



BIULETYN
Wydziału Farmaceutycznego
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Biul. Wydz. Farm. WUM, 2013, 4, 27-36
<http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/>

SPEKTROSKOPIA RAMANA: NOWOCZESNA TECHNIKA W DIAGNOSTYCE MEDYCZNEJ I ANALIZIE BIOCHEMICZNEJ

Paulina Nykiel

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

tel. +(48)22 5720753, e-mail: ponykiel@wum.edu.pl

Otrzymano 11.12.2012, zaakceptowany 19.03.2013, zamieszczony 8.05.2013

STRESZCZENIE

Spektroskopia Ramana jest szeroko stosowaną metodą w jakościowej i ilościowej analizie ciał stałych, cieczy i gazów. Do głównych zalet spektroskopii Ramana należą: możliwość bezpośredniego zastosowania w trakcie badania medycznego lub operacji, dokładność wyników, duża liczba otrzymywanych informacji przy stosunkowo niskich kosztach i możliwość zbadania próbki bez wcześniejszego przygotowania. Ponadto analiza jest niedestrukcyjna. Widmo ramanowskie tkanki biologicznej może być traktowane jako jej „ślad daktyloskopowy”, pozwalający na łatwą strukturalną i chemiczną charakterystykę oraz identyfikację tak złożonego materiału. W artykule przedstawiono szereg możliwości wykorzystania spektroskopii Ramana w diagnostyce medycznej i analizie biochemicznej. Przedstawione przykłady ilustrują duży potencjał tej metody.

SŁOWA KLUCZOWE: spektroskopia Ramana, diagnostyka medyczna, analiza biochemiczna

ABSTRACT

RAMAN SPECTROSCOPY: A MODERN TECHNIQUE FOR MEDICAL DIAGNOSIS AND BIOCHEMICAL ANALYSIS

Raman spectroscopy (RS) is widely applied to qualitative and quantitative analysis of solid, liquid and gaseous samples. The main advantages of RS include a real-time analysis during medical examination or operation, precise results with low cost and minimal or no sample preparation. Moreover, the method is non-destructive. A Raman spectrum of a biological tissue can be treated as its “fingerprint”, which allows one to perform easy structural and chemical characterization and identification of such complex material. The present work is focused on prospects of RS in medical diagnosis and biochemical analysis. Those selected examples show high potential of RS.

KEYWORDS: Raman spectroscopy, medical diagnosis, biochemical analysis

1. Wstęp

Diagnoza polega na rozpoznaniu choroby w oparciu o objawy subiektywne, obiektywne oraz wyniki badań laboratoryjnych i obrazowych (np. ultrasonografia, tomografia komputerowa, rezonans magnetyczny). Efektem przeprowadzonych badań powinno być szybkie i trafne rozpoznanie choroby. Standardem w klinicznej ocenie zmian patologicznych, które zachodzą w tkankach, jest badanie histopatologiczne. Jednakże pobranie materiału podczas biopsji i właściwa jego ocena nie są łatwe, ponieważ istnieje możliwość pobrania niereprezentatywnego fragmentu tkanki, co może skutkować postawieniem błędnej diagnozy. Trzeba brać pod uwagę, że analiza materiału pobranego z biopsji jest czasochłonna, co w konsekwencji opóźnia postawienie diagnozy. Poza tym biopsja generuje znaczne koszty, jest zabiegiem nieprzyjemnym dla pacjentów, a dla niektórych z nich wiąże się z traumatycznymi przeżyciami [1]. Korzystne więc wydaje się opracowanie nowych, tanich i mniej inwazyjnych metod badania materiału biologicznego.

Próbki biologiczne charakteryzują się złożoną strukturą i zróżnicowanym składem chemicznym. W badanych tkan-

kach analizowane składniki często występują w bardzo niskich stężeniach. Metody spektroskopowe można z powodzeniem stosować w badaniach tego typu próbek biologicznych [2]. Do głównych zalet metod spektroskopowych zaliczyć można: małą inwazyjność, niedestrukcyjność oraz możliwość wykrycia zmian w tkankach już na wczesnym etapie ich powstania.

Metodami instrumentalnymi, które mogą być wykorzystane w biochemicznej i klinicznej analizie są spektroskopia: UV-ViS, fluorescencyjna, w podczerwieni, Ramana oraz magnetycznego rezonansu jądrowego [3]. W medycynie spektroskopia optyczna znalazła zastosowanie np. w endoskopii żołądka i jelit [4], natomiast fluorescencja np. w kolonoskopii [5]. Metody spektroskopowe są stosunkowo szybkie oraz umożliwiają badania *in vivo*, dzięki czemu można ominąć etapy pobierania i przygotowywania próbek do analizy oraz uniknąć bolesnych biopsji. Metody spektroskopowe mogą być zastosowane do diagnozy stanów chorobowych nawet na bardzo wczesnych etapach rozwoju choroby i w monitorowaniu leczenia. W szczególności dobrze się do tego nadaje spektroskopia oscylacyjna, gdyż nawet bardzo złożone biomolekuły jak białka, cukry, tłuszcze czy kwasy nukleinowe dają charakterystyczne widma zawiera-

jące informacje o ich budowie chemicznej. Do metod oscylacyjnych należą spektroskopia w podczerwieni oraz spektroskopia Ramana [6].

W spektroskopii oscylacyjnej w podczerwieni (IR) absorpcji promieniowania towarzyszą zmiany energii oscylacyjnej cząsteczki. Skomplikowany ruch drgający cząsteczki wieloatomowej można opisać jako zespół drgań prostszych, nazywanych normalnymi. Podczas drgania normalnego drgają wszystkie zręby atomowe cząsteczki (zręby atomowe to atom bez elektronów walencyjnych), czynią to zgodnie w fazie i z jednakową częstością, lecz amplituda wychYLENIA jest niejednakowa dla różnych zrębów atomowych. Jeżeli podczas danego drgania normalnego zręby atomowe jakiejś grupy funkcyjnej wychylają się znacznie bardziej niż w pozostałej części cząsteczki, to takie drganie normalne jest charakterystyczne dla tej grupy funkcyjnej. Drgania charakterystyczne odpowiadają drganiom elementów struktury cząsteczek (oscylatorów), np. takich jak pierścienie aromatyczne, łańcuchy alifatyczne i grupy funkcyjne. Energia drgań normalnych, w tym charakterystycznych, jest skwantowana i każdemu takiemu drganiu odpowiada specyficzny układ oscylacyjnych poziomów energetycznych. W związku z tym cząsteczki absorbują fotony o ściśle określonych energiach $h\nu$, pasujących do różnicy energii ΔE poziomów ich oscylatorów. W widmie IR przy częstościach ν absorbowanych fotonów pojawiają się pasma charakterystyczne dla danych oscylatorów. W praktyce położenia pasm oscylacyjnych podaje się w liczbach falowych $\bar{\nu}$

$$\bar{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda}$$

gdzie c jest prędkością światła w próżni, a λ długością fali. Ze względu na charakterystyczne położenia pasm widmo IR umożliwia ustalenie, jakie grupy funkcyjne występują w analizowanym materiale. W podczerwieni aktywne są te drgania, dla których następują zmiany elektrycznego momentu dipolowego. Wobec tego w widmach IR intensywne są pasma pochodzące od drgań grup polarnych np. OH, NH, >C=O. W widmie IR mogą się także pojawiać pasma od wielokwantowych przejść spektroskopowych (nadtony) oraz przejść złożonych (sumacyjnych i różnicowych) na różnych oscylatorach jednocześnie.

Spektroskopia Ramana wykorzystuje natomiast zjawisko rozproszenia promieniowania elektromagnetycznego związanego ze zmianą energii rozpraszanych fotonów. Źródłem promieniowania w spektroskopii Ramana są lasery pracujące przy długości fali z zakresu od ultrafioletu, poprzez zakres widzialny, aż do podczerwieni. Wspomniana zmiana energii rozpraszanych fotonów zawiera informację o oscylacyjnych poziomach energetycznych badanej substancji. W spektroskopii Ramana otrzymuje się widma zawierające pasma oscylacyjne odpowiadające drganiom normalnym cząsteczek. Są one wykorzystywane w analizie chemicznej, podobnie jak widma oscylacyjne w podczerwieni. Jednakże o intensywności pasm ramanowskich decyduje zmiana polaryzowalności podczas drgania normalnego, a nie zmiana elektrycznego momentu dipolowego, jak dla pasm w podczerwieni. Tak więc w spektroskopii Ramana aktywne są te drgania, dla których następuje zmiana polaryzowalności wiązania, czyli w widmach ramanowskich intensywne są pasma drgań niepolarnych, homojądrowych ugrupowań np. C=C, N-N, S-S.

Z powyższego krótkiego omówienia wynika, że spektroskopie w podczerwieni i Ramana są metodami komplementarnymi. Ze względu na różne reguły wyboru mogą istnieć drgania aktywne w widmie IR, a nieaktywne w widmie Ramana i odwrotnie (reguła wykluczenia). Taka sytuacja występuje dla cząsteczek mających środek symetrii. Najczęściej jednak można zarejestrować zarówno pasma ramanowskie, jak i pasma IR tych samych grup funkcyjnych. Różnią się one jednak, często znacznie, intensywnością. Natomiast położenia pasm w widmach zarejestrowanych tymi dwiema metodami spektroskopii oscylacyjnej są zasadniczo takie same.

Zastosowanie zarówno spektroskopii w podczerwieni, jak i ramanowskiej, zależy w dużej mierze od czułości aparatury używanej do rejestracji widm. Dużym wyzwaniem jest obecnie takie zwalidowanie metod diagnostycznych spektroskopii oscylacyjnej, aby wyniki były niezależne od aparatury, na jakiej się je otrzymuje [7]. Warto również wspomnieć, że spektroskopia oscylacyjna znajduje zastosowanie nie tylko w medycynie, ale również w farmacji - służy m.in. do badania procesu uwalniania substancji leczniczej ze stałych postaci leków, w szczególności z nowych nośników substancji leczniczych oraz do badania penetracji tkanek przez uwolnione leki. Badania te są aktualnie wykonywane głównie *in vitro*, ale po zapewnieniu odpowiednich środków bezpieczeństwa mogą być wykonywane *in vivo* [8].

W zastosowaniach biologicznych i medycznych spektroskopia Ramana ma tę zaletę, że widma zawierające dużą ilość informacji możemy otrzymać z nienaruszonej tkanki [9,10], a więc bez ingerencji w jej strukturę. Wobec tego możliwa jest szczegółowa analiza chemiczna materiału biologicznego, mimo wysokiej jego złożoności. Inną korzystną właściwością spektroskopii Ramana jest czułość nawet na małe zmiany strukturalne. Dzięki temu możliwe są badania porównawcze między zdrową a chorobowo zmienioną tkanką [10]. Istotną zaletą spektroskopii Ramana jest także mała intensywność pasm wody, która w podczerwieni bardzo utrudnia analizę materiału biologicznego.

Spektroskopia Ramana może być użyteczną metodą w diagnostyce wielu chorób cywilizacyjnych współczesnego społeczeństwa. Proponuje się jej stosowanie w diagnostyce miażdżycy [11], raka piersi [12] i żołądka [13], czy też osteoporozy [14]. Przy użyciu spektroskopii Ramana wykonywano badania krwi, mierząc *ex vivo* zawartość kwasu mlekowego [15] lub *in vivo* poziom glukozy u osób chorych na cukrzycę typu drugiego [16].

W artykule dokonano przeglądu możliwości wykorzystania tej szybkiej i prostej w wykonaniu metody w badaniach diagnostycznych różnego rodzaju jednostek chorobowych.

2. Spektroskopia Ramana

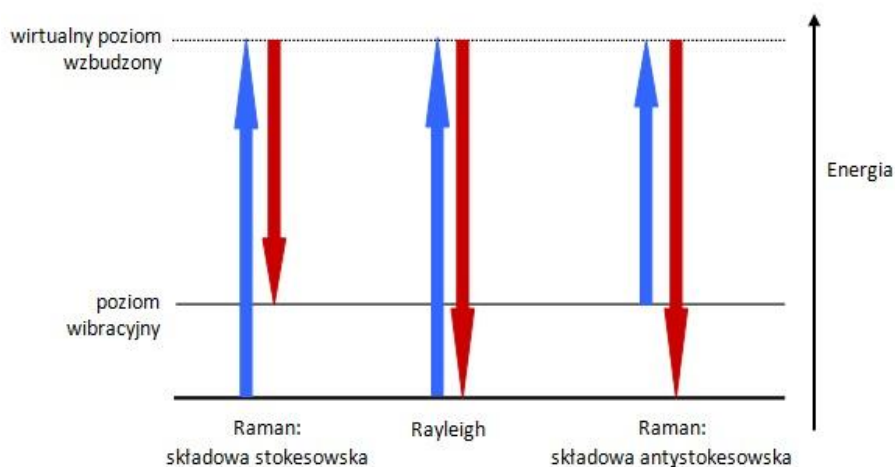
Zjawisko rozproszenia światła związanego ze zmianą częstości fotonu zostało po raz pierwszy zarejestrowane przez Ramana w 1928 roku, ale wykorzystanie spektroskopii Ramana w medycynie stało się możliwe dopiero w latach 80-tych ubiegłego wieku wraz z zastosowaniem w spektrometrach transformacji Fouriera. Efekt Ramana może być wytłumaczony zarówno przy użyciu falowego, jak i korpuskularnego przedstawienia promieniowania elektromagnetycznego [6].

W pierwszym przypadku stosuje się teorię Placzka [6], która wykorzystuje fizykę klasyczną. Teoria ta zakłada, że padająca fala elektromagnetyczna działa na cząstkę materii (zbiór małych cząsteczek, makrocząsteczkę) rozumianą

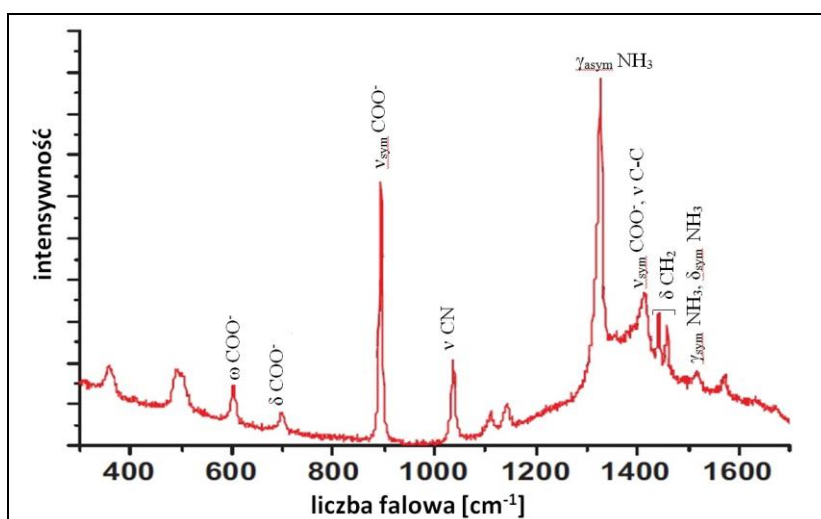
jako zbiór ładunków elektrycznych. Pole elektryczne fali elektromagnetycznej polaryzuje ten rozkład ładunków, indukując w nim dipol elektryczny. Wielkość tego indukowanego dipola elektrycznego zależy od łatwości, z jaką ta cząstka się polaryzuje, czyli od parametru zwanego polaryzowalnością. Wspomniany indukowany dipol elektryczny oscyluje w takt zmian pola elektrycznego fali elektromagnetycznej oraz własnych oscylacji molekularnych. Oscylujący dipol elektryczny jest zawsze źródłem fal elektromagnetycznych, czymś w rodzaju minianteny, która w tym przypadku emituje falę rozproszoną. Fala elektromagnetyczna jest rozpraszana we wszystkich kierunkach i ma różne składowe. Składowa dominująca ma częstość taką samą, jak fala padająca i nosi nazwę składowej Rayleigha. Składowe posiadające częstości zmodyfikowane o częstości drgań własnych badanego układu noszą nazwę ramanowskich (Chandrasekhara Venkata Raman 1888-1970; fizyk hinduski; Nagroda Nobla w 1930 r.). Częstość fali rozproszonej może być podwyższona względem częstości fali padającej o częstość oscylacji własnych układu - wtedy mamy do czynienia z tak zwaną składową antystokesowską. Natomiast, jeśli jest ona obniżona o częstość oscylacji własnych układu, to jest to składowa stokesowska. Pasma stokesowskie są silniejsze i one zwykle są analizowane w widmie ramanowskim. Z teorii Placzka wynika, że im większa jest zmiana polaryzowalności cząsteczki w trakcie drgania normalnego, tym silniejsze jest odpowiadające mu pasmo ramanowskie. Teoria Placzka przewiduje także, że oprócz wspomnianych składowych ramanowskich (stokesowskich i antystokesowskich) promieniowanie rozproszone zawiera składową Rayleigha, która ma niezmienną częstość w stosunku do fali padającej. Składowa Rayleigha jest ponad 3 rzędy wielkości silniejsza niż składowe ramanowskie. Efekt Ramana jest więc słaby i wymaga do detekcji bardzo czułej aparatury.

Promieniowanie elektromagnetyczne możemy także traktować jako strumień fotonów. Jeśli więc kładziemy nacisk na aspekt korpuskularny promieniowania, to musimy rozważyć fotony docierające do cząstek analizowanej substancji (promieniowanie padające) i fotony wyemitowane przez te cząstki (promieniowanie rozproszone) [6,17].

Promieniowanie padające jest monochromatyczne i koherentne. Jego źródłem jest laser. W analizie teoretycznej rozproszenia fotonów na cząstkach materii stosuje się mechanikę kwantową. Zakłada się, że promieniowanie padające (Ryc. 1) wzbudza cząsteczki analizowanej substancji do pewnego wirtualnego poziomu energetycznego, z którego powracają emitując fotony promieniowania rozproszonego. Jeśli fotony rozproszone nie mają zmienionej częstości względem fotonów padających, to mamy do czynienia z rozproszeniem Rayleigha. W przeciwnym przypadku zachodzi rozproszenie ramanowskie. Efekt Ramana jest dość słaby, ponieważ ulega mu tylko co 10^6 - 10^8 kwant promieniowania. Na Ryc. 1 widzimy schemat energetyczny cząsteczki zawierający dyskretne poziomy energii. Najniższy (pogrubiona) linia symbolizuje podstawowy stan elektronowy i jednocześnie najniższy, to jest zerowy poziom oscylacyjny w tym stanie elektronowym (liczba kwantowa oscylacji równa 0), odpowiadający jednemu z drgań normalnych. Wyżej położona linia symbolizuje wyższy stan oscylacyjny, czyli pierwszy w tym podstawowym stanie elektronowym (liczba kwantowa oscylacji równa 1). Linia przerywana symbolizuje wzbudzony wirtualny poziom energetyczny cząsteczki. Jeśli cząsteczka przechodzi z zerowego poziomu oscylacyjnego do wzbudzonego poziomu wirtualnego i wraca na pierwszy poziom oscylacyjny, to emitowany (rozproszony) foton ma niższą energię od padającego i niższą częstość. Wtedy foton rozproszony odpowiada składowej stokesowskiej a obniżenie częstości odpowiada częstości danego drgania normalnego. Jeśli cząsteczka przechodzi z pierwszego poziomu oscylacyjnego do wzbudzonego poziomu wirtualnego i wraca na zerowy poziom oscylacyjny, to emitowany (rozproszony) foton ma wyższą energię od padającego i wyższą częstość. Wtedy foton rozproszony odpowiada składowej antystokesowskiej a podwyższenie częstości również odpowiada częstości rozważanego drgania normalnego. Pasma stokesowskie są znacznie silniejsze od antystokesowskich, gdyż większość cząsteczek w temperaturze pokojowej, w której rejestrujemy widma, znajduje się na zerowym poziomie oscylacyjnym. Dlatego zwykle rejestrujemy widmo Ramana rozproszenia stokesowskiego.



Ryc. 1. Diagram energetyczny dla procesów rozproszenia Rayleigha i Ramana.



Ryc. 2. Widmo Ramana glicyny (drżania: ν -rozciągające, δ -zginające, γ -wahadłowe, ω -wahlarzowe, *sym*-symetryczne, *asym*-asymetryczne).

Widmo Ramana przedstawia zależność intensywności sygnału od częstości (liczby falowej), będącej różnicą między częstościami (liczbami falowymi) promieniowania padającego a rozproszonego (przesunięcie Ramana). Widmo składa się z pasm o położeniach uzależnionych od częstości drgań składników próbki. Przykładowe widmo Ramana przedstawiono na Ryc. 2. W zaprezentowanym widmie glicyny przypisano tylko główne, charakterystyczne pasma. Dwa spośród tych pasm: przy 894 i 1327 cm^{-1} mogą być uważane za markery glicyny w bardziej złożonych widmach zawierających pasma wielu substancji [18]. Podobnie jak przykładowo wymieniona glicyna, każdy związek daje swoje charakterystyczne widmo ramanowskie będące „śladem daktyloskopowym”, wykorzystywanym w analizie jakościowej. Dzięki powyższym właściwościom możliwe jest badanie tą metodą białek, polisacharydów, czy kwasów nukleinowych. Metodą spektroskopii Ramana możliwe jest również wykonanie analizy ilościowej opartej na zależności intensywności sygnałów od stężenia substancji w analizowanej próbce [17].

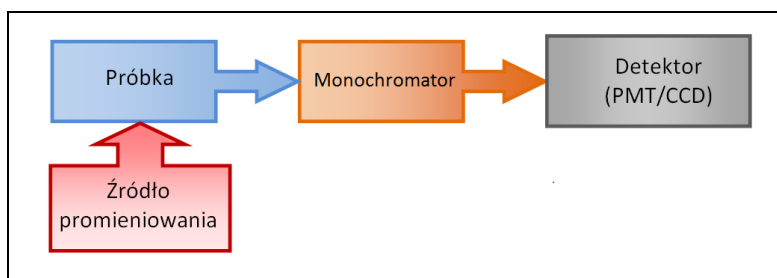
Główne elementy budowy spektrometru ramanowskiego pokazano na Ryc. 3 i 4. Ponieważ efekt Ramana jest stosunkowo słaby, konieczne jest stosowanie w spektrometrach intensywnego, monochromatycznego promieniowania, które nie wzbudzałoby przeszkadzającej fluorescencji. Niezbędna jest również czuła detekcja rozproszonych fotonów. Rozpowszechnienie spektroskopii ramanowskiej w naukach biologicznych stało się zatem możliwe dzięki użyciu laserów emitujących promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni oraz dzięki wykorzystaniu transformacji Fouriera. Warto zwrócić uwagę na to, że promieniowanie laserowe z zakresu bliskiej podczerwieni lepiej wnika w głąb próbki biologicznej oraz wywołuje mniejszą fluorescencję [9,19]. Postęp techniczny umożliwił także budowę mikroskopów ramanowskich, które stają się coraz bardziej popularne w laboratoriach biologicznych i medycznych.

Do otrzymania widma ramanowskiego stosuje się dwie główne techniki: dyspersyjną oraz z transformacją Fouriera (FT). Różnią się one długością fali promieniowania padającego oraz sposobem detekcji (Ryc. 3 i 4) [20]. W obu przypadkach składowa rayleighowska jest eliminowana przez odpowiednie filtry. Spektrometry dyspersyjne (Ryc. 3) wy-

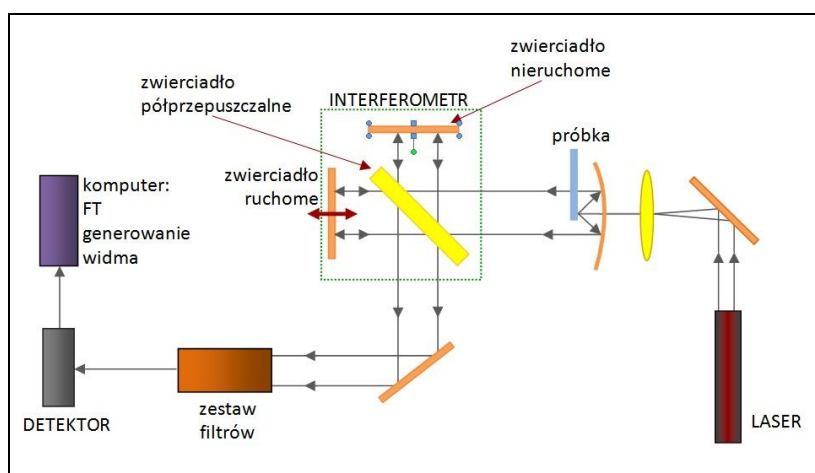
korzystają do wzbudzenia próbki promieniowaniem laserowe z zakresu widzialnego, a do detekcji fotopowielacze (PMT) lub - obecnie częściej - detektory matrycowe CCD. Matryca CCD jest dwuwymiarowym układem światłoczułych detektorów półprzewodnikowych. Promieniowanie rozproszone jest analizowane przez klasyczny monochromator. Natomiast spektrometry fourierowskie (Ryc. 4) zaopatrzone są w lasery pracujące w zakresie bliskiej podczerwieni, w którym detektory CCD są nieprzydatne. Sygnał ramanowski próbki, stanowiący zbiór rozproszonych fal o częstościach zmodyfikowanych przez oscylacje molekularne, zostaje przekształcony przez interferometr w sygnał interferencyjny. Ten z kolei po detekcji daje interferogram, który zawiera w sobie informację o całym widmie oscylacyjnym. Do rejestracji interferogramów stosowane są detektory germanowe (Ge) lub indowo-galowo-arsenowe (InGaAs). Rejestrację interferogramów powtarza się wielokrotnie, czyli wykonuje się odpowiednią liczbę skanów, dodając zdigitalizowane interferogramy w pamięci komputera. Stosunek sygnału do szumu rośnie z pierwiastkiem kwadratowym z liczby skanów, a więc akumulacja interferogramów zwiększa czułość metody. Na końcu komputer wykonuje transformację Fouriera, przekształcając interferogram w klasyczne widmo oscylacyjne.

Obie te techniki rejestracji widm ramanowskich mają swoje wady i zalety, a wybór jednej z nich powinien być dostosowany do właściwości analizowanej próbki [17]. Główne zalety techniki fourierowskiej to brak przeszkadzającej fluorescencji i duża dokładność określenia częstości pasm. Technika dyspersyjna charakteryzuje się większą czułością i rozdzielczością przestrzenną.

W spektroskopii Ramana stosuje się obecnie wiele nowych technik, które przede wszystkim zwiększają czułość tej metody. Rezonansowa spektroskopia Ramana (*Resonance Raman Spectroscopy, RRS*) jest techniką, w której częstość wiązki monochromatycznej lasera jest dostrojona do częstości przejścia elektronowego analizowanego związku, co prowadzi do selektywnego wzrostu intensywności pasm ramanowskich $10^2 - 10^6$ razy w stosunku do klasycznej dys-



Ryc. 3. Schemat dyspersyjnego spektrometru Ramana.



Ryc. 4. Schemat spektrometru Ramana z transformacją Fouriera.

persyjnej spektroskopii Ramana [10]. W badaniach stosuje się również powierzchniowo wzmocnioną spektroskopię Ramana (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS*), w której mierzy się rozproszenie ramanowskie cząsteczek zaadsorbowanych na powierzchni metalu lub metalicznego zolu (głównie srebra). Zjawisko wzmocnienia tłumaczy się dwoma różnymi mechanizmami: chemicznym i elektromagnetycznym. SERS zwiększa intensywność sygnału ramanowskiego $10^3 - 10^7$ razy w stosunku do sygnału otrzymywanego w klasycznym eksperymencie ramanowskim [10,17,19]. Wykorzystując konfokalną mikroskopię ramanowską (*Confocal Raman Microscopy*) możliwe jest wykonanie widm z bardzo małego, precyzyjnie wybranego obszaru próbki (ok. $1 \mu\text{m}^2$). Dzięki możliwościom jakie daje mikroskop konfokalny uzyskuje się przekroje optyczne badanych materiałów, obrazy trójwymiarowe oraz wizualizację komórek i fragmentów tkanek [10,20]. Ciekawą, stosowaną m.in. w obrazowaniu techniką jest wymuszona (nieliniowa) antystokesowska spektroskopia Ramana (*Coherent Antistokes Raman Spectroscopy, CARS*). Technika ta bazuje na wymuszonym rozproszeniu ramanowskim, gdzie do wzbudzenia próbki wykorzystuje się dwie wiązki promieniowania. Wymuszone antystokesowskie rozproszenie Ramana jest kilka rzędów wielkości silniejsze niż rozproszenie spontaniczne. Mimo to, nie jest jeszcze wystarczająco czułe do wszystkich zastosowań biologicznych i medycznych. Wobec tego CARS wykorzystywane jest głównie do analizy substancji, które występują w dużej ilości w próbkach biologicznych, w szczególności lipidów [21]. Ponadto, testowano zastosowanie tej metody w diagnostyce medycznej *in vivo* chorób skóry lub podczas zabiegów medycznych [22].

3. Zastosowanie spektroskopii Ramana

3.1. Diagnostyka miażdżycy

Miażdżycą jest przewlekłą chorobą charakteryzującą się zmianami zwyrodnieniowymi - powstającymi w błonie środkowej i wewnętrznej tętnic - prowadzącymi do zwężenia światła tętnic oraz zmniejszenia ich elastyczności. Zwężenie światła tętnic jest wynikiem odkładania się blaszek cholesterolu na wewnętrznej stronie naczyń, natomiast spadek elastyczności następuje w wyniku odkładania wapnia. Za przyczyny choroby uważane są: siedzący tryb życia, dieta bogata w cholesterol oraz dziedziczna skłonność do rozwoju miażdżycy. Miażdżycą jest chorobą bardzo niebezpieczną, ponieważ w wyniku rozrostu blaszek miażdżycowych lub ich pęknięcia może dojść do zatorów, a nawet zamknięcia światła tętnicy, co prowadzi do poważnych konsekwencji zdrowotnych. Z powodu miażdżycy i związanych z nią komplikacji umiera niemal 20% mieszkańców krajów wysokorozwiniętych [23].

Obecne techniki diagnozowania i obrazowania miażdżycy, jak m.in. angiografia czy obrazowanie metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (MRI), umożliwiają jedynie ocenę anatomii blaszki miażdżycowej. Angiografia, uważana za tzw. „złoty standard” w diagnostyce chorób naczyń wieńcowych, pozwala ocenić stopień zwężenia naczyń, nie dostarcza jednak chemicznych i morfologicznych informacji o blaszkach miażdżycowych. Natomiast przeprowadzone badania pokazują, że to skład chemiczny i morfologia, bardziej niż anatomia (stopień zwężenia tętnic), określają niestabilność blaszek miażdżycowych i pozwalają przewidzieć rozwój choroby oraz ryzyko zagrażających życiu komplikacji, takich jak: zakrzepica tętnic wieńcowych czy ostre krwawienia jako następstwo pęknięcia płytki miażdżycowej [9,24]. Spektroskopia Ramana jest obiecującą

metodą diagnostyczną obrazowania tętnic wieńcowych, ponieważ oba osadzające się w świetle naczynia krwionośnego składniki - cholesterol i związki wapnia - dają różne widma Ramana. Analizując widmo ramanowskie naczyń tętnicznych możliwe jest więc określenie czy naczynia są zdrowe, czy posiadają pierwsze, cholesterolowe blaszki miażdżycowe, czy też jest to miażdżycza zaawansowana, gdzie blaszki są już zwapniałe.

Spektroskopia Ramana jest metodą o potencjalnych możliwościach wykorzystania w badaniach diagnostycznych miażdżycy naczyń wieńcowych przeprowadzanych *in vivo*. Przemawiają za tym przede wszystkim możliwości szybkiego zbierania danych i niemal natychmiastowe otrzymanie wyniku. W kilku pracach zaprezentowano, że na podstawie matematycznego modelu porównywania między naczyniem zdrowym a miażdżycowo zmienionym, można z widm Ramana uzyskać ilościową informację o chemicznym składzie komponentów powodujących zwężenie tętnic [11,23]. Technika ta daje nie tylko możliwość sklasyfikowania zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych, dostarcza również informacji o cechach morfologicznych, takich jak obecność komórek piankowatych, zmian martwiczych i kryształów cholesterolu, które mogą być użyte do oceny niestabilności blaszek, przewidywania postępu choroby i możliwości wystąpienia groźnych komplikacji (np. ostrego zespołu wieńcowego) [24].

Jedne z pierwszych widm naczyń tętnicznych metodą spektroskopii Ramana wykonali Rava i in. [25] przypisując charakterystyczne pasma elementom strukturalnym budującym naczynia. De Paula i in. [23] przypisali w widmie ramanowskim zdrowej tętnicy dominujące pasma przy 1660, 1452 i 1260 cm^{-1} białkom strukturalnym: kolagenowi i elastynie. W przypadku widma tętnicy z blaszkami miażdżycowymi występują pasma 1442 i 1665 cm^{-1} cholesterolu i jego estrów, głównych budulców blaszek miażdżycowych. Widmo Ramana zwapniałych blaszek miażdżycowych wykazuje znaczne różnice w stosunku do dwóch poprzednich - główne pasma: 962 i 1073 cm^{-1} pochodzą od związków wapnia [23].

Przytoczone przykłady pokazują, że spektroskopia Ramana jest obiecującą metodą w szybkiej, bezbolesnej i nieinwazyjnej diagnostyce miażdżycy *in vivo*.

3.2. Diagnostyka osteoporozy

Od 2005 roku [26-29] pojawiają się doniesienia o możliwości wykorzystania spektroskopii Ramana w diagnostyce osteoporozy. W standardowej procedurze diagnostyki osteoporozy materiał używany do badań pochodzi z kości (badanie gęstości kości), natomiast Towler i in. [26-29] wykorzystali do badań nietypowy materiał - płytkę paznokci. Prace grupy Towlera wykazały, że ilość wiązań disiarczkowych w paznokciach osób chorych na osteoporozę jest mniejsza niż w paznokciach osób zdrowych. Wyniki takie nasuwają przypuszczenie, że istnieje korelacja między mechanicznymi i chemicznymi właściwościami kości i płytki paznokci [30]. Sugeruje to, że zmiany w macierzy organicznej kości, a więc w jej głównym białku budulcowym kolagenie, mają swoje odbicie w strukturze keratyny - pokrewnego białka będącego składnikiem paznokci. Kolagen i keratyna, pomimo że są różnymi białkami, mają jedną wspólną cechę: dużą zawartość reszt cysteinowych i w związku z tym dużą ilość wiązań disiarczkowych warunkujących wytrzymałość tkanek. Z badań Dittmara i in. [31] wiadomo natomiast, że ilość siarki w płytce paznokci pozo-

staje stała niezależnie od wieku. Zatem liczba „miejsc”, w których mogą utworzyć się wiązania S-S jest stała, ale u osoby chorej na osteoporozę liczba tych wiązań maleje w porównaniu z osobą zdrową. Na widmie ramanowskim paznokci osób chorych następuje więc obniżenie intensywności pasma, charakterystycznego dla drgań rozciągających wiązania S-S przy ok. 510 cm^{-1} w stosunku do wartości otrzymanej dla osób zdrowych.

3.3. Diagnostyka i monitorowanie leczenia chorób skóry

Możliwe jest również wykorzystanie spektroskopii Ramana w diagnostyce i analizie biochemicznej niektórych chorób skóry.

Spektroskopię Ramana w połączeniu ze spektroskopią fluorescencyjną zastosowano w diagnostyce *in vivo* bielactwa nabytego. Bielactwo nabyte jest przewlekłą chorobą polegającą na depigmentacji fragmentów skóry na skutek wymierania komórek barwnikowych skóry - melanocytów. Dokładny mechanizm powstawania plam bielactwych nie jest znany. Teorie powstawania tych zmian koncentrują się na trzech mechanizmach: autoimmunologicznym, autocytotoksycznym i związanym z układem nerwowym (neurogeny). Schallreuter i współpracownicy [32] donoszą, że wykorzystując spektroskopię Ramana z transformacją Fouriera zidentyfikowali obecność nadtlenu wodoru (H_2O_2) w stężeniu milimolowym w skórze osoby chorej (zarówno w obszarze objętym pigmentacją jak i poza nim). Dodatkowo wykorzystując spektroskopię fluorescencyjną wykryli spowodowane przez H_2O_2 utlenianie reszt tryptofanowych w obszarze depigmentacji (co prowadzi do zniszczenia komórek melanocytów). Otrzymane wyniki stanowią potwierdzenie dla teorii autocytotoksycznej (według której zniszczenie melanocytów powoduje jakiś czynnik obecny w tych komórkach - w tym przypadku H_2O_2) i wskazują efektywną metodę diagnostyki bielactwa.

Spektroskopię Ramana w połączeniu z mikroskopem konfokalnym oraz spektroskopią w podczerwieni wykorzystano do scharakteryzowania łuszczycy *in vitro*. Jest to przewlekła choroba skóry z tendencją do samoistnego ustępowania objawów i ich nawrotów. Jej charakterystyczną cechą jest występowanie łuszczących się wykwitów. Bernard i in. [33] badali warstwę rogową skóry odpowiedzialną za przepuszczalność naskórka. W przypadku pacjentów cierpiących na łuszczycę stwierdzono zwiększoną przepuszczalność i spadek grubości warstwy rogowej naskórka w porównaniu do osób zdrowych. Ta korelacja jest istotna w lepszym zrozumieniu patogenezy choroby, a ponadto może znaleźć zastosowanie w monitorowaniu klinicznego leczenia łuszczycy i przewidywania nawrotu objawów choroby [33].

Spektroskopia Ramana umożliwia również badanie wielu składników skóry człowieka: fosfodiesteraz, DNA czy keratyny - rozszerzając tym samym możliwości dalszego jej wykorzystania.

3.4. Diagnostyka chorób nowotworowych

Choroba nowotworowa jest jedną z najczęstszych chorób współczesnego społeczeństwa, atakującą różne narządy. Jej najniebezpieczniejszą postacią jest nowotwór złośliwy charakteryzujący się szybkim wzrostem i zdolnością rozprzestrzeniania się (tworzenia przerzutów). Przerzuty powstają wtedy, gdy komórki nowotworowe, wędrując z krwią, dają początek nowemu ognisku nowotworowemu nawet w odległych tkankach. Leczenie nowotworów jest

problematiczne ze względu na częsty brak dostatecznych informacji o rodzaju zmian nowotworowych i ich szybkim rozwoju po wyjściu z okresu utajenia. Stale prowadzone są badania nad różnego rodzaju terapiami, m.in. chemioterapią - polegającą na podawaniu leków toksycznych dla komórek nowotworowych, tzw. cytostatyków. Wraz ze wzrastającą ilością nowosyntetyzowanych leków o potencjalnym działaniu antynowotworowym niezbędne jest opracowanie metod wstępnej, szybkiej i rzetelnej oceny ich działania. Badanie takie można prowadzić zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Jednak ze względu na większą prostotę, mniejszą czasochłonność i niższy koszt, efektywniej prowadzić je *in vitro* [34]. W tym kontekście bardzo przydatne są takie metody spektroskopowe jak: spektroskopia Ramana (w tym SERS), NMR, IR, UV/Vis, fluorescencyjna czy krystalografia rentgenowska.

Bardzo trudno jest diagnozować różnego rodzaju nowotwory. Rak jest skutkiem mutacji w genach kodujących białka. Początkowy okres choroby jest długi i utajony, a to ogranicza możliwości diagnostyczne, wskutek czego pacjent dowiaduje się o chorobie z reguły, gdy jest ona już w poważnym stadium. W wyniku postępu procesu nowotworowego zmienia się morfologia i biochemia tkanki. Biochemiczne markery komórek rakowych, takie jak: specyficzne białka, enzymy, hormony, mogą być analizowane za pomocą spektroskopii Ramana poprzez porównanie komórek zdrowej i potencjalnie chorej tkanki [35].

„Złoty standard” w badaniu patologicznych zmian, to obecnie badanie histopatologiczne tkanek. Jednak pobranie materiału biopsji i jego zbadanie jest czasochłonne, ponadto istnieje ryzyko pobrania niereprezentatywnej próbki. Stąd zainteresowanie metodami spektroskopowymi - szybkimi, nieinwazyjnymi, wykonywanymi *in situ*. Widmo otrzymane przy ich użyciu z jakiegokolwiek tkanki zawiera informacje histologiczne i biochemiczne [1].

Spektroskopia Ramana, jako metoda diagnostyki raka, stała się przedmiotem zainteresowania wielu grup naukowców. Przeprowadzono szereg badań pod kątem wykorzystania tej metody w diagnostyce nowotworów m.in. piersi [12,36-38], gardła [39], płuc [2,35], skóry [40], jelita grubego [41], nerek [42], szyjki macicy [43] i wielu innych. Niemal w każdym przypadku otrzymane wyniki są bardzo obiecujące, potwierdzają duże możliwości, jakie spektroskopia Ramana daje w diagnostyce chorób nowotworowych *in vitro*, ale co ważniejsze również *in vivo*. W ramach tego opracowania przytoczono tylko kilka przykładów przeprowadzonych w tym zakresie badań.

Huang i in. [35] w swoich badaniach wykorzystali spektroskopię Ramana z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR) do diagnostyki raka płuc. Skoncentrowali się na poszukiwaniu techniki służącej odróżnieniu tkanki zdrowej od nowotworowo zmienionej. Badania przeprowadzone były *in vitro*. Używając spektrometru dyspersyjnego NIR-Raman wyposażonego w laser 785 nm już po 5 sekundach otrzymano dobrej jakości widma. W zarejestrowanych widmach występowały istotne różnice. Dla tkanki nowotworowo zmienionej mniejszą intensywność miały pasma charakterystyczne karotenoidów, a większą kwasów nukleinowych, w porównaniu z tkanką zdrową. Również kształty pasm otrzymanych dla tkanki zdrowej i objętej procesem nowotworowym były różne - głównie dla drgań wiązań białek i lipidów oraz drgań rozciągających grupy CH kwasów nukleinowych, czyli w zakresach 1000-1100, 1200-1400 i 1500-1700 cm^{-1} . Dobre rozróżnienie między tkanką zdrową a nowotworowo

zmienioną stanowi różnica intensywności pasm przy 1445 i 1655 cm^{-1} . Otrzymane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania spektroskopii Ramana z zakresu bliskiej podczerwieni w diagnostyce raka płuc.

Lin i in. [39] wykorzystali spektroskopię Ramana w badaniach nowotworu gardła. Wykonano analizę 94 próbek: 22 zdrowej tkanki, 72 pochodzących z guzów nowotworowych. W widmach tkanek zdrowych i nowotworowo zmienionych widać znaczne różnice w intensywności pasm przy 2845 i 2880 cm^{-1} (drgania rozciągające CH_2 lipidów), które są intensywniejsze dla chorej tkanki oraz pasm 2920 (drgania rozciągające CH_2 lipidów) i 2940 cm^{-1} (drgania rozciągające CH_3 białek) intensywniejszych dla zdrowej tkanki. Otrzymane wyniki dowiodły dużej wrażliwości (ok. 90 %) i specyficzności (ok. 91 %) spektroskopii Ramana jako metody diagnostycznej raka gardła.

Abramczyk i in. [12,36-38] w swojej pracy skoncentrowali się na diagnostyce raka piersi. Wykazano, że spektroskopia Ramana jest bardzo dobrą metodą służącą rozróżnieniu tkanek piersi zdrowej i objętej nowotworem łagodnym lub złośliwym. Tylko w widmie zdrowej tkanki widać pasma drgań rozciągających C-C (1150 cm^{-1}), C=C (1520 cm^{-1}) karotenoidów oraz symetrycznych i asymetrycznych drgań rozciągających C-H lipidów (2850-2940 cm^{-1}), a brak ich w widmach tkanek nowotworowych. Ponadto fluorescencja tkanki objętej nowotworem złośliwym jest znacznie wyższa niż fluorescencja tkanki zdrowej czy z nowotworem łagodnym [12,37]. Otrzymane rezultaty wskazują, że w spektroskopii Ramana zestawienie intensywności pasm lipidów i karotenoidów oraz fluorescencji próbki, stanowi kluczowy element w diagnostyce nowotworu złośliwego piersi tą metodą [37]. Grupa Abramczyk przeprowadziła również obrazowanie ramanowskie tkanek piersi zmienionych nowotworowo. Stwierdzono, że skład kwasów tłuszczowych w nowotworowo zmienionej tkance piersi jest inny w porównaniu do otaczających zdrowych tkanek. W nowotworowej tkance piersi w przewodzie występują produkty metabolizmu kwasu arachidonowego, podczas gdy w tkance zdrowej dominują jednonienasycone pochodne kwasu oleinowego. Sugeruje to, że niektóre produkty metabolizmu kwasów tłuszczowych mogą brać udział w procesie karcynogenezy [36,38]. Pokazano, że spektroskopia Ramana jest dobrą metodą obrazowania bez potrzeby stosowania kontrastu, umożliwiającą rozróżnienie tkanki nowotworowej od zdrowej [38].

Gniadecka i in. [40] podjęli się diagnostyki najczęściej występującej postaci raka skóry, raka podstawnocomórkowego skóry (*basal cell carcinoma, BCC*), wykorzystując spektroskopię Ramana z zakresu bliskiej podczerwieni. Wykonano widma ramanowskie próbek skóry zdrowej i objętej chorobą, dla których wcześniej przeprowadzono badania histopatologiczne. Wyniki badań spektroskopowych wskazują na zmiany w strukturze białek i lipidów w próbkach skóry objętej procesem nowotworowym. Różnice spektralne między widmami zdrowej i chorej tkanki obserwowane są na pasmach charakterystycznych białek: amid I (1640-1680 cm^{-1}), amid III (1220-1300 cm^{-1}) i $\nu_{\text{C-C}}$ (928-940 cm^{-1}) oraz lipidów: $\delta(\text{CH}_2)$ - (1420-1450 cm^{-1}) i skręcających $-(\text{CH}_2)_n$ (ok. 1300 cm^{-1}). Ponadto między tkanką chorą a zdrową występuje również różnica w obszarze 840-860 cm^{-1} , co odpowiada różnicom w strukturze polisacharydów. Podsumowując - analizując w widmie ramanowskim pola powierzchni pasm w zakresach: 1230-1360, 900-990 i 830-900 cm^{-1} możliwe jest pełne rozróżnienie między skórą zdrową

a chorą na raka podstawnomórkowego (Tabela 1). Zaprezentowane wyniki pozwalają postrzegać spektroskopię Ramana jako obiecujące narzędzie również w diagnostyce tej jednostki chorobowej.

Tabela 1. Porównanie pól powierzchni pasm w widmie ramanskim w odpowiednich zakresach dla skóry zdrowej i chorej na raka podstawnomórkowego [40].

Pola powierzchni pasm w widmie w danym zakresie [cm ⁻¹]	Skóra zdrowa	Rak podstawnomórkowy skóry
(1290-1360)/(1230-1290)	0,29 (0,22-0,36)	1,37 (1,21-1,54)
900-990	0,20 (0,17-0,22)	0,10 (0,08-0,12)
830-900	1,16 (0,14-0,18)	0,07 (0,04-0,10)

Rak szyjki macicy jest jedną z najczęstszych chorób nowotworowych wśród kobiet w krajach rozwiniętych i rozwijających się. Wykorzystaniem spektroskopii Ramana do badania tego nowotworu zajęli się Krishna i in. [43]. Widmo zdrowej tkanki nabłonkowej szyjki macicy charakteryzuje się silnym i szerokim pasmem amid I (ok. 1655 cm⁻¹), szerokim pasmem amid III (ok. 1250-1384 cm⁻¹) oraz ostrymi pasmami przy 853 i 938 cm⁻¹, które prawdopodobnie pochodzą od drgań białek strukturalnych takich jak kolagen. Charakterystycznymi cechami widma nowotworowo zmienionej tkanki szyjki macicy w stosunku do widma tkanki zdrowej są: słabsze i bardziej ostre pasmo amid I, przesunięcie pasma pochodzącego od drgań grupy CH₂ oraz ostrzejsze pasmo amid III. Obserwowane zmiany wiążą się prawdopodobnie ze zwiększeniem ilości kwasu deoksyrybonukleinowego, lipidów i niekolagenowych białek w komórkach szyjki macicy objętych procesem nowotworowym. Dla przeprowadzonych badań wykonana została również analiza głównych składowych (jedna ze statystycznych metod analizy czynnikowej), co potwierdziło, że spektroskopia Ramana jest dobrą metodą rozróżnienia zdrowej i nowotworowo zmienionej tkanki szyjki macicy [43].

Rak jelita grubego jest jednym z najcięższych nowotworów, powodującym w Polsce śmierć prawie 80% chorych na niego pacjentów. Badaniem przesiewowym w kierunku nowotworu jelita grubego jest badanie na krew utajoną w kale. W przypadku pozytywnego wyniku badania niezbędne jest kolejne - kolonoskopia, dla pacjentów bardzo stresujące i nieprzyjemne badanie, obarczone dodatkowo ryzykiem pobrania niereprezentatywnej próbki. Optyczna biopsja z wykorzystaniem spektroskopii Ramana

wyda się więc korzystną alternatywą. Widjaja i in. [41] przy wykorzystaniu spektroskopii Ramana z zakresu bliskiej podczerwieni w połączeniu z odpowiednim programem statystycznym, sklasyfikowali różne rodzaje próbek tkanek jelita grubego: zdrowych, z polipami i z gruczolakiem. Zarejestrowano widma Ramana w zakresie 1800-800 cm⁻¹, a główne analizowane pasma występują ok. 875, 1002, 1090, 1267, 1320, 1445, 1605, 1655 i 1740 cm⁻¹. Zarejestrowano diagnostyczne różnice w intensywności, położeniu i kształcie pasm między zdrowymi a chorymi tkankami (Ryc. 5). Różnice te są skutkiem zmian w składzie biochemicznym i strukturze tkanek, które zachodzą wraz z postępem procesu patologicznego.

Spektroskopia Ramana wydaje się więc stanowić obiecujące, alternatywne narzędzie w diagnostyce raka, umożliwia odróżnienie zdrowych tkanek od zmienionych nowotworowo. Ponadto, w niektórych przypadkach, umożliwia różnicowanie między postacią łagodną a złośliwą nowotworu [37].

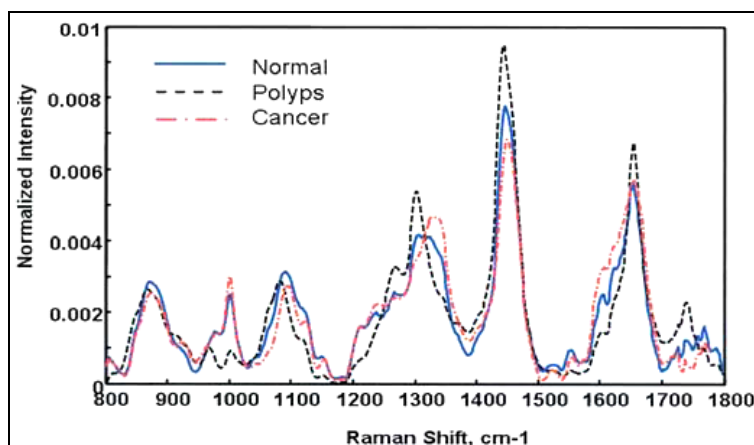
3.5. Inne zastosowania

Za pomocą spektroskopii Ramana można badać również białą i szarą istotę mózgu. Tą metodą uzyskuje się istotne informacje w diagnostyce takich chorób, jak choroba Parkinsona czy Alzheimerera, poprzez porównanie między tkanką zdrową i objętą chorobą [44]. Wykonując badania *post mortem* tkanki mózgowej osoby cierpiącej na Alzheimerera, stwierdzono obecność sygnału przy 1628 cm⁻¹ pochodzącego od białka β-amylazy, podejrzanego o wywołanie choroby Alzheimerera [45].

Spektroskopia Ramana może być stosowana również w diagnostyce kamicy nerkowej. Pozwala na wykrycie kamieni zarówno typu szczawianowego, jak i powstałych w wyniku redukcji cysteiny do cystyny. Dla tych drugich otrzymujemy widma z sygnałami charakterystycznymi dla cystyny: 498 cm⁻¹ pochodzącym od drgań wiązań S-S i 677 cm⁻¹ od drgań rozciągających wiązań C-S [46]. Analiza ta dostarcza szybkich i rzetelnych informacji o rodzaju powstałych kamieni.

4. Podsumowanie

Spektroskopia Ramana staje się uznaną i szeroko wykorzystywaną metodą analizy biochemicznej tkanek i diagnostyki chorób. Techniki: spektroskopia Ramana z transformacją Fouriera oraz powierzchniowo wzmocniona spektro-



Ryc. 5. Widma Ramana tkanek jelita grubego: zdrowej (*Normal*), z polipami (*Polyps*), z gruczolakiem (*Cancer*) [41].

skopia Ramana, umożliwiły techniczny rozwój metody i otworzyły nowe pola jej wykorzystania, przewyższając takie problemy, jak fluorescencja próbek czy niska czułość metody. Widmo ramanowskie dostarcza bogatej informacji o chemicznym składzie próbek biologicznych, pozwala na identyfikację takich makromolekuł, jak kwasy nukleinowe, białka czy lipidy na podstawie ich charakterystycznych pasm.

Na uwagę zasługuje fakt, że wiele prac powstaje we współpracy naukowców ze środowiskiem lekarskim. Kilka grup badaczy podjęło próby wykorzystania spektroskopii Ramana w diagnostyce *in vivo* [32]. Otrzymane wyniki są obiecujące, niemniej jednak wymagają jeszcze szeroko zakrojonych badań. Niezaprzeczalne jest jednak to, że wdrożenie spektroskopii Ramana jako metody diagnostycznej przyspieszyłoby badania, a co za tym idzie umożliwiło zbadanie większej liczby pacjentów w tym samym czasie, obniżyłoby koszty, a w przypadku niektórych chorób zwiększyło jakość życia pacjenta poprzez uniknięcie bolesnych i nieprzyjemnych badań.

5. Wykaz skrótów

CARS	(ang. <i>Coherent Antistokes Raman Spectroscopy</i>) wymuszona (nieliniowa) antystokesowska spektroskopia Ramana;
CCD	(ang. <i>Charge Coupled Device</i>) detektor CCD, półprzewodnikowy odbiornik promieniowania, głównie z zakresu widzialnego;
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe;
FT	(ang. <i>Fourier transform</i>) transformacja Fouriera;
IR	(ang. <i>Infrared</i>) spektroskopia w podczerwieni;
MRI	(ang. <i>magnetic resonance imaging</i>) obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego;
NIR	(ang. <i>Near Infrared</i>) spektroskopia w zakresie bliskiej podczerwieni;
PMT	(ang. <i>photomultipliers</i>) fotopowielacz;
RRS	(ang. <i>Resonance Raman Spectroscopy</i>) rezonansowa spektroskopia Ramana;
SERS	(ang. <i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i>) powierzchniowo wzmocniona spektroskopia Ramana.

6. Bibliografia

1. Swinson B., Jerjes W., El-Maaytah M., Norris P., Hopper, Oral Oncol., 2006, 42, 221-228.
2. Zeng H., AcWilliams A., Lam S., Photodiagn. Photodyn. Ther., 2004, 1, 111-122.
3. Pons M., Le Bonté S., Potier O., J. Biotechnol., 2004, 113, 211-230.
4. Rollins A.M., Sivak M.V., Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol., 2001, 15, 227-247.
5. Zonios G., Silveira Jr. L., van Dam J., Crawford J.M., Cothren R.M., Arendt J.T., Manoharan R., Feld M.S., Gastrointest. Endosc., 1996, 43, 4: 307.
6. Kęcki Z., Podstawy spektroskopii molekularnej, PWN, Warszawa 1992.
7. Shaw R.A., Mantsch H.H., J. Mol. Struct., 1999, 480-481, 1-13.
8. Wartewig S., Neubert R.R.H., Adv. Drug Deliv. Rev., 2005, 57, 1144-1170.
9. Moreira L.M., Silveira Jr. L., Santos F.V., Lyon J.P., Rocha R., Zangaro R.A., Villaverde A.B., Pacheco M.T.T., Spectroscopy, 2008, 22, 1-19.
10. Baena J.R., Lendl B., Curr. Opin. Chem. Biol., 2004, 8, 534-539.
11. Silveira Jr. L., Sathaiiah S., Zângaro R.A., Pacheco M.T.T., Chavantes M.C., Pasqualucci C.A.G., Lasers Surg. Med., 2002, 30, 290-297.
12. Brożek-Pluska B., Placek I., Kurczewski K., Morawiec Z., Tazbir M., Abramczyk H., J. Mol. Liq., 2008, 141, 145-148.
13. Kim K.O., Park J.-J., Yeon J.E., Kim J.S., Byun K.S., Bak Y.-T., Oh S.N., Choi D.W., Han W.S., Park S.C., Chung H., Gastrointest. Endosc., 2007, 65, 5.
14. Moran P., Towler M.R., Chowdhury S., Saunders J., German M.J., Lawson N.S., Pollock H.M., Pillay I., Lyons D., J. Mater. Sci.: Mater. Med., 2007, 18, 969-974.
15. Pilotto S., Pacheco M.T.T., Silveira Jr L., Balbin Villaverde A., Zângaro R.A., Laser. Med. Sci., 2001, 16, 2-9.
16. Chaiken J., Finney W., Knudson P.E., Weinstock R.S., Khan M., Bussjager R.J., Hagrman D., Hagrman P., Zhao Y., Peterson C.M., Peterson K., J. Biomed. Opt., 2005, 10(3), 031111.
17. Smith E., Dent G., Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester 2005.
18. Zhu G., Zhu X., Fan Q., Wan X., Spectrochim Acta A, 2011, 78, 1187-1195.
19. Tu Q., Chang C., Nanomed.-Nanotechnol., 2012, 8, 545-558.
20. Das R.S., Agrawal Y.K., Vib. Spectrosc., 2011, 57, 163-176.
21. Zhang Y., Hong H., Cai W., Curr. Pharm. Biotechnol., 2010, 11(6), 654-661.
22. Downes A., Elfick A., Sensor (Basel.), 2010, 10, 1871-1889.
23. de Paula Jr. A.R., Sathaiiah S., Med. Eng. Phys., 2005, 27, 237-244.
24. Buschman H.P., Motz J.T., Deinum G., Römer T.J., Fitzmaurice M., Kramer J.R., van der Laarsw A., Brusckie A.V., Feld M.S., Cardiovasc. Pathol., 2001, 10, 59-68.
25. Rava R.P., Baraga J.J., Feld M.S., Spectrochim. Acta Part A, 1991, 47, 509-512.
26. Pillay I., Lyons D., German M.J., Lawson N.S., Pollock H.M., Saunders J., Chowdhury S., Moran P., Towler M.R., J. Womens Health, 2005, 14(4), 339-344.
27. Moran P., Towler M.R., Chowdhury S., Saunders J., German M.J., Lawson N.S., Pollock H.M., Pillay I., Lyons D., J. Mater. Sci.-Mater. M., 2007, 18, 969-974.
28. Towler M.R., Wren A., Rushe N., Saunders J., Cummins N.M., Jakeman P.M., J. Mater. Sci.-Mater. M., 2007, 18, 759-763.
29. Cummins N.M., Day J.C.C., Wren A., Carroll P., Murphy N., Jakeman P.M., Towler M.R., Spectroscopy, 2010, 42, 517-524.
30. Pandey G., Nakamura T., Singh R. P., Investigation into the Correlation Between Viscoelastic Properties of Fingernails and Osteoporosis; Processings of the Xth International Congress and Exposition, June 2-5, 2008 Orlando, Florida USA.
31. Dittmar M., Dindorf W., Banerjee A., Gerontology, 2008, 54, 100-105.
32. Schallreuter K.U., Krüger Ch., Rokos H., Hasse S., Zothner C., Panske A., Arch. Dermatol. Res., 2007, 299, 225-230.
33. Bernard G., Auger M., Soucy J., Pouliot R., Biochim. Biophys. Acta, 2007, 1770, 1317-1323.
34. Ye Y., Hu J., He L., Zeng Y., Vib. Spectrosc., 1999, 20, 1-4.
35. Huang Z., McWilliams A., Lam S., Lui H., Zeng H., Int. J. Cancer, 2003, 107, 1047-1052.
36. Abramczyk H., Brożek-Pluska B., Surmacki J., Jablonska-Gajewicz J., Kordek R., Prog. Biophys. Mol. Bio., 2012, 108, 74-81.
37. Abramczyk H., Surmacki J., Brożek-Pluska B., Morawiec Z., Tazbir M., J. Mol. Struct., 2009, 924-926, 175-182.
38. Abramczyk H., Brożek-Pluska B., Surmacki J., Jablonska J., Kordek R., J. Mol. Liq., 2011, 164, 123-131.
39. Lin K., Lau Pang Cheng D., Huang Z., Biosens. Bioelectron., 2012, 35, 213-217.
40. Gniadecka M., Wulf H.C., Nymark Mortensen N., Faurskov Nielsen O., Christensen D.H., J. Raman Spectrosc., 1997, 28, 125-129.
41. Widjaja E., Zheng W., Huang Z., Int. J. Oncol., 2008, 32, 653-662.

42. Bensalah K., Fleureau J., Rolland D., Lavastre O., Rioux-Leclercq N., Guille F., Patard J.-J., Senhadji L., de Crevoisier R., *Eur. Urol.*, 2010, 58, 602-608.
43. Murali Krishna C., Prathima N.B., Malini R., Vahiraja B.M., Bhatt R.A., Fernandes D.J., Kushtagi P., Vidyasagar M.S., Kartha V.B.; *Vib. Spectrosc.*, 2006, 41, 136-141.
44. Ong C.W., Shen Z.X., He Y., Lee T., Tang S.H., *J. Raman Spectrosc.*, 1999, 30, 91-96.
45. Sajig J., Elhaddoui A., Turrel S., *J. Raman Spectrosc.*, 1997, 28, 165-169.
46. Pappas D., Smith B.W., Wineforder J.D., *Talanta*, 2000, 51, 131-144.