



Raman spektroskopia työkaluna syöpäsolujen tunnistuksessa

LuK-tutkielma

Turun yliopisto

Fysiikan ja tähtitieteen laitos

Kokeellinen fysiikka

Syyskuu 2023

Tekijä: Niko Nurmi

Ohjaaja: Edwin Kukk

April 29, 2024

Contents

1	Johdanto.	3
2	Raman spektroskopia.	3
2.1	Toimintaperiaate.	5
2.1.1	Raman sironta ja vapausasteet.	5
2.2	Pinta- Raman spektroskopia (SERS).	10
2.2.1	Toimintaperiaate	11
2.2.2	Lokalisoitunut pintaplasmoniresonanssi (LSPR)	11
2.2.3	Laitteisto	14
3	Raman spektroskopia syövän tunnistuksessa.	15
3.1	Raman luotain.	16
3.2	Raman spektroskopian käyttö neurokirurgiassa.	17
3.3	Tunnistus laboratorio-olosuhteissa ja elävissä organismeissa.	19
4	Yhteenveto	23

1 Johdanto.

Tämän tutkielman tarkoituksena on havainnollistaa Raman spektroskopian hyötyjä ja käyttöä biomolekyylien ja lääketieteellisenä tutkimusmenetelmänä. Erityisesti keskitymme syöpäsolujen tehokkaaseen ja nopeaan tunnistamiseen Raman spektroskopian avulla, kun kyseessä on montaa eri partikkelia omaava näyte, josta mahdolliset syöpäsolut ja patogeenit on tunnistettava. Käsittelemme Raman spektroskopian ja sironnan peruseräitä, sekä edellä mainittuja spektroskopian eri muotoja ja näistä saatujen tulosten tulkintaa data-analytiikan keinoin.

Syöpä on edelleen yksi vakavimmista sairauksista, jota esiintyy ympäri maailmaa, ja se on yleisin kuolemaan johtava sairaus. Kuitenkin selviytymisprosentti kasvaa huomattavasti, jos syöpä voidaan tunnistaa jo sen varhaisessa vaiheessa. Selviytymisprosentti korreloi vahvasti syövän leviämistäasteeseen.

Syöpää voidaan tutkia erilaisilla spektroskoppisilla menetelmillä, joille kaikille yhteistä on hyvä sensitiivisyys biologisia näytteitä tutkittaessa. Hyvä sensitiivisyys on tärkeä osa tutkimusmenetelmää, jotta biokemialliset erot voidaan erottaa näytteestä, kuten erilaisten solujen pintaproteiinit, joiden kautta mahdollinen patogeeninen solu voidaan tunnistaa. (Krishna et al., 2005).

2 Raman spektroskopia.

Raman spektroskopiaa on onnistuneesti käytetty jo kymmeniä vuosia lääketieteellisessä spektroskopiassa, jossa biomolekyylien hauraus estää perinteisten korkeataajuuksisten spektroskopiamenetelmien käyttämisen. Ennen Raman spektroskopian yleistymistä, yleisimmät tutkimusmenetelmät olivat mikroskopia, fluoresenssispektroskopia ja vasta-ainemääritys näiden menetelmien suuren sensitiivisyyden tähden. Jokseenkin edellä mainittujen tekniikoiden spesifisyys oli heikko, jolloin annettujen näytteiden molekyyli-tason rakenteesta ei saada tarkkaa tietoa (Petry et al., 2003). Solujen tutkimiseen on mahdollista käyttää myös Fourier muunnettua infrapunaspektroskopiaa (FTIR) jolla on riittävän hyvä sensitiivisyys ja nopeus näytteiden tutkimiseen, mutta tämänkin menetelmän res-

oluutio on liian heikko yksittäisen solun hienorakenteen analysoimiseen (Krishna et al., 2005). Raman spektroskopian vahvuutena on sen huomattavan suuri spesifisyys jonka ansiosta voidaan suurella tarkkuudella havaita, onko tutkittavaa ainetta näytteessä vai ei. Tämän ominaisuuden hyöty näkyy esimerkiksi syöpäsolujen pintaproteiinien, yksittäisten molekyylien ja näiden rakenteiden tehokkaassa tunnistuksessa, sekä tehokkuudesta nopean ja varhaisen syöpäsolujen ja patogeenien hienorakenteiden tunnistamisessa *in vivo* (elävässä oliossa) (Petry et al., 2003).

2.1 Toimintaperiaate.

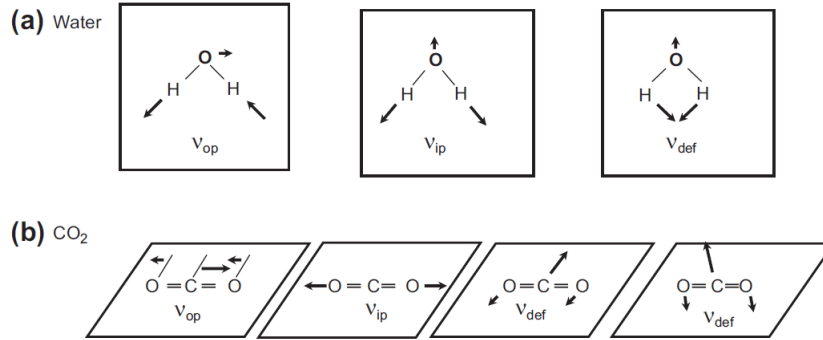
2.1.1 Raman sironta ja vapausasteet.

Raman spektroskopian perustana toimii Raman sironta. Raman sironnassa tapahtuu vuorovaikutus valon ja aineen välillä. Tämä vuorovaikutus voi olla joko sironta tai suora absorptio. Seuraavaksi tarkastellaan sirontaa ja absorptiota, jotka pätevät yleisesti biomolekyyleihin, kudoksiin ja soluihin. Raman spektroskopiassa käytetään hyväksi aineen ominaisuutta absorboida valoa. Yleisesti, jos valon aallonpituus on infrapunavalon alueella, on todennäköistä, että molekyylien vapausasteista värähtelymoodit virittyvät. Jos valon aallonpituus vastaa ultraviolettisäteilyn aallonpituuksia, absorboi molekyyli valon ja virittyy elektronitransition kautta, josta yleisimmin seuraa säteilyn emissio, eli fluoresenssi. (Petry et al., 2003)

Kaikki valo on elektromagneettista säteilyä, joka muodostuu vuorottelevien sähkö- ja magneettikenttien jaksollisesta värähtelystä. Raman spektroskopiassa olemme yleisesti kiinnostuneita sähkökentästä ja sen muutoksista. Erityisesti Raman-sirontaan käytetty aallonpituus (infrapun ja ultraviolettisäteilyn alueella) aiheuttaa molekyylin värähtelymoodien E_{vib} virittymisen. Pienempien (suuremman energian omaavat) aallonpituuksien käyttö aiheuttaisi myös muiden vapausasteiden virittymisen. Mikäli käytetty aallonpituus on suurempi, virittyvät rotationaaliset vapausasteet. Kuitenkin on hyvä muistaa, että kaasufaasisessa näytteessä on huomioitava värähtely- ja rotationaaliset vapausasteet.

Vapausasteita ovat translationaaliset v_x, v_y, v_z sekä rotationaaliset vapausasteet, jotka riippuvat molekyylin muodosta. Jos molekyyli on lineaarinen, sillä on kaksi rotaatioon liittyvää vapausastetta. Jos molekyyli ei ole lineaarinen, sillä on kolme rotaatioon liittyvää vapausastetta. Värähtelyyn liittyvien vapausasteiden määrä voidaan laskea lineaarisen molekyylin tapauksessa kaavalla $3n - 5$, jossa n on molekyylyssä olevien atomien määrä. Esimerkiksi lineaarisessa CO_2 -molekyylyssä on $3(3) - 5 = 4$ värähtelyyn liittyvää vapausastetta (*in-phase stretch* (molekyylin dipolimomentti ei muutu), *out-phase stretch* (molekyylin dipolimomentti muuttuu) ja kaksi deformaation liittyvää astetta). Epälineaarisen molekyylin tapauksessa kaava on $3n - 6$, kuten es-

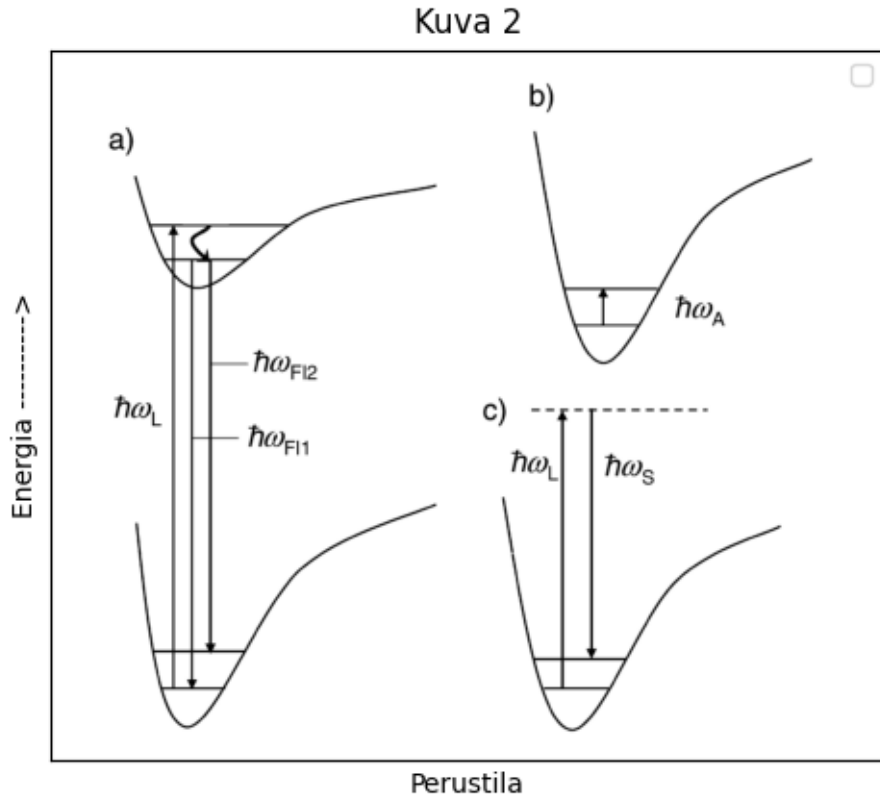
imerkiksi H_2O -molekyylissä, jossa on $3(3) - 6 = 3$ värähtelyyn liittyvää vapausastetta (*in-phase stretch*, *out-phase stretch* ja yksi deformaatio). Nämä on esitelty kuvassa 1 (Larkin, 2011).



Kuva 1: Värähtelyn vapausasteet vesi ja hiilidioksidi molekyyleissä. v_{op} on *out-phase stretch*, v_{ip} on *in-phase stretch*, v_{def} on deformaatio (Larkin, 2011).

IR-spektroskopiassa pyritään virittämään molekyyli ja saamaan muutos sen dipolimomenttiin $\vec{\mu} = q * \vec{d}$ jossa \vec{m} on dipolimomentti, q on partikkelin varaus, \vec{d} on dipolimomentin suuntavektori. Hyvänä esimerkkinä toimii lineaariset, kaksiatomiset molekyylit H_2 ja N_2 , jotka ovat inaktiivisia IR-spektroskopiassa, mutta aktiivisia Raman spektroskopiassa. Raman spektroskopiassa virittämisen sijaan pyritään mittaamaan hajonneen valon Raman-siirtymä, eli näytteen valaisuun käytetyn valon energiamuutos. Jotta Raman sironta ja siihen liittyvät aallonpituudet voidaan havaita on molekyylin polarisoiduttava, jolloin dipolimomentti muuttuu. Tällöin polarisoidun valon sähkökenttä vaikuttaa molekyylin kanssa, ja tuloksena on pieni määrä Stokes- tai anti-Stokes-sironnutta valoa, jolla on eri taajuus kuin alkuperäisellä valolla. Stokes sironnut elektroni virittyy perustilaltaan korkeammalle energiatasolle ja palaa perustilaa ylemmälle energiatasolle, jolloin sironneen valon energia voidaan laskea kaavalla $E = hc(\vec{\nu}_L - \vec{\nu}_m)$, jossa E on sironneen valon energia, h on Plancin vakio, c on valonnopeus tyhjiössä, ν_L on laserista tulevan valon aaltoluku, ν_m on molekyyllille ominaisen värähtelyn aaltoluku. Anti-Stokes sironnassa elektroni virittyy korkeammalta energiatasolta, kuin perustaso ja palaa perustasolle, tällöin sironneen valon energia voidaan laskea kaavasta $E = hc(\vec{\nu}_L + \vec{\nu}_m)$ On hyvä huomata, että vaikka Raman spektroskopia käyttää hyväkseen IR-valoa, on tämä tekniikka kuitenkin erillinen verrattuna varsinaiseen IR-spektroskopiaan. (Larkin,

2011).

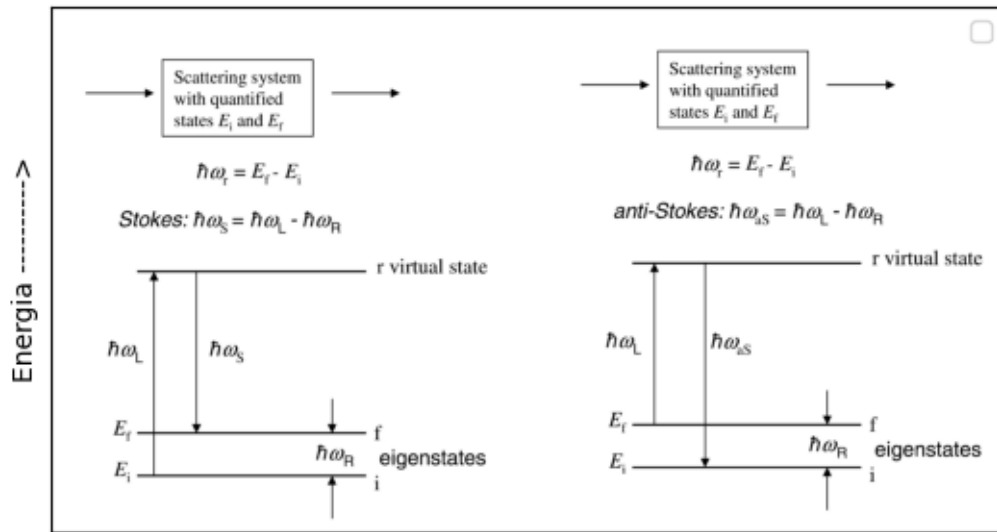


Kuva 2: Yksinkertaistettu kaavio a) fluoresenssista, b) infrapuna absorptiosta, c) Raman sironnasta. Tässä ω_L = laserin taajuus, ω_{F11} ja ω_{F12} = fluoresenssitaajuuksia, ω_A = absorptiotaajuus, ω_S = Stokes sironneen valon taajuus (Petry et al., 2003)

Kuvassa 2 kuvataan yksinkertaisia infrapuna- ja säteilyemissioilmiöitä, eli fluoresenssia.

Valon sirontaa voi tapahtua molekyylistä täysin elastisesti tai joissain harvinaisemmissa tapauksissa epäelastisesti. Elastinen sironta tapahtuu, kun fotonin osuu molekyylin atomien elektroniverhoon ja siroaa tästä menettämättä energiaa, jolloin $\hbar\omega_{alku} = \hbar\omega_{loppu}$. Epäelastisessa sironnassa sironneen fotonin energia on eri kuin ennen sirontaa, eli $\hbar\omega_{alku} \neq \hbar\omega_{loppu}$. Tätä epäelastista sirontaa kutsutaan Raman sirontaksi. Epäelastinen sironta voidaan edelleen jakaa kahteen eri sirontaluokkaan. Jos sironneen fotonin energia on pienempi kuin ennen sirontaa, kyseessä on Stokes-sironta. Jos taas sironnassa fotonin

saa lisää energiaa, kyseessä on anti-Stokes-sironta. Näitä epäelastisesti sironneita foneita esiintyy kuitenkin vain suhteellisen harvoin, noin $1/10^8$ kertaa, joten Raman sironnan intensiteetti on heikko, ja siten myös menetelmän sensitiivisyys (Petry et al., 2003).



Kuva 3: Stokes-Raman- ja anti-Stokes-Raman sironta. (Petry et al., 2003)

Kuvassa 3 on havainnollistettu Stokes-Raman- ja Anti-Stokes-Raman-sirontaa.

Stokes-Raman-sironnassa tapahtuu kvantttilojen i ja f välillä siirtyminen niin, että i on alemman energian omaava kvantttila ja f korkeamman energian omaava kvantttila. Aluksi elektroni siirtyy matalammalta energiatilalta i lyhytaikaiselle virtuaalitalalle r ja palaa korkeammalle energiatilalle f . Koska kyseessä on epäelastinen sironnassa, muodostuneen fotonin energia on $\hbar\omega_r = E_f - E_i$

Anti-Stokes-sironnassa elektroni siirtyy korkeammalta tilalta alemmalle virtuaalitalan kautta. Huomautetaan, että virtuaalitala on matemaattinen käsite, jolla havain-

nollistetaan hyvin lyhytikäisiä viritystiloja, jotka eivät ole fysikaalisesti havaittavissa. Tässä siirtymässä emittoituvien fotonien intensiteetti on huomattavasti pienempi verrattuna Stokes-Raman-sirontaan, sillä virittyneiden f tilojen lukumäärä on huomattavasti pienempi kuin perustilojen i (Petry et al., 2003).

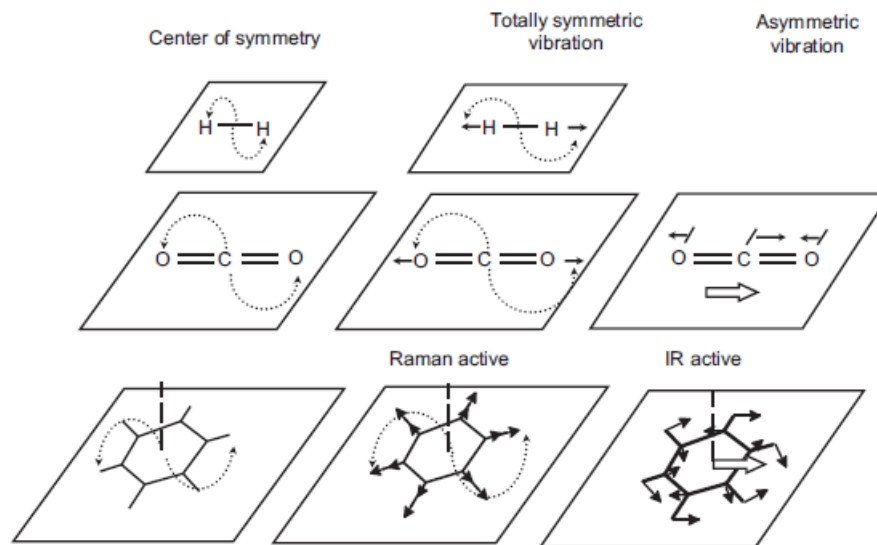
Raman sironneen säteilyn intensiteetti saadaan kaavasta:

$$I_R \propto v^4 I_0 N \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)^2 \quad (1)$$

Jossa I_0 on tulevan valon intensiteetti (laser), N on molekyylien määrä, jossa sironta voi tapahtua ja jotka ovat tietyssä sirontaan liittyvässä tilassa, v on laserin valon taajuus, α on molekyylien polarisoituvuus ja Q on värähtelyn amplitudi.

Kaavasta 1 voidaan nähdä, mitkä parametrit vaikuttavat Raman sironnan intensiteettiin. Selvästi N viittaa intensiteetin riippuvuuteen tutkittavan näytteen konsentraatiosta. Myös laserista lähetetyn valon taajuus vaikuttaa intensiteettiin seuraavasti: kun taajuutta suurennetaan, tai laserista saapuvien fotonien intensiteettiä niin myös Raman intensiteetti lisääntyy. Parametri α ilmaisee, että vain värähtelymoodit, jotka aiheuttavat molekyylin polarisaation, ovat Raman aktiivisia, jolloin polarisoituminen värähtelyn amplitudiin nähden on suurempi kuin nolla.

Molekyylin Raman aktiivisuuden voi päätellä molekyylin polarisaation muutoksesta värähtelytilojen aktivoituessa. Mikäli molekyyli on symmetrinen ja säilyttää värähtelytilojen aktivoitumien seurauksena symmetriansa, on todennäköistä, että molekyyli on Raman aktiivinen. Tämä polarisaation muutos aiheuttaa myös dipolimomentin muutoksen ja on syytä huomata, että Raman aktiivisien molekyylien yhteydessä dipolimomentti silti säilyy vaikka dipolimomentti kokisi ajasta riippuvaa oskillointia. (Larkin, 2011)



Kuva 4: Symmetrinen ja asymmetrinen värähtely. Symmetriset värähtelyt ovat Raman aktiivisia, sillä niissä ei tapahdu muutoksia molekyylin symmetrian keskipisteen sijainnissa ja dipolimomentti säilyy, kuten kohdassa *Totally symmetric vibration*. Mikäli värähtelytilojen aktivoituessa molekyylin symmetrinen keskipiste muuttuu, eli värähtely on asymmetristä (*Asymmetric vibration*), muuttuu myös dipolimomentti ja näin ollen molekyyli on IR-aktiivinen mikäli dipolimomentti ei säily, muttei Raman aktiivinen. (Larkin, 2011).

2.2 Pinta- Raman spektroskopia (SERS).

Pinta- Raman spektroskopiassa käytetään hyväksi valon sirontaa voimistavia materiaaleja, kuten metalleja, jonka pintaan tutkittava näyte asetetaan. Näin taustalla oleva metalli voimistaa Raman sirontaa, ja tutkittavan materiaalin hienorakenteiden havaitseminen helpottuu huomattavasti.

Pinta-Raman-spektroskopiolla on useita käyttökohteita monilla eri aloilla johtuen menetelmän hyvästä spesifisyydestä metallin kanssa adsorboitaessa, hyvästä sensitiivisyydestä ja tarvittaessa spatiaalisesta resoluutiosta. Pinta-Raman-spektroskopian käyttökohteita voivat olla esimerkiksi DNA:n emäsjärjestyksen, räjähteiden, lääkkeiden, solujen ja itiöiden analysointi.

Esimerkiksi Pinta-Raman-spektroskopiolla voidaan havaita erilaiset solut tehokkaasti ja nopeasti. Kuitenkin biologisten näytteiden kanssa on ymmärrettävää, että näytteen

aaltolukujen spektri on hyvin suuri ja monimuotoinen. Näissä tapauksissa on tärkeää valita näytteelle ominainen substraatti (taustamateriaali, yleensä metalli) ja näytteen oikeanlainen kerrostaminen. Tämän lisäksi tarvitaan data-analyttisiä menetelmiä, kuten PCA (*principal component analysis*) tai *partial least square* (PLS), jotta tuloksia voitaisiin tulkita tehokkaasti ja luotettavasti (McNay et al., 2011).

2.2.1 Toimintaperiaate

Pinta-Raman-spektroskopiassa (SERS), näyte adsorboidaan metallin pinnalle, tyypillisesti käytetään kultaa tai hopeaa, mikä johtaa Raman sironnan intensiteetin voimistumiseen plasmonisen värähtelyn kautta.

Jos adsorbaatti on epätasaisella pinnalla, kuoppaisella pinnalla, sähkömagneettinen värähtely vahvistuu näissä kohdissa. Tässä tilanteessa metallin elektronit muodostavat kollektiivisia värähtelytiloja, joita kutsutaan plasmoneiksi. Plasmonit johtavat sähkömagneettisen kentän voimistumiseen pinnan läheisyydessä, mikä puolestaan voimistaa Raman sironnan intensiteettiä (Stiles et al., 2008).

2.2.2 Lokalisoitunut pintaplasmoniresonanssi (LSPR)

LSPR, eli lokalisoitunut pintaplasmoniresonanssi on ilmiö, jossa valenssielektronien kollektiivinen värähtely on resonanssissa näytteeseen tulevan valon kanssa.

Sähkömagneettisen kentän voimakkuus näytteen pinnan läheisyydessä voidaan laskea kaavalla

$$\mathbf{E}_{out}(x, y, z) = E_0 \hat{\mathbf{z}} - \alpha E_0 \left[\frac{\hat{\mathbf{z}}}{r^3} - \frac{3z}{r^5} (x\hat{\mathbf{x}} + y\hat{\mathbf{y}} + z\hat{\mathbf{z}}) \right] \quad (2)$$

jossa x , y ja z ovat karteesisia kordinaatteja, r on etäisyys, E_0 on sähkömagneettisen kentän voimakkuus näytteen pinnalla, $\hat{\mathbf{x}}$, $\hat{\mathbf{y}}$, $\hat{\mathbf{z}}$ ovat karteesisia yksikkövektoreita ja α metallin polarisoituvuus joka voidaan laskea kaavalla

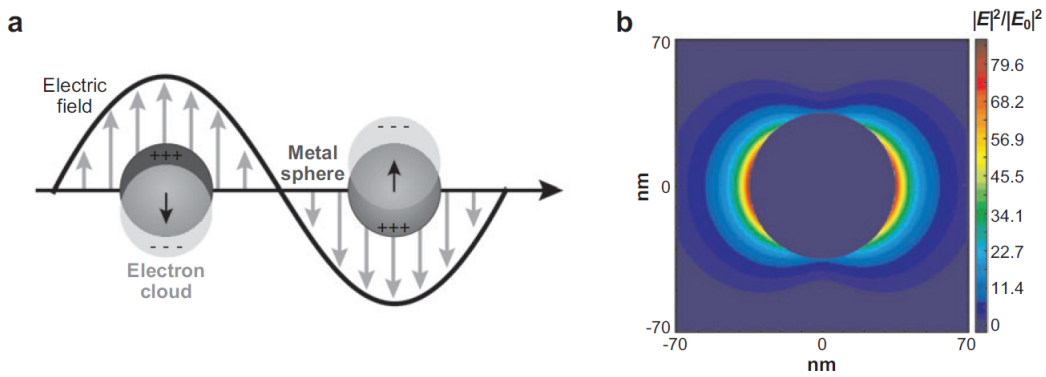
$$\alpha = ga^3 \quad (3)$$

missä a on pallon säde, g on

$$g = \frac{\varepsilon_{in} - \varepsilon_{out}}{(\varepsilon_{in} + 2\varepsilon_{out})} \quad (4)$$

Tässä ε_{in} on metallin nanopartikkeleille ominainen dielektrinen vakio ja ε_{out} on ympäristön dielektrinen vakio (Stiles et al., 2008) (veden kohdalla $\varepsilon_{H_2O} = 78,54$ lämpötilassa $T = 25^\circ C$ (Weast, 1968)).

Kuten kaavasta (5) huomataan, suurin vahvistuminen saadaan aikaiseksi, kun nimittäjässä $\varepsilon_{in} \approx -2\varepsilon_{out}$. Kaavasta (3) huomataan, että signaalin vahvistumiselle on riippuvuus r^{-3} . Tästä voidaan päätellä, että on olemassa raja-arvo sähkökentälle E_{out} , jonka jälkeen vahvistunutta signaalia ei voida enää havaita (Stiles et al., 2008).



Kuva 5: Kuvassa a) lokalisoitu pintaplasmoniresonanssi. Kuvassa b) pallomaisen hopea-atomin sammumistehokkuus. (Stiles et al., 2008)

Sammumistehokkuus määrittää aineen kyvyn absorboida ja sirottaa valoa tietyillä aallonpituuksilla Mie teorian mukaan. Sammumistehokkuus voidaan määrittää mielivaltaisen muotoiselle kappaleelle seuraavasti

$$E(\lambda) = \frac{24\pi^2 N a^3 \varepsilon_{out}^{3/2}}{\lambda n(10)} \left[\frac{\varepsilon_i(\lambda)}{(\varepsilon_r(\lambda) + \chi \varepsilon_{out})^2 + \varepsilon_i(\lambda)^2} \right] \quad (5)$$

jossa ε_r on reaalinen ja ε_i on imaginäärinen komponentti dielektrisessä funktiossa. χ on muototekijä, joka ottaa huomioon poikkeaman pallomaisesta hiukkasgeometriasta. Tämä on otettava huomioon, koska Mie teoriaa ei voida analyttisesti ratkaista muissa, kuin pallomaisissa geometrioissa. λ on aallonpituus. Koska χ voimistaa ε_{out} voidaan χ ajatella olevan osa LSPR:n sensitiivisyyttä sammumistehokkuudelle dielektrisessä ympäristössä (Stiles et al., 2008).

Raman spektroskopiassa sironneen valon intensiteetti on lineaarinen tulevan valon suhteen seuraavasti

$$|\mathbf{E}_{out}^2| = E_0^2[|1 - g|^2 + 3\cos^2\theta(2\text{Re}(g) + |g|^2)] \quad (6)$$

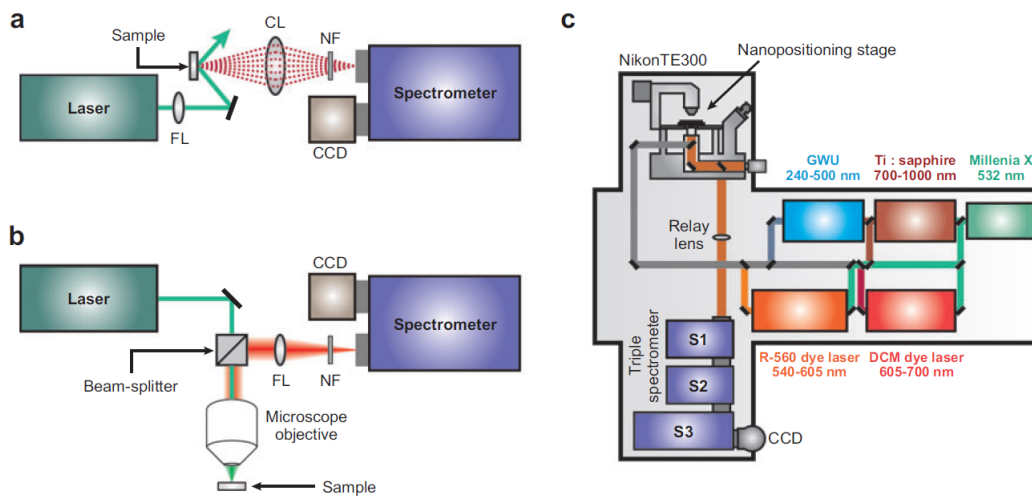
jossa θ on kulma tulevan valon kenttä vektorin ja pinnalla sijaitsevan molekyylin paikkavektorin välillä. Suurin intensiteetin vahvistus tapahtuu kun kulma $\theta = 0^\circ$ tai $\theta = 180^\circ$ jolloin maksimi-intensiteetiksi saadaan $|\mathbf{E}_{out}|^2 = 4E_0^2|g|^2$ kun taas radiaalisella keskiarvolla $|\mathbf{E}_{out}|^2 = 2E_0^2|g|^2$ (Stiles et al., 2008).

Raman sironnassa muodostunut sähkökenttä indusoi oskilloivan dipolin tutkittavaan adsorboituun molekyyliin, jolloin dipoli emittoi säteilyä. Tällöin on mahdollista, että pieni osa valosta kokee Stokes siirtymän molekyylin värähtelyn ansiosta. Tätä emittoitunutta säteilyä voidaan vahvistaa, kuten edellä on mainittu, ja tätä vahvistusta voidaan kuvata kaavalla

$$EF = \frac{|\mathbf{E}_{out}|^2|\mathbf{E}'_{out}|^2}{|\mathbf{E}_0|^4} = 4|g|^2|g'|^2 \quad (7)$$

jossa EF on Raman sironnan vahvistuksen määrä, kun molekyyli on adsorboitu SERS aktiiviselle pinnalle. \mathbf{E} suureet viittaavat sähkömagneettisen kentän voimakkuuteen sironneen valon taajuudella. Kaavasta (8) on hyvä huomata, että mikäli g ja g' ovat yhtä suuret (tai lähes sama), muuttuu EF neljänteen potenssiin, eli g^4 (Stiles et al., 2008).

2.2.3 Laitteisto



Kuva 6: Kuvassa tyypillinen SERS mittauslaitteisto. Kohdassa a) oleva laitteisto on suunniteltu suuremmille näytteille, eli ns. macro-Raman konfiguraatio. Tätä laitteistoa käytetään näytteiden kanssa joiden kuvantamiseen riittää $100\mu\text{m} - 1\text{mm}$ spatiaalinen resoluutio. Kohdassa b) on puolestaan micro-Raman laitteiston konfiguraatio, joka käyttää mikroskooppista objektiivia valaisemaan, keräämään ja suurentamaan spatiaalista resoluutiota. Kohdassa c) Koko laitteisto joka sisältää useamman laserin jolloin on mahdollista tuottaa myös näkyvää valon aallonpituutta, kun jokainen laser on kohdistettu näytteeseen.

Kuvan (6), kohdassa a) laserin valo asetetaan ennalta määrättyssä kulmassa osumaan substraattiin ja samalla Raman sironnut valo johdetaan valon keräävän linssin läpi. Kerätty valo johdetaan spektrometriin ja havaitaan tyyppijäähdytteisellä kameralla. Tämä menetelmä sopii näytteille, jossa pieni paikkaresoluutio on riittävä.

Kuvassa b) laserista tuleva valo kerätään ja fokusoidaan, jonka jälkeen valo viedään katkaisusuotimen läpi jolloin Rayleigh sironnut valo suodattuu suurilta osin pois. Tämän jälkeen valo ohjataan spektrometrille ja detektorille. Kuvassa c), on useampi peili joita kääntämällä voidaan muuttaa laserin/lasereilta tulevan valon aallonpituutta nopeasti vastaamaan tarvittavaa aallonpituutta, eli taajuutta. Selitykset: CCD = CCD- Kenno, joka luo kuvan vastaanotetuista aallonpituuksista; CL = keräävä linssi; FL = tarkennuslinssi; NF = katkaisusuodin, joka suodattaa tarpeettomat aallonpituudet (Rayleigh

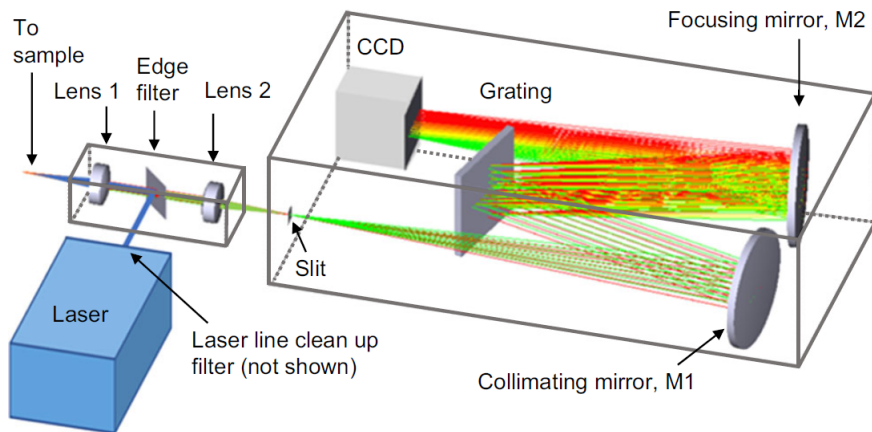
sironneen valon) (Stiles et al., 2008).

3 Raman spektroskopia syövän tunnistuksessa.

Raman spektroskopia on nouseva ja lupaava uusi spektroskopian menetelmä lääketieteen eri diagnostiikan osa-alueilla sen tarjoaman kvantitatiivisen informaation ja monipuolisen soveltuvuuden vuoksi. Raman-spektroskopiaa voidaan käyttää esimerkiksi avustamaan leikkauksissa, joissa tarkan marginaalirajan saavuttaminen on leikkauksen onnistumisen ja potilaan toipumisen kannalta tärkeää. Raman-spektroskopiaa käytetään lääketieteellisessä diagnostiikassa molekyylien ja moninaisten taudinaiheuttajien havaitsemiseen, mikä helpottaa hoitosuunnitelman tekemistä ja operatiivisten interventioiden suunnittelua.

Koska jokaisella otetulla näytteellä on oma yksilöllinen rakenteensa (Raman-spektroskopia erottaa hyvin erilaiset lipidit, proteiinit ja hiilihydraatit), voidaan näitä rakenteita havainnoimalla erottaa esimerkiksi erilaiset kudostyypit. Tätä on käytetty hyväksi esimerkiksi rinta-, aivo-, munasarja-, eturauhas- ja haimasyövissä. Menetelmää voidaan myös käyttää havaitsemaan syöpäsoluja jopa verenkierrosta.

Non-invasiivinen lähestymistapa mahdollistaa solujen, jotka muodostavat kudoksen, nopean tutkimisen ja tarjoaa siten tärkeää tietoa hoitohenkilökunnalle tehokkaimman hoidon suunnittelussa. Tämän vuoksi Raman-spektroskopia on ollut kasvava kiinnostuksen kohde lääketieteellisessä diagnostiikassa sen perustuessa molekyylin värähtelytiloihin solujen tunnistamisessa. Lisäksi yksi Raman-spektroskopian suurista eduista on sen käyttämä aallonpituus, joka ei ole riittävän energinen vaurioittamaan tutkittavaa kudosta.



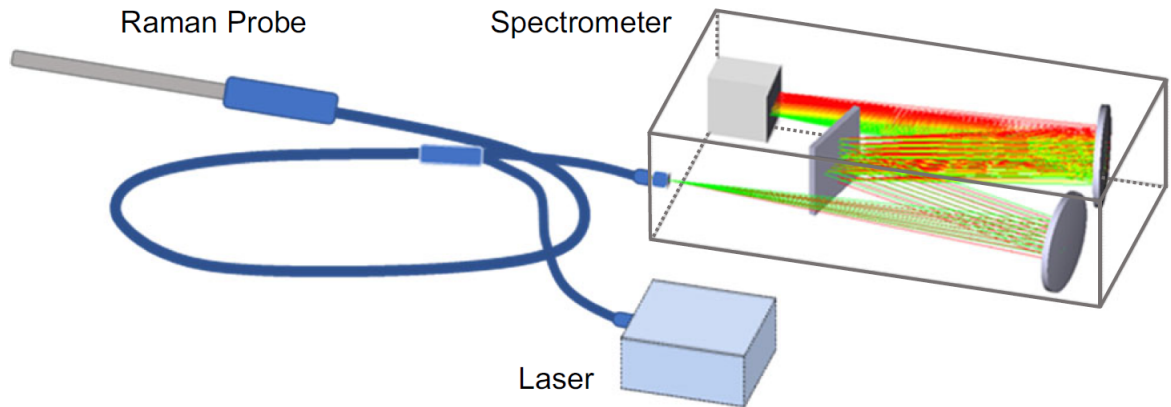
Kuva 7: Tyypillinen diagnostiikassa käytettävän Raman spektrometrin kaaviokuva (Auner et al., 2018).

Kuvassa 7 on kaaviokuva tyypillisestä Raman spektrometristä, jota käytetään diagnostiikassa. Laserista tuleva valo ohjataan ensin notch-filtterille (kuvassa edge filter), joka suodattaa laserin muut aallonpituudet pois. Tämän jälkeen laserin valo ohjataan linssille 1, joka fokuo laserin valon ja keskittää sen suoraan näytteeseen. Kun valo siroaa osuessaan näytteeseen, se kerätään talteen ja ohjataan takaisin notch-filtterille, joka päästää lävitseen vain Raman-sironneen valon aallonpituudet. Tämä suodatettu valo jatkaa linssille 2. Valo kulkee tämän jälkeen spektrometrin raon läpi kollimointipeilille, jonka jälkeen valon säteet kulkevat rinnakkain hilalle, joka hajottaa valon eri aallonpituuksiin. Tämän jälkeen hajonnut valo ohjataan peilille 2, joka fokuo valon CCD-laitteelle, missä valon aallonpituudet tunnistetaan. (Auner et al., 2018).

3.1 Raman luotain.

In vivo sovelluksiin tarvitaan pienikokoinen korkean resoluution järjestelmä, joka mahdollistaa nopeat mittaukset. Tavallisesti käytetään Raman-kuituoptista anturia (probe), joka mahdollistaa pääsyn pienen pinta-alan omaavaan elimen osaan. Pienempi koko voi kuitenkin tarkoittaa alhaisempaa resoluutiota tai pienempää spektrialuetta verrattuna laboratorio-olosuhteissa käytettyihin laitteisiin. Alhaisempi resoluutio tarkoittaa sitä, että dataa ei välttämättä saada tarpeeksi tarkasti. Lyhyemmät mittausajat voivat johtaa alhaisempiin signaali-kohinasuhteisiin. Kuitenkin näitä laitteistoja kehitetään

aktiivisesti niiden merkittävän avun tähden kliinisessä diagnostiikassa jolloin Raman luotaimista saadaan tulevaisuudessa monipuolisempaa dataa.



Kuva 8: Raman luotain (Auner et al., 2018).

Kuvassa 8 on tyypillinen Raman luotain. Toimintaperiaate on muilta osin sama, kuin laboratoriossa suoritettussa Raman spektrometrissä, mutta tässä laser johdetaan valokuituja pitkin luotaimelle ja luotaimesta valokuituja pitkin CCD- laitteelle. (Auner et al., 2018)

3.2 Raman spektroskopian käyttö neurokirurgiassa.

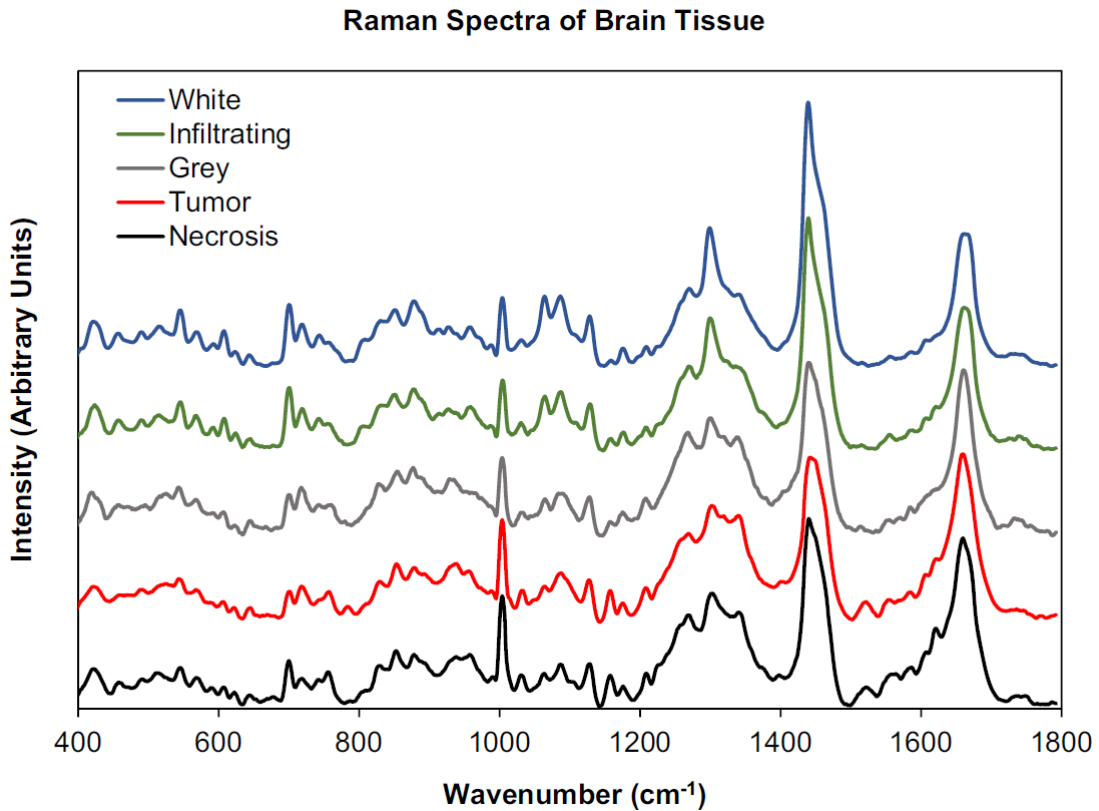
Tässä osassa tarkastellaan Raman-spektroskopian käyttöä neurokirurgisen leikkauksen apuvälineenä. Erityisesti keskitymme Raman luotaimen, jota käytetään leikkausalueen määrittämiseen, mikä on kriittisen tärkeää leikkauksen onnistumisen ja potilaan toipumisen kannalta. Luotaimen tehokkuus ja sen käytön helppous mahdollistavat diagnostiikan tekemisen leikkauksen aikana intraoperatiivisesti, tarjoten reaaliaikaisen kuvan tarvittavista marginaaleista.

Neurokirurgiassa Raman-spektroskopia on osoittautunut tehokkaaksi erilaisten aivojen kudosten erottelussa. Se kykenee erottamaan esimerkiksi valkoisen aineen, harmaan aineen, glioblastoomat ja nekroosit toisistaan. Yhdessä tutkimuksessa käytettiin jäädytettyä näytettä, ja Raman-spektrissä havaittiin intensiteettiipiikit 1004cm^{-1} , 1300cm^{-1} – 1344cm^{-1} ja 1660cm^{-1} aallonpituusalueilla, jotka osoittivat proteiinien ja lipidien läsnäoloa.

Jermyn ja kollegat (Desroches et al., n.d.) suorittivat intraoperatiivista Raman-spektroskopiaa käyttäen Raman-luotainta neurokirurgisen toimenpiteen aikana. Luotain oli kykenevä erottamaan syöpäsoluja sisältävän kudoksen terveestä kudoksesta erittäin hyvällä herkkyydellä (93%) ja spesifisyydellä (91%). Käsikäyttöinen luotain asetettiin aivojen lähelle, missä leikkaus suoritettiin, ja laserin aallonpituus oli 785 nm. Kuvantamisnopeus oli asetettu 0,2 sekuntiin. Tulosten analysointiin käytettiin koneoppimisen menetelmää, *boosted-trees* -luokittelualgoritmia, joka hyödynsi kaikkea mitattua dataa terveen ja syöpää sisältävän kudoksen erottamiseksi toisistaan. On huomionarvoista, että tämä Raman-luotaukseen perustuva tekniikka kykeni havaitsemaan syöpäsolujen läsnäolon, kun taas T1- ja T2-kontrastivahvistettu magneettiresonanssikuvaus ei siihen pystynyt. (Auner et al., 2018)

Kuvassa 9 havainnollistaa minkälaista Raman spektriä voidaan näytteestä saada. Tässä tapauksessa näytteenä toimi aivokudos joka sisälsi harmaata- ja valkoista aivokudosta, tervettä kudosta, sekä syöpäsoluja sisältävää kudosta. Kyseisen mittauksen mittausalue oli $400\text{cm}^{-1} - 1800\text{cm}^{-1}$ välissä. Kuten huomaamme, oli Raman spektrin intensiteetti eri aaltolukujen kohdilla huomattavasti muista intensiteeteistä eriävä, eli voitiin intensiteetin avulla päätellä minkälaisesta solukosta on kyse. Esimerkiksi nekroosinen solukko ja aivojen valkoinen aine antavat intensiteettiä jopa 1450cm^{-1} aallonpituuden kohdalla, mutta valkoisen aineen intensiteetti on huomattavasti suurempi verrattuna nekroosiin.

Raman spektri on usein hyvin monimuotoista ja haastavaa tulkita. Kuvassa 9 karakteristiset Raman piikit syntyvät aina jonkin tietyn funktionaalisen ryhmän tai sidoksen rotaatiosta tai värähtelystä. Esimerkiksi aaltolukujen $1500\text{cm}^{-1} - 1760\text{cm}^{-1}$ välissä tapahtuu $C = O$ kaksoissidoksen venymistä tapahtuvaa värähtelyä, proteiinien $C = C$ sidoksen värähtelyä, kuten myös lipidien ja aminohappojen $C = C$ sidoksen värähtelyä. Alueella $1400\text{cm}^{-1} - 1500\text{cm}^{-1}$ tapahtuu $C - H$, CH_2 ja CH_3 sidosten värähtelyä ja niin edelleen. Eli jokaista intensiteettiä vastaa jokin tietty sidos joka värähtelee, kun siihen kohdistetaan tietyn aaltoluvun omaavaa valoa. Kuvassa 9 nähty spektri on valmiiksi analysoitua ja ”puhdistettua”, eli siitä on poistettu taustahäiriöt, sekä muiden solujen molekyyli sidosten tuottama ylimääräinen data. Tämän datan analysointiin on monia eri tekniikoita joita ei tässä tutkielmassa käsitellä (Auner et al., 2018).



Kuva 9: Raman spektri interoperattiiivisesta aivokudoksesta. Spektri $400 - 1800\text{cm}^{-1}$ on normaalin rajoissa. Kuvassa *White* tarkoittaa vaaleaa aivokudosta, *Infiltrating* tarkoittaa terveen kudoksen läpäisevää syöpäsolukkoa, *Grey* tarkoittaa harmaata ainetta, *Tumor* tarkoittaa syöpäsoluja, *Necrosis* on kuollut solukko (Auner et al., 2018).

3.3 Tunnistus laboratorio-olosuhteissa ja elävissä organismeissa.

Täysin noninvasiivinen biologisen näytteen kerääminen on usein ihanteellinen tapa saada tietoa potilaan terveydentilasta, etenkin kun pyritään välttämään kivuliaita tai haitallisia menetelmiä. Biofluidit, kuten veri, plasma, seerumi ja virtsa, tarjoavat arvokasta informaatiota monista syistä:

Monipuolisuus: Biofluidit sisältävät monenlaisia biologisia komponentteja, kuten proteiineja, hormoneja, metaboliitteja ja soluja. Tämä monipuolisuus mahdollistaa monien sairauksien ja terveydentilan piilevien merkkien tunnistamisen.

Noninvasiivisuus: Veri- ja virtsanäytteiden kerääminen on yleensä vähemmän haitallista potilaalle verrattuna kudospalojen ottamiseen (biopsia) tai muihin invasiivisiin menetelmiin.

Seuranta ja seulonta: Biofluidinäytteitä voidaan kerätä säännöllisesti potilailta seurannan tai seulonnan tarkoituksiin. Tämä auttaa havaitsemaan sairaudet varhaisessa vaiheessa tai seuraamaan pitkäaikaissairauksien kulkua.

Hoitojen seuranta: Veri- ja virtsanäytteitä voidaan käyttää hoidon tehokkuuden seuraamiseen. Esimerkiksi tiettyjen lääkkeiden tai hoitojen vaikutusta voidaan arvioida näiden näytteiden perusteella.

Genetiikka: Verinäytteet voivat sisältää potilaan DNA:ta, mikä mahdollistaa geneettisten sairauksien tunnistamisen ja riskianalyysin.

Kuitenkin on tärkeää huomata, että vaikka veri- ja virtsanäytteiden kerääminen on noninvasiivista, se voi silti olla epämiellyttävää tai hankalaa potilaalle. Lisäksi tulosten tulkinta vaatii usein laboratoriotutkimuksia, ja tulosten oikeellisuus voi vaihdella näytteen laadun ja käsittelyn perusteella.

Nykyään lääketieteellinen diagnostiikka pyrkii kehittämään yhä tarkempia ja ei-invasiivisia menetelmiä, kuten nestemäisen biopsian, joka perustuu veren tai virtsan analysointiin syövän varhaisen tunnistamisen kannalta. Tämä voi auttaa potilaita saamaan tarvitsemansa hoidon varhaisemmassa vaiheessa ja parantamaan mahdollisuuksiaan toipumiseen.

Taulukossa 1 on esimerkkejä, minkälaisissa syöpätyypeissä voidaan käyttää hyödyksi Raman spektroskopiaa, kun näytteenottomenetelmä keskittyy biofluideihin. Taulukossa 2 on havainnollistettu erilaisia aallonpituuksia joita voidaan käyttää eri syöpätyyppien tunnistuksessa.

(Austin et al., 2016).

Type of cancer	Sample platform		
	Biofluid	<i>Ex vivo</i> tissue	<i>In vivo</i> model
Prostate	Blood, ^{100,101,164} urine ¹⁰²	Human ¹⁶⁵	—
Oral	Blood, ¹⁰³⁻¹⁰⁵ urine, ¹⁰⁶ saliva ¹⁰⁷	Human ^{166,167}	Human ⁵⁴⁻⁵⁶
Breast	Blood, ¹⁰⁸ urine, ¹⁰⁹ saliva ¹¹⁰	Human ^{114-118,121,122,124-126,168-170}	Mouse ^{52,53,158-160,171}
Skin	—	Human ^{132-139,172-174}	Human ^{59-64,161} mouse ⁵⁸
Brain	—	Human, ^{141,142,144-146,148,149,151,175,176} mouse, ^{147,148,150,151,153,177} pig ^{143,149,178}	Mouse, ^{151,153,154} human ^{50,51}
Lung	—	Human ¹²⁷⁻¹³¹	Human ⁴⁹
Gastrointestinal	Blood ^{179,180}	Human ^{162,163,181}	Human, ^{34,36-39,41-48} pig, ³⁵ rat ⁴⁰
Leukemia	Blood ^{182,183}	—	—
Head and neck	Blood ¹⁸⁴	Human ¹⁸⁵	—
Cervical	Blood ¹⁸⁶	Human ¹⁸⁷	Human ²⁹⁻³³
Liver	Blood ¹⁸⁸	Human ^{189,190}	—
Ovarian	—	Human ¹⁹¹	Mouse ¹⁹²
Circulating tumor cells	Blood ^{193,194}	—	—

Taulukko 1: Yhteenveto syöpätyypeistä joissa voidaan käyttää hyväksi Raman spektroskopiaa ja minkälainen näyte tyyppi soveltuu Raman spektroskopiassa käytettäväksi. Taulukko toimii esimerkkinä missä syöpätyypeissä Raman spektroskopia on hyödyllinen. (Austin et al., 2016).

Raman shift (cm^{-1})	Vibrational mode	Assignment
481		Glycogen
558	$\nu(\text{C-C})$	Uric acid
600	$\nu(\text{N-CH}_3)$, $\delta(\text{C=O})$, ring vibrations	Creatinine
621	$t(\text{C-C})$	Phenylalanine
650	$t(\text{C-C})$	Tryptophan, uric acid
678	$\nu(\text{N-CH}_2)$, $\nu(\text{C=O})$, ring vibrations	Creatinine
685	$t(\text{C-S})$	
692	$\delta(\text{O-C=O})$	Creatinine
798	$\nu(\text{N-H})$	Uric acid
825	$\text{as}(\text{O-P-O})$	DNA backbone
840	$\delta(\text{N-CH}_2)$, ring vibrations	Creatinine
903	$\nu(\text{C-C-N})$	Creatinine
912	$\nu(\text{C-C})$	Calcium oxalate dihydrate
960	$\nu(\text{PO}_4^{-3})$	Calcium hydroxyapatite
1049	$\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-N})$	Proteins
1004	$\nu(\text{C-C})$ ring breathing	Phenylalanine
1155		β -Carotene
1176	$\nu(\text{C-H})$	Tyrosine
1217	$\nu(\text{C-C}_6\text{H}_5)$	Tyrosine, phenylalanine
1265	$\nu(\text{C-N})$, $\delta(\text{NH})$ amide III	Proteins, α -helix, collagen
1310	$t(\text{C-H})$	Lipids
1340	$w(\text{CH}_3\text{CH}_2)$	Collagen, lipids
1445	$\delta(\text{CH}_2)$	Collagen, lipids
1477	$\nu(\text{C-O})$	Calcium oxalate dihydrate
1523		β -Carotene
1586	$\delta(\text{C=C})$	Phenylalanine
1654	$\nu(\text{C=C})$	Fatty acids
1655	$\nu(\text{C=O})$ amide I	Proteins, α -helix, collagen
1739	$\nu(\text{C=O})$	Cholesterol esters
2850	$\nu(\text{CH}_2)$	Lipids
2940	$\nu(\text{CH}_3)$	Proteins, lipids

Taulukko 2: Esimerkkejä aallonpituuksista joita usein käytetään syöpätutkimuksien yhteydessä. Arvot eivät ole absoluuttisia, vaan ovat riippuvaisia käytettävästä näytteestä (Austin et al., 2016)

4 Yhteenveto

Kuten tutkielmasta voidaan huomata, on Raman spektroskopialle löytynyt käyttöä niin lääketieteellisessä tutkimuksessa, kuin myös yleisessä molekyylien tunnistamisessa. Raman spektroskopia on onnistunut tuomaan vaihtoehtoisen tavat tutkia hauraita biologisia näytteitä joita tutkimusmenetelmien korkeaenergisten menetelmien tähden ei ole ennen voitu tutkia. Menetelmän yksi suurimmista hyödyistä on sen kompaktisuus ja nopeus. Kuten edellä mainittiin, Raman spektroskopiaan perustuvaa luotainta voidaan käyttää aivokasvaimien marginaalien määrittämiseen leikkauksen aikana. Tämä kuvantamismenetelmä on myös potilaalle turvallinen eikä käytettäessä aiheuta lisärasitetta tai vahinkoa tutkittavalle kudokselle. Koska Raman spektroskopia toimii molekyylien kanssa jotka kokevat indusoidun dipolimomentin muutoksen molekyylin polarisaation seurauksensa, on myös kirjoittajan mielestä kannattavaa harkita myös IR- spektroskopian käyttöä mahdollisimman monipuolisten tulosten saamiseksi. IR- spektroskopia havaitsee luotettavammin esimerkiksi kemiallisten sidosten vahvuuden ja funktionaaliset ryhmät. Toisaalta IR-spektroskopian toiminta perustuu molekyylin dipolimomenttiin $\mu = \sum e_i r_i$, jossa μ on dipolimomentti, e on varauksen suuruus, r on varauksen paikka. Raman spektroskopian käyttöä patogeenien havaitsemiseen biofluidien kautta olisi nopea ja tarkka menetelmä, joka saattaisi nopeuttaa tulosten prosessointia nykyisestään ja helpottaa laboratoriodiagnostiikan taakkaa. Menetelmän kustannustehokkuutta ei ole tässä tutkielmassa käsitelty, mutta kirjoittaja näkee tässä mahdollisuuden kehittää diagnostisia menetelmiä suomen terveydenhuollossa.

References

- Auner, G. W., Koya, S. K., Huang, C., Broadbent, B., Trexler, M., Auner, Z., Elias, A., Mehne, K. C., & Brusatori, M. A. (2018). Applications of raman spectroscopy in cancer diagnosis. *Cancer and metastasis reviews*.
- Austin, L. A., Osseiran, S., & Evans, C. L. (2016). Raman technologies in cancer diagnosis. *the royal society of chemistry*.

- Desroches, J., Jermyn, M., Mok, K., Lemieux-Leduc, C., Mercier, J., St-Arnaud, K., Urmev, K., Guiot, M.-C., Marple, E., Petrecca, K., & Leblond, F. (n.d.). *Biomed. opt. express*, 2015, 6, 2380–2397.
- Krishna, C. M., Sockalingum, G. D., Kegelaer, G., Rubin, S., Kartha, V. B., & Manfait, M. (2005). Micro-Raman spectroscopy of mixed cancer cell populations. *Unite Médian, CNRS UMR 6142, UFR Pharmacie, Université de Reims, 51, rue Cognacq-Jay, 51906 Reims, France b Center for Laser Spectroscopy, Manipal Academy of Higher Education, Manipal 576104, India.*
- Larkin, P. (2011). *Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation*. Elsevier.
- McNay, G., Eustace, D., Smith, W. E., Fauds, K., & Graham, D. (2011). Surface-enhanced Raman scattering (SERS) and surface-enhanced resonance Raman scattering (SERRS): A review of applications. *Applied Spectroscopy*.
- Petry, R., Schmitt, M., & Popp, J. (2003). Raman spectroscopy – a prospective tool in the life sciences. *Chemphyschem*, 4(2), 14–30. <https://doi.org/10.1439-4235/03/04/01>
- Stiles, P. L., Dieringer, J. A., Shah, N. C., & Duyne, R. P. V. (2008). Surface-enhanced Raman spectroscopy. *The Annual Review of Analytical Chemistry*.
- Weast, R. C. (1968). *Handbook of Chemistry and Physics*.