ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ
ΔΠΜΣ «ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ & ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ RAMAN ΩΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Γεωργία Γ. Αναστασιάδη

Επιβλέπουσα : Ι. Ζεργιώτη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΜΠ

Αθήνα, Ιούλιος 2015

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΈΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ
ΔΠΜΣ «ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ & ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ RAMAN ΩΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Γεωργία Γ. Αναστασιάδη

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την

.....	.....	.....
Ι. Ζεργιώτη	Γ. Ράπτης	Δ. Τσουκαλάς
Αν. Καθηγήτρια ΕΜΠ	Αν. Καθηγητής ΕΜΠ	Καθηγητής ΕΜΠ

Αθήνα, Ιούλιος 2015

Περίληψη

Η φασματοσκοπία Raman είναι μία φασματοσκοπική τεχνική η οποία μπορεί να παρέχει βιοχημικές πληροφορίες, καθώς το κάθε μόριο ακολουθεί το δικό του τρόπο ταλάντωσης, πράγμα το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό βιοδείκτη Raman. Ένα φάσμα Raman δίνει συγκεκριμένες πληροφορίες ανάλογα με το χημικό δεσμό των μορίων που σχετίζονται με τις δονήσεις, και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάκριση διαφορετικών μορίων στον ιστό. Αυτή η ιδιότητα χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί σε αυτή την εργασία, κατά πόσο μπορεί η τεχνική αυτή να διακρίνει έναν υγιή ιστό μαστού από έναν καρκινικό. Ο λόγος για τον οποίο γίνεται αυτή η προσπάθεια εύρεσης νέων διαγνωστικών μεθόδων, συνοψίζεται στο ότι οι σύγχρονες μέθοδοι διάγνωσης καρκίνου στο μαστό είναι επώδυνες, χρονοβόρες και υψηλού κόστους για τον ασθενή, καθώς επίσης γίνονται ακόμα και για καλοήθιες για τις οποίες θα μπορούσε μία επεμβατική τεχνική όπως η βιοψία, να αποφευχθεί. Στην παρούσα μελέτη, επιλέχθηκε να γίνει και μία μικρή έρευνα για τη διάκριση μεταξύ διαφορετικών ειδών υγιούς ιστού.

Abstract

Raman spectroscopy is a technique capable of recognizing biochemical information, because of the personal characteristic vibrational modes of each molecule, known as Raman biomarker. A Raman spectum gives specific information about chemical bonding of molecules related to vibrations and can therefore be used to identify different molecules in a system. This is the characteristic capacity that is used in order to present in this study whether it is possible to differentiate healthy and cancerous breast tissues. The reason why there is such a wide research for new cancer diagnostic techniques is that the already known techniques are painful, lengthy and expensive for the patient as well as they have to be done even if the tumor is benign. Additionally, in this report, it is presented a limited research about the discrimination between different kinds of healthy tissues.

Table of Contents

Περίληψη iii

Abstract iv

Κεφάλαιο 1 :Φασματοσκοπία Raman: Βασικές αρχές, πειραματικές διατάξεις, εφαρμογές 1

1.1 Βασικές Αρχές 1

1.2 Ιστορική αναδρομή 4

1.3 Μακροσκοπική ερμηνεία φαινομένου Raman και κλασσική προσέγγιση 5

1.4 Κβαντική προσέγγιση φαινομένου Raman 7

1.5 Κανόνες επιλογής 10

1.6 Διάταξη 10

1.7 Εφαρμογές 15

Κεφάλαιο 2: Φασματοσκοπικές τεχνικές διάγνωσης καρκίνου 17

2.1 Η ασθένεια του καρκίνου 17

2.2 Συμβατικές και εναλλακτικές διαγνωστικές μέθοδοι 17

2.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα φασματοσκοπίας Raman 21

2.4 Πλεονεκτήματα φασματοσκοπίας έναντι βιοψίας 23

Κεφάλαιο 3: Πειραματική διαδικασία 25

3.1 Διαδικασία προετοιμασίας πειράματος 25

3.2 Δείγματα υγιούς μαστού 27

3.2.1 Όλα τα υγιή δείγματα-Απλός μαστός 29

3.2.2 Ίδιος χρόνος-Διαφορετική ισχύς 32

3.2.3 Ίδια ισχύς- Διαφορετικοί χρόνοι 35

3.3 Καρκινικός ιστός 38

3.3.1 Δείγματα καρκινικού ιστού 39

3.3.2 Προχωρημένος όγκος 3 περιοχών 41

3.3.3 Ίδια ισχύς-Διαφορετικός χρόνος 43

3.3.4 Ίδιος χρόνος-Διαφορετική ισχύς 45

3.4 Διαφορετικά είδη υγιών ιστών 48

3.4.1 Όλα τα δείγματα 50

Κεφάλαιο 4: Σχόλια και συμπεράσματα 54

4.1 Σύγκριση υγιούς-καρκινικού ιστού 54

4.1.1 Χαρακτηρισμός ταυτοποιημένων κορυφών υγιούς ιστού 55

4.1.2 Χαρακτηρισμός ταυτοποιημένων κορυφών καρκινικού ιστού 56

4.2 Ο ρόλος των λιπιδίων στον καρκίνο του μαστού 57

4.3 Ανάλυση φασμάτων με διαφορετικές παραμέτρους 60
4.4 Ανάλυση αποτελεσμάτων διαφορετικών ειδών υγιών ιστών 61
4.5 Συμπεράσματα..... 62

Κεφάλαιο 1 :Φασματοσκοπία Raman: Βασικές αρχές, πειραματικές διατάξεις, εφαρμογές

1.1 Βασικές Αρχές

Η Φασματοσκοπία μπορεί να οριστεί ως η χρήση των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας με την ύλη, για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη δομή, τη σύσταση και τις ιδιότητες της ύλης που εξετάζεται. Ως αποτελέσματα αλληλεπίδρασης ύλης και ακτινοβολίας αναφέρουμε τη σκέδαση, την απορρόφηση και την εκπομπή.

Εκπομπή ακτινοβολίας προκύπτει όταν ένα σωματίδιο βρίσκεται σε μια διεγερμένη κατάσταση και μεταβαίνει σε μια στάθμη χαμηλότερης ενέργειας. Κατά τη μετάβαση αυτή αποβάλλεται ενέργεια με τη μορφή εκπομπής φωτονίου που ισούται με

$$E_2 - E_1 = \mathrm{h} \cdot \mathrm{f} = h \cdot (\frac{c}{\lambda}) \qquad (1.1)$$

Απορρόφηση ακτινοβολίας προκύπτει αν ένα ηλεκτρόνιο μεταβεί από την E_1 στην E_2, ύστερα από αλληλεπίδραση της ύλης με θερμική ακτινοβολία, και έχει τελική ενέργεια την διαφορά των ενεργειών των σταθμών ($\Delta E=E_2-E_1$).

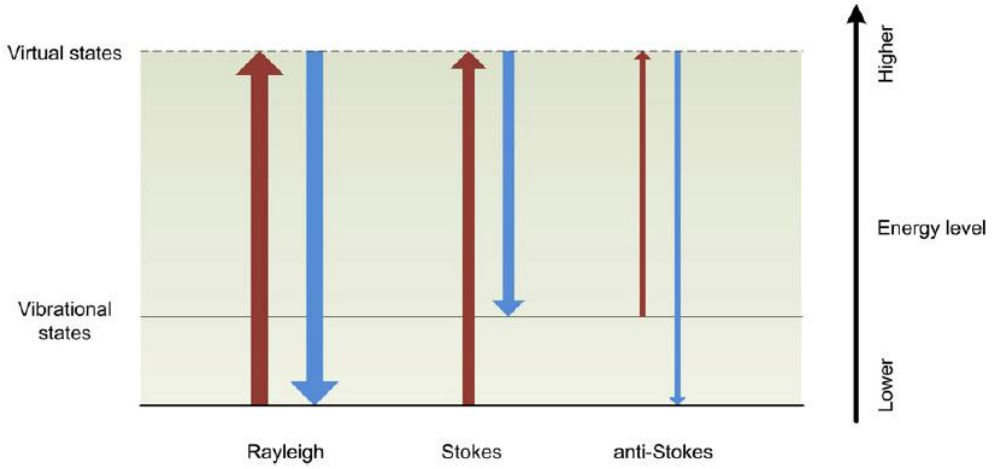
Σκέδαση παρουσιάζεται όταν ένα σύστημα (σκεδαστής) απορροφά ένα προσπίπτον φωτόνιο και επανεκπέμπει μέρος της ενέργειας του.[1] Είδη σκέδασης αποτελούν η ελαστική σκέδαση Rayleigh, η ανελαστική σκέδαση Raman, η σκέδαση Mie, η σκέδαση Stokes και Anti-Stokes και η σκέδαση Brillouin.

Η γραμμή Stokes αναφέρεται στην ακτινοβολία συγκεκριμένων μηκών κύματος που παρουσιάζονται στο γραμμικό φάσμα και σχετίζεται με το φθορισμό και τη σκέδαση Raman. Η σκέδαση Stokes λαμβάνει χώρα όταν το μόριο προσλαμβάνει ενέργεια από το προσπίπτον φωτόνιο και μεταβαίνει από μία κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας σε μία διεγερμένη δονητική κατάσταση. Αντίθετα, λόγω προηγούμενης εξωτερικής διέγερσης, το μόριο μπορεί να βρίσκεται ήδη σε διεγερμένη δονητική κατάσταση πριν την αλληλεπίδραση με το προσπίπτον φωτόνιο. Σε αυτή την περίπτωση, μπορεί να προκύψει η σκέδαση Anti-Stokes, καθώς το μόριο

απελευθερώνει ενέργεια από αλληλεπίδραση με προσπίπτον φωτόνιο και μεταβαίνει έτσι σε στάθμη χαμηλότερης ενέργειας. Τα σκεδαζόμενα φωτόνια σε μια διαδικασία Anti-Stokes είναι μεγαλύτερης ενέργειας από τα προσπίπτοντα φωτόνια.

Το φαινόμενο σκέδασης Raman είχε αρχικά προβλεφθεί θεωρητικά από τον A.G. Smekal (1923) και από τους Kramers και Heisenberg (1925). Την ονομασία του όμως την οφείλει στον Ινδό φυσικό Sir C.V. Raman, ο οποίος στα πλαίσια συστηματικών ερευνών του σχετικά με τη μοριακή σκέδαση φωτός, το απέδειξε πειραματικά (1928). Για αυτή τη μελέτη τιμήθηκε με το βραβείο Nobel Φυσικής (1930).

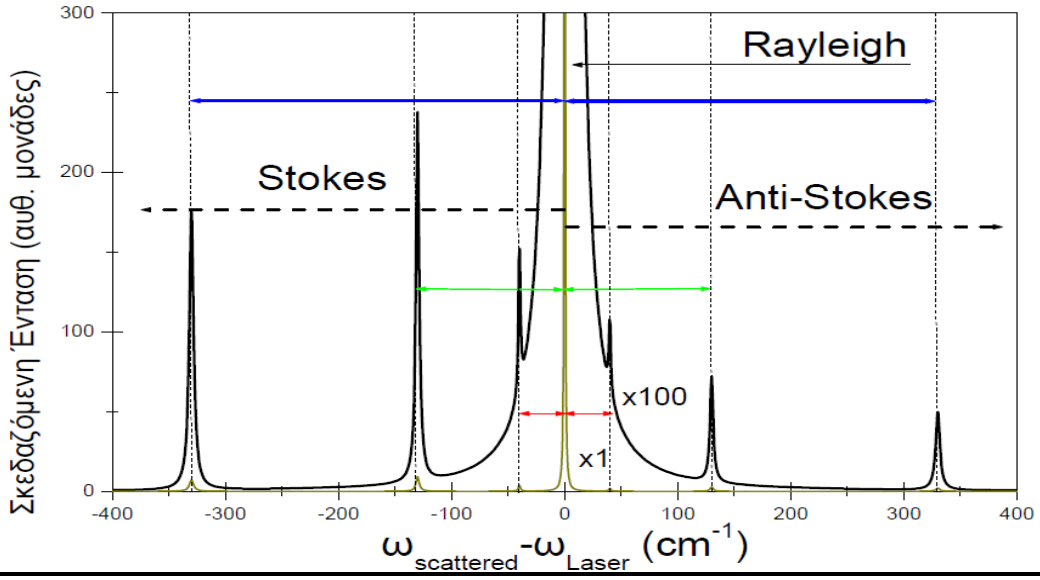
Το φαινόμενο σκέδασης Raman περιγράφεται ως εξής: Όταν κάποιο υλικό σύστημα (στερεό, υγρό, αέριο, άμορφο ή κρυσταλλικό), ακτινοβολείται με μονοχρωματική ακτινοβολία , τότε η διάχυτη ακτινοβολία, που σκεδάζεται περιέχει νέες φασματικές περιοχές.[2] Οι νέες αυτές συχνότητες σκέδασης, που ονομάζονται «συχνότητες Raman», είναι χαρακτηριστικές κάθε μορίου και αποτελούν «δακτυλικό αποτύπωμα» του.



Εικ.1 Ενεργειακό διάγραμμα για σκέδαση Rayleigh και Raman. Το πάχος των βελών δείχνουν τη σχετική ένταση για τις τρεις διαδικασίες.[3]

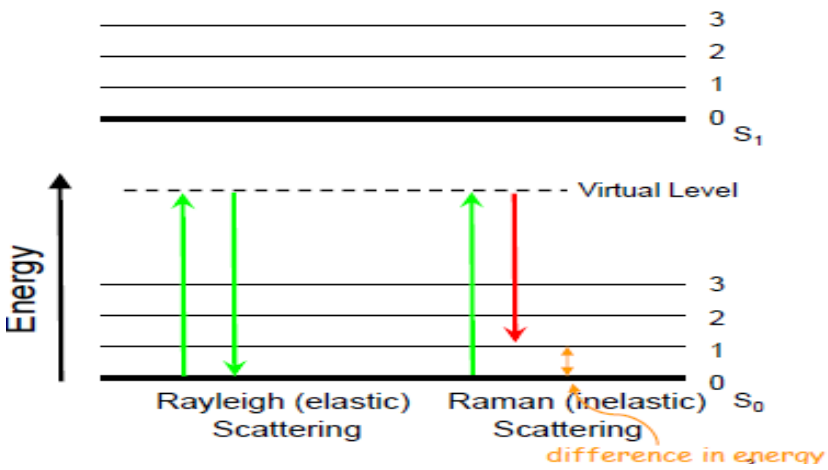
Ως «φάσμα» ορίζεται το οπτικό φαινόμενο που προκύπτει κατά την αποσύνθεση ή την ανάλυση μιας φωτεινής δέσμης στα επιμέρους συστατικά μήκη κύματος αυτής, δηλαδή του φωτός. Ως φάσμα εκπομπής ορίζεται το διάγραμμα που στον y άξονα παραθέτει την ένταση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και στον χ παραθέτει είτε τη συχνότητα είτε το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, ενώ αντίστοιχα, το φάσμα απορρόφησης διαθέτοντας τον ίδιο άξονα χ, διαθέτει στον άξονα y την ενέργεια

απορρόφησης. Ένα τυπικό φάσμα Raman, όπου απεικονίζεται η σκεδαζόμενη ακτινοβολία σε συνάρτηση με τη συχνότητα έχει την παρακάτω μορφή:



Εικ.2: Τυπικό φάσμα σκέδασης Raman, όπου διακρίνονται οι κορυφές ελαστικής σκέδασης Rayleigh και μη ελαστικής σκέδασης Stokes και Anti-Stokes

Παρατηρούμε πως οι πλευρικές ζώνες σκέδασης, Stokes ($\omega_{scattered}-\omega_{laser} < 0$) και Anti-Stokes ($\omega_{scattered}-\omega_{laser} > 0$) είναι ασθενέστερες και εμφανίζονται σε νέες συχνότητες.(Εικ. 2) Η εμφάνιση αυτών των ζωνών είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης της εισερχόμενης μονοχρωματικής ακτινοβολίας με τις διεγέρσεις του υλικού.



Εικ.3 Διάγραμμα σκέδασης Rayleigh και Raman[4]

Εφόσον αναλυθεί η σκεδαζόμενη συχνότητα ή ισοδύναμα το μήκος κύματος της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, παρατηρείται η συνήθης σκέδαση Rayleigh του

φαινομένου, αλλά και ένα πολύ μικρό ποσοστό της ακτινοβολίας, περίπου $1x10^{-7}$, που σκεδάζεται σε διαφορετικά μήκη κύματος. Αυτό το μικρό ποσοστό είναι που αποτελεί τη σκεδαζόμενη ακτινοβολία Raman. Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, στην περίπτωση της ανελαστικής σκέδασης, η επιστροφή του φωτονίου που διεγέρθηκε, δεν έχει ως τελική στάθμη την αρχική του. Συνεπώς, έχουμε μια διαφορά στην ενέργεια, πράγμα που όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί και τον ορισμό της σκέδασης Raman. Η σκέδαση Raman μπορεί να περιγραφεί σαν αποτέλεσμα μεταφοράς του σκεδαζόμενου φωτονίου σε μια «εικονική ενεργειακά στοιβάδα» και την επιστροφή του σε μια στοιβάδα υψηλότερης ή χαμηλότερης ενέργειας, σε σχέση με την αρχική ενέργεια πριν την αλληλεπίδραση, εκπέμποντας τελικά ένα φωτόνιο.

1.2 Ιστορική αναδρομή

Χρονολογικά, παρατηρήθηκε μία σταδιακή εξέλιξη της φασματοσκοπίας που κατέληξε στη φασματοσκοπία Raman που χρησιμοποιείται για ποικίλες εφαρμογές στη σημερινή επιστημονική κοινότητα.

Την περίοδο 1928-1960, υπήρχε μικρής έκτασης πειραματική πρόοδος, κυρίως λόγω των πρώιμων φωτεινών, όπως ήταν οι λάμπες υδραργύρου, ηλίου, βισμουθίου, μολύβδου και ψευδαργύρου, οι οποίες δεν ήταν επαρκείς λόγω χαμηλής έντασης φωτός. [5]

Από το 1960 και έπειτα, με την εφεύρεση του laser, διευρύνεται το εύρος συχνοτήτων και μηκών κύματος που μπορούν να ακτινοβολήσουν το δείγμα, και συνεπώς από εκείνη τη στιγμή και μετά παρατηρούμε επέκταση του πεδίου πειραματικών εφαρμογών της φασματοσκοπίας. Τα lasers Ar^{+}(351,1-514,5nm) και Kr^{+}(337,4-676,4nm) εμφανίστηκαν αρχικά, και αρκετά αργότερα χρησιμοποιήθηκαν για φασματοσκοπία Raman και το Nd-YAG laser (1064nm) .

Βελτιώσεις παρουσιάστηκαν και στα οπτικά συστήματα της φασματοσκοπίας. Στις αρχές του 1960 ανακαλύφθηκε ότι ο διπλός μονοχρωμάτορας απομακρύνει το εκτρεπόμενο φως πιο αποτελεσματικά από το μονό. Αργότερα, ένας τριπλός μονοχρωμάτορας χρησιμοποιήθηκε ακόμα πιο αποτελεσματικά.

Μεταξύ των δεκαετιών 1980 και 1990, παρατηρήθηκαν οι πρώτες βιοϊατρικές εφαρμογές και η έναρξη της χρήσης προηγμένων φασματογράφων. Από το 2000 και μετά, άρχισαν να εμφανίζονται οι πρώτες εφαρμογές in vivo, δηλαδή εφαρμογές σε

ζωντανούς οργανισμούς. Παράλληλα, για να επιτευχθεί αυτό θα πρέπει να έχει υπάρξει και η κατασκευή και χρήση συσκευών και οργάνων όπως οι καθετήρες οπτικών ινών.

1.3 Μακροσκοπική ερμηνεία φαινομένου Raman και κλασσική προσέγγιση

Οι βασικές αρχές στις οποίες βασίζεται η κλασσική ερμηνεία του φαινομένου Raman, αρχικά συνοψίζονται στα εξής:[6]

1)Το προσπίπτον φως πολώνει τα μόρια του μέσου με το οποίο αλληλεπιδρά επάγοντας κατά τον τρόπο αυτό ταλαντούμενα ηλεκτρικά δίπολα. Σύμφωνα με την κλασσική ηλεκτροδυναμική θεωρία, επιταχυνόμενα φορτία έχουν την δυνατότητα να ακτινοβολούν. Η δευτερογενής αυτή ακτινοβολία των διπόλων είναι η σκέδαση.

2)Η σκέδαση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας προέρχεται από την αλληλεπίδραση των φωτονίων με το ηλεκτρονιακό νέφος. Με άλλα λόγια το φως σκεδάζεται από τα ηλεκτρόνια του μορίου και όχι από τους πυρήνες.

3)Η σκέδαση Raman αποδίδεται στην σύζευξη των κινήσεων των ηλεκτρονίων και των πυρήνων. Η διαμόρφωση των θέσεων των πυρήνων καθορίζει το ενδομοριακό πεδίο το οποίο «καταλαβαίνουν» τα ηλεκτρόνια. Η παραμορφωσιμότητα του ηλεκτρονιακού νέφους από το προσπίπτον ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την στιγμιαία διαμόρφωση των πυρηνικών συντεταγμένων. Έτσι, καθώς οι πυρήνες δονούνται γύρω από τις θέσεις ισορροπίας τους, η παραμορφωσιμότητα των ηλεκτρονιακών νεφών μεταβάλλεται με την συχνότητα δόνησης των πυρήνων. Επιπλέον, η ταλάντωση του ηλεκτρονιακού νέφους με την σειρά της επηρεάζει την δόνηση των πυρήνων του μορίου.

Κάθε υλικό που βρίσκεται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου Ε, αναπτύσσει μια επαγόμενη πόλωση, που είναι ανάλογη του Ε:

$\vec{P} = \tilde{\alpha} \cdot \vec{E}$ (1.2) όπου $\tilde{\alpha}$ η σταθερά της πολωσιμότητας.

Η συμμετρία του μέσου, η γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας , καθώς και το επίπεδο πόλωσής της θα καθορίσει αν θα υπάρξει μεταβολή της πόλωσης.

Για εναλλασσόμενο μονοχρωματικό ηλεκτρομαγνητικό κύμα, το ηλεκτρικό πεδίο γίνεται:

$\vec{E} = \overrightarrow{E_0} sin(\omega_{i0} \cdot t)$ (1.3)

Και συνεπώς η πόλωση γίνεται :

$\vec{P} = \alpha \overrightarrow{E_0} sin(\omega_{i0} \cdot t)$ (1.4)

Όταν το υλικό εκτελεί και μια εσωτερική κίνηση, η πολωσιμότητα γίνεται :

$\tilde{\alpha} = \tilde{\alpha}_0 + \tilde{\beta} \sin(\omega_m \cdot t)$ (1.5)

Όπου $\tilde{\beta}$ το πλάτος της μεταβολής , $\tilde{\alpha}_0$ η πολωσιμότητα για την κατάσταση ισορροπίας και ω_{i0} η συχνότητα για τον κανονικό τρόπο ταλάντωσης.

Στην κλασσική προσέγγιση του φαινομένου, η πολωσιμότητα είναι μια φαινομενολογική παράμετρος. Αν υποθέσουμε ότι η πολωσιμότητα a εξαρτάται από την απόσταση μεταξύ των πυρήνων των ατόμων για κάθε χρονική τιμή και q_i μία δονητική συντεταγμένη που περιγράφει τη δόνηση ενός μορίου, τότε μπορούμε να θεωρήσουμε ότι ισχύει : $a = q_i$

Αντικαθιστώντας την (1.5) στην (1.4) και αναπτύσσοντας το γινόμενο των τριγωνομετρικών συναρτήσεων σε άθροισμα, προκύπτει:

$$\vec{P} = \alpha \overrightarrow{E_0} sin(\omega_{i0} \cdot t) + \frac{\tilde{\beta}\, \overrightarrow{E_0}}{2} [\cos(\omega_{i0} - \omega_m)\, t - \cos(\omega_{i0} + \omega_m)\, t] \quad (1.6)$$

Αυτό το νέο Η/Μ κύμα περιέχει εκτός από την ω_i της ελαστικής σκέδασης Rayleigh και τις νέες συχνότητες $\omega_i \pm \omega_{i0}$, που αντιστοιχούν στις πλευρικές ζώνες Anti-Stokes και Stokes της μη ελαστικής σκέδασης, αντίστοιχα.Οι πλευρικές ζώνες εξαρτώνται από την τιμή του $\tilde{\beta}$ και παύουν να υπάρχουν για β=0.

Θεωρώντας ότι η ποσότητα q_i είναι πολύ μικρή, μπορούμε να αναπτύξουμε την πολωσιμότητα σε μία σειρά δυνάμεων γύρω από το σημείο ισορροπίας:

$a(q_i) = a_0 + \left(\frac{\partial a}{\partial q_i}\right) q_i + \text{όροι ανώτερης τάξης}$ (1.7)

Αν η πολωσιμότητα στη θέση ισορροπίας είναι α_0 και $(\frac{\partial \alpha}{\partial q_i})_0$ είναι ο ρυθμός μεταβολής της πολωσιμότητας σε σχέση με τη μεταβολή της μεταβλητής q_i.

Θεωρώντας ότι το μόριο δονείται με συχνότητα ω_0, μπορούμε να εξάγουμε την παρακάτω σχέση:

$$q_i = q_{i0}\cos(\omega_{i0} \cdot t) \quad (1.8)$$

Συγκρίνουμε την (14) και την (16) και λαμβάνουμε

$$\beta = [\frac{\partial \tilde{\alpha}}{\partial q_i}\Big|_{q_i=0} q_{i0}] \qquad (1.9)$$

Στη εξίσωση (1.6) διακρίνουμε τρεις όρους. Ο πρώτος όρος αναπαριστά την ελαστική σκέδαση Rayleigh, όπου έχουμε συχνότητα εκπομπής ίση με τη συχνότητα πρόσπτωσης, ενώ ο δεύτερος και τρίτος όρος αναπαριστούν τις σκεδάσεις Stokes και Anti-Stokes ,αντίστοιχα, με συχνότητες εκπομπής $\omega_{i0} - \omega_m$ και $\omega_{i0} + \omega_m$.

Συνοψίζοντας, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι ένας κανονικός τρόπος ταλάντωσης με κανονική συντεταγμένη q_iκαι συχνότητα ω_{i0} παρουσιάζει στο φάσμα Raman πλευρικές ζώνες $\boldsymbol{\omega_m \pm \omega_{i0}}$ μόνο όταν η παράγωγος της πολωσιμότητας ως προς την κανονική συνταταγμένη (q_i) είναι μη μηδενική γύρω από το σημείο ισορροπίας

$$\frac{\partial \tilde{\alpha}}{\partial q_i}\Big|_{q_i=0} \neq 0 \qquad (1.10)$$

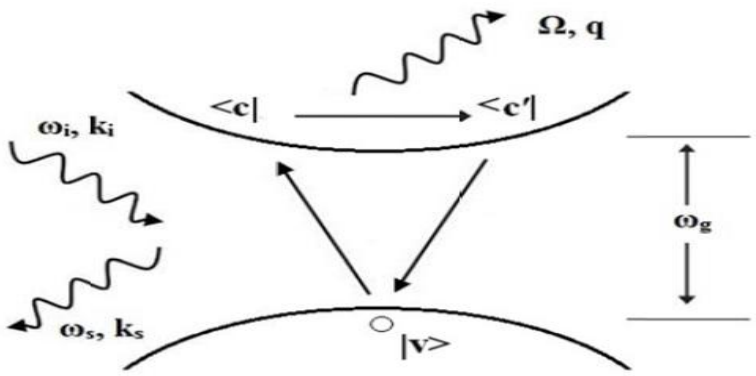
Καθώς για

$$\frac{\partial \tilde{\alpha}}{\partial q_i}\Big|_{q_i=0} = 0 \qquad (1.11)$$

Υπερτερεί μόνο ο όρος ελαστικής σκέδασης.

1.4 Κβαντική προσέγγιση φαινομένου Raman

Όπως είδαμε στην προηγούμενη παράγραφο, η κλασσική περιγραφή μας επιτρέπει την ποιοτική κατανόηση του φαινομένου Raman, ωστόσο ο μηχανισμός του αναδεικνύεται πλήρως εάν μελετηθεί το φαινόμενο κβαντομηχανικά. Στη μικροσκοπική θεώρηση η σκέδαση Raman πρώτης τάξης περιγράφεται ως μια διαδικασία όπου το φως αλληλεπιδρά έμμεσα με τα ηλεκτρόνια σθένους του υλικού.[7]



Εικ.4 Μικροσκοπική περιγραφή του φαινομένου της σκέδασης ενός φωτονίου από μία στοιχειώδη διέγερση (φωνόνιο) ενός κρυσταλλικού υλικού

Μία τέτοια διαδικασία περιγράφεται από μία διαδικασία όπως η παρακάτω:

1)Φωτόνιο ενέργειας $\hbar\omega_i$ και ορμής $\hbar k_i$ προσπίπτει στο υλικό και μέσω αλληλεπίδρασης φωτονίου- ηλεκτρονίου, διεγείρει ένα ηλεκτρόνιο από μια κατάσταση $|v\rangle$ της ζώνης σθένους σε μια κατάσταση $|c\rangle$ της ζώνης αγωγιμότητας, η οποία μπορεί να είναι πραγματική (χρόνος ζωής 10^{-8}sec) ή δυνητική (χρόνος ζωής

10^{-14}sec).

2)Το ηλεκτρόνιο στη ζώνη αγωγιμότητας αλληλεπιδρώντας με το πλέγμα σκεδάζεται σε μία νέα κατάσταση $|c'\rangle$ εκπέμποντας ένα φωνόνιο Ω,q.

3)Το ηλεκτρόνιο επανασυζεύγνυται με την οπή στην κατάσταση της ζώνης σθένους εκπέμποντας φωτόνιο ω_s, k_s.

Κβαντομηχανικά, η διαδικασία περιγράφεται [7]

$$H_R + H + H_{ER} \quad (1.12)$$

όπου H_R η Χαμιλτονιανή του πεδίου της προσπίπτουσας και της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, H η ολική Χαμιλτονιανή του σκεδάζοντος μέσου και H_{ER} η Χαμιλτονιανή σύζευξης της ακτινοβολίας με τα ηλεκτρόνια του μέσου. Η Χαμιλτονιανή του μέσου είναι το άθροισμα της ολικής των διαφόρων διεγέρσεων της H_0 και της ολικής Χαμιλτονιανής των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διεγέρσεων.

$$H = H_0 + H_1 \quad (1.13)$$

όπου η H_1 ισούται με την H_{ep}, δηλαδή της αλληλεπίδρασης ηλεκτρονίου-φωνονίου.

Κάθε διαδικασία σκέδασης αντιστοιχεί σε μία μετάπτωση από μια αρχική κατάσταση $|i\rangle$ σε μια τελική $|f\rangle$, που θα είναι ιδιοκαταστάσεις της H_0:

$$H_0|i\rangle = \hbar\omega_i|i\rangle \quad (1.14)$$

και

$$H_0|f\rangle = \hbar\omega_i|f\rangle \quad (1.15)$$

Επίσης, το πεδίο ακτινοβολίας θα υπόκειται σε μια μετάπτωση από μια αρχική κατάσταση με m_I προσπίπτοντα φωτόνια και m_s σκεδαζόμενα φωτόνια σε μια τελική κατάσταση με $(m_I - 1)$ και $(m_S + 1)$ φωτόνια.

$$H_R\left|m_{I,}m_S\right\rangle = (m_I\hbar\omega_I + m_S\hbar\omega_S)\left|m_{I,}m_S\right\rangle \quad (1.16)$$

και

$$H_R|m_I - 1, m_S + 1\rangle = [(m_I - 1)\hbar\omega_I + (m_S + 1)\hbar\omega_S]|m_{I-1}, m_S + 1\rangle \quad (1.17)$$

Έτσι, το σκεδάζον μέσον αυξάνει την ενέργειά του κατά $\hbar\omega$ με $\omega = \omega_f - \omega_i$, όπου ο ρυθμός απώλειας ενέργειας από την προσπίπτουσα δέσμη κατά τη σκέδαση θα είναι $(\frac{\hbar\omega_i}{\tau})$, και $\frac{1}{\tau}$ ο ρυθμός μεταπτώσεων αρχικής και τελικής κατάστασης.

Στη συνέχεια εκφράζουμε την πόλωση συναρτήσει της ηλεκτρικής επιδεκτικότητας $\tilde{\chi}$ με μορφή

$$\vec{P} = \varepsilon_0\left(\chi_0 + \frac{\partial\tilde{\chi}}{\partial q}q\right)\vec{E} \quad (1.19)$$ ως προς κάποια εσωτερική διέγερση

Η Χαμιλτονιανή λόγω πόλωσης γράφεται

$$H = -\int_v \vec{p}\cdot\vec{E}d^3r \quad (1.20)$$

Από τις (1.19) και (1.20) λαμβάνουμε την Χαμιλτονιανή για τη σκέδαση Raman

$$H_{Raman} = -\int_v \varepsilon_0\left(\frac{\partial\tilde{\chi}}{\partial q}q\right)\vec{E}\cdot\vec{E}d^3r = \varepsilon_0(\frac{\partial\tilde{\chi}}{\partial q})\int_v Q\cdot\vec{E}\cdot\vec{E}d^3r \quad (1.21)$$

1.5 Κανόνες επιλογής

Για να αντιληφθούμε εάν μια δόνηση είναι ενεργή κατά Raman ή στο IR, θα πρέπει οι κανόνες επιλογής να έχουν εφαρμογή σε κάθε κανονική δόνηση.

Μια δόνηση είναι ενεργή στο IR όταν η διπολική ροπή αλλάζει κατά τη δόνηση, ενώ είναι ενεργή κατά Raman όταν η πόλωση μεταβάλλεται κατά τη δόνηση. Τα επαγόμενα δίπολα που είναι υπεύθυνα για τη σκέδαση Raman και συνδέονται με τη συντεταγμένη q, θα είναι μη μηδενικά εάν έστω και μία συνιστώσα της παραγώγου του τανυστή της επιδεκτικότητας $(\chi_{ij}^{'})_k$ δεν είναι μηδέν, όπου

$$(\chi_{ij}^{'})_k = \left(\frac{\partial \chi_{ij}}{\partial Q_m}\right)_0 \quad (1.22)$$

Έτσι, η προϋπόθεση για να είναι ενεργός κατά Raman ένας τρόπος δόνησης, θα πρέπει η παράγωγος τουλάχιστον μίας συνιστώσας της επιδεκτικότητας ως προς την κανονική συντεταγμένη της δόνησης να είναι μη μηδενική.

1.6 Διάταξη

Η διάταξη φασματοσκοπίας Raman που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη είναι η διάταξη micro-Raman του τμήματος Φυσικής του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και αποτελείται από πέντε βασικά μέρη:

1)Την πηγή διέγερσης της ακτινοβολίας, laser Ar^+,με μήκος κύματος λ=514,53nm

2)Το σύστημα φωτισμού του δείγματος και συλλογής του σκεδαζόμενου φωτός

3)Η βάση για να τοποθετείται το δείγμα

4)Ο μονοχρωμάτορας

5)Το σύστημα ανίχνευσης, το οποίο αποτελείται από έναν ανιχνευτή, έναν μετασχηματιστή και μια συσκευή εξόδου σήματος

6)Ο ηλεκτρονικός υπολογιστής, ο οποίος ελέγχει την όλη διάταξη και συλλέγει τα δεδομένα για να συνθέσει τελικά, με ειδικό υπολογιστικό πρόγραμμα, το τελικό αποτέλεσμα, δηλαδή το φάσμα.

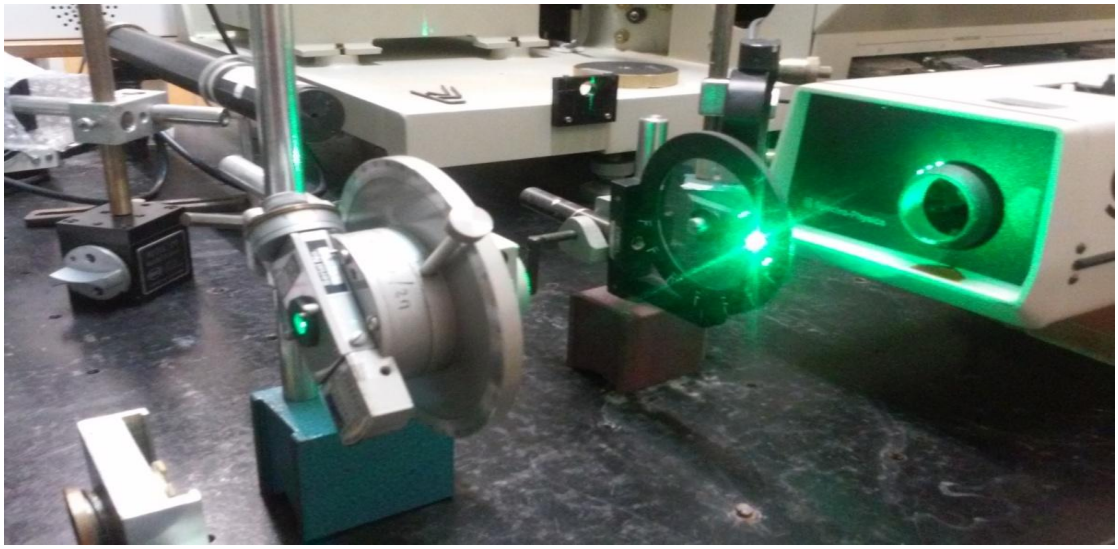
Η διάταξη απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα:

Εικ.5 Διάταξη Φασματοσκοπίας Raman

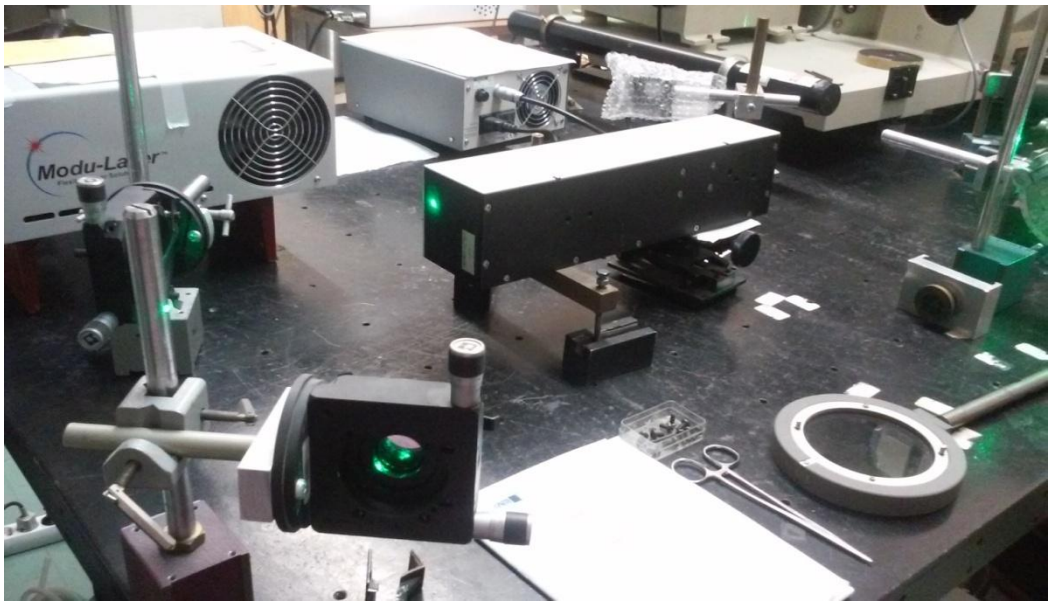
Η λειτουργία της διάταξης έχει ως εξής:

Μία δέσμη laser παράγεται από τη συσκευή laser Ar^+, εταιρείας "Spectra-Physics, Stabilite 2017", και περνάει μέσα από έναν πολωτή. Μέσω ενός συστήματος κατόπτρων, η δέσμη ευθυγραμμίζεται και κατευθύνεται μέσα στον μονοχρωμάτορα, στο φίλτρο δηλαδή που θα αποκόψει τις γραμμές πλάσματος και θα μας απαλλάξει από τις παρασιτικές συνιστώσες. Ο μονοχρωμάτορας της διάταξής μας είναι ένας τριπλός μονοχρωμάτορας Jobin Yvon T64000. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια οπτικών στοιχείων, η δέσμη οδηγείται στο συνεστιακό μικροσκόπιο όπου και ακτινοβολεί το δείγμα. Μέσω ενός διαχωριστή δέσμης, η σκεδαζόμενη ακτινοβολία οδηγείται στον φασματογράφο όπου αναλύεται και στη συνέχεια ανιχνεύεται με την CCD κάμερα. Ο φασματογράφος που χρησιμοποιήθηκε στη διάταξή μας είναι T64000.Το οπτικό μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε επιτυγχάνει μέγιστη μεγέθυνση 100x, με τον αντίστοιχο φακό. Στο πείραμά μας χρησιμοποιήσαμε κυρίως φακούς 100x και 40x, οι οποίοι μας δίνουν διάμετρο δέσμης 1μm και 2,5μm, αντίστοιχα. Τέλος, όσον αφορά την κάμερα συλλογής CCD, θα πρέπει να αναφερθεί ότι παράγει φωτοηλεκτρόνια-παράσιτα, ο ρυθμός των οποίων μειώνεται όσο μειώνεται και η θερμοκρασία της συσκευής. Επίσης, χαρακτηρίζεται και από read noise, δηλαδή από ψηφιακό θόρυβο που εισάγεται κατά τη διαδικασία ανάγνωσης των τιμών των εικονοστοιχείων, όπου

όμως στην δική μας περίπτωση είναι αμελητέας ποσότητας θόρυβος. Για τους δύο προαναφερθέντες ανεπιθύμητους θορύβους, η κάμερα υποστηρίζεται από ένα σύστημα ψύξης με υγρό άζωτο, το οποίο διατηρεί τη συσκευή σε μια σταθερή θερμοκρασία -133°C. [8]Το σύστημα συλλογής αποτελείται από ένα σύνολο αχρωματκών φακών, έναν συγκεντρωτικό και έναν εστίασης. Στις μετρήσεις μας, η ισχύς της δέσμης, η οποία ρυθμιζόταν με τη βοήθεια του φίλτρου-πολωτή, κυμάνθηκε από 0,5mW μέχρι 4,5mW.



Εικ.6 Ο πολωτής της διάταξης



Εικ.7 Ο μονοχρωμάτορας της διάταξης

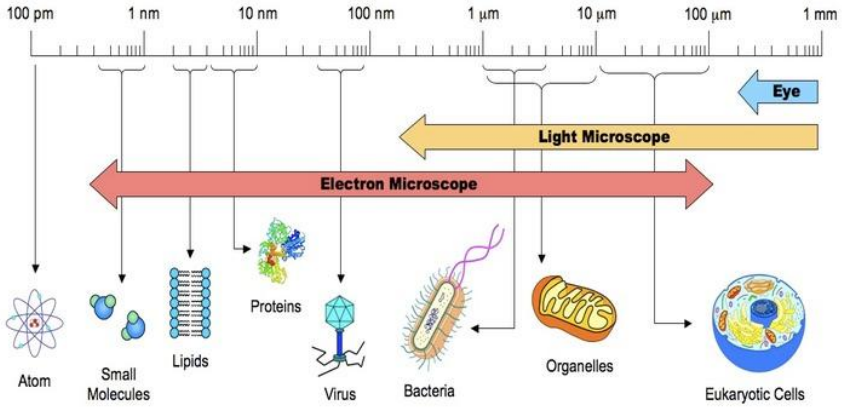
Εικ.7 Η CCD κάμερα και το σύστημα ψύξης με άζωτο

Εικ.8 Το συνεστιακό μικροσκόπιο

Ένα άλλο μέγεθος το οποίο μας ενδιαφέρει ιδιαιτέρως για τη μελέτη μας είναι το βάθος διείσδυσης ή αλλιώς penetration depth, το οποίο και εξαρτάται από το μήκος κύματος της δέσμης του laser. Στην περίπτωση του δικού μας laser με μήκος κύματος λ=514,53nm, το βάθος διείσδυσης ισούται με 30μm.[9] Αυτή η παρατήρηση θα μας επιτρέψει να έχουμε μια ιδέα για το τι μεγέθη των δειγμάτων μελετάμε. Γνωρίζουμε ότι κατά μέσο όρο η διάμετρος ενός ευκαρυωτικού κυττάρου κυμαίνεται στα 10 μm με 100μm, με το ανθρώπινο να φτάνει περίπου μέχρι 50μm.[10] Για παράδειγμα ένα ερυθροκύτταρο είναι 7,7μm, ενώ ένα κύτταρο δέρματος 15,5μm.Έχει παρατηρηθεί ότι το μέγεθος των κυττάρων μεταξύ των ειδών των θηλαστικών δεν παρουσιάζει μεγάλες διαφορές, και ένα παράδειγμα αποτελεί το ερυθροκύτταρο του ποντικού σε σύγκριση με το προαναφερθέν ανθρώπινο, το οποίο παρουσιάζει διάμετρο 6μm.[11]Αν θέλουμε να μιλήσουμε και για ύψος του κυττάρου, είναι της ίδιας τάξης

με τη διάμετρο. Αν μελετήσουμε τη μικρότερη πιθανή διάμετρο του κυττάρου στα 10μm, τότε με διάμετρο δέσμης 2,5μm, τότε σίγουρα η περιοχή που μελετάμε θα είναι σίγουρα περιοχή ενός μόλις κυττάρου. Παρόμοια λαμβάνοντας υπόψη το ύψος του κυττάρου που ελάχιστα θα είναι 10μm, η δέσμη θα μπορεί με βάθος διείσδυσης 30μm να φτάσει να ακτινοβολήσει ένα κύτταρο και ίσως οριακά και ένα δεύτερο. Η χημική σύσταση ενός τυπικού κυττάρου είναι ο άνθρακας (C),το Υδρογόνο (H), το Οξυγόνο (O), το Άζωτο (N) και σε μεγάλο βαθμό το νερό (H_2O).

Οι διαστάσεις του κυττάρου φαίνονται και στην παρακάτω εικόνα:



Εικ.9 Σύγκριση μεγεθών σε κλίμακα [12]

1.7 Εφαρμογές

Η φασματοσκοπία Raman χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλούς τομείς της επιστημονικής έρευνας, καθώς επικεντρώνεται στην ανάλυση της μοριακής δομής των στερεών, των υγρών και των αερίων. [13]

-Φαρμακευτική και κοσμητολογία όπως: έλεγχος κρυσταλλικότητας, σύστασης, καθαρότητας ουσιών

-Γεωλογία και ορυκτολογία όπως: μελέτη μεταβατικών φάσεων πετρωμάτων, μελέτη συμπεριφοράς πετρωμάτων σε δύσκολες καταστάσεις

-Ημιαγωγοί όπως: χαρακτηρισμός υλικών, έλεγχος προσμίξεων

-Επιστήμες υγείας όπως: βιοσυμβατότητα, ανάλυση DNA/RNA, αλληλεπίδραση κυττάρων – φαρμάκου, φωτοδυναμική θεραπεία, μεταβολικές διαδικασίες, διαγνωστική μέθοδος ασθενειών, χαρακτηρισμός βιομορίων.

Κεφάλαιο 2: Φασματοσκοπικές τεχνικές διάγνωσης καρκίνου

2.1 Η ασθένεια του καρκίνου

Ο καρκίνος αποτελεί μία ασθένεια στην οποία οφείλεται μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας παγκοσμίως, λόγω των πολλών διαφορετικών τύπων εμφάνισης, αλλά και του ραγδαίου ρυθμού ανάπτυξής του. Μια αποτελεσματική θεραπεία της ασθένειας αυτής, έγκειται στην ακριβή και έγκαιρη διάγνωση σε ένα πρώιμο στάδιο.

Ο όρος «καρκίνος του μαστού» αναφέρεται στην ανάπτυξη κακοήθους όγκου στην ευρύτερη περιοχή του μαστού. Οφείλεται στον αφύσικο και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων στους ιστούς του μαστού, προκαλώντας έτσι, τον σχηματισμό κακοήθους όγκου. Τα παθολογικά αυτά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να επεκταθούν σε γειτονικούς ιστούς και συνεπώς να έχουμε και πιθανή μετάσταση όγκου.

Στις Η.Π.Α, τα κρούσματα ξεπερνούν τα 200.000 ετησίως, ενώ στην Ελλάδα τα κρούσματα καρκίνου του μαστού είναι περίπου 4.500 ετησίως, με μια σημαντική αύξηση των κρουσμάτων από το 1970 και μετά, η οποία εν μέρει μπορεί να αιτιολογηθεί από την αστικοποίηση του τρόπου ζωής. Είναι πολύ σημαντικό να τονιστεί ότι εάν η ασθένεια αυτή διαγνωστεί και συνεπώς θεραπευτεί σε πρώιμο στάδιο, πάνω από 95% των περιστατικών είναι δυνατό να αντιμετωπιστούν.

2.2 Συμβατικές και εναλλακτικές διαγνωστικές μέθοδοι

Ο πιο γνωστός και πλέον διαδεδομένος τρόπος διάγνωσης του καρκίνου του μαστού είναι η μαστογραφία και η βιοψία. Η μαστογραφία είναι μία μέθοδος η οποία δείχνει μεταβολή στην πυκνότητα του μαστού με τη βοήθεια των ακτίνων χ , για όγκους που δεν μπορούν να ψηλαφιστούν. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή δεν μπορεί να είναι ακριβείας καθότι οι μεταβολές αυτές στην πυκνότητα μπορεί να μην σχετίζονται πάντα με παρουσία κακοήθειας, αλλά με άλλα αίτια. Για αυτό το λόγο, η μαστογραφία θεωρείται απεικονιστική μέθοδος και όχι διαγνωστική. Υπάρχουν, επίσης, και άλλες παρόμοιες μέθοδοι όπως το υπερηχογράφημα, το MRI (Magnetic Resonance imaging) και το PET (Positron Emission Tomography). Το υπερηχογράφημα είναι

μία μέθοδος γρήγορη και χαμηλού κόστους, αλλά με μικρή χωρική ανάλυση. Το MRI είναι μια τεχνική που προσφέρει μια καλή σύγκριση μεταξύ διαφορετικών μαλακών ιστών του σώματος, ωστόσο εμφανίζει μειονεκτήματα όπως η μεγάλη διάρκεια της εξέτασης και το υψηλό κόστος των μηχανημάτων. Επίσης, έχει και παράπλευρες επιπτώσεις στους ασθενείς όπως υπερθερμία και έναν αρνητικό αντίκτυπο στα νεφρά λόγω του γαδολινίου που χρησιμοποιείται για παράγοντας αντίθεσης. Το PET είναι μία συμπληρωματική απεικονιστική μέθοδος, αλλά η ανάλυση της εικόνας είναι μικρή και τυπικά κυμαίνεται μεταξύ 4 mm και 7mm. Όταν υπάρχει υποψία καρκίνου στο μαστό είτε από μαστογραφία, είτε από κάποια άλλη από τις παραπάνω μεθόδους, είτε από κλινική εξέταση, πάντα γίνεται βιοψία στον ασθενή ώστε να υπάρξει πιο σαφής διάγνωση. Όσον αφορά τη βιοψία σε όγκους που έχουν ανιχνευθεί μέσω μαστογραφίας έχει προκύψει ότι ένα ποσοστό της τάξεως του 70-90% των όγκων αυτών είναι καλοήθεις. Επιπλέον, η βιοψία στον μαστό απαιτεί χειρουργική επέμβαση και να ληφθεί ιστός περίπου 1mm πλάτους και κάποιων cm μήκους ώστε να αποτελεί ένα αξιοπρεπές δείγμα που θα είναι δυνατό να μελετηθεί. Η βιοψία, επίσης, είναι μία μέθοδος της οποίας η ανάλυση διακατέχεται από υποκειμενικότητα, καθώς εξαρτάται από την εμπειρία και τη διακριτική ικανότητα του εκάστοτε παθολόγου. Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η όλη διαδικασία διάγνωσης από την αρχή μέχρι το τέλος μπορεί να διαρκέσει μέχρι και μήνες και υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να χρειαστούν περισσότερες από μία βιοψίες.

Η ανάγκη για αποφυγή της βιοψίας κυρίως σε καλοήθεις όγκους, η μεγάλη χρονική καθυστέρηση, το τραύμα του ασθενούς που υπόκειται σε χειρουργική επέμβαση με τη βιοψία, αλλά και το μεγάλο κόστος που όλο αυτό συνεπάγεται, οδήγησε την έρευνα στην εύρεση νέων διαγνωστικών μεθόδων καθώς και της εξέλιξης μεθόδων φασματοσκοπίας για αυτόν τον σκοπό. Οι νέες αυτές τεχνικές χρησιμοποιούν πηγή φωτός στο ορατό ή το κοντινό υπέρυθρο για να δώσουν χημικές πληροφορίες και είναι λιγότερο επεμβατικές από μεθόδους όπως η βιοψία.

Μία τέτοια μέθοδος είναι η DOT (Diffuse Optical Tomography), η οποία μελετάει τη διάδοση παλμών φωτός διαμορφωμένου πλάτους μέσα από το μαστό. Είναι μία μη επεμβατική μέθοδος και μπορεί να ανιχνεύσει όγκους πολύ βαθιά μέσα στον ιστό. Ωστόσο, μπορεί να ανιχνεύσει μικρό αριθμό χημικών στοιχείων και έχει μικρή διακριτική ικανότητα, το οποίο συνεπάγεται ότι μικροί όγκοι δεν μπορούν να ανιχνευθούν.

Μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για διάγνωση είναι και μέθοδοι οπτικής φασματοσκοπίας. Σε αντίθεση με το DOT, αυτές οι τεχνικές λειτουργούν τοπικά σε όγκο περίπου $1mm^3$. Η διάδοση και η συλλογή του φωτός μπορεί να γίνει με τη βοήθεια οπτικών ινών σε μορφή ενός καθετήρα βιοψίας. Αντίθετα με τη βιοψία, ο καθετήρας μπορεί να δώσει γρήγορα αποτελέσματα και χωρίς να χρειάζεται να γίνει αφαίρεση ιστού, πραγματοποιείται εξέταση in vivo, δηλαδή απευθείας επάνω στον ζωντανό οργανισμό.

Οι οπτικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τεχνικές φθορισμού, ανάκλασης και σκέδασης Raman. Οι τεχνικές φθορισμού χρησιμοποιούνται σε μελέτη στους ιστούς ex vivo δηλαδή έξω από τον οργανισμό, και προσφέρει μεγάλα σήματα. Λόγω, όμως, του μικρού αριθμού παραγόντων φθορισμού μέσα στον ιστό του μαστού είναι περιοριστικός ο παράγοντας για διάγνωση με αυτή την τεχνική. Αρκετά ελπιδοφόρα όχι μόνο στη διάγνωση καρκίνου του μαστού αλλά και άλλων τύπων καρκίνου είναι η τεχνική που βασίζεται σε συνδυασμό φασματοσκοπίας φθορισμού και διάχυτης ανάκλασης.

Υπάρχουν φασματοσκοπικές τεχνικές στις οποίες έχει στραφεί η επιστημονική έρευνα, οι οποίες δείχνουν να είναι αρκετά ελπιδοφόρες.

Μια τέτοια μέθοδος είναι η φασματοσκοπία Terahertz [14].Η περιοχή terahertz βρίσκεται κάπου ενδιάμεσα στην περιοχή των μικροκυμάτων και του υπερύθρου. Η ακτινοβολία terahertz έχει πολύ χαμηλή ενέργεια φωτονίου και έτσι δεν θέτει κίνδυνο ιονισμού για τους βιολογικούς ιστούς και για αυτό το λόγο παρουσιάζει και μεγάλο ενδιαφέρον για ανίχνευση ασθενειών όπως ο καρκίνος μέσω imaging και φασματοσκοπίας. Η παρουσία καρκίνου παρουσιάζει πολλές φορές αυξημένη παροχή αίματος στους ιστούς που νοσούν και προκαλεί και δομικές αλλαγές στους ιστούς αυτούς, τα οποία μπορούν να αποτελέσουν παράγοντα φυσικής αντίθεσης για terahertz imaging του καρκίνου.

Μία άλλη φασματοσκοπική μέθοδος είναι η FTIR (Fourier Transformation Infrared) φασματοσκοπία[15], η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη διαχωριστική γραμμή και σε ασαφείς περιοχές και με αυτό τον τρόπο να ανιχνεύσει την ασθένεια σε αρκετά πρώιμο στάδιο. Λειτουργεί κυρίως σε κύτταρα και τα αποτελέσματά της βασίζονται σε χαρακτηριστικά τους δονητικά φάσματα.

Επίσης, η οπτική φασματοσκοπία (optical spectroscopy) [16] είναι μία τεχνική ανίχνευσης ιστού. Διαφορετικοί τύποι ιστών μπορούν να διαχωριστούν μεταξύ τους βασιζόμενοι σε συγκεκριμένες αλλαγές στο φάσμα φωτός που ανακλάται, οι οποίες αλλαγές είναι αποτέλεσμα των διαφορών σε ένα μοριακό επίπεδο.

Όσον αφορά τη φασματοσκοπία Raman που αποτέλεσε αντικείμενο της μελέτης μας, είναι ένα είδος φασματοσκοπίας που μπορεί να ανιχνεύσει πολλά χημικά στοιχεία στον ιστό και συνεπώς και πολλές χημικές μεταβολές που σχετίζονται με την παρουσία κακοήθους καρκινικού όγκου. Επίσης, αυτή η τεχνική, εν αντιθέσει με το φθορισμό, παρουσιάζει επιτυχία, λόγω της παρουσίας μεγάλου αριθμού ενεργών κατά Raman μορίων μέσα στον ιστό του μαστού, καθώς και του γεγονότος ότι τα φάσματα Raman για αυτά τα στοιχεία είναι έντονα και οριοθετούνται καλώς. Η φασματοσκοπία Raman, όμως, παρόλο που εξάγει μεγάλο αριθμό πληροφοριών, τα σήματά της είναι τάξεις μεγέθους ασθενέστερα από τη φασματοσκοπία φθορισμού, πράγμα το οποίο μπορεί να διορθωθεί με κατάλληλο εξοπλισμό laser και με κατάλληλα μήκη κύματος, που θα αναλύσουμε διεξοδικότερα παρακάτω. Η φασματοσκοπία Raman αποτελεί μία αρκετά αποτελεσματική και έγκαιρη διαγνωστική μέθοδο, καθώς κάθε μόριο χαρακτηρίζεται από δικούς του χαρακτηριστικούς τρόπους δόνησης, πράγμα που μπορεί να αποτελέσει χαρακτηριστικό βιολογικό δείκτη Raman (Raman biomarker). Οι χημικοί δεσμοί μεταξύ των γειτονικών μορίων είναι επίσης, ένας παράγοντας για διαφορετικό τρόπο ταλάντωσης, χαρακτηριστικό για κάθε είδος μορίου. Εφόσον, λοιπόν, η συγκεκριμένη μέθοδος ανιχνεύει και μελετά τρόπους δόνησης των μορίων, μπορεί να βρει άμεση εφαρμογή σε μια διαδικασία διάγνωσης όπως η παραπάνω.

Οι πιο συχνοί δεσμοί που ανιχνεύονται σε βιολογικούς ιστούς είναι απλοί δεσμοί με υδρογόνο (π.χ. H-C), οι οποίοι εμφανίζονται κυρίως στην φασματική περιοχή των 2500-4000cm^{-1}, διπλοί δεσμοί μεταξύ όμοιων ή διαφορετικών ατόμων (π.χ. C=C, C=N), που παρατηρούνται κυρίως στην περιοχή 1500-2000 cm^{-1}, αλλά και πολύπλοκα πρότυπα όπως C-O, C-N, που εμφανίζονται στην περιοχή 600-1500 cm^{-1}. Όσον αφορά τα στοιχεία που ανιχνεύονται πιο συχνά στους βιολογικούς ιστούς, είναι κυρίως βιολογικά μακρομόρια όπως είναι τα νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες και λιπίδια.

Η σκέδαση Raman είναι μια ανελαστική σκέδαση, κατά την οποία τα φωτόνια προσπίπτουν στην επιφάνεια ενός δείγματος, μεταφέροντας ενέργεια από και προς

μοριακές δονητικές καταστάσεις. Είναι μια διαδικασία συναφής με αυτή των δύο φωτονίων, κατά την οποία ένα μόριο απορροφά ένα προσπίπτον φωτόνιο και εκπέμπει ένα φωτόνιο Raman, που συνοδεύεται από την ενέργεια που προκύπτει από τη μετάβαση από τη μία στάθμη στην άλλη. Επειδή οι ενεργειακές στάθμες είναι μοναδικές για κάθε μόριο, η φασματοσκοπία Raman δίνει ακριβείς χημικές πληροφορίες. Επιπλέον, αυτές οι δονήσεις είναι γενικά ευαίσθητες δομικά και γι' αυτό το λόγο ανακλούν σε τυχούσα αλλαγή της δομής, πράγμα το οποίο μπορεί να λειτουργήσει ως οπτικός δείκτης ενός υγιούς ιστού και ενός καρκινικού. Επιπρόσθετα, η φασματοσκοπία Raman εμφανίζει ευαισθησία και στη δομή και στη μετάπτωση φάσης, η οποία αυτή ευαισθησία μπορεί να προσφέρει επαρκείς μορφολογικές πληροφορίες. Επίσης, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι η τεχνική αυτή είναι ιδιαιτέρως ικανή να χρησιμοποιηθεί in vivo, δηλαδή επάνω στον ασθενή, καθώς τα μήκη κύματος που χρησιμοποιούνται είναι ακίνδυνα για τους ιστούς και επιπλέον έχουν αρκετά μεγάλο βάθος διείσδυσης. Επίσης, απαιτείται ελάχιστη ως καθόλου προετοιμασία των προς εξέταση δειγμάτων. Για το μήκος κύματος στο οποίο έγινε η δική μας μελέτη, δηλαδή τα 514,53nm, το βάθος διείσδυσης είναι 30μm.

Είναι γνωστό ότι η παρουσία καρκίνου σε κάποιον ιστό σχετίζεται άμεσα με τη δημιουργία νέων ουσιών ή με την αλλαγή της περιεκτικότητας σε ήδη υπάρχουσες ουσίες στον ιστό αυτό. Αυτές οι ουσίες ονομάζονται καρκινικοί δείκτες. Οι ιδανικοί δείκτες θα πρέπει να μπορούν να μετρηθούν εύκολα και επαναλήψιμα, να μπορούν να παρουσιάζουν τη συσχέτιση με το στάδιο της κακοήθειας και να ανταποκρίνονται στην κλινική θεραπεία.

2.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα φασματοσκοπίας Raman

Η συγκεκριμένη μέθοδος φασματοσκοπίας εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα, τα οποία υπερτερούν και στη φασματοσκοπία IR.

1)Στις δύο αυτές μεθόδους έχουμε διαφορετικούς κανόνες επιλογής. Γενικά, η δόνηση θα είναι ενεργή κατά Raman ,κατά IR, ή και τα δύο. Όταν αναφερόμαστε σε τελείως συμμετρικές δονήσεις ,τότε θα αναφερόμαστε μόνο σε δονήσεις ενεργές κατά Raman.

2)Κάποιες δονήσεις μπορεί να είναι έντονες κατά Raman και παράλληλα ασθενείς στο IR. Ιδιαίτερα έντονες δονήσεις κατά Raman είναι οι ομοιοπολικοί δεσμοί. Παραδείγματα δονήσεων έντονων κατά Raman είναι: C=C, P=S, S-S. Αντίστοιχα, έντονες δονήσεις κατά IR εμφανίζουν οι ιοντικοί δεσμοί, με κάποια παραδείγματα: O-H, N-H.

3)Μετρήσεις αποπόλωσης μας δίνουν πληροφορίες για τη συμμετρία των κανονικών δονήσεων. Τέτοια αποτελέσματα δεν είναι δυνατόν να ληφθούν από φάσματα IR, όπου τα μόρια είναι τυχαία προσανατολισμένα.

4)Με το φαινόμενο συντονισμού Raman (Resonance Raman effect), έχουμε τη δυνατότητα για πολύ συγκεκριμένη επιλογή δονήσεων τις οποίες θα μελετήσουμε, πράγμα το οποίο μας προσφέρει μεγάλο πλεονέκτημα για μεγάλα βιολογικά μόρια.

5)Όταν η διάμετρος της δέσμης laser είναι 1-2mm, τότε δεν χρειαζόμαστε μεγάλη επιφάνεια δείγματος για τη φασματοσκοπία Raman, πράγμα που δεν συμβαίνει για τη φασματοσκοπία IR.

6)Το νερό είναι κακός σκεδαστής του φωτός και συνεπώς όταν έχουμε φασματοσκοπία Raman υδατικού διαλύματος, δεν έχουμε σκέδαση του νερού που μπορεί να αλλοιώνει το αποτέλεσμά μας. Το γεγονός αυτό μας δίνει τη δυνατότητα να μπορούμε να μελετήσουμε φασματοσκοπικά κατά Raman βιολογικά δείγματα που έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό.

7)Η φασματοσκοπία Raman μπορεί να εφαρμοστεί σε περιπτώσεις υγροσκοπικών και σε ευαίσθητα στον αέρα συστατικών, τοποθετώντας το υπό μελέτη δείγμα σε σφραγισμένο γυάλινο σωλήνα. Στη φασματοσκοπία IR, κάτι τέτοιο δεν είναι δυνατό καθότι το γυαλί απορροφά ακτινοβολία στο IR.

8)Στη φασματοσκοπία Raman, το εύρος 50 με 4.000 cm^{-1} μπορεί να καλυφθεί με μια ενιαία εγγραφή. Αντίθετα, για να καλυφθεί η ίδια περιοχή με το IR, θα πρέπει να αλλάζουν τα οπτικά μέρη όπως τα φίλτρα, οι ανιχνευτές και οι διαχωριστές δέσμης.

Ωστόσο, η φασματοσκοπία Raman εμφανίζει και ορισμένα μειονεκτήματα ως τεχνική χαρακτηρισμού, τα οποία αναφέρονται παρακάτω:

1)Για να παρατηρηθεί μια ασθενής σκέδαση Raman, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια πολύ δυνατή πηγή laser, γεγονός το οποίο μπορεί να προκαλέσει τοπική

υπερθέρμανση ή φωτοαποσύνθεση, ειδικά στην Resonance Raman Spectroscopy, όπου η συχνότητα του laser είναι σκόπιμα ρυθμισμένη στο ενεργειακό εύρος απορρόφησης του μορίου.

2)Κάποια συστατικά φθορίζουν όταν ακτινοβοληθούν με τη δέσμη laser.

3)Είναι περισσότερο δύσκολο να διατηρηθεί η περιστροφικότητα και το φάσμα περιστροφής-δόνησης με υψηλή διακριτική ικανότητα στη φασματοσκοπία Raman από ότι στην IR. Αυτό συμβαίνει καθώς τα φάσματα Raman παρατηρούνται στην περιοχή UV-ορατό, όπου είναι δύσκολο να διατηρηθεί η ικανότητα των οπτικών να διαχωρίζουν πολύ κοντινές εικόνες.

4)Η διάταξη της φασματοσκοπίας Raman κοστίζει πολύ περισσότερο από μια συμβατική διάταξη φασματογράφου FT-IR.

2.4 Πλεονεκτήματα φασματοσκοπίας έναντι βιοψίας

Για να προχωρήσουμε στην γενικότερη ανάλυση της πειραματικής διαδικασίας, θα πρέπει πρώτα να κατανοήσουμε για ποιο λόγο θα μας ήταν χρήσιμο να αντικαταστήσουμε μια μέθοδο παγιωμένη για τόσα χρόνια και κοινώς αποδεκτή από την ιατρική κοινότητα για διάγνωση καρκίνου, που είναι η βιοψία, με μία μέθοδο που είναι ιδιαιτέρως καινούργια στο πεδίο των βιοϊατρικών επιστημών, τη φασματοσκοπία. Αρχικά, θα πρέπει να αναφέρουμε ότι η βιοψία από τη φύση της παρουσιάζει έναν αριθμό μειονεκτημάτων και ως προς το διαγνωστικό πόρισμα αλλά και ως προς τη μεταχείριση του ασθενή, τα οποία συνοψίζονται παρακάτω:

1) Η βιοψία για να μας δώσει αποτέλεσμα το οποίο μπορεί να αξιολογηθεί από τον αρμόδιο ιατρό, χρειάζεται ένα χρονικό διάστημα τουλάχιστον 7 ημερών, σε αντίθεση με τη φασματοσκοπία Raman που χρειάζεται 2-3 λεπτά για να ληφθεί το τελικό φάσμα του εξεταζόμενου ιστού.

2) Η οικονομική δαπάνη της μεθόδου είναι επίσης ένα σημαντικό ζήτημα. Στη βιοψία, το κόστος είναι αρκετά πιο μεγάλο, καθώς απαιτείται και ειδική διαδικασία στον ασθενή για αφαίρεση του επιθυμητού ιστού και ιατρική ανάλυση ειδικοτήτων όπως μικροβιολόγου και ογκολόγου. Σε αντίθεση, η φασματοσκοπία χρειάζεται μόνο

την ειδική συσκευή και έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή που θα μας δίνει το φάσμα του ιστού.

3) Ιδιαίτερο πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας είναι ο περιορισμός του τραύματος του ασθενούς. Στη βιοψία, χρειάζεται να αφαιρεθεί μέρος του ιστού που εικάζεται ότι νοσεί, και να εξεταστεί εκτός σώματος. Η φασματοσκοπία, αντιθέτως, λειτουργεί με τη βοήθεια καθετήρων (probes) που εισέρχονται μέσα στο σώμα και κατευθύνονται στον ιστό που μας ενδιαφέρει. Εκεί ακτινοβολείται και μας δίνει το φάσμα απορρόφησης του ιστού. Έτσι, ο ασθενής δεν υπόκειται σε επίπονη διαδικασία.

4) Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η βιοψία σαν μέθοδος διάγνωσης βασιζόμενη σε μορφολογική ανάλυση, θέτει την διακριτική ικανότητα του εκάστοτε ιατρού ως βασικό παράγοντα τελικής εκτίμησης. Σε αντίθεση, η φασματοσκοπία περιορίζει τον ανθρώπινο παράγοντα καθώς είναι μια ιστοχημική ανάλυση.

5)Η φασματοσκοπία, η οποία είναι μη ιονίζουσα μέθοδος, μας παρέχει συνδυασμό βιοχημικής και μορφολογικής διάγνωσης και έτσι δεν απαιτούνται διαφορετικών ειδών εξετάσεις για τον ασθενή.

Σε αυτό το σημείο, όμως, θα πρέπει να διευκρινίσουμε και το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου της φασματοσκοπίας ως διαγνωστικής μεθόδου που είναι το ότι υπάρχουν περιοχές που μπορεί να νοσούν αλλά να μην είναι προσβάσιμες από τους καθετήρες. Δεν πρέπει, βέβαια, να ξεχνάμε και την πιθανή δυσπιστία της ιατρικής κοινότητας αλλά και της κοινότητας των ασθενών σε κάτι τόσο νέο για κάτι τόσο επικίνδυνο όσο η παρουσία καρκίνου.

Κεφάλαιο 3: Πειραματική διαδικασία

3.1 Διαδικασία προετοιμασίας πειράματος

Στην εργασία αυτή, μελετήθηκαν δείγματα ιστού μαστού από ποντίκια που είχαν αναπτύξει ιστοειδικό σποραδικό καρκίνο. Τα ποντίκια αυτά χωρίζονταν σε δύο κατηγορίες. Η μία κατηγορία είναι εκείνη όπου τα ποντίκια είχαν τροποποιηθεί γενετικά με αναπτυγμένο το ογκογονίδιο HER 2 ή αλλιώς ERB B2, ένα γονίδιο το οποίο στον αναπτυγμένο καρκίνο παρουσιάζει νέκρωση. Τα ποντίκια υπερεκφράζουν την μεταλλαγμένη μορφή του υποδοχέα EGF στα κύτταρα του μαστού και ο παράγοντας αυτός ξεκινά να παρουσιάζει ψηλαφητούς όγκους μετά τον τέταρτο μήνα της ζωής του ζώου. Εδώ, θα πρέπει να αναφερθεί ότι το ποντίκι διαθέτει δέκα μαστούς, στους οποίους όταν ξεκινά να ενεργοποιείται ο παράγοντας, ψηλαφητοί όγκοι ξεκινούν να εμφανίζονται και στους δέκα μαστούς χωρίς όμως να ακολουθούν την ίδια εξέλιξη. Συνεπώς, σε ένα χρονικό διάστημα έξι μηνών, έχουμε δέκα δείγματα σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης της ασθένειας.

Η δεύτερη κατηγορία είναι η κατηγορία των ποντικιών που είναι γενετικά τροποποιημένα με το ογκογονίδιο 2C-MYC, η υπερέκφραση του οποίου προκαλεί σχηματισμό όγκου στο μαστό στον πέμπτο μήνα της ζωής του ζώου. Η διαφορά του ογκογονιδίου αυτού από το πρώτο που αναφέρθηκε είναι ότι προκαλεί την ανάπτυξη πιο συμπαγών όγκων με καλύτερη αιμάτωση, χωρίς να παρουσιάζει νέκρωση.

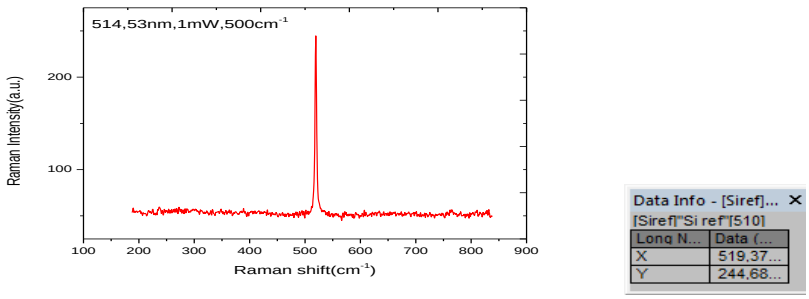
Όσον αφορά, τώρα, την προετοιμασία και λήψη των ιστών για να μελετηθούν στο εργαστήριο της φασματοσκοπίας, είναι η εξής :

Το ποντίκι θυσιάζεται και αφαιρούνται χειρουργικά οι μαστοί. Παρατηρώντας αν ο όγκος είναι μικρός ή μεγάλος, αναπτυγμένος ή πρώιμος, κρίνεται και η τομή των δειγμάτων που θα γίνει τελικά. Αν το δείγμα πρέπει να περιλαμβάνει, για παράδειγμα, λεμφαδένα, τότε θα πρέπει να αφαιρεθεί τμήμα του μαστού που να περιλαμβάνει ολόκληρο το λεμφαδένα. Στη συνέχεια, τα δείγματα ξεπλένονται με φυσιολογικό όρο και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Δεν γίνεται χρήση άλλων χημικών διαλυμάτων όπως για παράδειγμα φορμαλδεΰδης ή φορμόλης, καθώς η μελέτη των δειγμάτων γίνεται αμέσως και δεν χρειάζεται να συντηρηθούν για να μελετηθούν. Τα δείγματα αυτά μεταφέρθηκαν μέχρι το εργαστήριο της φασματομετρίας μέσα σε

ειδικό κουτί με ξηρό πάγο, όπου και παρέμειναν μέχρι να τοποθετηθούν για τη μέτρηση, έτσι ώστε να μην αλλοιωθεί η σύστασή τους. Έγινε προσπάθεια να μην εκτεθούν για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα κάτω από τη δέσμη του laser, όπως επίσης και να μην χρησιμοποιηθεί δέσμη μεγάλης ισχύος, που πιθανόν θα αλλοίωνε το δείγμα μας σε μικρότερο χρόνο.

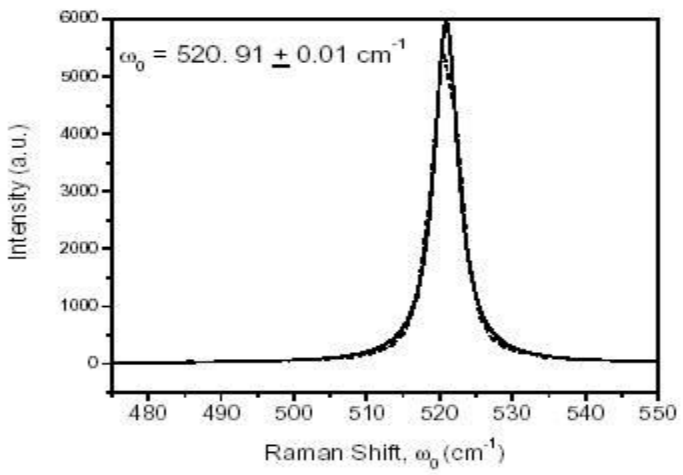
Στην πειραματική διαδικασία της εργασίας αυτής, λάβαμε και αναλύσαμε φάσματα υγιών και καρκινικών ιστών μαστού ποντικών. Η μελέτη επικεντρώνεται στη διάγνωση καρκίνου του μαστού, χωρίς βέβαια να αποκλείεται ότι τυχούσα επιτυχία του πειράματος δεν μπορεί να γενικευθεί, έπειτα από αντίστοιχο πείραμα πάντα, και σε άλλους τύπους καρκίνου. Το πείραμα εξελίχθηκε σε 2 στάδια. Το πρώτο στάδιο αποτέλεσε η μελέτη και ο χαρακτηρισμός υγιών και καρκινικών ιστών μαστών ποντικιών. Οι καρκινικοί ιστοί που μελετήθηκαν ήταν ιστοί που είχαν προσβληθεί από δύο διαφορετικά καρκινικά γονιδιώματα και στη συνέχεια συγκρίθηκαν και μεταξύ τους. Για τους υγιείς ιστούς μελετήθηκαν 8 δείγματα, τα οποία στη συνέχεια συγκρίθηκαν μεταξύ τους ούτως ώστε να γίνει αντιληπτό αν συμφωνούν τα αποτελέσματά μας.

Εδώ θα πρέπει να αναφερθεί ότι πριν από κάθε σύνολο μετρήσεων προηγείτο η λήψη ενός φάσματος αναφοράς για να εξακριβώσουμε αν το σύστημά μας λειτουργεί σωστά. Εμείς ως φάσμα αναφοράς είχαμε επιλέξει το φάσμα ενός πλακιδίου πυριτίου, στην περιοχή των 500cm^{-1}, όπου βιβλιογραφικά αναμένουμε κορυφή στα 520cm^{-1} . [[13]]Ένα τυπικό φάσμα πυριτίου που λάβαμε στο εργαστήριο είναι:



Εικ.10 Πειραματικό φάσμα πυριτίου

Βιβλιογραφικά το φάσμα είναι[13]:



Εικ.11 Βιβλιογραφικό φάσμα πυριτίου

3.2 Δείγματα υγιούς μαστού

Πραγματοποιήθηκε ακτινοβόληση του δείγματος σε διάφορα σημεία του, στην προσπάθειά μας να σαρώσουμε το δείγμα για να ελέγξουμε τυχούσα συστηματικότητα των αποτελεσμάτων μας και συνεπώς και εγκυρότητα των συμπερασμάτων μας. Επειδή οι μετρήσεις και τα σημεία ακτινοβόλησης ήταν πολλαπλά, θα αναφερθούν κάποια επιλεγμένα σημεία μετρήσεων τα οποία, βέβαια, επιβεβαιώνονται από όλες τις μετρήσεις που δεν αναφέρονται.

Για τα 4 πρώτα δείγματα οι ρυθμίσεις έχουν ως εξής. Η ισχύς του laser είναι 1mW, το μήκος κύματος της φωτεινής δέσμης της πηγής είναι 514,53nm και η ένταση του ρεύματος είναι στα 25A. Επιλέχθηκαν φασματικές περιοχές για μελέτη στους 1000cm^{-1},1500 cm^{-1} και 2800cm^{-1},για κάθε δείγμα. Ο χρόνος κάθε κύκλου μέτρησης είναι 120sec όπου έγιναν για κάθε μέτρηση 2 κύκλοι. Στα διαγράμματα που θα ακολουθήσουν, τα τέσσερα αυτά δείγματα θα αναφέρονται ως: 1°,2°,3°,4° δείγμα.

Για τα 2 επόμενα δείγματα υγιών ιστών, οι ρυθμίσεις της πειραματικής διαδικασίας είχαν ως εξής. Η ισχύς του laser είναι 1mW, το μήκος κύματος της φωτεινής δέσμης της πηγής είναι 514,53nm και η ένταση του ρεύματος είναι στα 35A. Επιλέχθηκαν φασματικές περιοχές για μελέτη στους 1000 cm^{-1}, 1500 cm^{-1} και

$2800cm^{-1}$, για κάθε δείγμα. Ο χρόνος κάθε κύκλου μέτρησης είναι 120sec όπου έγιναν για κάθε μέτρηση 2 κύκλοι. Η πρώτη διαφοροποίηση έγινε στην τελευταία περιοχή του έκτου δείγματος όπου τροποποιήθηκε η ισχύς του laser σε 3,5mW από 1mW που ήταν στις προηγούμενες μετρήσεις. Η δεύτερη διαφοροποίηση είναι ότι και στα δύο αυτά δείγματα, εκτός από περιοχές απλού ιστού μαστού, υπήρχαν και τμήματα λεμφαδένα, τα οποία και ακτινοβολήθηκαν με τις ίδιες παραμέτρους ώστε να διερευνηθεί τυχούσα διαφορά με τον απλό ιστό. Τα δείγματα αυτά θα αναφέρονται στα παρακάτω διαγράμματα ως : 5°,6° δείγμα.

Στα επόμενα δείγματα, ακολούθησαν αλλαγές στις παραμέτρους της ισχύος αλλά και του χρόνου ολοκλήρωσης, ώστε έχοντας τη συστηματικότητα των έξι πρώτων δειγμάτων να εξεταστεί αν και σε άλλες συνθήκες φασματοσκοπίας λαμβάνονται τα ίδια αποτελέσματα. Το ιδανικό για όσο το δυνατόν ανώδυνη φασματοσκοπία in vivo στον ασθενή, θα ήταν για μικρό χρόνο και μικρής ισχύος δέσμη. Για τα δύο τελευταία δείγματα, έγιναν μετρήσεις για ισχύ δέσμης 1mW, ένταση ρεύματος 15A και μια ποικιλία χρόνων μετρήσεων που κυμάνθηκαν από 60sec (30sec για δύο κύκλους), μέχρι 240sec (120sec για δύο κύκλους). Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν ζεύγη μετρήσεων ισχύος –χρόνου ως εξής:

Δείγμα 7°, 8°: 1mW-60sec για δυο κύκλους

1mW-120sec για δύο κύκλους

1mW-30sec για δύο κύκλους

1mW-20sec για δύο κύκλους

1,5mW-60sec για δύο κύκλους

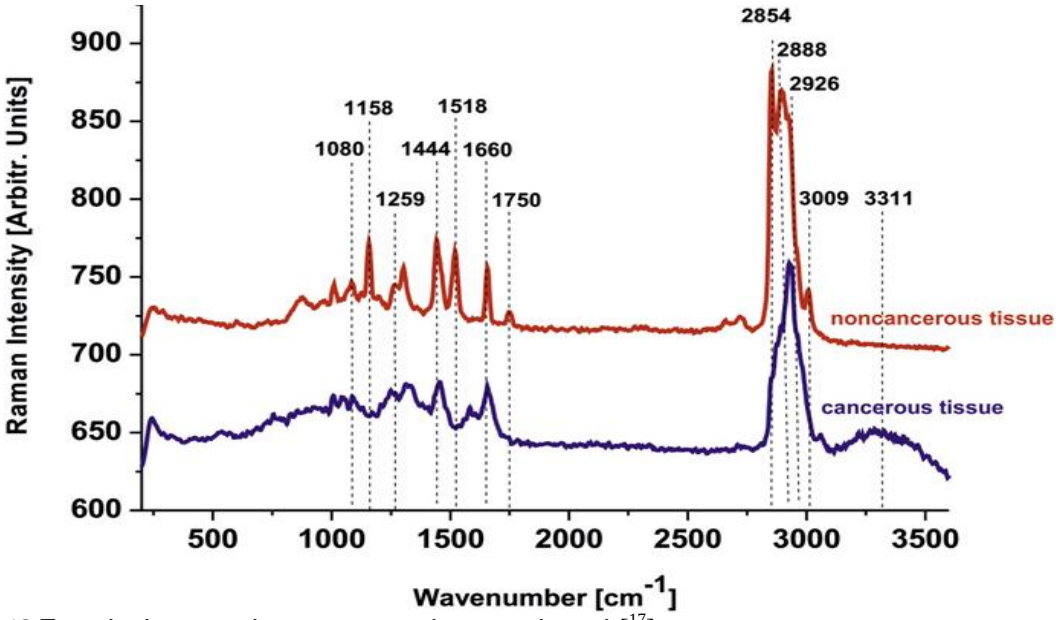
1,5mW-30sec για δύο κύκλους

1,5mW-20sec για δύο κύκλους

Όπως και στα δείγματα 5° και 6°, έτσι και σε αυτά τα δείγματα, επιλέχθηκε ως περιοχή χαρακτηρισμού μια περιοχή του λεμφαδένα, ώστε να διευκρινιστεί αν υπάρχουν διαφοροποιήσεις με τον απλό ιστό. Τα δείγματα αυτά αναφέρονται ως 7° και 8° δείγμα.

Οι αναλύσεις των φασμάτων έγιναν με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος OriginPro9.0,το οποίο με βάση τα δεδομένα που μας δίνει ο φασματογράφος Raman, μας εξάγει διαγράμματα φασμάτων σε κυματαριθμούς συναρτήσει της έντασης της ακτινοβολίας.

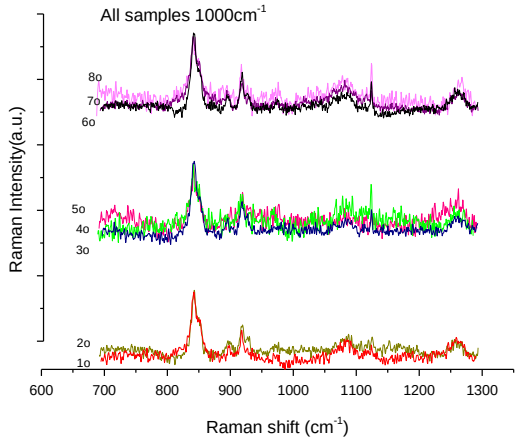
Πριν ξεκινήσουμε, όμως την ανάλυση των πειραματικών φασμάτων, θα πρέπει να έχουμε ένα αρχικό μέτρο σύγκρισης για τον υγιή και τον καρκινικό μαστό, όπου προκύπτει βιβλιογραφικά.



Εικ.12 Τυπικό φάσμα υγιούς και καρκινικού μαστικού ιστού [17]

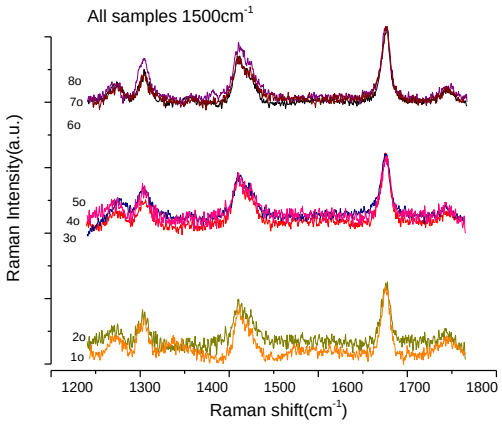
3.2.1 Όλα τα υγιή δείγματα-Απλός μαστός

Για την πρώτη φασματική περιοχή, στους 1000cm^{-1}, ελήφθησαν πολλαπλά φάσματα για όλα τα δείγματα από τα οποία επιλέχθηκε ένα αντιπροσωπευτικό για κάθε δείγμα. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι κατά τη διάρκεια των μετρήσεων ελήφθησαν κάποιες κορυφές που ήταν παρασιτικές και προέκυψαν λόγω πιθανού σφάλματος του φακού της οπτικής διάταξης και για αυτό το λόγο δεν θα ληφθούν υπόψη στην ανάλυση των αποτελεσμάτων. Οι κορυφές αυτές είναι στους 843cm^{-1}και 1085cm^{-1} .



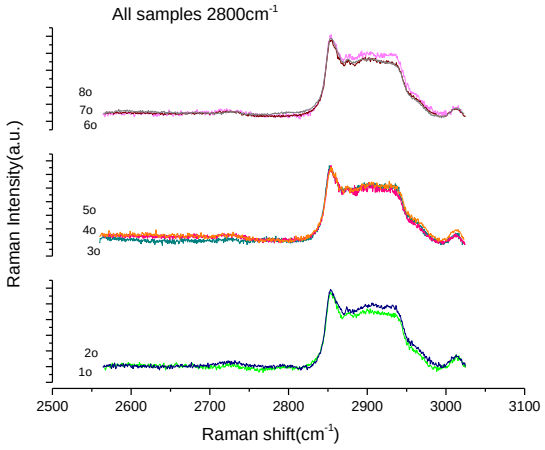
Διάγραμμα 1: Υγιής ιστός-όλα τα δείγματα 1000cm^{-1}

Στο συγκεντρωτικό διάγραμμα φασμάτων παραπάνω, παρουσιάζονται οι αντιπροσωπευτικές κορυφές και η αντίστοιχη μορφολογία για τον μαστικό ιστό, που όπως παρατηρούμε είναι συστηματικές και με μια ελάχιστη απόκλιση ταυτόσημες. Οι κορυφές αυτές, υπολογισμένες κατά μέσο όρο για να αναφερόμαστε σε όλα τα δείγματα είναι στα 840,28cm^{-1}, 917,63cm^{-1}, 1081,2cm^{-1},1180 2cm^{-1}και 1259,3cm^{-1}. Ωστόσο, παρόλη τη συστηματικότητα των αποτελεσμάτων, οι κορυφές που επιλέχθηκαν να αναφερθούν μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων κατά ένα παράγοντα μέχρι $\pm$2cm^{-1}, παράγοντας τόσο μικρής τάξης μη ικανής να επηρεάσει την τελική ανάλυση.



Διάγραμμα 2: Υγιής ιστός-όλα τα δείγματα 1500cm^{-1}

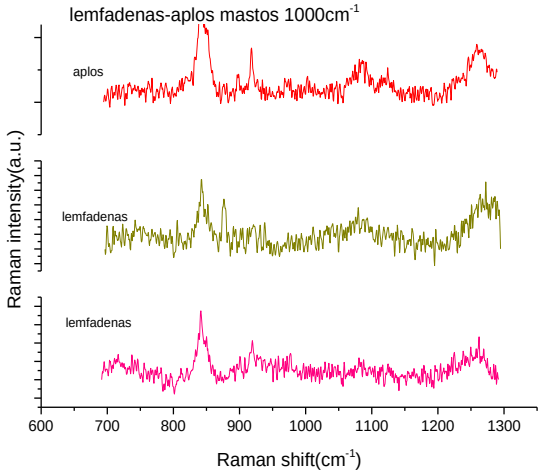
Τα δείγματα αυτής της μέτρησης μας δίνουν κορυφές στα 1255 cm^{-1},1299,1cm^{-1}, 1440cm^{-1} και 1659,4cm^{-1}.



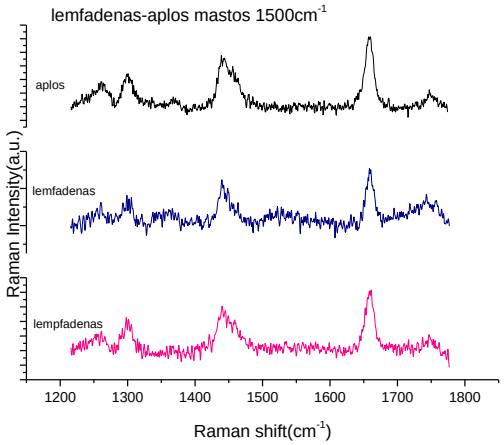
Διάγραμμα 3: Υγιής ιστός-όλα τα δείγματα 2800cm^{-1}

Σε αυτή τη φασματική περιοχή, λαμβάνουμε μία έντονη κορυφή στους 2852 cm^{-1} η οποία ακολουθείται από ένα «σκαλοπάτι» ή αλλιώς shoulder μέχρι τους 2935cm^{-1} και μία κορυφή μικρότερης έντασης στους 3011 cm^{-1}.

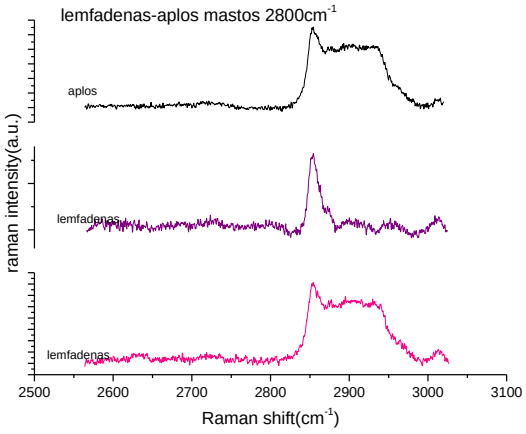
Τέλος, κάτι που θα πρέπει να υπογραμμίσουμε είναι ότι τα φάσματα των λεμφαδένων εμφανίζουν μικρότερου ύψους και έντασης κορυφή στα 2850cm^{-1} όπως επίσης και μεγαλύτερης κλίσης «σκαλοπάτι» απουσιάζοντας κάποιες κορυφές στο εύρος των 2850cm^{-1}- 3000 cm^{-1} ,κι αυτό πιθανά λόγω του ότι οι λεμφαδένες αποτελούνται από μικρότερη ποσότητα λιπιδίων από τον υπόλοιπο, κατά κύριο λόγο, λιπιδικό μαστικό ιστό.[18] Τα διαγράμματα δύο δειγμάτων λεμφαδένων παρατίθενται παρακάτω, σε σύγκριση με έναν απλό μαστικό ιστό.



Διάγραμμα 4: Υγιής ιστός-απλός ιστός και λεμφαδένας 1000cm^{-1}



Διάγραμμα 5: Υγιής ιστός-απλός ιστός και λεμφαδένας 1500cm^{-1}



Διάγραμμα 6: Υγιής ιστός-απλός ιστός και λεμφαδένας 2800cm^{-1}

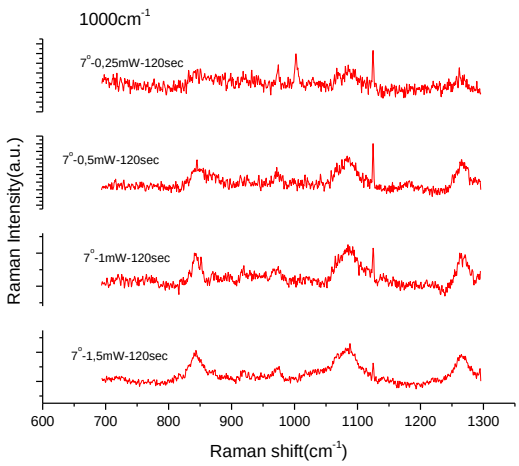
3.2.2 Ίδιος χρόνος-Διαφορετική ισχύς

Σε αυτό το σημείο των συγκρίσεων, θα παρατεθεί το διάγραμμα σύγκρισης φασμάτων που έλαβαν χώρα με ίδιο χρόνο έκθεσης αλλά με δέσμη laser διαφορετικής ισχύος. Αυτή η σύγκριση γίνεται ώστε να βρεθεί η ελάχιστη δυνατή ισχύς ακτινοβολίας σε συνδυασμό με τον λιγότερο δυνατό χρόνο παραμονής του δείγματος στην φωτεινή πηγή, ώστε να έχουμε ικανοποιητικό σήμα με ελάχιστο θόρυβο

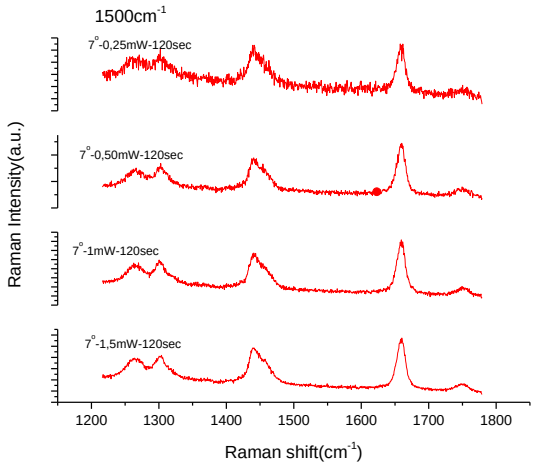
(signal/noise). Στο διάγραμμα αυτό συμπεριλάβαμε το 7° και 8° δείγμα, στα οποία λάβαμε μετρήσεις για διαφορετική ισχύ.

Για το 7° δείγμα, οι μετρήσεις που επιλέχθηκαν να παρουσιαστούν ήταν για χρόνο ολοκλήρωσης 60sec για 2 κύκλους, δηλαδή σύνολο 120sec, και η ισχύς πήρε τιμές 0,25mW, 0,5mW, 1mW και 1,5mW.

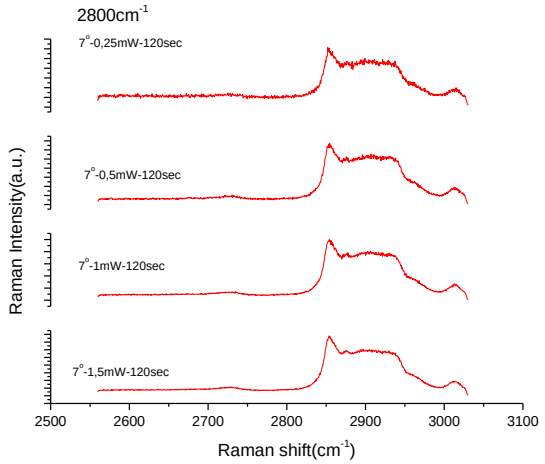
<u>60sec/2 κύκλους- 0,25mW, 0,5mW, 1mW, 1,5mW.</u>



Διάγραμμα 7: Υγιής ιστός-ίδιος χρόνος και διαφορετική ισχύς,1000cm^{-1}



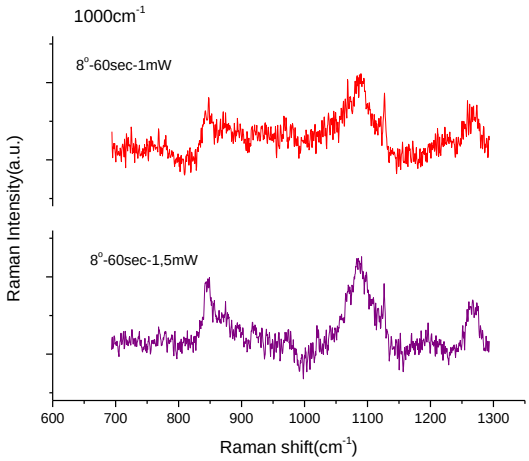
Διάγραμμα 8: Υγιής ιστός-ίδιος χρόνος και διαφορετική ισχύς,1500cm^{-1}



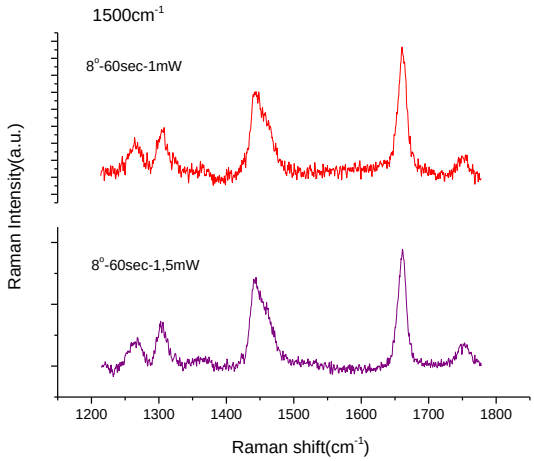
Διάγραμμα 9: Υγιής ιστός-ίδιος χρόνος και διαφορετική ισχύς, 2800cm^{-1}

Για το 8° δείγμα, ο χρόνος που επιλέχθηκε είναι 30sec για 2 κύκλους και η ισχύς πήρε τις τιμές 1mW και 1,5mW.

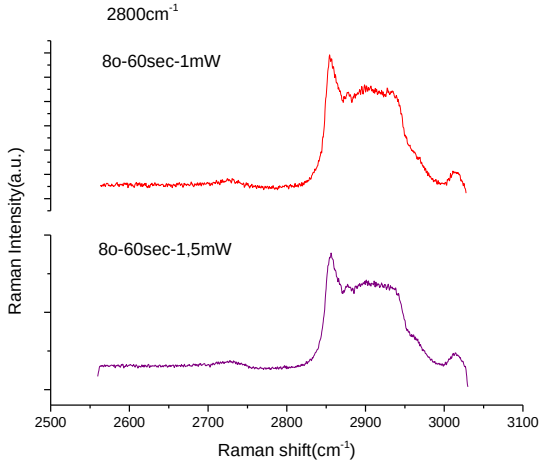
<u>30sec /2 κύκλους -1mW , 1,5mW</u>



Διάγραμμα 10: Υγιής ιστός-ίδιος χρόνος και διαφορετική ισχύς, 1000cm^{-1}



Διάγραμμα 11: Υγιής ιστός-ίδιος χρόνος και διαφορετική ισχύς,1500cm^{-1}



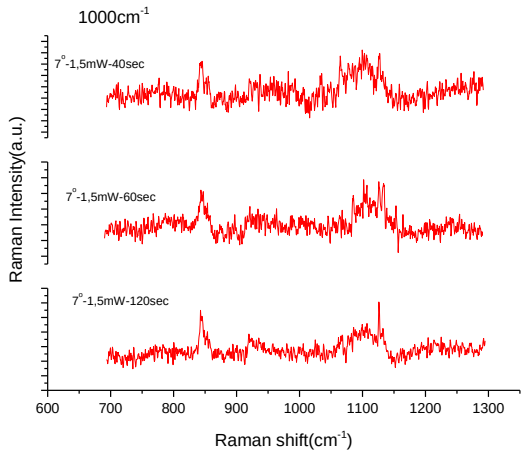
Διάγραμμα 12: Υγιής ιστός-ίδιος χρόνος και διαφορετική ισχύς, 2800cm^{-1}

3.2.3 Ίδια ισχύς- Διαφορετικοί χρόνοι

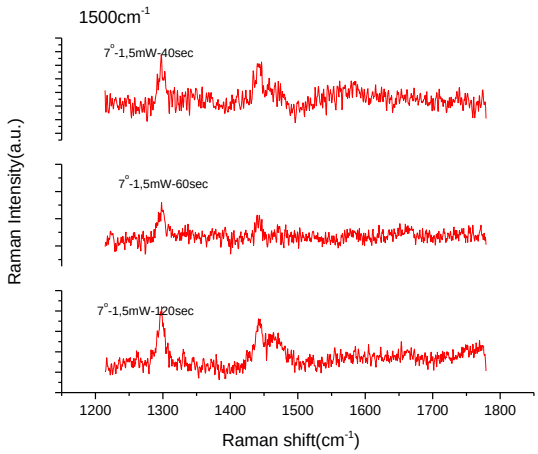
Σε αυτό το σημείο θα παρατεθούν συγκριτικά διαγράμματα φασμάτων που εκτελέστηκαν υπό δέσμη ίδιας ισχύος αλλά διαφορετικών χρόνων.

Για το 7° δείγμα, σχηματίστηκε διάγραμμα για φάσματα δέσμης 1,5mW, και συγκρίθηκαν οι χρόνοι ολοκλήρωσης 40sec, 60sec, 120sec.

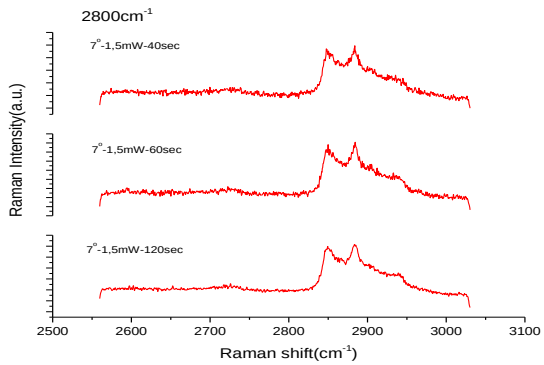
1,5mW-40sec,60sec,120sec



Διάγραμμα 13: Υγιής ιστός-ίδια ισχύς και διαφορετικός χρόνος,1000cm^{-1}



Διάγραμμα 14: Υγιής ιστός-ίδια ισχύς και διαφορετικός χρόνος,1500cm^{-1}

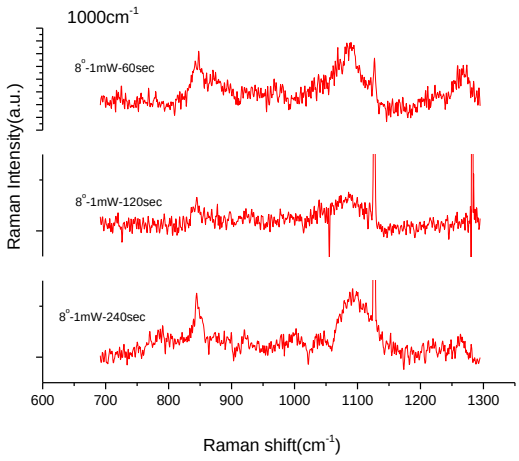


Διάγραμμα 15: Υγιής ιστός-ίδια ισχύς και διαφορετικός χρόνος, 2800cm^{-1}

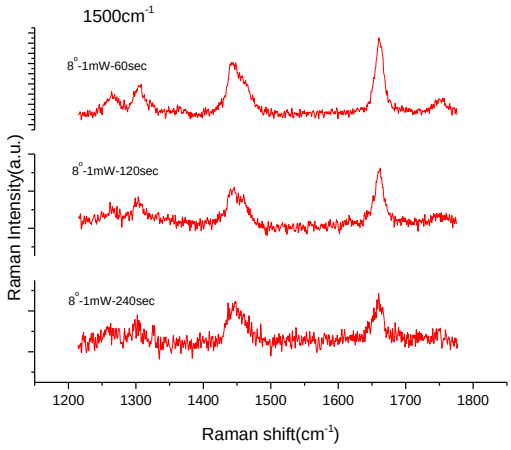
Μία υποσημείωση, εδώ, είναι ότι το 7° δείγμα είναι υγιής μαστικός ιστός από περιοχή που περιέχει και λεμφαδένα, και για αυτό το λόγο το φάσμα στην περιοχή των 2800cm^{-1} διαφέρει από τα υπόλοιπα δείγματα υγιών στο εύρος 2850 cm^{-1} - 3000 cm^{-1}.

Για το επόμενο είδος σύγκρισης επιλέχθηκαν από το 8° δείγμα φάσματα υπό δέσμη ισχύος 1mW, για χρόνους 60sec,120sec, 240sec.

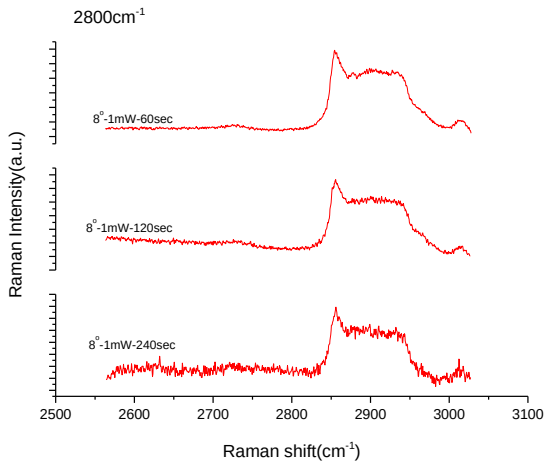
<u>1mW-60sec,120sec,240sec</u>



Διάγραμμα 16: Υγιής ιστός-ίδια ισχύς και διαφορετικός χρόνος,1000cm^{-1}



Διάγραμμα 17: Υγιής ιστός-ίδια ισχύς και διαφορετικός χρόνος,1500cm^{-1}



Διάγραμμα 18: Υγιής ιστός-ίδια ισχύς και διαφορετικός χρόνος,2800cm^{-1}

3.3 Καρκινικός ιστός

Τα καρκινικά δείγματα μαστικού ιστού που φασματοσκοπήθηκαν στο πείραμά μας ήταν συνολικά 14 διαφορετικοί ιστοί. Τα δείγματα αυτά αποτελούνταν από ιστούς που βρίσκονταν σε αρχικό στάδιο της ασθένειας (συνολικά 8 δείγματα), από ιστούς που διένυαν την τελική φάση του καρκίνου ή αλλιώς τη νεκρωτική φάση του (συνολικά 3 δείγματα), και από έναν νεκρωτικό ιστό από τον οποίο όμως λάβαμε 3 περιοχές: μία εξωτερική όπου ο όγκος ήταν σε πολύ αρχικό στάδιο, δηλαδή δεν είχε προλάβει ο ιστός να εκφυλιστεί, σε μια εσωτερική περιοχή όπου ο ιστός είχε αρχίσει να νοσεί και σε μια νεκρωτική περιοχή όπου ο ιστός ήταν σχεδόν νεκρός.

Οι ονομασίες που θα χρησιμοποιηθούν στα διαγράμματα που ακολουθούν, είναι οι εξής:

Καρκινικοί ιστοί: 1°, 2°, 3°, 4°, 5°, 6°, 7°, 8° δείγμα

Νεκρωτικοί ιστοί: 9°,10°,11° δείγμα

Νεκρωτικός ιστός τριών περιοχών: 12° δείγμα

Οι παράμετροι με τις οποίες έγιναν οι μετρήσεις στους καρκινικούς ιστούς είχαν ως εξής:

1°-4°: Ακτινοβολία ισχύος 1mW, ρεύματος έντασης 35A, για χρόνους 120sec για 2 κύκλους

5°: Ακτινοβολία ισχύος 1mW, ρεύματος έντασης 20A, για χρόνους 120sec, 60sec και 30sec για 2 κύκλους. Ακτινοβολία ισχύος 1,5mW, για χρόνο 30sec για 2 κύκλους.

6°: Ακτινοβολία ισχύος 1mW, ρεύματος έντασης 35A, για χρόνους 120sec, 60sec και 30sec για 2 κύκλους. Ακτινοβολία ισχύος 1,5mW, για χρόνο 30sec και 60sec για 2 κύκλους.

7°: Ακτινοβολία ισχύος 1mW, ρεύματος έντασης 20A, για χρόνο 60sec για 2 κύκλους. Ακτινοβολία ισχύος 1,65mW, για χρόνο 30sec για 2 κύκλους και ισχύος 0,5mW για χρόνο 60sec για 2 κύκλους.

8°: Ακτινοβολία ισχύος 1mW, ρεύματος έντασης 20A, για χρόνους 120sec και 60sec για 2 κύκλους.

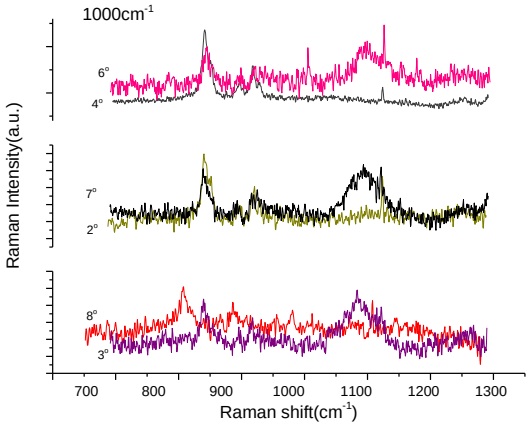
9°,12° : Ακτινοβολία ισχύος 1mW, ρεύματος έντασης 20A, για χρόνο 60sec για 2 κύκλους.

10°: Ακτινοβολία ισχύος 1mW, ρεύματος έντασης 20A, για χρόνους 120sec,30sec και 60sec για 2 κύκλους.

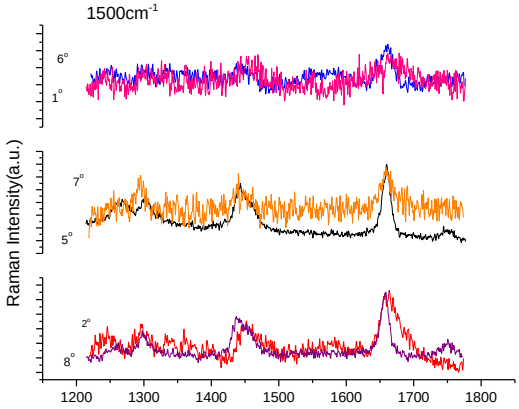
11°: Ακτινοβολία ισχύος 1mW, ρεύματος έντασης 35A, για χρόνο 120sec για 2 κύκλους.

3.3.1 Δείγματα καρκινικού ιστού

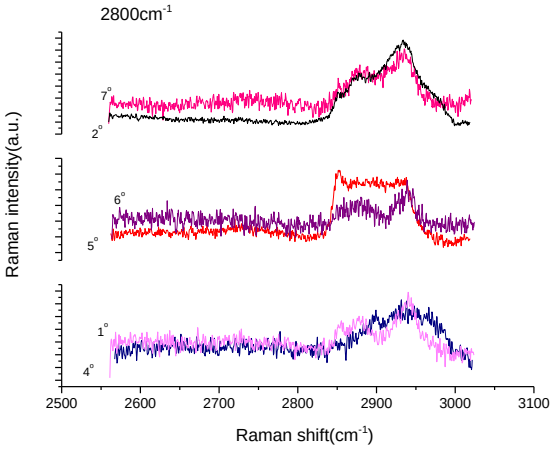
Ακολουθούν διαγράμματα για τις τρεις φασματικές περιοχές (1000 cm^{-1},1500 cm^{-1}, 2800cm^{-1}), δειγμάτων καρκινικών ιστών μαστού από τα δείγματα 1°-8°, για να ελέγξουμε σε πρώτο στάδιο τη συστηματικότητα μεταξύ των μετρήσεων.



Διάγραμμα 19: Καρκινικός ιστός-όλα τα δείγματα,1000cm^{-1}



Διάγραμμα 20: Καρκινικός ιστός-όλα τα δείγματα,1500cm^{-1}

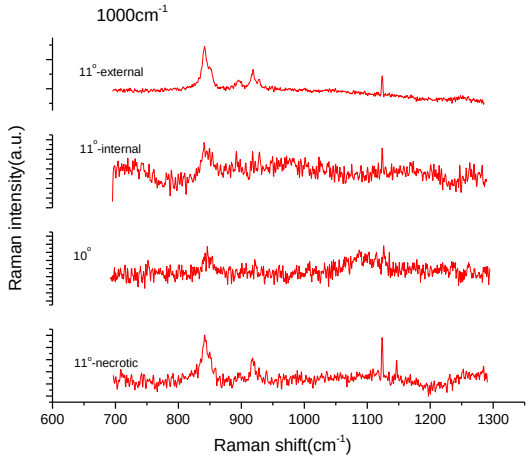


Διάγραμμα 21: Καρκινικός ιστός-όλα τα δείγματα,2800cm^{-1}

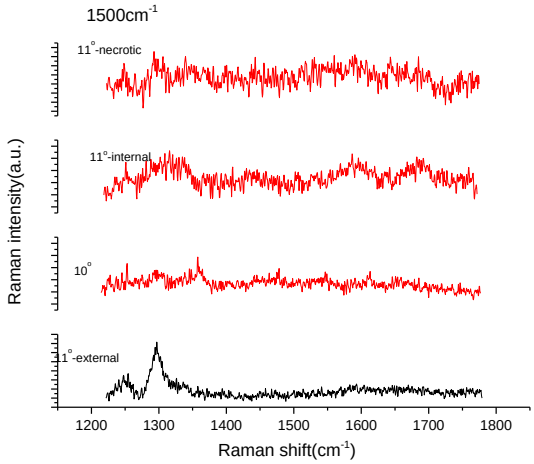
Οι κορυφές που παρατηρούνται σε αυτά τα φάσματα είναι στους εξής κυματαριθμούς: 840 cm^{-1}, 918,26 cm^{-1},1095,9 cm^{-1},1259 cm^{-1}, 1451,8 cm^{-1}, 1661,6cm^{-1},1750 cm^{-1}, 2853 cm^{-1}, 2899,2 cm^{-1}, 2937,8 cm^{-1}, 2966 cm^{-1}

3.3.2 Προχωρημένος όγκος 3 περιοχών

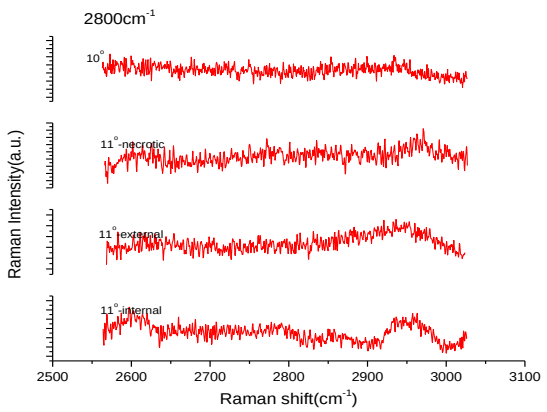
Σε αυτό το σημείο των διαγραμμάτων, παρατίθεται συγκριτικό διάγραμμα δειγμάτων καρκινικών ιστών προχωρημένου σταδίου, τόσο νεκρωτικού ιστού όσο και εξωτερικού στρώματος νεκρωτικού ιστού, πάντα σε σύγκριση με ένα δείγμα απλού όγκου. Συνεπώς, επιλέχθηκαν και συγκρίθηκαν δείγματα από το 9° μέχρι το 12°.



Διάγραμμα 22: Προχωρημένος όγκος, νεκρωτικός, απλός όγκος,1000cm^{-1}

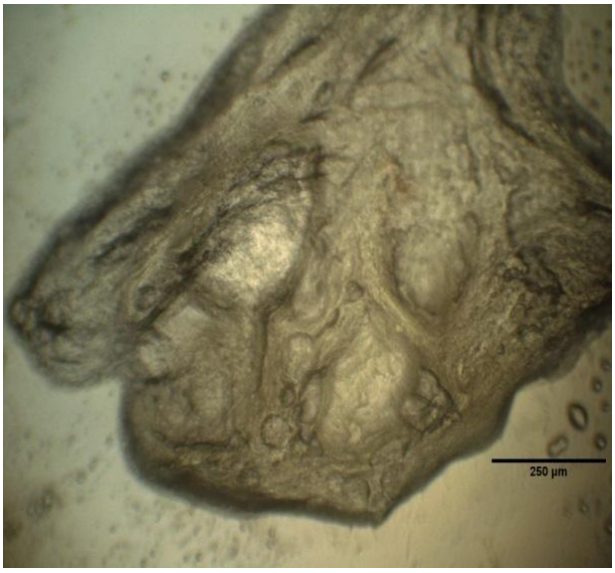


Διάγραμμα 23: Προχωρημένος όγκος, νεκρωτικός, απλός όγκος,1500cm^{-1}



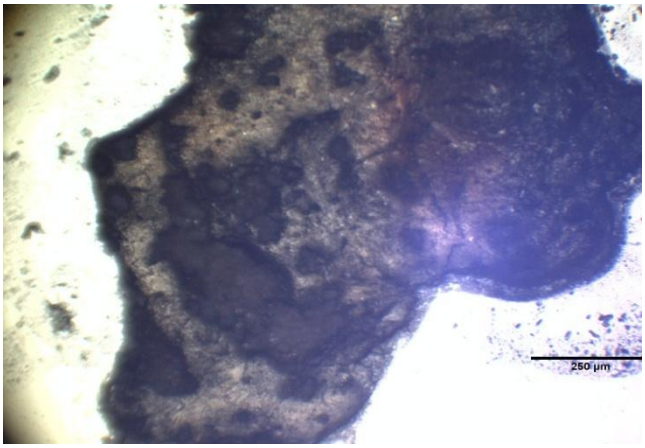
Διάγραμμα 24: Προχωρημένος όγκος, νεκρωτικός, απλός όγκος,2800cm^{-1}

Σε αυτό το σημείο, μπορούμε να παραθέσουμε κάποιες εικόνες των δειγμάτων εξωτερικό- εσωτερικό- νεκρωτικό στρώμα από το οπτικό μικροσκόπιο, όπως επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα Imagej:



Εικ.13 10° δείγμα-external 2^{η} περιοχή

Εικ.14 10^{ο} δείγμα-external 1^{η} περιοχή

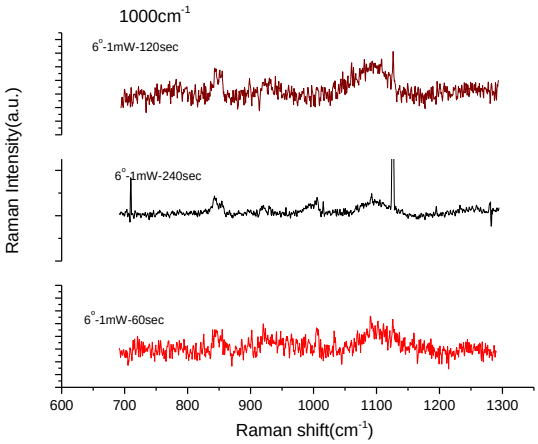


Εικ.15 10^{ο} δείγμα-internal

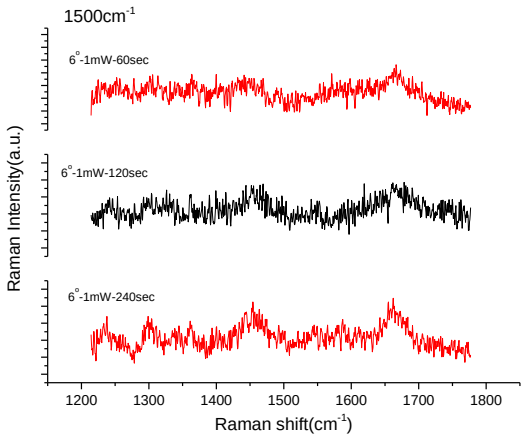
Ακολουθούν συγκρίσεις με βάση τον χρόνο έκθεσης του δείγματος και την ισχύ ακτινοβολίας της δέσμης, ακριβώς με την ίδια λογική που ακολουθήθηκε στα δείγματα υγιών ιστών παραπάνω.

3.3.3 Ίδια ισχύς-Διαφορετικός χρόνος

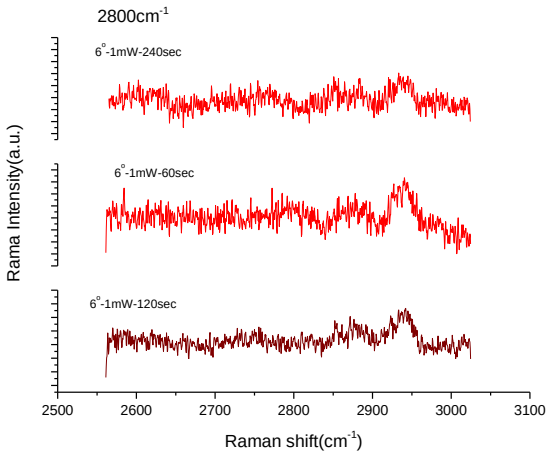
Πραγματοποιήθηκε σύγκριση στο 6^{ο} δείγμα, για ισχύ ακτινοβολίας 1mW και χρόνους 30sec και 60sec για 2 κύκλους.



Διάγραμμα 25: Καρκινικός ιστός: ίδια ισχύς και διαφορετικός χρόνος,1000cm^{-1}



Διάγραμμα 26: Καρκινικός ιστός: ίδια ισχύς και διαφορετικός χρόνος,1500cm^{-1}

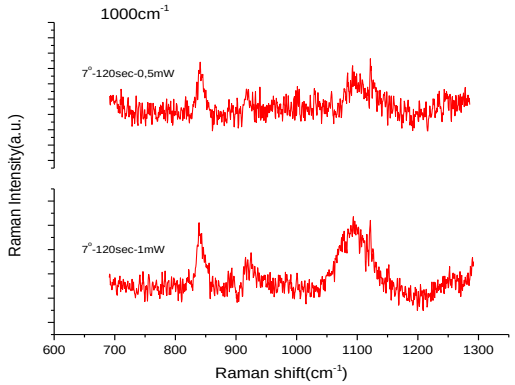


Διάγραμμα 27: Καρκινικός ιστός: ίδια ισχύς και διαφορετικός χρόνος,1000cm^{-1}

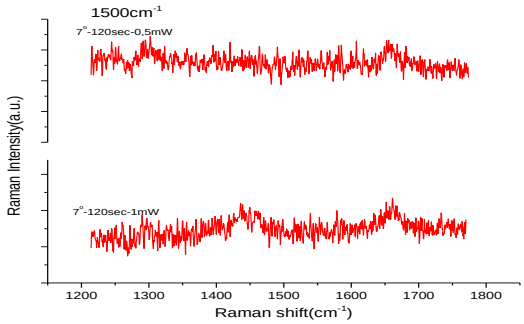
3.3.4 Ίδιος χρόνος-Διαφορετική ισχύς

Στο σημείο αυτό των συγκρίσεων παρατίθεται διάγραμμα για το 7° δείγμα, για χρόνο ολοκλήρωσης 60sec για 2 κύκλους και ισχύ 1mW και 0,5mW, και αντίστοιχα για χρόνο 30sec για 2 κύκλους και ισχύ 1,65mW και 4,5mW.

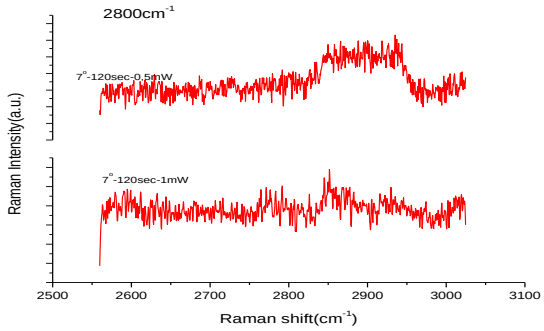
<u>60sec/2κύκλοι-0,5mW,1mW</u>



Διάγραμμα 28: Καρκινικός ιστός: ίδιος χρόνος και διαφορετική ισχύς,1000cm^{-1}

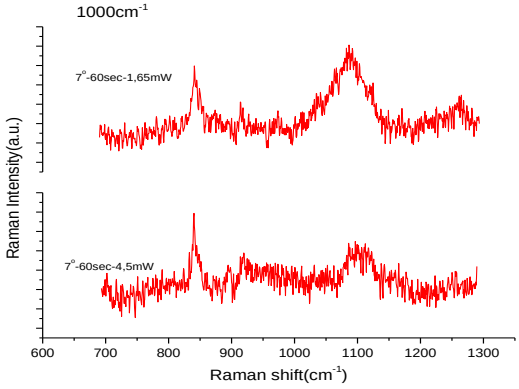


Διάγραμμα 29: Καρκινικός ιστός: ίδιος χρόνος και διαφορετική ισχύς,1500cm^{-1}

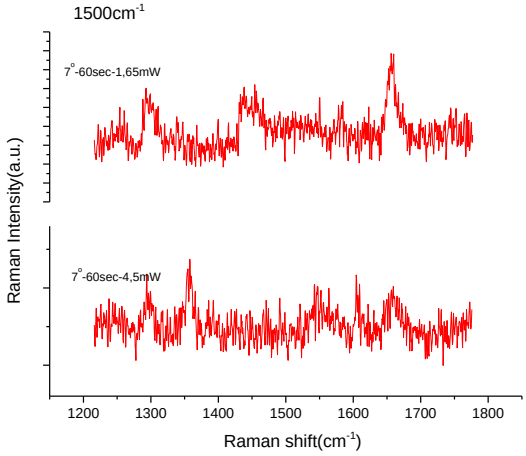


Διάγραμμα 30: Καρκινικός ιστός: ίδιος χρόνος και διαφορετική ισχύς,1500cm^{-1}

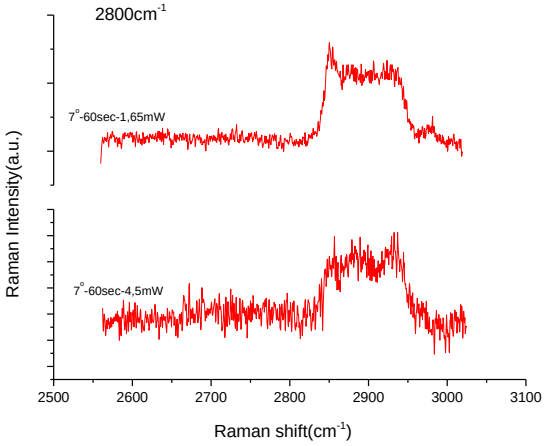
30sec/2κύκλοι-1,65mW,4,5mW



Διάγραμμα 31: Καρκινικός ιστός: ίδιος χρόνος και διαφορετική ισχύς,1000cm^{-1}



Διάγραμμα 32: Καρκινικός ιστός: ίδιος χρόνος και διαφορετική ισχύς,1500cm^{-1}



Διάγραμμα 33: Καρκινικός ιστός: ίδιος χρόνος και διαφορετική ισχύς,2800cm^{-1}

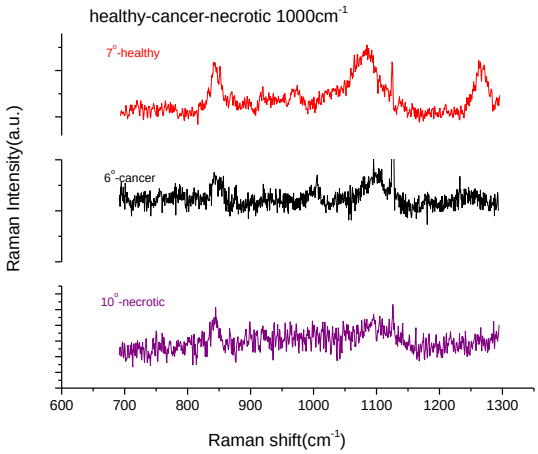
Έπειτα από τη συγκριτική μελέτη τόσο των υγιών όσο και των καρκινικών ιστών, καταλήξαμε ότι με όλα αυτά τα δείγματα που μελετήσαμε καταλήξαμε σε μία συστηματικότητα αποτελεσμάτων. Έχοντας, λοιπόν, μια κοινή γραμμή όλων των καρκινικών και όλων των υγιών, προβαίνουμε στο πιο σημαντικό σημείο των συγκριτικών διαγραμμάτων, το οποίο και τελικά είναι αυτό το οποίο θα μας φανερώσει και το αποτέλεσμα της εργασίας αυτής. Επομένως, με τα συγκριτικά διαγράμματα υγιών-καρκινικών ιστών που θα ακολουθήσουν, θα καταλήξουμε στο συμπέρασμα εάν μπορεί τελικά να γίνει διάγνωση καρκίνου του μαστού μέσω της φασματοσκοπίας Raman.

Σύγκριση υγιούς- καρκινικού ιστού

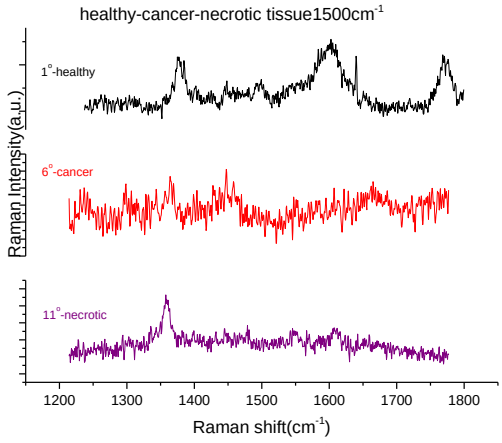
Για να έχουμε μια σαφή και πιο ορθή εικόνα για τη σύγκριση αυτή, κάθε φορά θα μεταβάλλουμε μία παράμετρο και όχι πολλές μαζί.

Πιο συγκεκριμένα, θα επιλέξουμε ένα φάσμα καρκινικού ιστού, ένα υγιούς και ένα νεκρωτικού ιστού, στα οποία η ισχύς της ακτινοβολίας και ο χρόνος έκθεσης θα είναι κοινά.

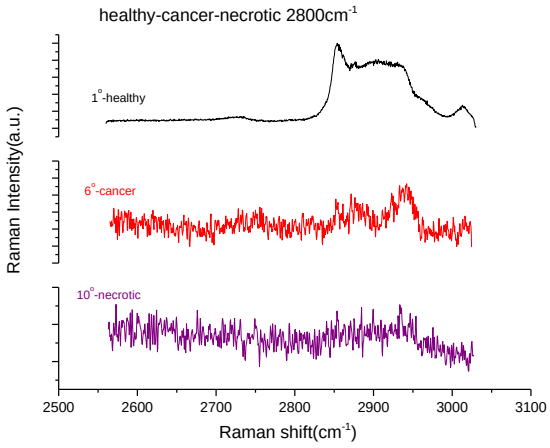
60sec για 2 κύκλους-1mW



Διάγραμμα 34: Υγιής-καρκινικός- νεκρωτικός ιστός 1000cm^{-1}



Διάγραμμα 35: Υγιής-καρκινικός- νεκρωτικός ιστός 1500cm^{-1}



Διάγραμμα 36: Υγιής-καρκινικός- νεκρωτικός ιστός 2800cm^{-1}

3.4 Διαφορετικά είδη υγιών ιστών

Έπειτα από τη λήψη μετρήσεων για τον ιστό μαστού και την εκτεταμένη μελέτη του με αξιοσημείωτο αριθμό επαναλήψεων, έγινε μία προσπάθεια σύγκρισης άλλων ειδών υγιών ιστών. Ζητούμενο σε αυτό το μέρος της πειραματικής διαδικασίας είναι να παρατηρήσουμε αν μπορεί να γίνει διαχωρισμός μεταξύ διαφορετικών ιστών του ποντικού, ακόμα κι αν είναι ιστοί από τον ίδιο οργανισμό και ακόμα κι αν είναι όλοι υγιείς. Εν ολίγοις, θα θέλαμε να πάρουμε μια σύντομη εικόνα αν η τεχνική της

φασματοσκοπίας Raman θα μπορούσε να δώσει αποτελέσματα όχι μόνο για σύγκριση υγιούς- καρκινικού ιστού, αλλά και μεταξύ υγιών ιστών διαφορετικού είδους.

Στο σημείο αυτό μελετήθηκαν 8 δείγματα διαφορετικών ιστών:

- 2 δείγματα σιελογόνου
- 2 δείγματα παγκρέατος
- 2 δείγματα λίπος από μήτρα
- 1 δείγμα δέρματος
- 1 δείγμα μυός και κοιλίας

Οι παράμετροι διεξαγωγής των μετρήσεων για κάθε δείγμα είχαν ως εξής:

1° δείγμα- σιελογόνος αδένας 1: 1mW-120sec για 2 κύκλους

1mW- 60sec για 2 κύκλους

1mW- 30sec για 2 κύκλους

1mW- 20sec για 2 κύκλους

2°δείγμα- σιελογόνος αδένας 2: 1mW-120sec για 2 κύκλους

1mW- 60sec για 2 κύκλους

3°δείγμα- λίπος μήτρας 1: 1mW-120sec για 2 κύκλους

1mW- 30sec για 2 κύκλους

1mW- 20sec για 2 κύκλους

4° δείγμα- λίπος μήτρας 2: 1mW-120sec για 2 κύκλους

1mW- 60sec για 2 κύκλους

5° δείγμα- πάγκρεας 1: 1,5mW-80sec για 2 κύκλους

6° δείγμα-πάγκρεας 2 : 1mW-120sec για 2 κύκλους

1mW-60sec για 2 κύκλους

7° δείγμα-μυς κοιλίας: 1,5mW-60sec για 2 κύκλους

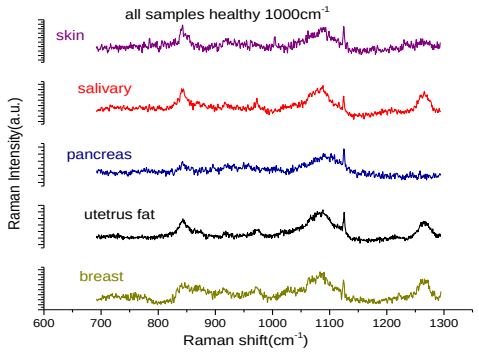
1,5mW-30sec για 2 κύκλους

8° δείγμα-δέρμα: 1mW-120sec για 2 κύκλους

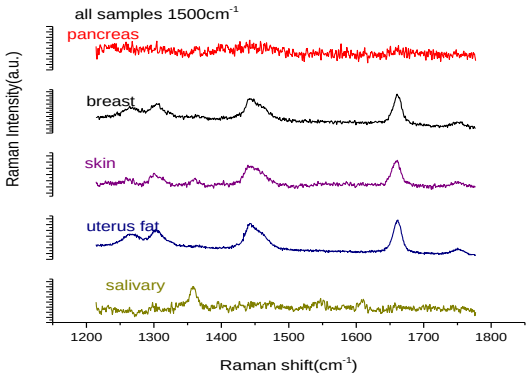
1mW-60sec για 2 κύκλους

Μεταξύ των μετρήσεων για το κάθε δείγμα, παρατηρήθηκε συστηματικότητα και επιλέχθηκε ένα φάσμα για το καθένα για να προβούμε στις παρακάτω συγκρίσεις:

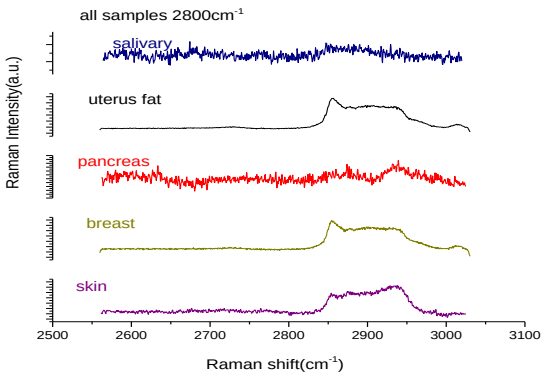
3.4.1 Όλα τα δείγματα



Διάγραμμα 37: Όλα τα είδη υγιών ιστών,1000cm^{-1}



Διάγραμμα 38: Όλα τα είδη υγιών ιστών,1500cm^{-1}



Διάγραμμα 39: Όλα τα είδη υγιών ιστών,2800cm^{-1}

Οι κορυφές που παρατηρούνται στους παραπάνω εξεταζόμενους ιστούς όπως δείχνουν τα παραπάνω διαγράμματα είναι:

<u>Δέρμα</u>: 840cm^{-1},922 cm^{-1},1261 cm^{-1},1300,9 cm^{-1} , 1360 cm^{-1}, 1439 cm^{-1}, 1661 cm^{-1},2936 cm^{-1},2853 cm^{-1}

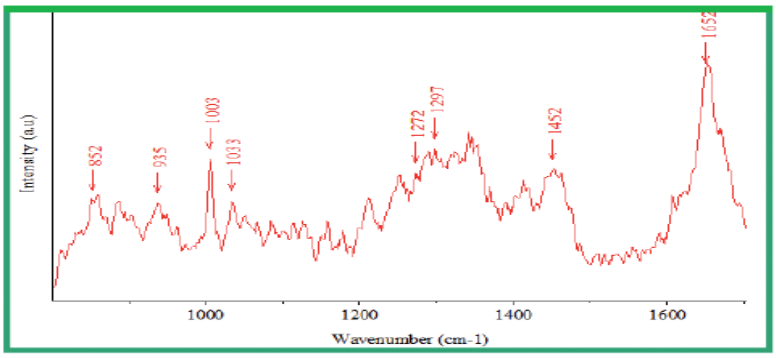
<u>Σιελογόνος αδένας</u>:840 cm^{-1}, 972 cm^{-1},1358 cm^{-1},1610 cm^{-1},1547 cm^{-1}

<u>Πάγκρεας</u>: 2874 cm^{-1},2932 cm^{-1}

<u>Λίπος μήτρας</u>: 918 cm^{-1},976 cm^{-1},1263 cm^{-1},1269 cm^{-1},1302,11 cm^{-1},1443,4 cm^{-1}, 1659 cm^{-1},2854,4 cm^{-1}

Στη συνέχεια, θα ήταν ιδιαιτέρως χρήσιμο να παρουσιάσουμε τα αναμενόμενα, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, φάσματα, για τα νέα είδη ιστών και η συσχέτιση πειραματικών με βιβλιογραφικές κορυφές θα γίνει στο επόμενο κεφάλαιο των συμπερασμάτων.

<u>Δέρμα:</u>[14]



Εικ.17 Φάσμα Raman σε δερματικό ιστό

Peak Position (cm^{-1})	Protein Assignments	Lipid Assignments	Others
1745		V(C=0)	
1655	V(C=0)Amide I		
1445	$\delta(CH_2)$, $\delta(CH_3)$ δ	$\delta(CH_2)$ scissoring	
1301		$\delta(CH_2)$ twisting, wagging	
1269	v(CN), δ (NH) Amide III		
1080		v(CC)skeletal	v(CC), v_s (PO_2)
1030		v(CC)skeletal	Nucleic acids
1002	v(CC) Phenyl ring		
938	v(CC) praline, valine		
855	δ(CCH) aromatic, olefinic		polysaccaride
822	δ(CCH) aliphatic		

Εικ.18 Πίνακας βασικών ταυτοποιημένων δονητικών καταστάσεων στο δέρμα

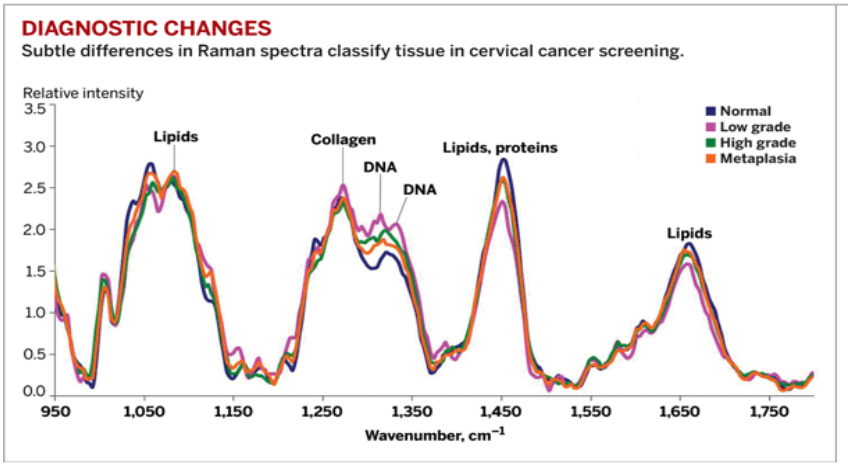
Πάγκρεας:[19]

TABLE 1. Tentative Peak Assignments

Peak Shift	Tentative Peak Assignment
623	C–C twisting mode of phenylalanine
645	C–C twist of tyrosine
671	T, G, and υ(C–S) of cystine (DNA/RNA)
720	C-N (membrane phospholipid head)/nucleotide peak symmetric choline stretch, phospholipids, $(H_3C)N^+$ stretch band
760	Symmetric ring breathing of tryptophan, υ_s(O–P–O)
785	U, C, T ring breathing, DNA
814	υ(O–P–O), lipids
832	Out-of-plane ring breathing tyrosine/υ(O–P–O), DNA
855	Ring breathing of tyrosine and υ(C–C) hydroxyproline ring specific to collagen
939	υ(C–C) protein backbone α-helix (proline/glycogen), collagen
1004	υ_s Symmetric ring breathing mode, phenylalanine
1010	C–O deoxyrib (DNA/RNA)
1034	δ(C–H), phenylalanine
1080	C-N stretching of proteins and lipids, υ(C–C) and υ(C–O) of phospholipids
1094	υ(O–P–O), DNA/RNA
1098–1100	DNA and chain υ(C–C) of lipids, desmosine/isodesmosine
1128	υ(C–C) of lipids from trans-segments and υ(C–N)of proteins
1177	δ(C–H), tyrosine
1210	$\upsilon(C–C_6H_5)$ of tyrosine phenylalanine and tryptophan
1258–1262	Amide III, β-sheet/adenine and cytosine/δ(=CH)of lipids (around 262)

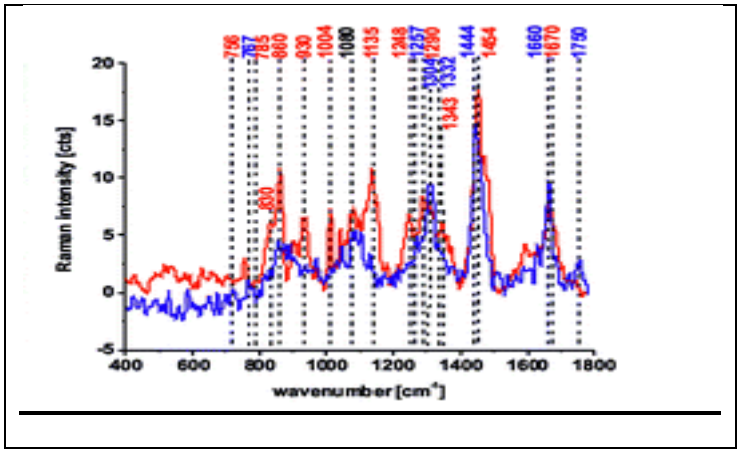
Εικ.19 Πίνακας βασικών κορυφών φάσματος Raman σε ιστό παγκρέατος

Λίπος μήτρας:[20]



Εικ.20 Φάσματα Raman σε ιστό τραχύλου της μήτρας

Σιελογόνος αδένας:[21]



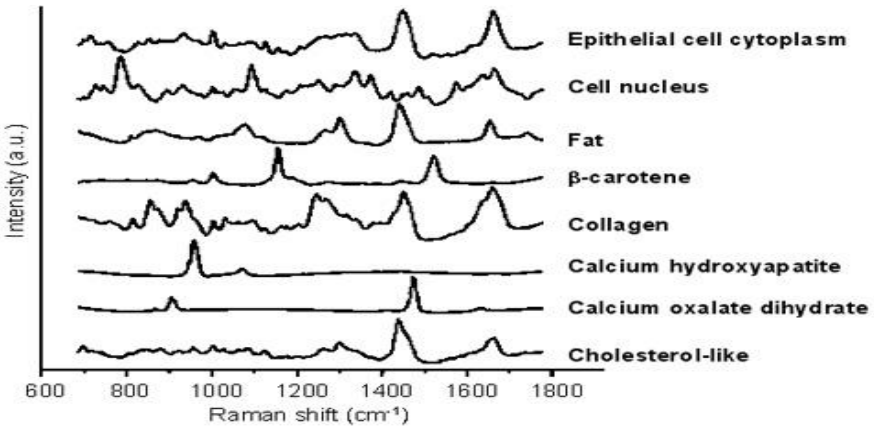
Εικ.21 Μπλε φάσμα:υγιής ιστός σιελογόνου αδένα.Κόκκινο φάσμα:καρκινικός ιστός σιελογόνου αδένα

Κεφάλαιο 4: Σχόλια και συμπεράσματα

4.1 Σύγκριση υγιούς-καρκινικού ιστού

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η μελέτη υγιών και καρκινικών ιστών μαστού μέσω φασματοσκοπίας Raman και η εξαγωγή συμπερασμάτων για την αποτελεσματικότητα της μεθόδου αυτής ως διαγνωστική τεχνική καρκίνου του μαστού.

Για να προβούμε σε ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη συλλογή των φασμάτων αυτής της εργασίας, θα πρέπει πρώτα να αναφέρουμε ότι υπό την παρουσία καρκίνου, τα συστατικά του ιστού που μεταβάλλονται περισσότερο και πιο εμφανώς, τόσο σε περιεκτικότητα όσο και σε σύσταση, είναι τα λιπίδια και τα καροτενοειδή. Τα καροτενοειδή αποτελούν φυσικές χρωστικές και μπορούν να παραχθούν από λιπίδια ή από άλλα βασικά μεταβολικά δομικά στοιχεία των οργανισμών. [22]Η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τα συστατικά που μεταβάλλονται στον ιστό και συνεπώς και στο χαρακτηρισμό του εκάστοτε ιστού σε υγιή ή καρκινικό, βασίζεται στην ανάλυση και ταυτοποίηση των κορυφών του με βιβλιογραφικά δεδομένα. Παρακάτω παρουσιάζονται οι κορυφές που διακρίνονται στα φάσματα που ελήφθησαν πειραματικά και παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο 3, καθώς και οι κορυφές που ελήφθησαν από άλλες μελέτες και για εμάς θα αποτελέσουν δεδομένα σύγκρισης. Για την ταυτοποίηση θα χρειαστεί εκτός από τη βιβλιογραφία που αναφέρεται, και το παρακάτω διάγραμμα το οποίο απεικονίζει τα φάσματα βασικών συστατικών που συναντώνται και στον μαστικό ιστό.



Εικ.22 Φάσματα Raman βασικών συστατικών του μαστού[23]

Κορυφές υγιούς ιστού:

840cm^{-1}, 917,63 cm^{-1},1081,2 cm^{-1} ,1150 cm^{-1},1259,3cm^{-1}, 1299 cm^{-1}, 1450 cm^{-1}, 659,4 cm^{-1}, 2852,6 cm^{-1}, 3009,2 cm^{-1}, 3012,3 cm^{-1}

Βιβλιογραφικές κορυφές υγιούς ιστού:[9], [24], [25]

877 cm^{-1},1004 cm^{-1},1080 cm^{-1},1150 cm^{-1},1158 cm^{-1},1266 cm^{-1},1304 cm^{-1},1444 cm^{-1}, 1518 cm^{-1},1660 cm^{-1},1750 cm^{-1},2674 cm^{-1},2727 cm^{-1},2854 cm^{-1},2888 cm^{-1}, 2926 cm^{-1}, 3009 cm^{-1}

Όπως παρατηρούμε, υπάρχει ταυτοποίηση των κορυφών που λάβαμε πειραματικά με τις κορυφές που παρατηρούνται από άλλες ομάδες βιβλιογραφικά. Οι κορυφές που ταυτίζονται είναι 840 cm^{-1},1081,2cm^{-1} , 1150 cm^{-1},1259,3 cm^{-1} ,1299 cm^{-1}, 1450 cm^{-1}, 1659 cm^{-1}, 2852,6 cm^{-1}, 3009 cm^{-1}.

4.1.1 Χαρακτηρισμός ταυτοποιημένων κορυφών υγιούς ιστού [24], [25]

3009 cm^{-1}: C-H δεσμός προσδεδεμένος στον C=C

2854cm^{-1}: συμμετρικός δεσμός CH_2 της αλκυλικής λιπιδικής αλυσίδας

1660 cm^{-1}: C=C stretching mode στον ακόρεστο δεσμό των λιπιδίων

1444 cm^{-1}: CH_2 scissoring vibration των λιπιδίων

1259 cm^{-1}: ασύμμετρος PO_2- stretching modes των φωσφολιπιδίων

1150 cm^{-1},1520 cm^{-1}: stretching vibration των καροτενοειδών

1080 cm^{-1}: συμμετρικός PO_2- stretching modes των φωσφολιπιδίων

1180cm^{-1}: β-καροτίνη

830cm^{-1}: κολλαγόνο

Κορυφές καρκινικού ιστού:

840 cm^{-1}, 918,26 cm^{-1},1095,9 cm^{-1},1259 cm^{-1}, 1451,8 cm^{-1}, 1661,6cm^{-1},1750 cm^{-1}, 2853 cm^{-1}, 2899,2 cm^{-1}, 2937,8 cm^{-1}, 2966 cm^{-1}

Βιβλιογραφικές κορυφές καρκινικού ιστού:[9],[24],[25]

558 cm^{-1},1098 cm^{-1},1004 cm^{-1},1259 cm^{-1},1444 cm^{-1},1660 cm^{-1}, 2854 cm^{-1}, 2888 cm^{-1}, 2926 cm^{-1}, 2940 cm^{-1}, 3009 cm^{-1}, 3311 cm^{-1}

Οι κορυφές που ταυτοποιούνται με τη βιβλιογραφία είναι οι 1095,9 cm^{-1},1259cm^{-1}, 1451,8 cm^{-1},1661,6 cm^{-1}, 2853 cm^{-1}, 2899,2 cm^{-1}, 2937,8 cm^{-1}, 2966 cm^{-1}

4.1.2 Χαρακτηρισμός ταυτοποιημένων κορυφών καρκινικού ιστού[24],[25]

2854cm^{-1}: συμμετρικός δεσμός CH_2 της αλκυλικής λιπιδικής αλυσίδας

1750 cm^{-1}:καρβονυλ-εστέρας C=O stretch των λιπιδίων

1660 cm^{-1}:C=C stretching mode στον ακόρεστο δεσμό των λιπιδίων

1660 cm^{-1},1750 cm^{-1}, 2854 cm^{-1}, 2888 cm^{-1}, 2926 cm^{-1}: λιπίδια

1259 cm^{-1}:ασύμμετρος PO_2- stretching modes των φωσφολιπιδίων

1450 cm^{-1},1630 cm^{-1}: κολλαγόνο

Με μια πρώτη σύγκριση, μεταξύ υγιούς και καρκινικού ιστού παρατηρείται ένα σύνολο κορυφών που ταυτίζονται αριθμητικά αλλά διαφέρουν σε ένταση. Τα καρκινικά δείγματα παρουσιάζουν εμφανώς εξασθενημένες τις κορυφές αυτές σε σχέση με τα αντίστοιχα υγιή δείγματα. Επίσης, υπάρχουν και κορυφές, κυρίως στην περιοχή των 2800cm^{-1}- 2900 cm^{-1}, όπου ενώ εμφανίζονται στα υγιή δεν συναντώνται στα καρκινικά ή και αντίστροφα. Αυτό παρατηρείται λόγω διαφορετικής σύστασης των λιπιδίων, τα οποία εμφανίζουν κορυφές στην περιοχή αυτή των κυματαριθμών. Όπως δείχνουν τα αποτελέσματα των μετρήσεων, οι πιο εμφανείς διαφορές μεταξύ υγιών και καρκινικών ιστών μπορούν να αποδοθούν στη βιοχημική σύσταση και συμβολή των καροτενοειδών (1150cm^{-1} και 1520 cm^{-1}) και των λιπιδίων (2800 cm^{-1}-3000 cm^{-1}). Στους υγιείς ιστούς, τα καροτενοειδή δίνουν κορυφές υψηλής έντασης σε αντίθεση με τους καρκινικούς ιστούς, στους οποίους δεν δίνουν καθόλου κορυφές.

Ο υγιής ιστός αποτελείται από αδενικό και λιπιδικό ιστό, με τον δεύτερο να επικρατεί σε μεγαλύτερο ποσοστό. [18]Ο αδενικός ιστός αποτελείται από μικροσκοπικούς σωλήνες με επένδυση από επιθηλιακά κύτταρα και με μία υποστηρικτική εξωκυττάρια μήτρα που έχει ως κύριο συστατικό το κολλαγόνο

(830cm^{-1}). Για αυτό το λόγο, οι κορυφές που εμφανίζουν τα φάσματα των αδένων των υγιών ιστών της μελέτης αυτής, δεν αντιστοιχούν σε λιπίδια αλλά σε κολλαγόνο και πρωτεΐνες (Εικ.10) .Ο λιπώδης ιστός συνίσταται κυρίως από λιποκύτταρα, τα οποία είναι κύτταρα που περιέχουν μεγάλες ποσότητες κυτταροπλασματικού λίπους, και έχει επίσης εξωκυττάρια μήτρα. Οι μικροσκοπικοί σωλήνες που αναφέρθηκαν, συνολικά αντιπροσωπεύουν μόνο έναν πολύ μικρό όγκο του ιστού και για αυτό το λόγο, τα υπό μελέτη δείγματα είναι σαν να αποτελούνται από λίπος με μικρές συνεισφορές από κολλαγόνο. Οι συνεισφορές από το λίπος είναι ιδιαιτέρως εμφανείς, (2800 cm^{-1}-2900 cm^{-1}) καθώς οι λιπώδεις ιστοί εμφανίζουν μεγάλη ενεργό διατομή σε σχέση με άλλα στοιχεία. Τα δείγματα δεν δείχνουν συνεισφορά από επιθηλιακά κύτταρα όπως φαίνεται και αν συγκρίνουμε τα φάσματά μας με την (Εικ.10), το οποίο συμβαίνει καθώς τα κύτταρα αυτά είτε δεν υπάρχουν σε επαρκείς ποσότητες είτε δεν έχουν αρκετά ισχυρή ενεργό διατομή σκέδασης Raman.

Για τα καρκινικά δείγματα, τα φάσματα παρουσιάζουν μια διαφορετική χημική μορφολογία και σύσταση από τα υγιή δείγματα. Παρατηρείται αύξηση του κολλαγόνου, αποτέλεσμα που συμβαδίζει με την μέχρι τώρα γνωστή παθολογία του μαστού. Σύμφωνα με την παθολογία του μαστού, η παρουσία κακοηθειών συνοδεύεται από ίνωση, μία διαδικασία που χαρακτηρίζεται από πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και συσσώρευση κολλαγόνου.[25] Η σχετική αύξηση σε κολλαγόνο εκδηλώνεται περισσότερο στην ινοκυστική αλλαγή, μια άλλη, καλοήθη αυτή τη φορά, περίπτωση που συνεπάγεται και δημιουργία ίνωσης, αδένωσης ή σχηματισμό κύστεων. Η αύξηση του κολλαγόνου διακρίνεται με την παρουσία κορυφών στους 1450cm^{-1} και 1630 cm^{-1}. Επίσης, παρατηρείται μια διαφορετική κατανομή λιπιδίων κυρίως στην περιοχή 2850 cm^{-1}-3000 cm^{-1}, όπου πάλι βέβαια, έχουμε στα φάσματα το χαρακτηριστικό «σκαλοπάτι» σε αυτό το εύρος κυματαριθμών.

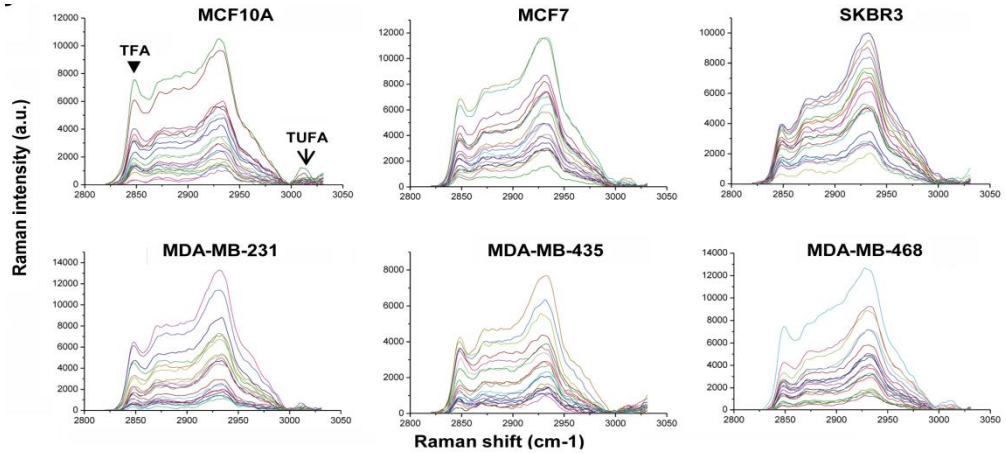
4.2 Ο ρόλος των λιπιδίων στον καρκίνο του μαστού

Αλλαγές στη μεταβολική διαδικασία των λιπιδίων έχει παρατηρηθεί σε πολλές μορφές καρκίνου. [26]Τα λιπίδια εμπλέκονται στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης (differentiation), της απόπτωσης, της φλεγμονής, της κινητικότητας και της ομοιόστασης της μεμβράνης.

Η βιοσύνθεση των λιπιδίων γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να ενισχύεται η ομοιόσταση και να προλαμβάνεται η άσκοπη δαπάνη ενέργειας. Η λιπιδική βιοσύνθεση είναι στενά συνδεδεμένη με ρυθμιστικές οδούς μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η σωστή ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός των κυττάρων ενός οργανισμού. Σε περιπτώσεις καρκίνου, αυτές οι ρυθμιστικές οδοί φαίνονται να απορρυθμίζονται.

Σε αυτό το σημείο, πρέπει να αναφέρουμε την πρωτεΐνη HER/2 neu η οποίο είναι μέρος της οικογένειας των ανθρώπινων EGFR (Epidermal growth factor receptor), [27] , δηλαδή κάποιων υποδοχέων που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου. Στους υποδοχείς αυτούς, προσδένονται οι αντίστοιχοι αυξητικοί παράγοντες, που ονομάζονται EGF (Epidermal growth factor)[28], με αποτέλεσμα να ενισχύεται ο πολλαπλασιασμός και η ανάπτυξη του κυττάρου. Ενίσχυση ή υπερέκφραση του ογκογονιδίου HER/2 neu δείχνει να κατέχει σημαντική ευθύνη για την ανάπτυξη και εξέλιξη κάποιων επιθετικών τύπων καρκίνων του μαστού, σε ποσοστό 20-25% του συνόλου των περιπτώσεων. Τα τελευταία χρόνια, η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί βιολογικό δείκτη για την ύπαρξη ή μη καρκίνου σε κάποιο ιστό. Έχει παρατηρηθεί ότι η υπερέκφραση του γονιδίου HER/2 neu παρέχει έναν λιπογόνο φαινότυπο και σχετίζεται και με μεγάλη πιθανότητα επανεμφάνισης της ασθένειας. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφέρουμε ότι η απόκτηση ενός λιπογόνου φαινότυπου από ένα HER/2 neu σε υγιή επιθηλιακά κύτταρα δείχνει ότι μπορεί κάποιες από τις ίδιες ρυθμιστικές οδούς που ρυθμίζουν τη λιπογένεση στα λιποκύτταρα και στην ηπατική στεάτωση να είναι ενεργά και στο HER/2 των καρκινικών κυττάρων.

Τα καρκινικά κύτταρα μέσα σε στερεούς όγκους συνθέτονται από μικροπεριβάλλοντα που συχνά χαρακτηρίζονται από συνθήκες στρες συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης οξύτητας, ήπια έως σοβαρή υποξία και κυμαινόμενη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών.



Εικ.23 Φάσματα καρκίνου μαστού σε διαφορετικές κυτταροσειρές [24]

Στην Εικ. 20 χρησιμοποιήθηκαν οι έννοιες TFA (Total fatty acids) και TUFA (Total unsaturated acids), που αποτελούν λιπίδια που εμφανίζονται σε κορυφές των φασμάτων των καρκινικών ιστών στην περιοχή 2800cm^{-1}.

Έχει φανεί ότι κάτω από ήπιες συνθήκες στρες, το UPR/ER-stress είναι μια πολύ σημαντική διαδικασία για την επιβίωση των κυττάρων και δραστηριοποιείται σε ένα εύρος καρκινικών όγκων, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού. Η δραστηριοποίηση της διαδικασίας αυτής έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη των μεταγραφικών προγραμμάτων που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων. Μελετώντας, λοιπόν, την ύπαρξη καρκίνου σε ένα ιστό μαστού, μία κατάσταση ιδιαίτερα έντονου στρες, παρατηρούμε τη δημιουργία γλυκόζης και λιπιδίων.

Όταν αναφέρουμε την διαδικασία UPR (Unfolded protein response) εννοούμε όλες εκείνες τις μοριακές αλλαγές που θα πρέπει να υποστούν τα κύτταρα ως απάντηση στις εξωτερικές αλλαγές και σχετίζονται με το ενδοπλασματικό δίκτυο και τις πρωτεΐνες που ξετυλίγονται μέσα σε αυτό. Η διαδικασία αυτή μπορεί να λειτουργήσει σε συνεννόηση με ογκογόνες γενετικές αλλοιώσεις για να τελειοποιήσουν το μεταβολισμό, διατηρώντας τις προϋποθέσεις για ισχυρό κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε εχθρικό περιβάλλον.

4.3 Ανάλυση φασμάτων με διαφορετικές παραμέτρους

Σε αυτό το μέρος του κεφαλαίου θα γίνει η σύγκριση των φασμάτων που μπορούν να ληφθούν από τα δείγματά μας, υγιών και μη, διατηρώντας μία παράμετρο και μεταβάλλοντας την άλλη. Οι παράμετροι που παίζουν σημαντικό ρόλο στη δική μας μελέτη είναι η ισχύς ακτινοβολίας και ο χρόνος ολοκλήρωσης της μέτρησης. Θα πρέπει να σημειώσουμε ότι για να έχουμε μία ακριβή σύγκριση των μετρήσεων για να ελέγξουμε τις παραμέτρους αυτές, διατηρήσαμε τη εξεταζόμενη θέση στο δείγμα αμετάβλητη για κάθε σύγκριση.

Όπως παρατηρείται από τα φάσματα των υγιών ιστών, τόσο για χρόνο ολοκλήρωσης 120sec όσο και 60sec και για ισχύ ακτινοβολίας 0,25mW, 0,5 mW, 1 mW, 1,5 mW και 1 mW, 1,5 mW, αντίστοιχα, έχω λιγότερο θόρυβο μέτρησης στη μεγαλύτερη ισχύ κάθε φορά. Αντίστοιχα, για σταθερή ισχύ και για διαφορετικούς χρόνους, παρατηρούμε λιγότερο θόρυβο μετρήσεων για μεγαλύτερο χρόνο.

Ο πιο ιδανικός συνδυασμός για ελαχιστοποίηση του θορύβου και μεγιστοποίηση του σήματος, θα ήταν μεγάλη ισχύς με μεγάλο χρόνο. Ωστόσο κάτι τέτοιο δεν θα ήταν χρήσιμο και αποτελεσματικό για μία βιοϊατρική εφαρμογή της φασματοσκοπίας Raman σαν και αυτή που μελετάμε στην παρούσα εργασία, καθώς μία in vivo εξέταση με αυτές τις παραμέτρους, θα ήταν άκρως επιβλαβής για τον ασθενή. Αυτό, λοιπόν, που πρέπει να παρατηρηθεί σε αυτό το σημείο είναι ότι παρόλο που υπάρχει μια αύξηση του θορύβου στις μετρήσεις με χαμηλό χρόνο και χαμηλή ισχύ, ωστόσο η διαφορά είναι πολύ μικρής τάξης και δεν αλλοιώνει το αποτέλεσμα των μετρήσεων, ούτε ποσοτικά ούτε ποιοτικά, δηλαδή ούτε στα σημεία που βρίσκονται οι κορυφές ούτε στην έντασή τους.

Με πολλαπλές δοκιμές και λήψεις φασμάτων, στο δικό μας σύστημα Raman, το κλάσμα Signal/Noise, δηλαδή Σήμα/Θόρυβο, για το οποίο οριακά ο θόρυβος μας αλλοιώνει το σήμα, παρουσιάστηκε ως εξής:

Για ισχύ ακτινοβολίας 0,25mW, $\frac{Signal}{Noise} \approx 2$ για χρόνο 5sec για 2 κύκλους

και $\frac{Signal}{Noise} \approx 3$ για χρόνο 3sec για 2 κύκλους

Για ισχύ ακτινοβολίας 0,5sec, $\frac{Signal}{Noise} \approx 2$ για χρόνο 3sec για 2 κύκλους

και $\frac{Signal}{Noise} \approx 3$ για χρόνο 2sec για 2 κύκλους

4.4 Ανάλυση αποτελεσμάτων διαφορετικών ειδών υγιών ιστών

Στο προηγούμενο κεφάλαιο, παρατέθηκαν τα φάσματα από 4 είδη υγιών ιστών, καθώς και βιβλιογραφικά δεδομένα για τα φάσματα που έχουν ληφθεί από άλλες ερευνητικές μελέτες των ιστών αυτών. Τα είδη που εξετάστηκαν είναι: πάγκρεας, δέρμα, σιελογόνος αδένας και λίπος μήτρας. Πρέπει να αναφερθεί ότι σε αυτή την εργασία δεν ήταν το κεντρικό αντικείμενο μελέτης αυτών των ιστών, ωστόσο παρατίθεται αυτή η μικρή σύγκριση των υγιών ιστών για να πάρουμε μια πρώτη εκτίμηση για το αν θα ήταν εφικτό να διακριθούν διαφορετικοί ιστοί μέσω της φασματοσκοπίας Raman.

Ταυτοποιώντας κορυφές πειραματικών και βιβλιογραφικών φασμάτων προκύπτει:

Είδος ιστού	**Πειραματικές κορυφές (cm^{-1})**	**Βιβλιογραφικές κορυφές (cm^{-1})**
Δέρμα	840	852 (πρωτεΐνες)
	922	938(πρωτεΐνες)
	1261	1262(Amide III)
	1300	1301 (λιπίδια)
	1439	1445 (πρωτεΐνες, λιπίδια)
	1661	1655 (πρωτεΐνες-AmideI)
Πάγκρεας	849	832 (DNA)
	1250	1258 (λιπίδια-Amide III)
Λίπος μήτρας	972	970
	1263	1260 (κολλαγόνο)
	1302	1300 (DNA)
	1443,4	1400-1470 (πρωτεΐνες, λιπίδια)
	1659	1600-1670 (λιπίδια)
Σιελογόνος αδένας	840	860
	972	980
	1264	1257
	1358	1343

Από τον παραπάνω συγκριτικό πίνακα προκύπτει ότι μεταξύ δειγμάτων υγιών ιστών διαφορετικού είδους, μπορούμε να παρατηρήσουμε διαφοροποιήσεις αρκετά εμφανείς, οι οποίες στηρίζονται κυρίως στη σύσταση και την ποσότητα των λιπιδίων και των πρωτεϊνών.

4.5 Συμπεράσματα

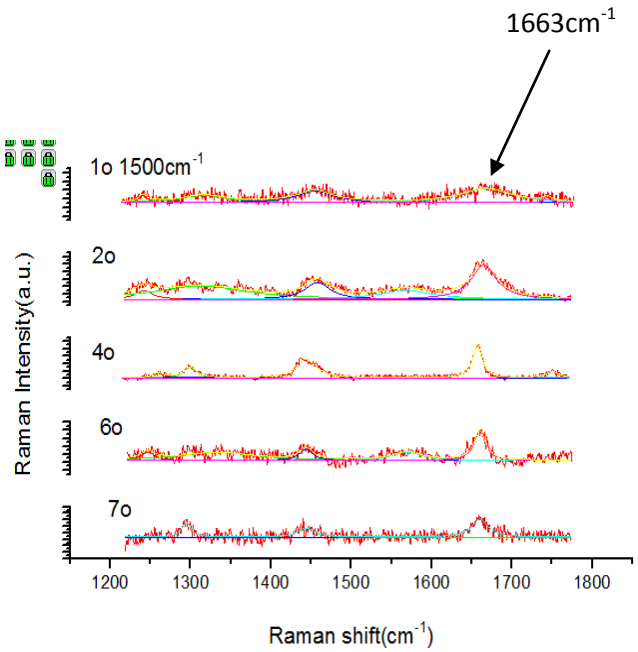
Έπειτα από την παραπάνω παράθεση αποτελεσμάτων και του αντίστοιχου σχολιασμού, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η φασματοσκοπία Raman φαίνεται να είναι αρκετά ελπιδοφόρα στον τομέα της διάγνωσης του καρκίνου. Τόσο το αντικείμενο της κύριας μελέτης μας, το οποίο είναι ο καρκίνος του μαστού, αλλά και οι υγιείς ιστοί διαφορετικών είδους, όπως πάγκρεας, δέρμα, σιελογόνος αδένας και λίπος μήτρας, οι οποίοι εξετάστηκαν σε μικρή κλίμακα και σε μικρό στατιστικό δείγμα, παρουσίασαν φάσματα τα οποία μπορούν να δώσουν έναν αρκετά έγκυρο χαρακτηρισμό του είδους τους και της κατάστασής τους, υγιούς ή καρκινικής.

Μία διάγνωση καρκίνου του μαστού μέσω φασματοσκοπίας Raman έγκειται στη διαφοροποίηση τόσο της σύστασης όσο και της περιεκτικότητας κυρίως των λιπιδίων και των πρωτεϊνών στον υγιή και στον καρκινικό ιστό. Το ίδιο συμβαίνει και όσον αφορά τη διάκριση μεταξύ των διαφορετικών ειδών υγιούς ιστού. Αρκετά ελπιδοφόρο, επίσης, είναι και το ότι τα αποτελέσματα που λήφθηκαν κυρίως για την περίπτωση των υγιών- καρκινικών συγκρίσεων, δεν επηρεάστηκαν σχεδόν καθόλου από την αλλαγή των παραμέτρων της ισχύος και του χρόνου φασματοσκόπησης. Αυτό, λοιπόν, επιτρέπει να μπορούν να ληφθούν φάσματα στον ασθενή in vivo, ελαχιστοποιώντας ισχύ και χρόνο, και συνεπώς ελαχιστοποιώντας και τις ανεπιθύμητες παρενέργειες από την ακτινοβολία.

Τέλος, με δυο λόγια για τυχούσες ερευνητικές δουλειές στο ίδιο αυτό θέμα, θα ήταν ιδιαιτέρως χρήσιμο, να εστιαστεί μία μελέτη στο στάδιο της ασθένειας στο οποίο θα ήταν δυνατή η διάγνωση, δηλαδή σε πόσο πρώιμο στάδιο και με πόση ακρίβεια. Επίσης, σε αυτά τα πλαίσια μελέτης, τι εύρος περιοχής θα πρέπει να φασματοσκοπηθεί σε ένα πρώιμο στάδιο καρκίνου και πόσα σημεία μελέτης είναι αρκετά, ώστε να έχουμε έγκυρη διάγνωση χωρίς πιθανότητα λάθους.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Λαμβάνουμε για τα καρκινικά δείγματα μία κορυφή από την δεύτερη φασματική περιοχή των 1500cm^{-1}, η οποία να είναι σταθερή και να εμφανίζεται και στα 6 δείγματα. Οι λόγοι των εντάσεων για υψηλές συχνότητες, για την περιοχή των 2800cm^{-1}, θα είναι ως προς αυτή την κορυφή για να υπάρχει ένα μέτρο σύγκρισης.



Διαγ.1 Όλα τα καρκινικά δείγματα /1500cm^{-1}

Τα εμβαδά Α και συνεπώς οι εντάσεις Ι για την κορυφή αυτή είναι οι εξής:

Δείγμα 1: $A_1=I_1=3878,4986$

Δείγμα 2: $A_1=I_1=5541,55151$

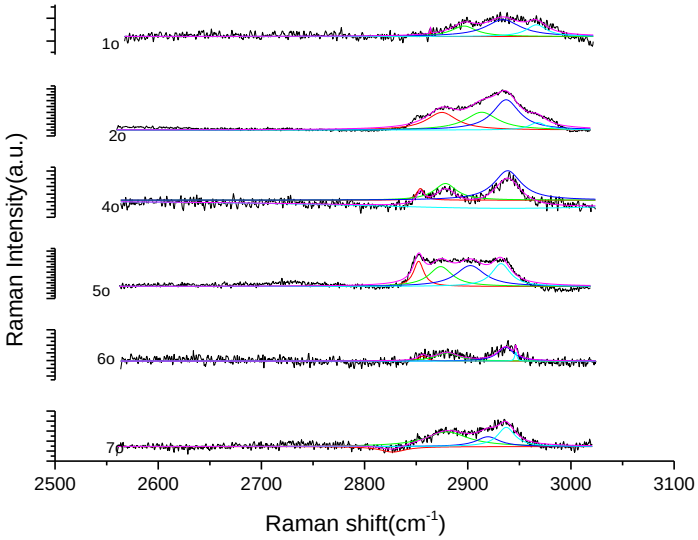
Δείγμα 4: $A_1=I_1=4785,90677$

Δείγμα 5: $A_1=I_1=2949,41538$

Δείγμα 6: $A_1=I_1=2008,80756$

Δείγμα 7: $A_1=I_1=1090,304$

Αντίστοιχα, για την Τρίτη φασματική περιοχή έχουμε:



Διαγ.2 Όλα τα καρκινικά δείγματα /2800cm^{-1}

Αναλύοντας τις εντάσεις των λιπιδίων στην περιοχή των 2850-3000cm^{-1}, έχουμε για τα αντίστοιχα εμβαδά-εντάσεις:

Δείγμα 1°: $A_2=I_2=18,9379$

$A_3=I_3=1052,26661$

$A_4=I_4=1353,0481$

$A_5=I_5=961,57351$

Δείγμα 2°: $A_2=I_2=8272,76594$

$A_3=I_3=9009,74479$

$A_4=I_4=12678,96708$

$A_5=I_5=1975,18446$

Δείγμα 4°: $A_2=I_2=420,38728$

$A_3=I_3=1797,47701$

$A_4=I_4=3834,67886$

$A_5=I_5=-12793,48211$

Δείγμα 5°: $A_2=I_2=4496,61656$

$A_3=I_3=8070,58417$

$A_4=I_4=10549,00878$

$A_5=I_5=7514,87246$

Δείγμα 6°: $A_2=I_2=188,93414$

$A_3=I_3=880,30821$

$A_4=I_4=1076,13495$

$A_5=I_5=91,27933$

Δείγμα 7°: $A_2=I_2=-515,3712$

$A_3=I_3=2293,55168$

$A_4=I_4=836,28763$

$A_5=I_5=1229,99479$

Υπολογίζουμε τους λόγους των εντάσεων των κορυφών 2,3,4,5 ως προς την κορυφή 1.

Δείγμα 1:

$I_2/I_1=$ 0,0048

$I_3/I_1=$ 0,2713

$I_4/I_1=$ 0,3488

$I_5/I_1=$0,2479

<u>Δείγμα 2</u>:

$I_2/I_1=$ 1,4928

$I_3/I_1=$ 1,6258

$I_4/I_1=$ 2,2879

$I_5/I_1=$0,3564

<u>Δείγμα4</u>:

$I_2/I_1=$ 0,0878

$I_3/I_1=$ 0,3755

$I_4/I_1=$ 0,8012

$I_5/I_1=$ 2,6731

<u>Δείγμα 5</u>:

$I_2/I_1=$1,5247

$I_3/I_1=$ 2,7363

$I_4/I_1=$ 3,5766

$I_5/I_1=$ 2,5479

<u>Δείγμα 6</u>:

$I_2/I_1=$ 0,09405

$I_3/I_1=$ 0,4382

$I_4/I_1=$ 0,5357

$I_5/I_1=$ 0,0454

Δείγμα 7:

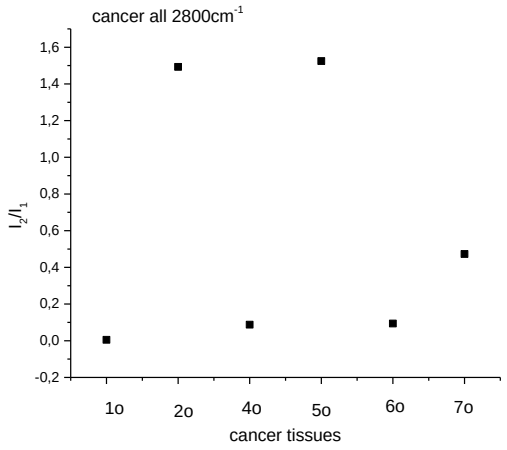
I_2/I_1= 0,4726

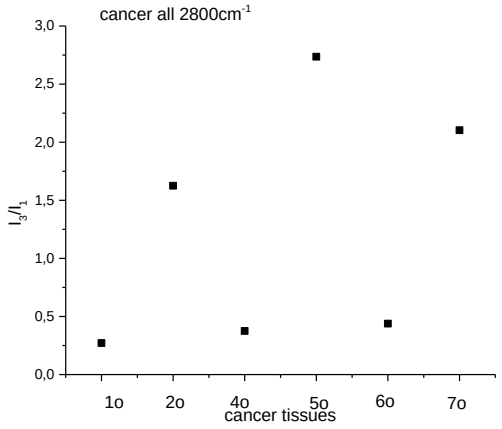
I_3/I_1=2,1035

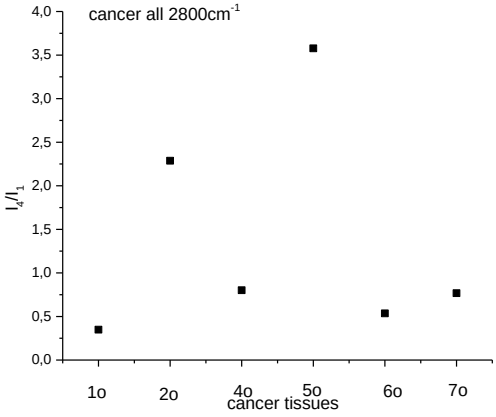
I_4/I_1= 0,7671

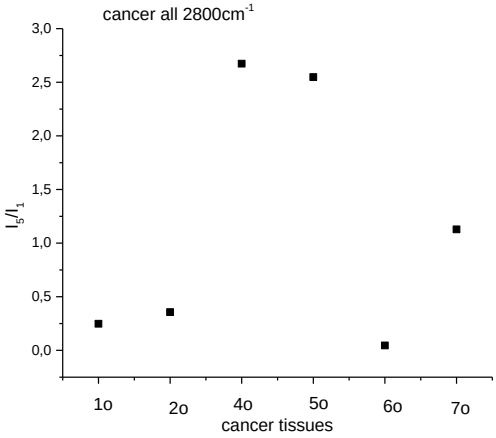
I_5/I_1= 1,1281

Στη συνέχεια δημιουργούμε διάγραμμα των λόγων των εντάσεων για κάθε δείγμα.

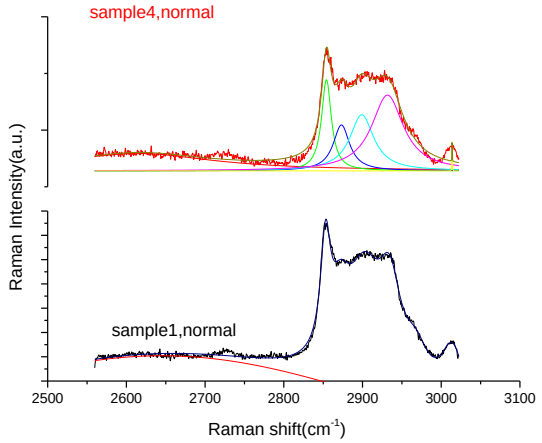




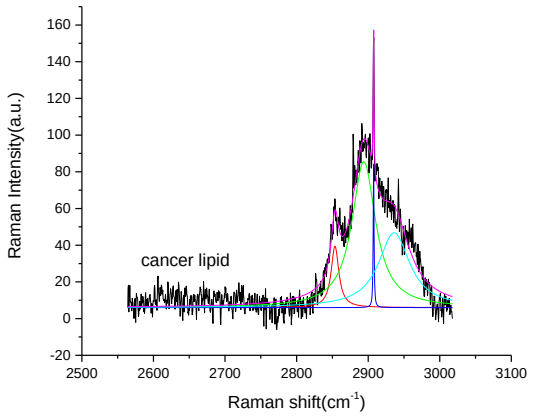




Την ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθούμε και για τους υγιείς ιστούς όπου όμως είχαμε αρκετή συστηματικότητα και στην τρίτη φασματική περιοχή, για αυτό το λόγο θα επιλεχθεί ως σταθερή κορυφή 1, μια κορυφή από την ίδια την τρίτη φασματική περιοχή. Επιλέχθηκε ένα τυπικό διάγραμμα origin για φάσματα 2 δειγμάτων, για το δείγμα 1° και το δείγμα 4° για να δειχθεί η ολοκλήρωση των φασμάτων μέσω πολλαπλών κορυφών. Η ίδια διαδικασία έγινε για όλα τα υγιή δείγματα καθώς και για δείγματα λιπιδικού καρκινικού ιστού.



Διαγ.3 Υγιείς ιστοί /2800cm^{-1}



Διαγ.4 Λιπιδικός ιστός /2800cm^{-1}

Τα αποτελέσματα από την ολοκλήρωση όλων των δειγμάτων έχει ως εξής:

Λιπιδικός ιστός/1^{η} μέτρηση

A_1=5193,2973 I_3/I_2= 1,02451

A_2=2837,66556 I_4/I_2=0,51082

A_3=2907,21294

A_4=1449,53689

Υγιής ιστός/ 1^{η} μέτρηση

A_1=4588,26108 I_3/I_2= 0,76629

A_2=3837,88502 I_4/I_2=1,84653

A_3=2940,96553

A_4=7086,76949

Σύγκριση όλα τα υγιή δείγματα

<u>Δείγμα 5</u>

A_1=11015,83967 I_2/I_1= 1,079771

A_2=11894,59186 I_3/I_1= 1,799646

A_3=19824,62005 I_4/I_1= 1,45858

A_4=16067,48546

<u>Δείγμα 6/1η μέτρηση</u>

A_1=16447,93072 I_2/I_1=0,90392

A_2=14867,73832 I_3/I_1= 1,77757

A_3=29237,47275 I_4/I_1= 2,318418

A_4=38133,19369

<u>Δείγμα 6 /2η μέτρηση</u>

A_1=84506,72846 I_2/I_1=0,98239

A_2=83018,6867 I_3/I_1= 2,10683

A_3=178041,97994 I_4/I_1= 2,59538

A_4=219327,15224

<u>Δείγμα 1</u>

A_1=21063,80124 I_2/I_1=1,170204

A_2=24648,95641 I_3/I_1= 3,461224

A_3=72906,53938 I_4/I_1= 1,850403

A_4=38976,53639

Δείγμα 4

A_1=12378,14055 I_2/I_1=1,16405

A_2=14408,78917 I_3/I_1= 2,739004

A_3=30322,17905 I_4/I_1= 2,44965

A_4=33903,77928

Δείγμα 4/2η μέτρηση

A_1=9451,39355 I_2/I_1=0,84762

A_2=8011,24752 I_3/I_1= 2,7221

A_3=14353,80395 I_4/I_1= 1,51869

A_4=25727,90662

Λιπιδικός ιστός

A_1=678,371 I_2/I_1=7,3757

A_2=5003,48273 I_3/I_1=0,2498

A_3=169,52224 I_4/I_1=4,9970

A_4=3389,84917

ΣΦΑΛΜΑΤΑ

ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ

$$S^2 = \frac{1}{n}\sum_{1}^{n}(x_i - \bar{x}_i)^2$$

Λιπιδικός –υγιής ιστός

ΜΕΣΕΣ ΤΙΜΕΣ

$I_3/I_2=0,895$

$I_4/I_2=1,178$

Και ΑΠΟΚΛΙΣΕΙΣ

$S(I_3/I_2)=0,12$

$S(I_4/I_2)=0,66$

Όλα τα υγιή δείγματα

ΜΕΣΕΣ ΤΙΜΕΣ

$I_2/I_1=1,02$

$I_3/I_1=2,17$

$I_4/I_1=2,27$

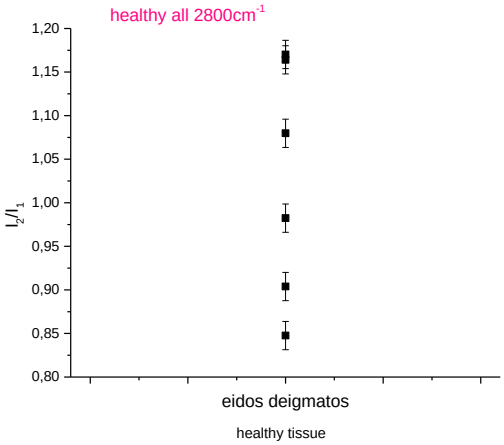
Και ΑΠΟΚΛΙΣΕΙΣ

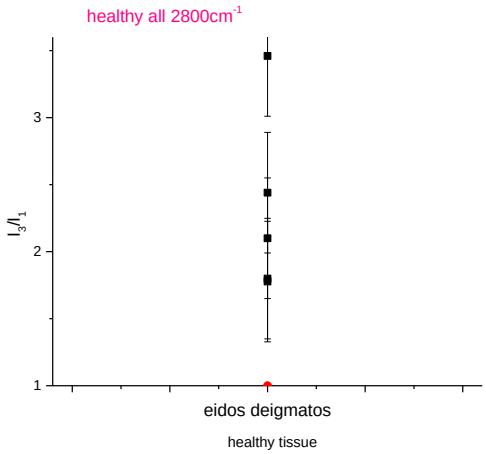
$S(I_2/I_1)=0,12$

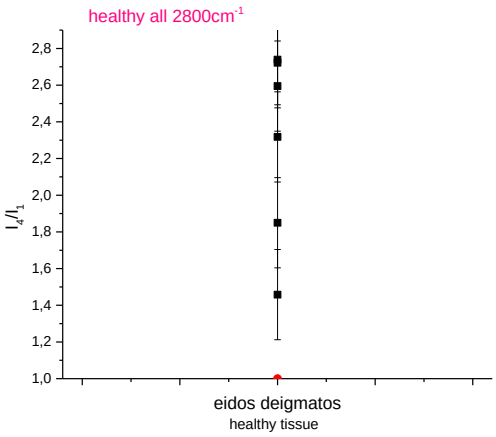
$S(I_3/I_1)=0,64$

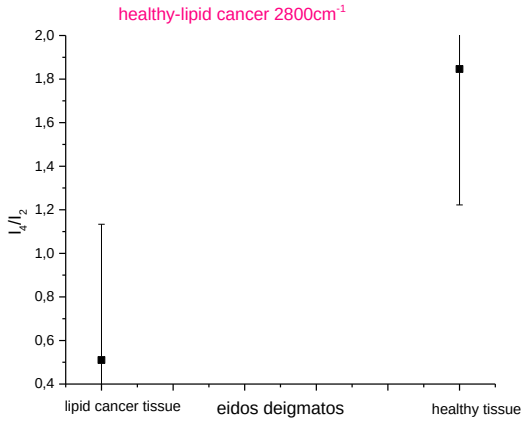
$S(I_4/I_1)=0,47$

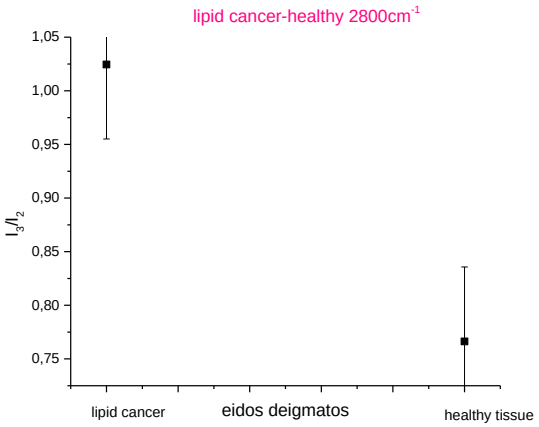
Τα αντίστοιχα διαγράμματα που προκύπτουν για τους λόγους των εντάσεων συναρτήσει των ειδών των δειγμάτων είναι:


healthy all 2800cm-1
1,20
1,15
1,10
1,05
1,00
0,95
0,90
0,85
0,80
I2/I1
eidos deigmatos
healthy tissue


healthy all 2800cm-1
3
2
1
I3/I1
eidos deigmatos
healthy tissue


healthy all 2800cm-1
2,8
2,6
2,4
2,2
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
I4/I1
eidos deigmatos
healthy tissue


healthy-lipid cancer 2800cm-1
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
I4/I2
lipid cancer tissue
eidos deigmatos
healthy tissue


lipid cancer-healthy 2800cm-1
1,05
1,00
0,95
0,90
0,85
0,80
0,75
I3/I2
lipid cancer
eidos deigmatos
healthy tissue

Αναφορές

[1] C.V. Raman and K.S. Krishnan, Nature 121, 501 (1928)

[2] D.A. Long, in "Raman Spectroscopy, Mc Graw-Hill, London (1976)

[3]http://en.wikipedia.org/wiki/Raman_spectroscopy#/media/File:Raman_energy_levels.svg

[4]http://en.wikipedia.org/wiki/Raman_spectroscopy#/media/File:Raman_energy_levels.svg

[5] J. R. Ferraro, K. Nakamoto, “Introductory Raman Spectroscopy”, Academic Press, CA 2002, ISBN: 978-0-12-254105-6

[6] Φυσικής, Τ. (2010). Εθνικό Μετσόβιο πολυτεχνείο

[7] W. Hayes and R. Loudon, John Wiley(1980) Scattering of Light by Crystals, Doi: 10.1063/1.2914020

[8] www.astronomia.org.gr/CCD-cameras.pdf

[9] Surmacki, J., Musial, J., Kordek, R., & Abramczyk, H. (2013). Raman imaging at biological interfaces: applications in breast cancer diagnosis. *Molecular Cancer*, *12*(1), 48. Doi:10.1186/1476-4598-12-48

[10] Σαρρής Φ. Παναγιώτης (2004) Εισαγωγή στην κυτταρική βιολογία και γενετική

[11] http://bionumbers.hms.harvard.edu

[12] www.ib.bioninja.com.au

[13] http://www.horiba.com/in/scientific/products/raman-spectroscopy

[14] Calvin Yu, Shuting Fan, Yiwen Sun, Emma Pickwell-MacPherson.(2012)The potential of terahertz imaging for cancer diagnosis: A review of investigations to date.Pubmed 2(1)33-45. doi: 10.3978/j.issn.2223-4292.2012.01.04.

[15] academia.edu(2009)FTIR Spectroscopy :A New Technique In Cancer Diagnoses

[16] DJ Evers, BHW Hendriks, GW Lucassen & TJM Ruers.(2012)Optical spectroscopy: current advances and future applications in cancer diagnostics and therapy 8(3):307-20. doi: 10.2217/fon.12.15.

[17] A. Smekal(1923) Naturwiss. 11, 873

[18] Haka, A. S., Shafer-Peltier, K. E., Fitzmaurice, M., Crowe, J., Dasari, R. R., & Feld, M. S. (2005). Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(35), 12371–12376. doi:10.1073/pnas.0501390102

[19] Pandya, A. K., Serhatkulu, G. K., Cao, A., Kast, R. E., Dai, H., Rabah, R., … Sarkar, F. H. (2008). Evaluation of pancreatic cancer with Raman spectroscopy in a mouse model. *Pancreas*, *36*(2), e1–e8. doi:10.1097/MPA.0b013e31815a3f1c

[20] Raman heads for the clinic/ http://pubs.acs.org/Chemical and engineering news

[21] Beata Brozek-Pluska,Monika Kopec,Izabela Niedzwiecka, Alina Morawiec-Sztandera (2015)Label-free determination of lipid composition and secondary protein structure of human salivary noncancerous and cancerous tissues by Raman microspectroscopy. *Analyst* ,Issue7, , DOI: 10.1039/C4AN01394H,

[22] https://en.wikipedia.org/wiki/Carotenoid

[23] Haka AS, Volynskaya Z, Gardecki JA, et al. Diagnosing breast cancer using Raman spectroscopy: prospective analysis. *Journal of Biomedical Optics*. 2009;14(5):054023. doi:10.1117/1.3247154.

[24]Nieva C, Marro M, Santana-Codina N, Rao S, Petrov D, Sierra A (2012) The Lipid Phenotype of Breast Cancer Cells Characterized by Raman Microspectroscopy: Towards a Stratification of Malignancy. PLoS ONE 7(10): e46456. doi:10.1371/journal.pone.0046456

[25]Abramczyk, H., Brozek- Pluska, B., Surmacki, J., Jablonska-Gajewicz, J., & Kordek, R. (2012). Raman “optical biopsy” of human breast cancer. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *108*(1-2), 74–81. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2011.10.004

[26] Baumann, J., Sevinsky, C., & Conklin, D. S. (2013). Lipid biology of breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1831*(10), 1509–1517. doi:10.1016/j.bbalip.2013.03.011

[27]https://en.wikipedia.org/wiki/Epidermal_growth_factor_receptor

[28] https://en.wikipedia.org/wiki/Epidermal_growth_factor