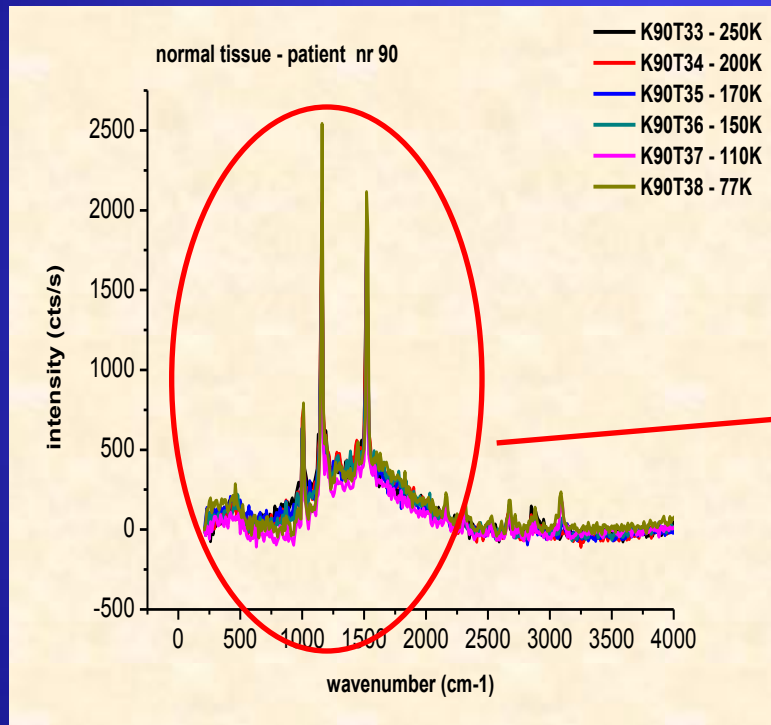
0006 KT - carcinoma ductale infiltrans G2



Comparison between the Raman spectra for normal and malignant tissue (infiltrating ductal carcinoma (IDC))



Wygaszanie fluorescencji w niskotemperaturowej spektroskopii



Comparison between the Raman Tumor & Healthy samples

Figure 3

Single Spectra:

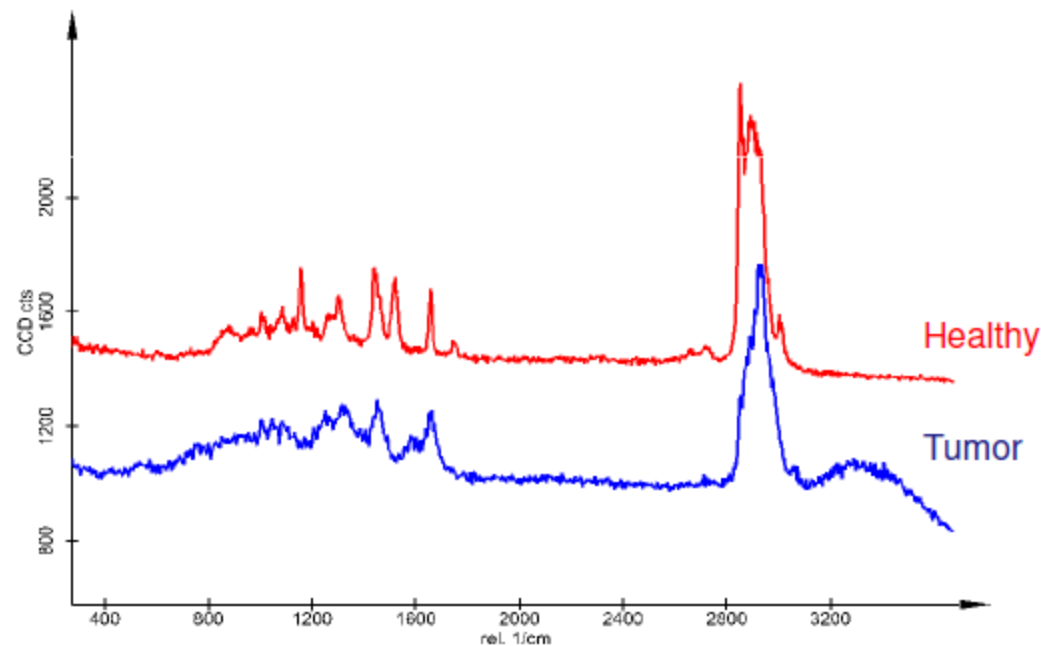
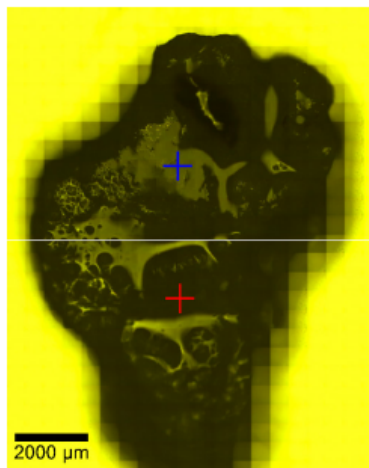


Figure 3. shows the Raman spectra of *sample 1 (Health)* and *sample 2 (Tumor)* for spectral comparison.

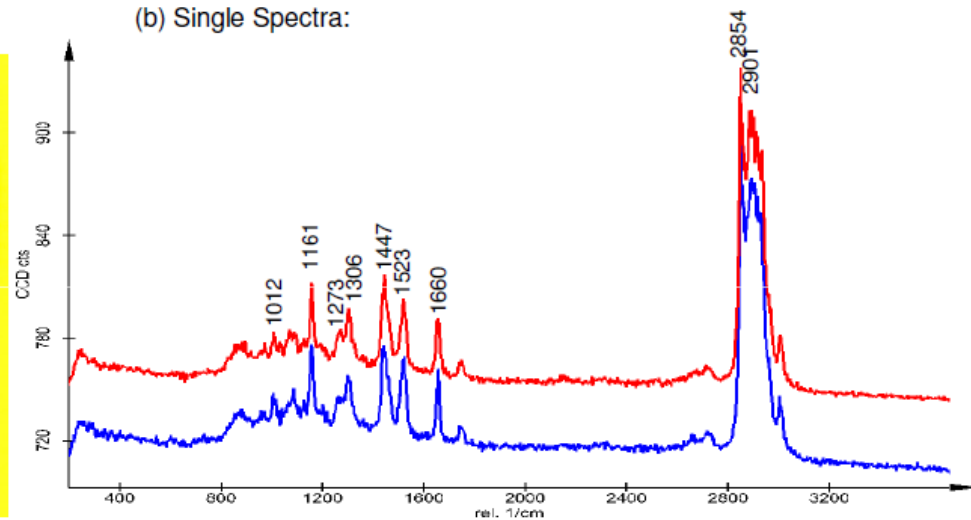
1. Healthy tissue (from surgery)

Figure 1

(a) Stitching image:



(b) Single Spectra:



Single spectra

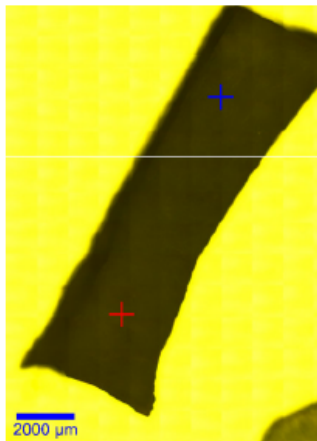
Wavelength [nm]: 532
Objective: 50x 0.50NA
Integration Time [s]: 0.2
Accumulations: 5

Figure 1.a. shows a stitching image composed of hundreds of video images for a larger overview of the sample. Two single spectra, Fig.1.b., were achieved at the positions marked in the stitching image, Fig.1.a., with a integration time of 0.2 s.

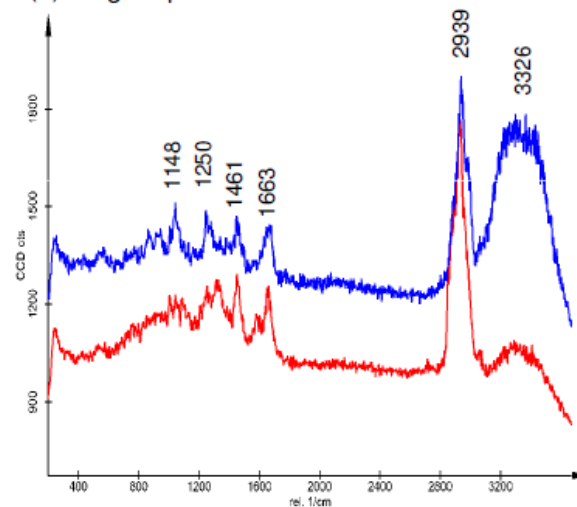
2. Tumor tissue (from surgery)

Figure 2

(a) Stitching image:



(b) Single Spectra:



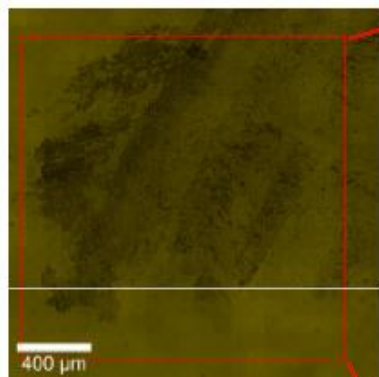
Single spectra
Wavelength [nm]: 532
Objective: 50x 0.50NA
Integration Time [s]: 0.5
Accumulations: 5

Figure 2.a. shows a stitching image composed of hundreds of video images for a larger overview of the sample. Two single spectra, Fig.2.b., were achieved at the positions marked in the video image, Fig.2.a., with a integration time of 0.5s.

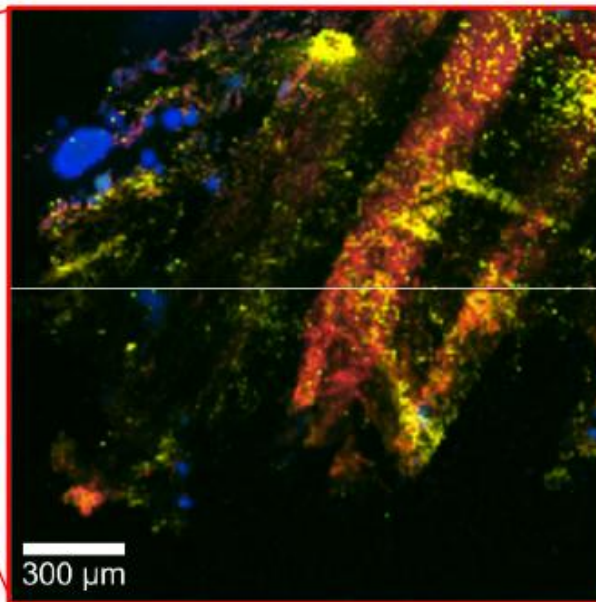
4. Cancer tissue (histopathological sample)

Figure 5

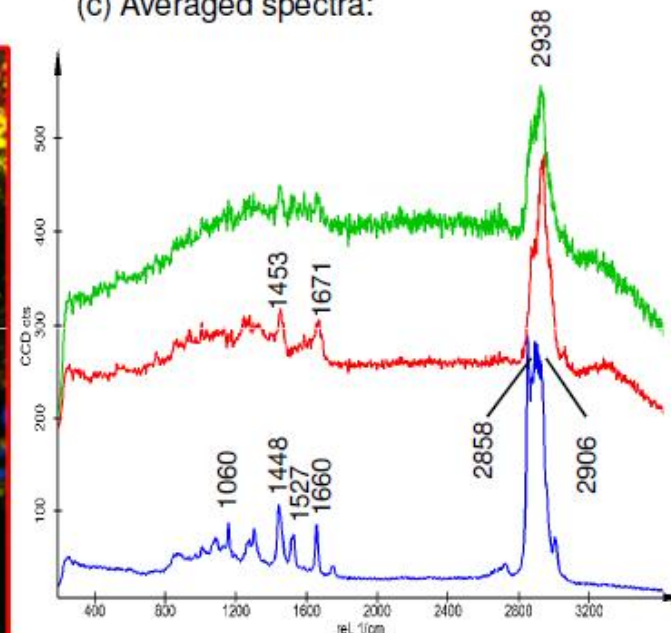
(a) Stitching image:



(b) Raman image (XY):



(c) Averaged spectra:



Using the confocal Raman Microscope alpha500 R, sample 4 was measured using a 532 nm laser for Raman imaging and a 50x objective with a numerical aperture (N.A.) of 0.50.

Figure 5. (a) shows the stitching image (2x2 mm) of sample 3 composed of hundreds of single video images. (b) The Raman image (1.75x1.75 mm) of the region marked in (a) obtained by basis analysis from the average spectra, is shown in (c). These three spectra were averaged from three different areas in the sample. The Raman images reveal an inhomogeneous distribution of the different compounds in the sample. The colors of the spectra correspond to the colors in the image. Mixed areas are displayed as mixed colors.

Colors.

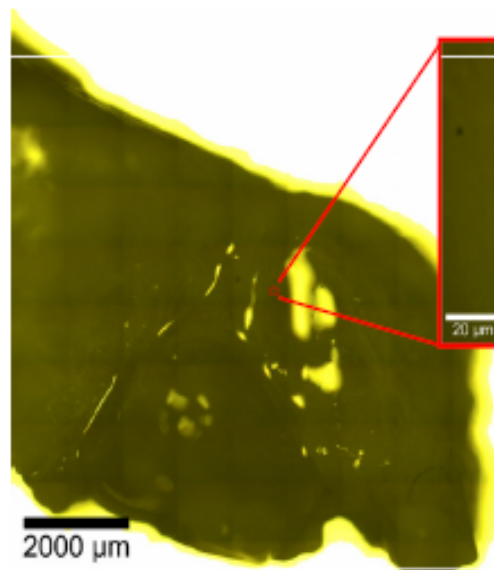
Image Scan (XY):

Points per Line:	175
Lines per Image:	175
Scan Width [μm]:	1750
Scan Height [μm]:	1750
Integration Time [s]:	0.2

1. Sample 1 P26 Health tissue

Figure 1

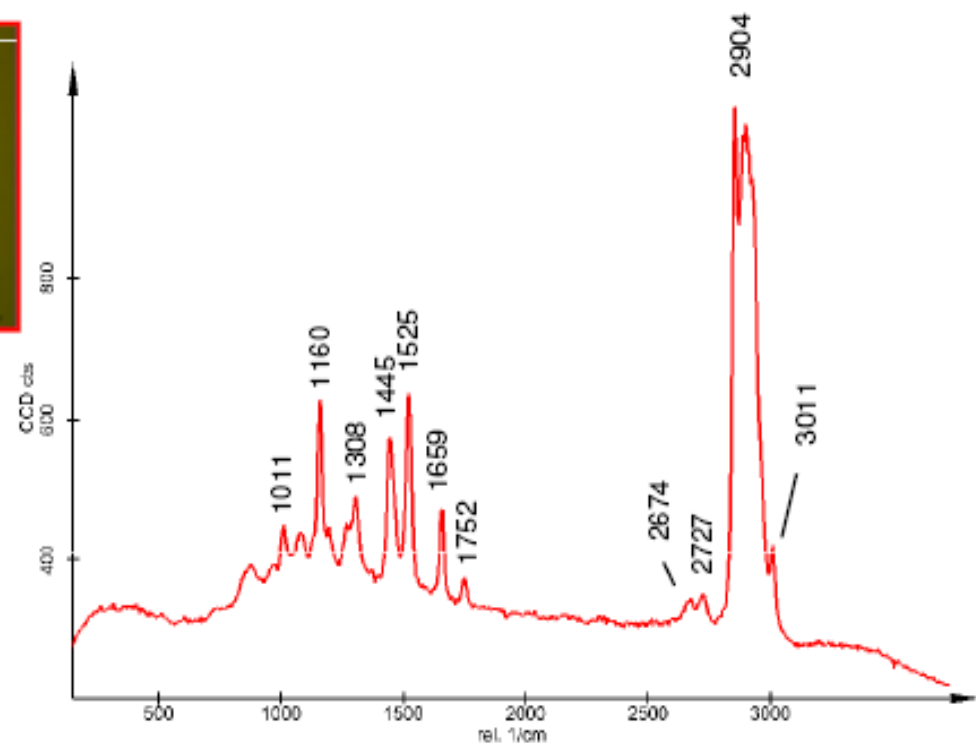
(a) Stitching image:



(b) Video image:



(c) Single Spectrum:



Single spectrum

Wavelength [nm]: 532
Objective: 50x 0.50NA
Integration Time [s]: 0.5
Acumulations: 3

Figure 1.a. shows a stitching image composed of hundreds of video images for a larger overview of the sample. A single spectrum of sample 1, Fig.1.c., was achieved at the position marked in the video image, Fig.1.b., with a integration time of 0.5 s.

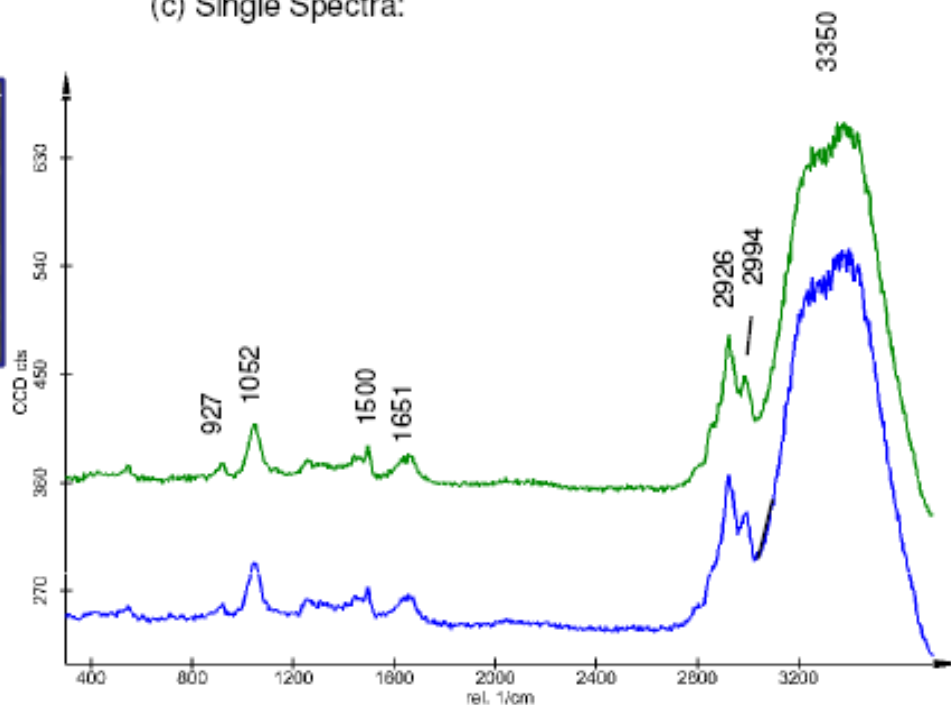
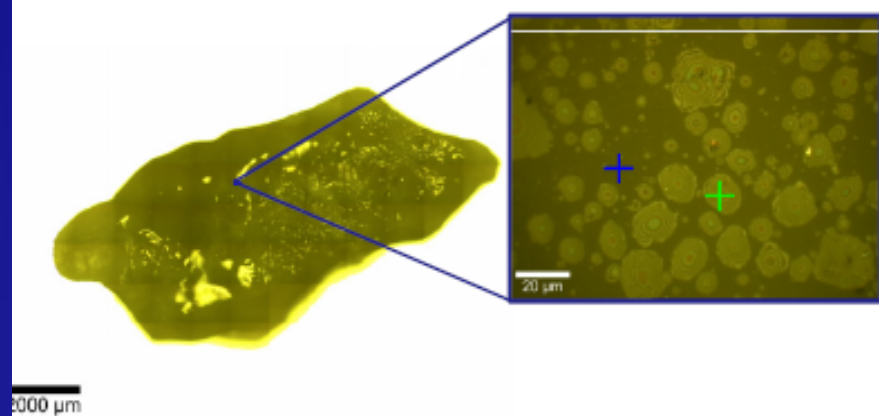
2. Sample 2 P26 Cancer tissue

Figure 2

(a) Stitching image:

(b) Video image:

(c) Single Spectra:



Single spectra

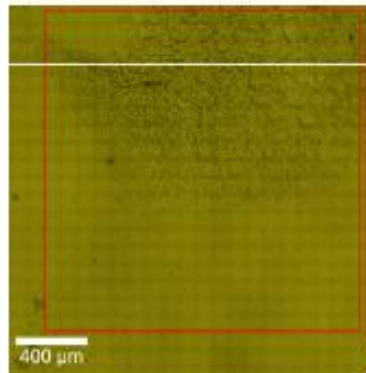
Wavelength [nm]: 532
Objective: 50x 0.50NA
Integration Time [s]: 1
Acumulations: 3

Figure 2.a. shows a stitching image composed of hundreds of video images for a larger overview of the sample. Two single spectra of sample 2, Fig.2.c., were achieved at the position marked in the video image, Fig.2.b., with a integration time of 1s.

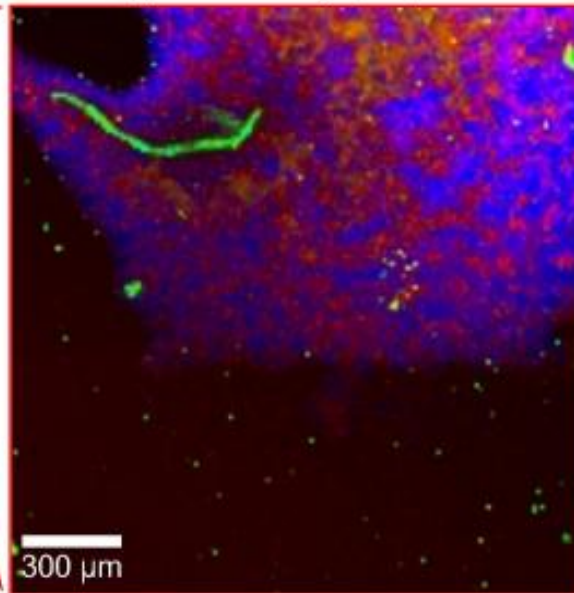
3. 37991/01 Cancer - Large area imaging -

Figure 4

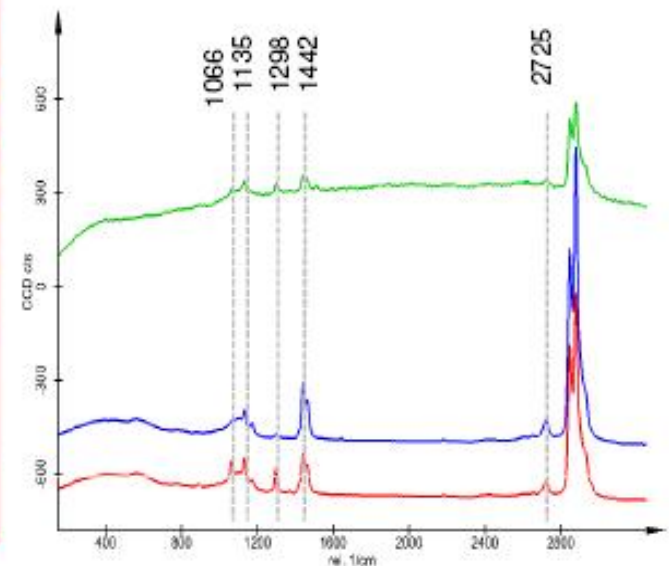
(a) Stitching image:



(b) Raman image (XY):



(c) Averaged spectra:



Using the confocal Raman Microscope alpha700 R, sample 3 was measured using a 532 nm laser for Raman imaging and a 50x objective with a numerical aperture (N.A.) of 0.50.

Figure 4. (a) shows the stitching image (2x2 mm) of sample 3 composed of hundreds of single video images. (b) The Raman image (1.75x1.75 mm) of the region marked in (a) obtained by basis analysis from the average spectra, is shown in (c). These three spectra were averaged from three different areas in the sample. The Raman images reveal an inhomogeneous distribution of the different compounds in the sample. The colors of the spectra correspond to the colors in the image. Mixed areas are displayed as mixed colors.

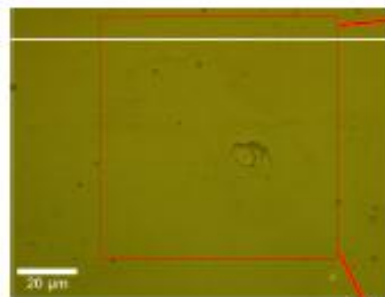
Image Scan (XY):

Points per Line:	120
Lines per Image:	120
Scan Width [μm]:	1750
Scan Height [μm]:	1750
Integration Time [s]:	0.5

3. 37991/01 Cancer - Scan Area Imaging -

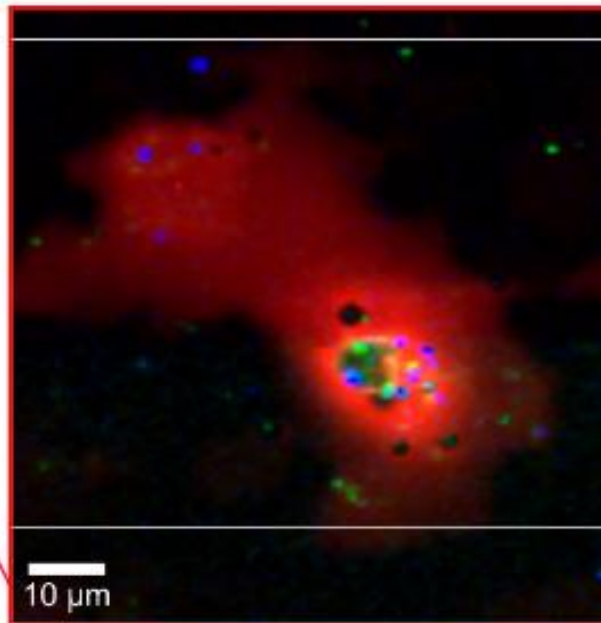
Figure 5

(a) Video image:



Using the confocal Raman Microscope alpha700 R, sample 3 was measured using a 532 nm laser for Raman imaging and a 50x objective with a numerical aperture (N.A.) of 0.50.

(b) Raman image (XY):



(c) Averaged spectra:

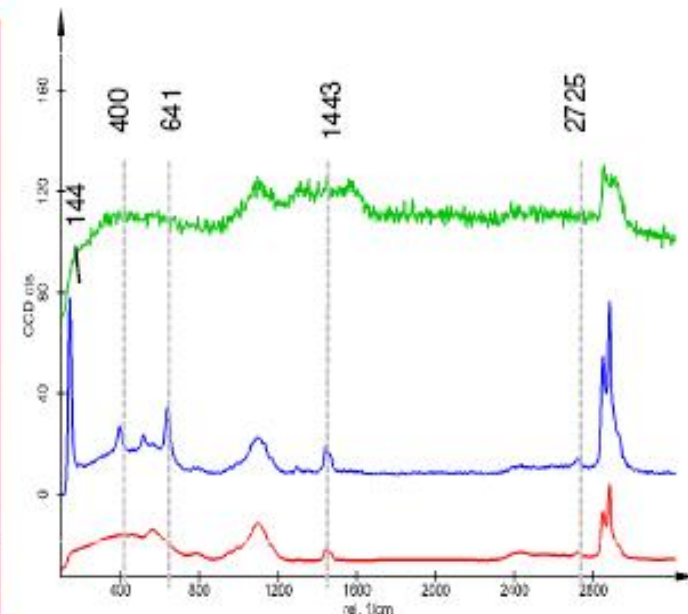


Figure 5. (a) shows the video image of sample 3 in a smaller area using a 100x100 μm piezo scanner. (b) The Raman image of the region (80x80 μm) marked in (a) obtained by basis analysis from the average spectra, shown in (c). These three spectra were averaged from three different areas in the sample. The Raman images reveal an inhomogeneous distribution of the different compounds in the sample. The colors of the spectra correspond to the colors in the image. Mixed areas are displayed as mixed colors.

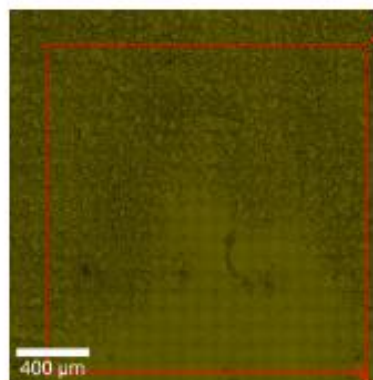
Image Scan (XY):

Points per Line:	120
Lines per Image:	120
Scan Width [μm]:	80
Scan Height [μm]:	80
Integration Time [s]:	0.2

4. 37991/02 Cancer - Large area imaging -

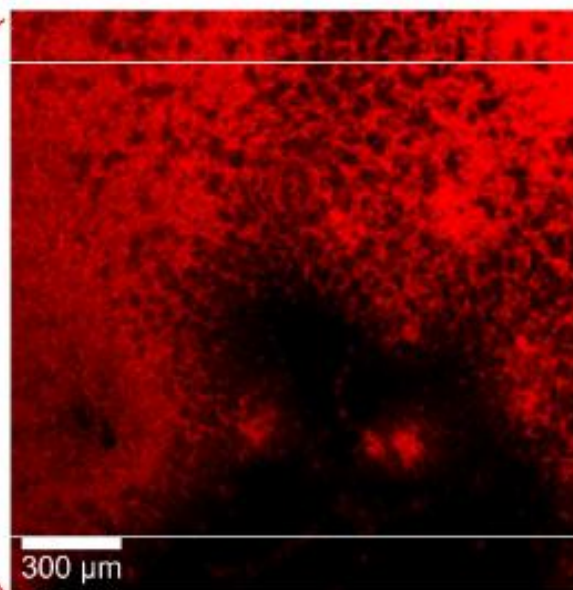
Figure 6

(a) Stitching image:



Using the confocal Raman Microscope alpha700 R, sample 4 was measured using a 532 nm laser for Raman imaging and a 50x objective with a numerical aperture (N.A.) of 0.50.

(b) Raman image (XY):



(c) Averaged spectra:

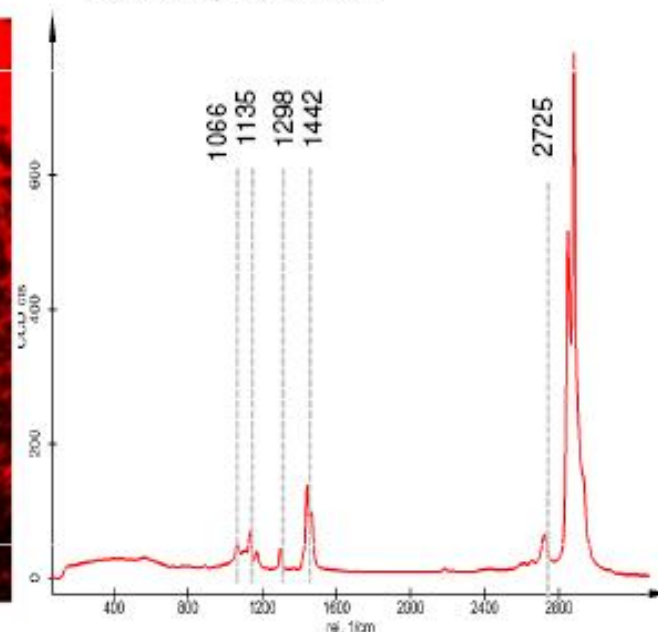


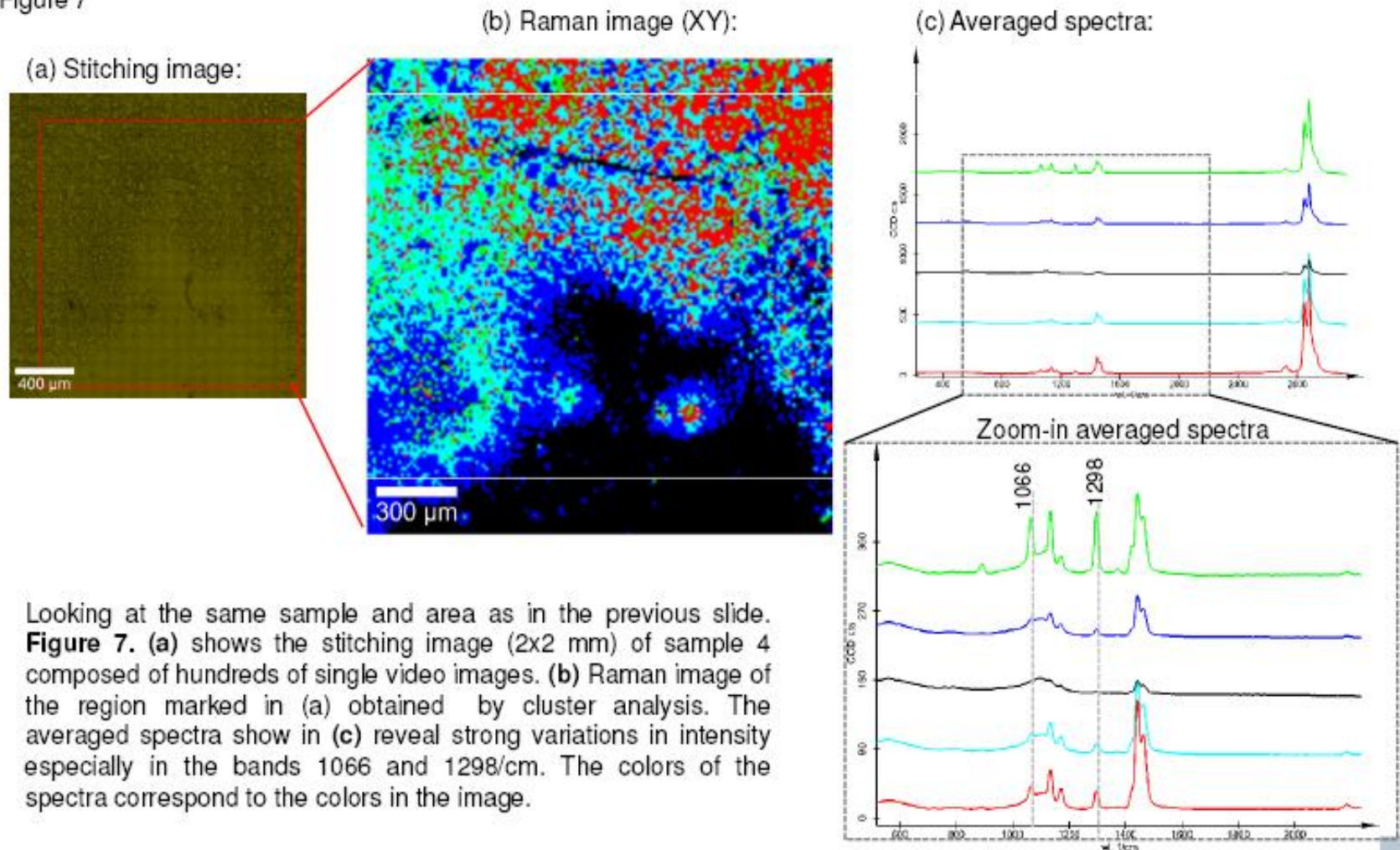
Figure 6. (a) shows the stitching image (2x2 mm) of sample 4 composed of hundreds of single video images. (b) The Raman image (1.75x1.75 mm) of the region marked in (a) is obtained by integrating over the CH-band (2775-3000/cm). The averaged spectrum is shown in (c). Before recording a spectrum, the fluorescence in the sample was quenched during 500 ms at each point. Variations in fluorescence intensity and form have been observed in all the sample.

Image Scan (XY):

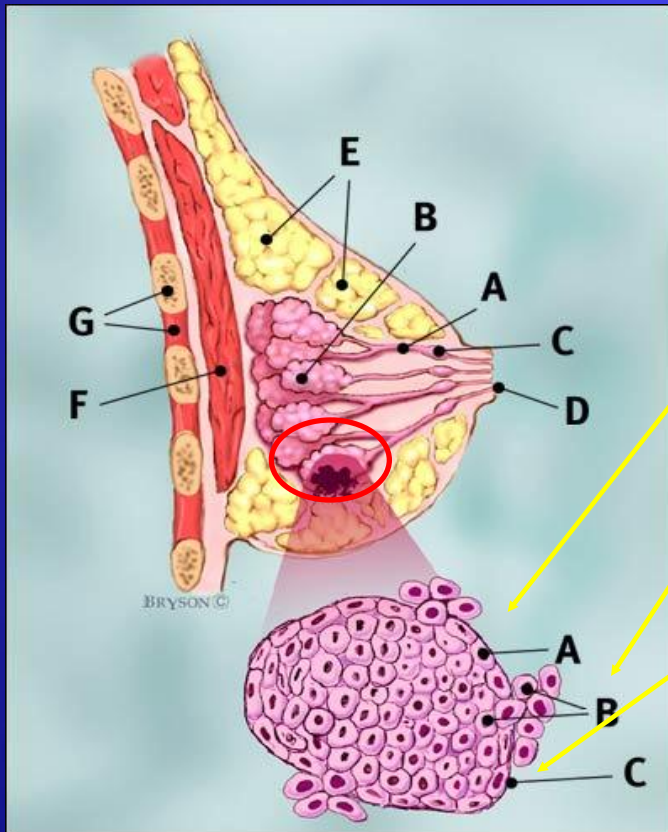
Points per Line:	150
Lines per Image:	150
Scan Width [μm]:	1750
Scan Height [μm]:	1750
Integration Time [s]:	0.5

4. 37991/02 Cancer - Cluster Analysis -

Figure 7



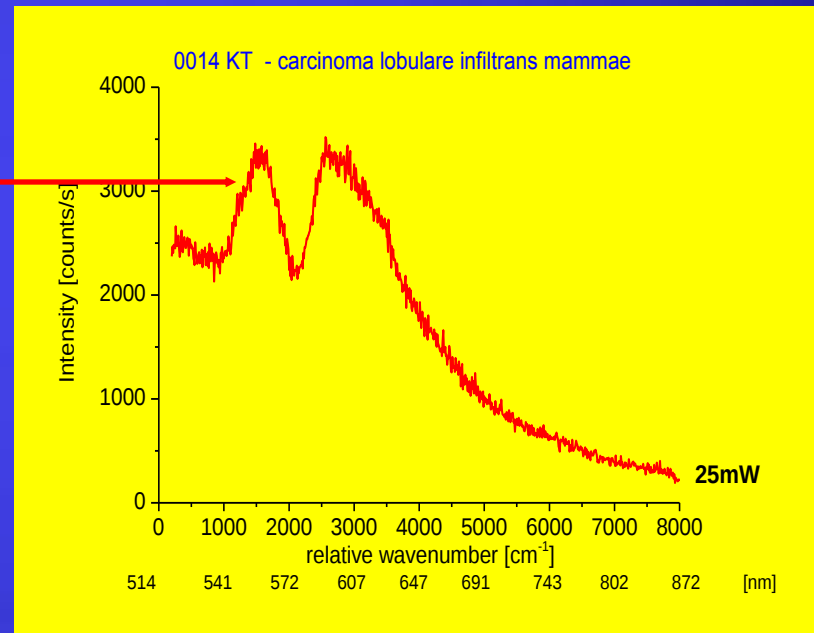
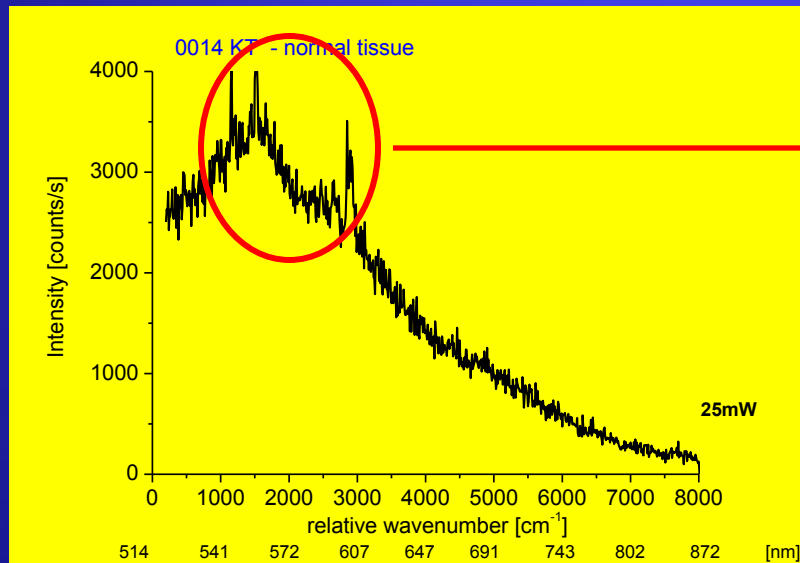
Comparison between the Raman spectra for normal and malignant tissue (infiltrating lobular carcinoma (ILC))



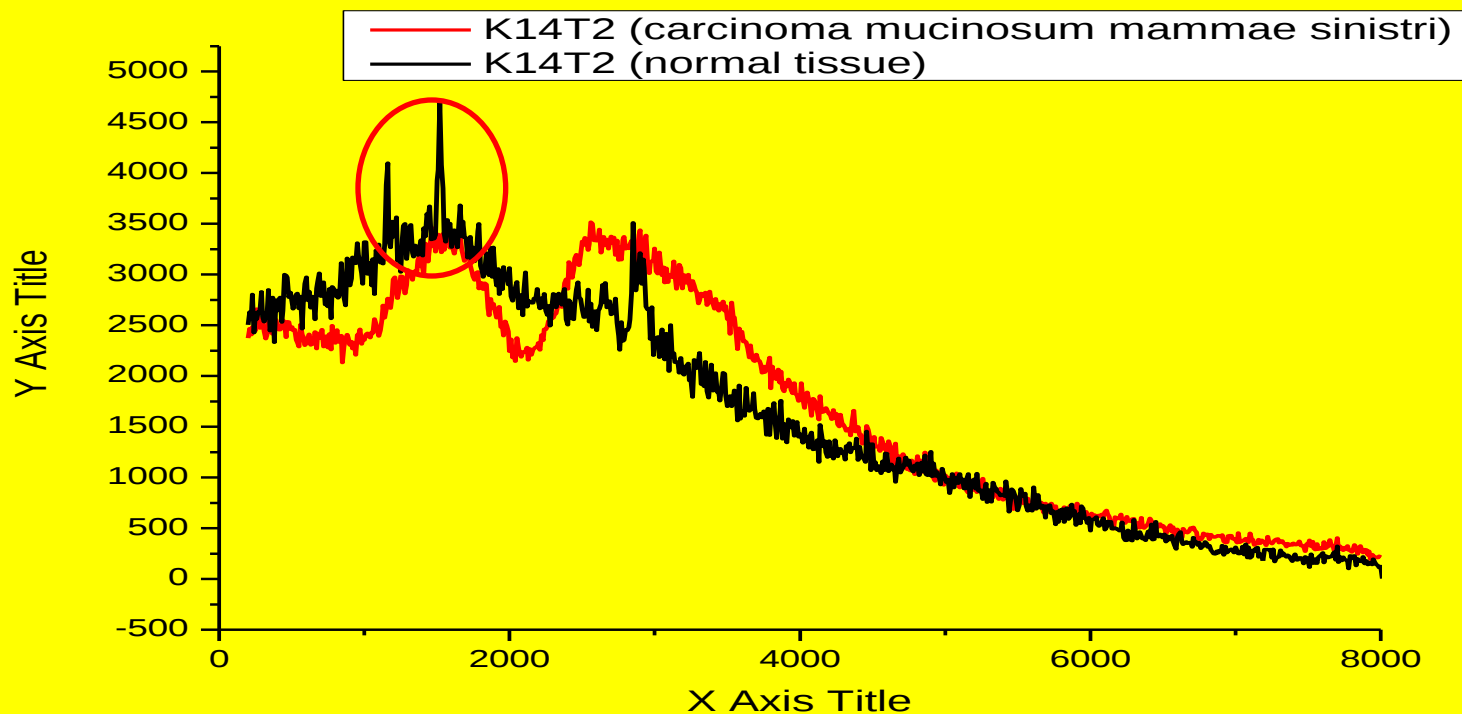
- **A** normal cells
- **B** lobular cancer cells breaking through the basement membrane
- **C** basement membrane

<http://www.breastcancer.org/pictures/>

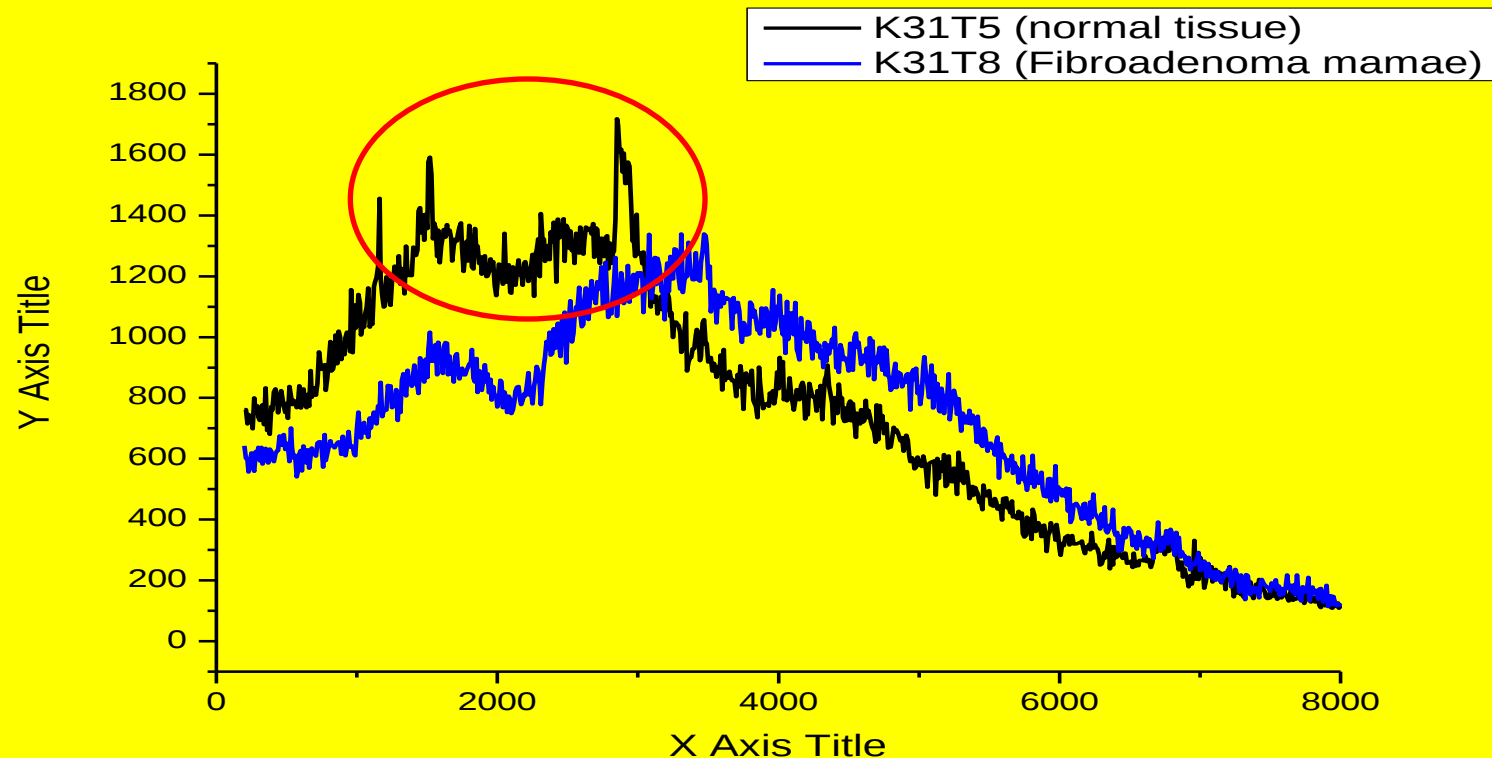
Comparison between the Raman spectra for normal and malignant tissue (infiltrating lobular carcinoma (ILC))



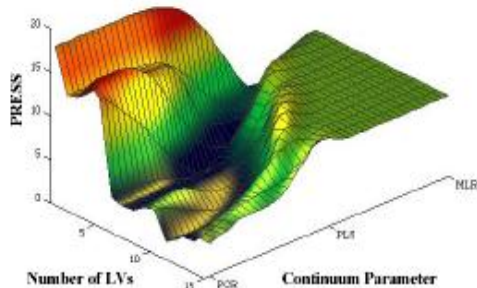
Comparison between the Raman spectra for normal and malignant tissue (carcinoma mucinosum)



Comparison between the Raman spectra for normal and benign tumour tissue (fibroadenoma)



PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA)



PLS_Toolbox 4.0

for use with MATLAB™

Barry M. Wise
Neal B. Gallagher
Rasmus Bro

Jeremy M. Shaver
Willem Windig
R. Scott Koch



PLS_Toolbox Version 4.0
for use with MATLAB™

**Barry M. Wise
Neal B. Gallagher
Rasmus Bro
Jeremy M. Shaver
Willem Windig
R. Scott Koch**

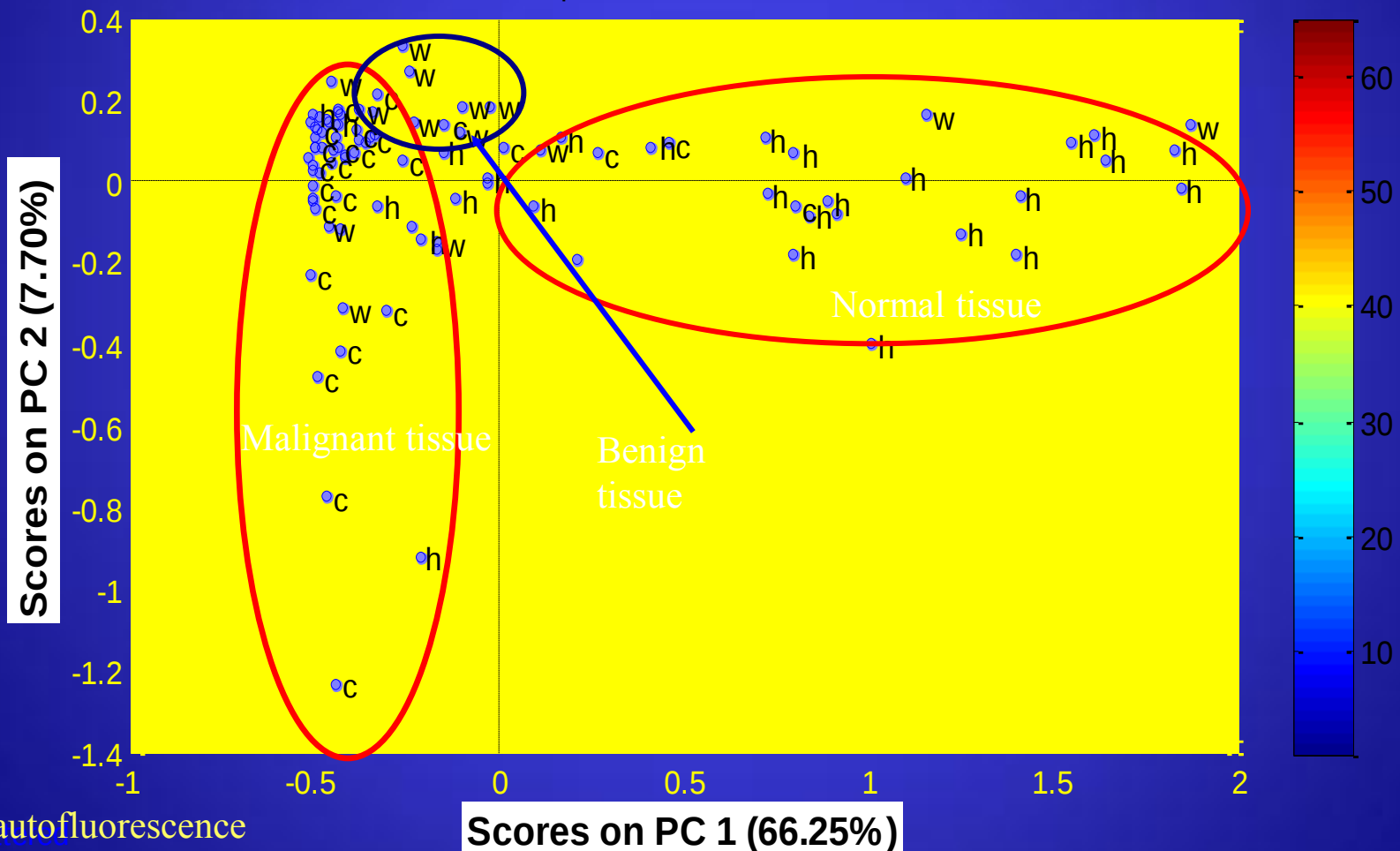
**Eigenvector Research, Inc.
3905 West Eaglerock Drive
Wenatchee, WA 98801**

**helpdesk@eigenvector.co
m
www.eigenvector.com**

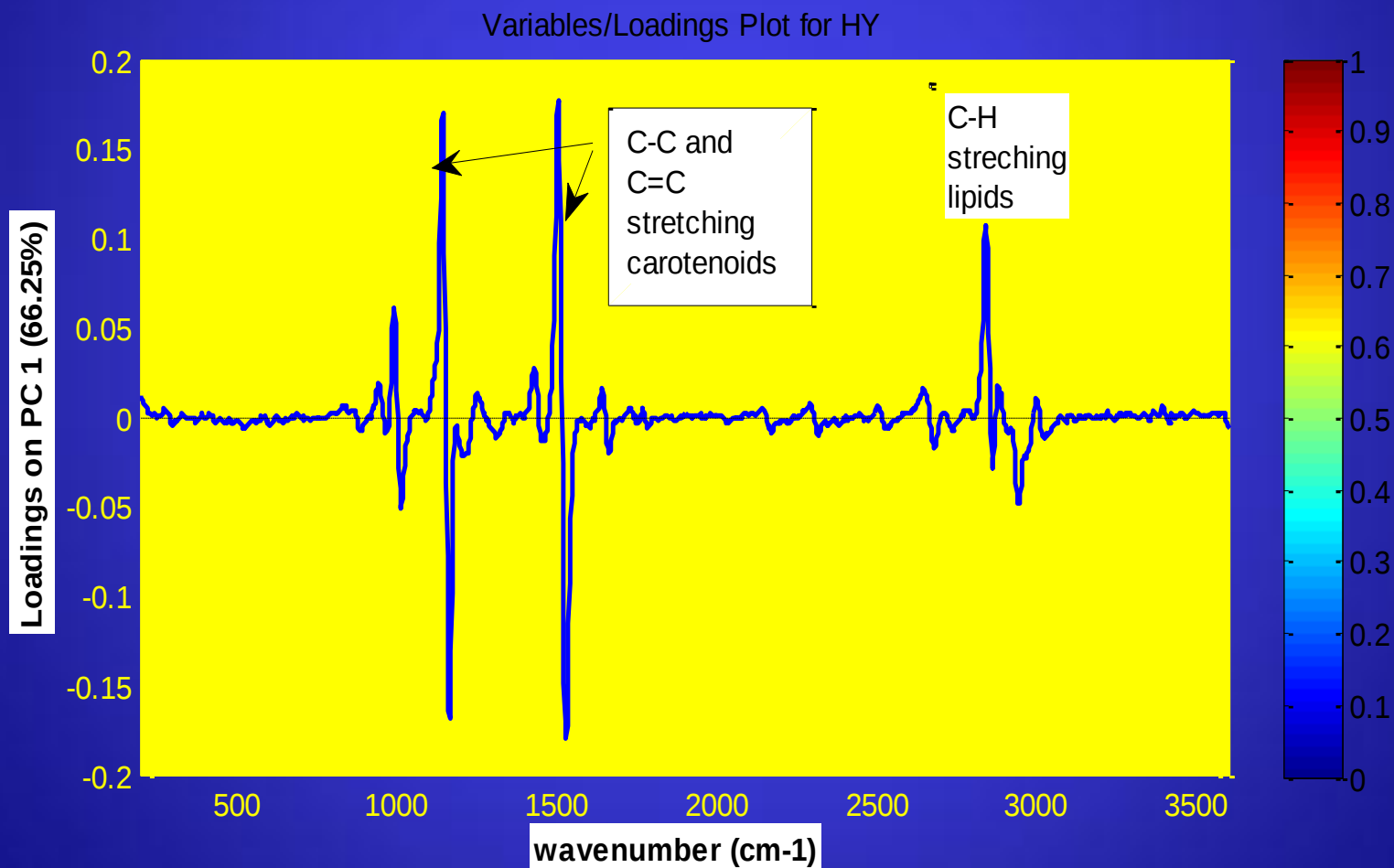
PCA score plot – mean center, SNV, 1-st derivative

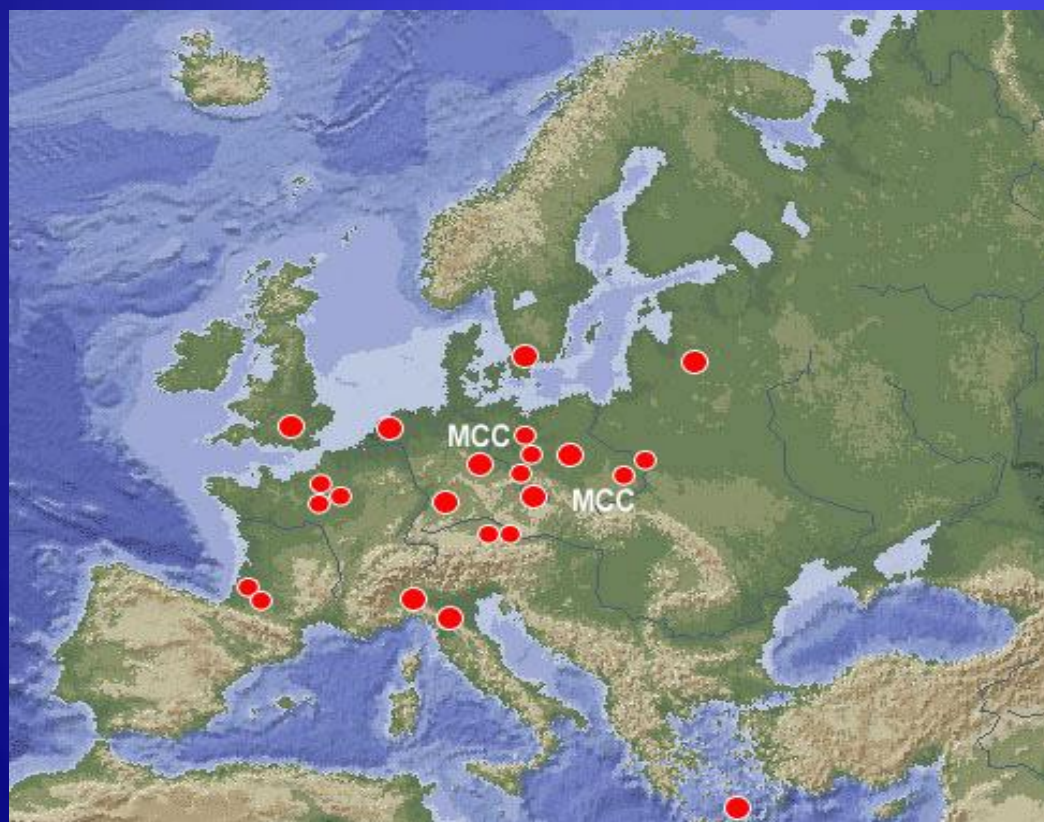
Low autofluorescence

Samples/Scores Plot of HY



PCA loading plot – mean center, SNV, 1-st derivative





<http://mitr.p.lodz.pl/evu>