



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Άλκηστη Δημακοπούλου

**«ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΤΟΥ
ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ RAMAN»**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

Αθανάσιος Κόντος, Αν. Καθηγητής, ΣΕΜΦΕ, ΕΜΠ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αθανάσιος Κόντος, Αν. Καθηγητής, ΣΕΜΦΕ, ΕΜΠ

Ιωάννης Ράπτης, Καθηγητής, ΣΕΜΦΕ, ΕΜΠ

Ιωάννα Ζεργιώτη, Καθηγήτρια, ΣΕΜΦΕ, ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2022

.....

Άλκηστη Δημακοπούλου

© (2022) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. All rights Reserved. Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σ' αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του ΔΠΜΣ «Μικροσυστήματα και Νανοδιατάξεις» αλλά και εκείνους των προπτυχιακών μαθημάτων που παρακολούθησα στο πλαίσιο των μεταπτυχιακών σπουδών μου. Όλοι με βοήθησαν μεταδίδοντας μου τις απαραίτητες γνώσεις και συνέβαλαν στην προσπάθειά μου.

Ιδιαίτερως, οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον διευθυντή του μεταπτυχιακού, καθηγητή Γιάννη Ράπτη, ο οποίος από τη στιγμή ακόμη της αίτησής μου στο πρόγραμμα, με υποστήριξε και με ενθάρρυνε. Η πόρτα του ήταν πάντα ανοικτή και, όπως και για όλους τους σπουδαστές, ήταν πρόθυμος να λύσει όλων των ειδών τις απορίες. Η γενικότερη καθοδήγησή του ήταν πολύτιμη για μένα.

Ένα ακόμη ιδιαίτερο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στον επιβλέποντα της διπλωματικής μου και συντονιστή του ερευνητικού προγράμματος ΒΙΟΦΑΣΜΑ, αν. καθηγητή Θανάση Κόντο για την άψογη συνεργασία, το πολύ καλό κλίμα, και τον χρόνο που αφιέρωσε. Η άψογη κατάρτισή του, η καθοδήγηση κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, αλλά και το χιούμορ και η αισιοδοξία του, αποτέλεσαν για μένα έμπνευση και εξαιρετική βοήθεια.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Πολύκαρπο Φαλάρα Δ/ντή ερευνών στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» για τη δυνατότητα πρόσβασης και λήψης μετρήσεων στο φασματόμετρο του εργαστηρίου Raman του Τομέα Φυσικοχημείας, στο Ι. Ν. Ν. του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», καθώς και την καθηγήτρια Ιωάννα Ζεργιώτη μέλος της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της διπλωματικής μου.

Θερμές ευχαριστίες στην Δρ. Ελίνα Σπυράτου (Β' Εργαστήριο Ακτινολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ), για την καθοριστική βοήθειά της ιδιαίτερως σε ότι αφορούσε τα δείγματα των ιστών.

Επίσης ευχαριστώ πολύ, την υποψήφια διδάκτορα Μαρία Καρναχωρίτη για την άριστη συνεργασία στα πειράματα και την συνολική βοήθειά της, τον Δρ. Παναγιώτη Κλώνο για το στήσιμο του υπολογιστή μου “εκ βάθρων” και τη βοήθεια στο Origin, το μηχανουργό μας Κώστα Χορμόβα για την βοήθειά του στην κατασκευή της συσκευής ψύξης δειγμάτων καθώς και τους Δρ. Μιχάλη Αρφάνη και Μ. Κουρή.

Τέλος, είναι βέβαιο ότι χωρίς την αμέριστη συμπαράσταση του συζύγου μου Γιάννη Τηλέμαχου, θα μου ήταν πολύ δύσκολο να ολοκληρώσω αυτό το μεταπτυχιακό. Η διαρκής παρότρυνση και ενθάρρυνση αλλά και η απαλλαγή μου από λοιπές υποχρεώσεις, ήταν για μένα ουσιαστική βοήθεια και τον ευχαριστώ πάρα πολύ γι' αυτό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

«Αναγνώριση καρκινικών κυττάρων σε ιστούς του παχέος εντέρου με φασματοσκοπία Raman»

Συγγραφέας: Άλκηστη Δημακοπούλου

Επιβλέπων: Αθανάσιος Κόντος, Αν Καθηγητής, ΣΕΜΦΕ, ΕΜΠ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι η τρίτη πιο συνηθισμένη μορφή κακοήθειας και η δεύτερη πιο θανατηφόρα. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητο να αναπτυχθούν σύγχρονες τεχνικές για τη μη επεμβατική, ασφαλή και ακριβή διάγνωσή του, ούτως ώστε να μπορεί να ανιχνεύεται σε πρώιμο στάδιο και να αντιμετωπίζεται έγκαιρα. Η φασματοσκοπία Raman είναι μια από τις πολλά υποσχόμενες μεθόδους που μπορεί να βοηθήσει όχι μόνο στην έγκαιρη διάγνωση αλλά και στην αποτελεσματικότερη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου. Δεδομένου ότι η κυριότερη αντιμετώπισή του είναι η χειρουργική αφαίρεση, η άμεση εντός του χειρουργείου διάκριση των καρκινικών περιοχών θα επιτρέψει την ακριβή αφαίρεση μόνο του πάσχοντος τμήματος, εξασφαλίζοντας στον ασθενή την καλύτερη δυνατή ποιότητα ζωής. Στο πλαίσιο αυτό κινούνται και οι έρευνες του προγράμματος ΒΙΟΦΑΣΜΑ μέρος του οποίου αποτελεί η παρούσα εργασία. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε 2 φασματομέτρα Raman: 1) στο ΕΜΠ με laser διέγερσης στα 532nm και 2) στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» με laser διέγερσης στα 514,5nm. Τα δείγματα προήλθαν από χειρουργικές επεμβάσεις αφαίρεσης καρκίνου του παχέος εντέρου και του ορθού που πραγματοποιήθηκαν στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικόν». Από συνολικές μετρήσεις σε 160 σημεία (88 σε υγιείς ιστούς και 72 σε καρκινικούς), εδώ παρουσιάζονται ενδεικτικά τα 56 φάσματα με τις μεγαλύτερες εντάσεις (28 υγιή και 28 καρκινικά). Γίνεται διάκριση των φασμάτων που προκύπτουν από υπόλευκες, έντονα λευκές και ερυθρές περιοχές των δειγμάτων. Παρουσιάζονται και αναλύονται οι κύριες κορυφές που εμφανίζονται στις φασματικές περιοχές $900-1750\text{ cm}^{-1}$ και $2800-3200\text{ cm}^{-1}$ και οι διαφορές μεταξύ φασμάτων καρκινικών και υγιών ιστών. Επίσης, παρουσιάζεται η σχεδίαση, η κατασκευή και ο έλεγχος ειδικής ψυκτικής συσκευής βασισμένης σε θερμοηλεκτρικό στοιχείο Peltier, που προσαρμόζεται στο εστιακό επίπεδο του μικροσκοπίου. Η συσκευή επιτρέπει τη θερμοστάτιση του ιστού σε χαμηλές θερμοκρασίες με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η γρήγορη αφύγρανση του ιστού και να παραμένει σταθερή η εστίαση της δέσμης laser κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Η έρευνα αυτή δείχνει ότι η φασματοσκοπία Raman με διέγερση στο ορατό δίνει σημαντικές φασματικές πληροφορίες ειδικά από τις περιοχές αγγείωσης των ιστών παρότι απαιτούνται περαιτέρω έρευνες ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα που θα πιστοποιούν φασματικές διαφορές μεταξύ υγιών και καρκινικών ιστών.

Λέξεις Κλειδιά: Καρκίνος παχέος εντέρου
Φασματοσκοπία Raman
Φωταύγεια ιστών
Θερμοστατούμενες διατάξεις

ABSTRACT

«Identification of cancer cells in colon tissues using Raman spectroscopy»

Author: Alkisti Dimakopoulou

Supervisor: Athanassios G. Kontos, associate professor, SAMPS, NTUA

Colon cancer is the third most common form of malignancy and the second most deadly. Therefore, it is necessary to develop modern techniques for its non-invasive, safe and accurate diagnosis, so that it can be detected at an early stage and treated in a timely manner. Raman spectroscopy is one of the most promising methods that can help not only in the early diagnosis but also in the most effective treatment of colon cancer. Since the main treatment is surgical removal, the immediate in-surgery identification of the cancerous areas will allow the accurate removal of strictly the affected part, ensuring that the patient will maintain the better possible quality of life. BIOPHASMA research program is focusing in this context, and the work presented here is a part of that project. Measurements were performed on 2 Raman spectrometers: 1) at NTUA with laser excitation at 532nm and 2) at NCSR "Demokritos" with laser excitation at 514.5nm. The samples were received from colon and rectal cancer surgeries performed at the University General Hospital "Attikon". Totally 160 regions (88 in healthy tissues and 72 in cancerous) were examined by Raman and the 56 spectra with the highest intensities (28 healthy and 28 cancerous) are presented here. The spectra resulting from pale-white, intense white and reddish regions of the samples are presented separately. The main peaks that appear in the 900-1750 cm^{-1} and 2800-3200 cm^{-1} spectral regions and the differences between the spectra of cancerous and healthy tissues are presented and analyzed. Furthermore, a specialized compact thermostatic device based on a Peltier plate was designed, assembled and tested. The device was used under the microscope for stabilizing the temperature of the tissues in order to avoid focus drift during measurements originating from the tissues dehydration. This research shows that Raman spectroscopy, with excitation in the visible range, gives important spectral information of colorectal tissues especially from the vascularization sites, although further research is needed to draw safe conclusions that will certify spectral differences between healthy and cancerous tissues.

Keywords: Colon cancer
Raman spectroscopy
Fluorescence
thermostatic devices

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Κεφάλαιο 1ο :	Η ασθένεια του καρκίνου.....	8
1.1	Ορισμός και γενικά στοιχεία	8
1.2	Είδη καρκίνου και επιδημιολογία	9
1.3	Αίτια ανάπτυξης καρκίνου.....	9
1.4	Καρκίνος του παχέος εντέρου	10
1.5	Καρκινογένεση και στάδια του καρκίνου	11
1.6	Διάγνωση και θεραπεία	11
Κεφάλαιο 2ο :	Φασματοσκοπία Raman.....	13
2.1	Γενική περιγραφή Φασματοσκοπίας Raman	13
2.2	Το φαινόμενο Raman	14
2.2.1	Κλασική περιγραφή	14
2.2.2	Κβαντική περιγραφή	15
2.3	Πειραματική διάταξη - Φασματοσκόπιο Raman.....	16
2.4	Raman στον καρκίνο	18
2.5	Ερευνητικό πρόγραμμα ΒΙΟΦΑΣΜΑ.....	21
Κεφάλαιο 3ο :	Πειραματικές Διατάξεις και Τεχνικές - Όργανα και συστήματα	23
3.1	Πειραματική διάταξη Τομέα Φυσικής, ΣΕΜΦΕ, ΕΜΠ	23
3.2	Πειραματική διάταξη ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»	26
3.3	Δείγματα ιστών	27
3.3.1	Προέλευση και συντήρηση.....	27
3.3.2	Χειρισμός και προετοιμασία.....	28
3.4	Προβλήματα εστίασης – Κυψελίδα ψύξης.....	30
3.5	Κατασκευή συσκευής ψύξης δειγμάτων	31
3.5.1	Φαινόμενο Peltier	31
3.5.2	Κατασκευή διάταξης	34
Κεφάλαιο 4ο :	Παρουσίαση και Ανάλυση μετρήσεων.....	39
4.1	Φωταύγεια – Υπόβαθρο φασμάτων.....	39
4.1.1	Φωταύγεια ανθρώπινων ιστών.....	39
4.1.2	Υπόβαθρο νερού	41

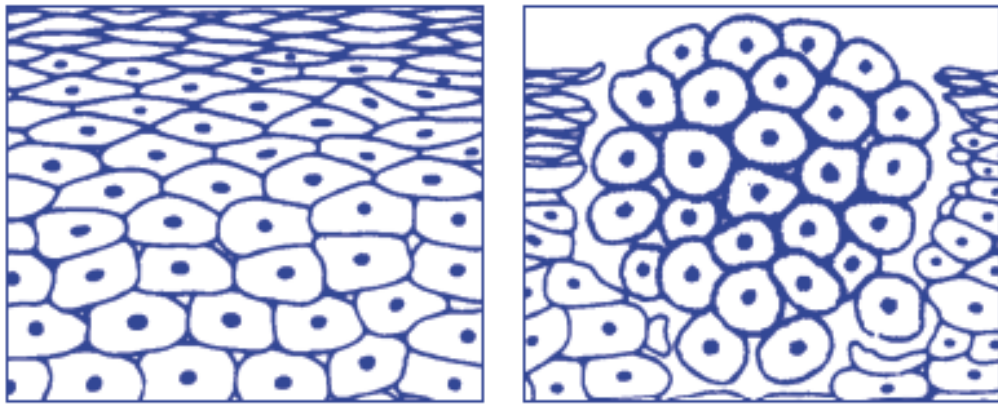
4.2	Μετρήσεις και επεξεργασία φασμάτων από το φασματόμετρο T64000 της Jobin-Yvon στο ΕΜΠ.....	43
4.2.1	Μετρήσεις με το laser διέγερσης των 532 nm	43
4.2.2	Επεξεργασία φασμάτων	44
4.2.3	Αποτελέσματα Σετ 4 και Σετ 5	47
4.2.4	Αποτελέσματα ΣΕΤ 18 με υδατοκαταδυτικό φακό χωρίς ψύξη.....	53
4.2.5	Αποτελέσματα ΣΕΤ 18 με ψύξη (immersive-cold)	62
4.3	Μετρήσεις και επεξεργασία φασμάτων από το φασματόμετρο Renishaw στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»	71
4.3.1	Μετρήσεις με το laser διέγερσης των 514.5 nm.....	71
4.3.2	Επεξεργασία φασμάτων	73
4.3.3	Αποτελέσματα Σετ 5.....	73
4.3.4	Αποτελέσματα Σετ 11	76
4.3.5	Αποτελέσματα Σετ 11 με υδατοκαταδυτικό φακό.....	80
4.3.6	Αποτελέσματα Σετ 18 immersive.....	84
4.4	Συγκεντρωτικά αποτελέσματα.....	93
4.5	Συμπεράσματα.....	100
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	101

Κεφάλαιο 1ο : Η ασθένεια του καρκίνου

1.1 Ορισμός και γενικά στοιχεία

Ο όρος «καρκίνος» ή «καρκίνωμα» ή «νεοπλασία» ή «όγκος» αναφέρεται σε μια μεγάλη ομάδα νοσημάτων η αιτία των οποίων βρίσκεται στο κυτταρικό επίπεδο. Κανονικά, η κυτταρική διαίρεση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων είναι μια απολύτως φυσιολογική διαδικασία, απαραίτητη για την ανάπτυξη και την διατήρηση της καλής υγείας ενός οργανισμού, αφού έτσι μπορεί να μεγαλώνει και να αντικαθιστά τα τραυματισμένα ή νεκρά κύτταρά του. Υπάρχουν όμως φορές που αυτή η διαδικασία διαταράσσεται, όταν μη φυσιολογικά κύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, χωρίς ο οργανισμός να τα χρειάζεται και χωρίς να πεθαίνουν τα παλιά. Τότε σχηματίζονται κυτταρικές μάζες (όγκοι) από αυτά τα πλεονάζοντα, μη φυσιολογικά κύτταρα. [1]

Όλα τα είδη κυττάρων μπορεί να ξεκινήσουν αυτό τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό αν συμβούν αλλαγές στο γενετικό τους υλικό (DNA). Αυτές οι αλλαγές μπορεί να είναι επίκτητες ή και κληρονομικές.



Εικόνα 1: Αριστερά διακρίνονται φυσιολογικά κύτταρα και δεξιά ανώμαλα καρκινικά κύτταρα που σχηματίζουν όγκο. [2]

Τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν μορφολογικά από τα φυσιολογικά. Μπορούν να μεταφερθούν σε νέα σημεία του σώματος μέσω του αίματος ή και του λεμφικού συστήματος και να δημιουργήσουν νέες καρκινικές εστίες (μεταστάσεις). Τα συσσωματώματα των καρκινικών κυττάρων συχνά πιέζουν τους παραπλήσιους ιστούς αλλά και διεισδύουν στα γειτονικά όργανα παρεμποδίζοντας τη φυσιολογική λειτουργία τους. [2]

Η παλαιότερη καταγραφή τέτοιου είδους ασθένειας χρονολογείται το 3000 π. Χ. στην Αίγυπτο. Όμως τον όρο «καρκίνος» τον χρησιμοποίησε πρώτος ο «πατέρας της ιατρικής» Ιπποκράτης (460-370 π. Χ.) πιθανότατα επειδή κάποιες δακτυλόσχημες απολήξεις των καρκινικών μαζών έκαναν το σχήμα του να μοιάζει με του καβουριού. Ο Κέλσος (50-28 π. Χ.) μετέφρασε τον όρο στα Λατινικά «cancer» και πολύ αργότερα ο Γαληνός (130-200 μ. Χ.) χρησιμοποίησε τον όρο «όγκος» από το οίδημα που παρατηρείται

σε αυτές τις περιοχές. [3] Αυτός ο όρος έδωσε και το όνομα στον κλάδο της ιατρικής που ασχολείται με τη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου, την ογκολογία, η οποία διαχωρίζεται σε ιατρική ογκολογία (θεραπεία με χρήση φαρμάκων, ορμονών και χημειοθεραπειών), σε χειρουργική ογκολογία (θεραπεία με χειρουργικές επεμβάσεις) και ακτινοογκολογία (θεραπεία με ακτινοβολίες). Συχνά απαιτούνται συνδυαστικές θεραπείες, ανάλογα με τον τύπο, την αρχική θέση και το στάδιο του καρκίνου. [4]

1.2 Είδη καρκίνου και επιδημιολογία

Υπάρχουν πάνω από 200 διαφορετικά είδη καρκίνου ανάλογα με τον τύπο των καρκινικών κυττάρων και την αρχική εστία του. Όταν ξεκινάει σε επιθηλιακούς ιστούς (δέρμα, έντερο, βλεννογόνοι) λέγεται καρκίνωμα, ενώ όταν ξεκινάει σε μεσεγχυματικούς ιστούς (οστά, μύες, συνδετικό ιστό) λέγεται σάρκωμα. Όταν δημιουργείται στο λεμφικό σύστημα (λεμφαδένες και ανοσοποιητικό) καλείται λέμφωμα και πολλαπλό μυέλωμα, ενώ όταν δημιουργείται στον μυελό των οστών (επηρεάζει το αίμα) καλείται λευχαιμία. [5]

Ο καρκίνος ήταν η αιτία θανάτου για περισσότερους από 1,2 εκατομμύρια κατοίκους στην Ευρώπη το 2011 (EU28) και σε αυτόν οφείλονταν περισσότεροι από το ¼ των συνολικών θανάτων. Μάλιστα παρότι παρατηρήθηκε ελαφριά μείωση των συνολικών θανάτων κατά την προηγούμενη δεκαετία, εντούτοις οι θάνατοι από καρκίνο αυξήθηκαν κατά 6,3%. [6]

Το 2016, η 1^η αιτία θανάτου σε όλη την Ευρωπαϊκή Ένωση (EU27) με 257,1 θανάτους ανά 100.000 κατοίκους, ήταν ο καρκίνος. Στην Ελλάδα το νούμερο ήταν ελαφρώς μικρότερο από το μέσο όρο της ΕΕ, 249,45 θάνατοι/100.000 κάτοικοι. Οι πιο κοινές μορφές καρκίνου που έχουν ποσοστά θνησιμότητας άνω των 10 θανάτων/100.000 κατοίκους είναι: α) καρκίνος του πνεύμονα (τραχείας και βρόγχων), β) του παχέος εντέρου (ορθοσιγμοειδικής διασταύρωσης, ορθού, πρωκτού), γ) του μαστού, δ) του προστάτη, ε) του στομάχου, στ) του ήπατος, ζ) του παγκρέατος. [7] [8]

Οι τρεις πιο συνηθισμένες μορφές καρκίνου, παγκοσμίως για το 2018 ήταν κατά σειρά 1^{ος} καρκίνος του πνεύμονα, 2^{ος} καρκίνος του στήθους και 3^{ος} καρκίνος του παχέος εντέρου, ενώ για το 2020 πέρασε μπροστά με περισσότερα κρούσματα ο καρκίνος του μαστού (11,7%), ακολούθησε του πνεύμονα (11,4%) και μετά του παχέος εντέρου (10%). Η κατάταξη για τους καρκίνους που προκάλεσαν τους περισσότερους θανάτους είναι διαφορετική. Σταθερά 1^{ος} είναι ο καρκίνος του πνεύμονα με 18,4% το 2018 και 18% το 2020, ακολουθεί στη 2^η θέση επίσης σταθερά ο καρκίνος του παχέος εντέρου με 9,2% το 2018 και 9,4% το 2020, ενώ στην 3^η θέση βρέθηκε το 2018 ο καρκίνος του στομάχου με 8,2% και το 2020 ο καρκίνος του ήπατος με 8,3%. [9], [10], [11]

1.3 Αίτια ανάπτυξης καρκίνου

Οι επιστήμονες δεν έχουν ακόμη καταλήξει σε ασφαλή συμπεράσματα όσον αφορά το γιατί κάποιος οργανισμός αναπτύσσει καρκινικούς όγκους και κάποιος άλλος όχι. Οι σχετικές έρευνες όμως έχουν δείξει συγκεκριμένους επιβαρυντικούς παράγοντες, αλλά και παράγοντες που μειώνουν αυτό τον κίνδυνο. Υπάρχουν παράγοντες που μπορούμε να επηρεάσουμε όπως η κατανάλωση κάποιων ουσιών και η γενικότερη ανθρώπινη συμπεριφορά, αλλά και άλλες που δεν μπορούμε όπως η κληρονομικότητα ή η ακούσια έκθεση σε χημικές ουσίες. [12]

Στους επιβαρυντικούς παράγοντες περιλαμβάνονται;

α) Η κατανάλωση καπνού: Σε όλες τις μορφές (καπνιζόμενη, μασώμενη κλπ.) αποτελεί το αίτιο για καρκίνο στα χείλη και το στόμα, στο λάρυγγα και οισοφάγο, στους βρόγχους και πνεύμονες, στο στομάχι, τα νεφρά και την ουροδόχο κύστη.

β) Ορμόνες: Φυσικές ή τεχνητές αυξάνουν την πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη στους άνδρες και του μαστού στις γυναίκες.

γ) Ιοί και βακτήρια: Έχει ανακαλυφθεί εδώ και χρόνια ότι ο καρκίνος του ήπατος προκαλείται από τον ιό της ηπατίτιδας και ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων ή HPV προκαλεί εκτός από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και αρκετούς από τους καρκίνους της στοματικής κοιλότητας

δ) Ρύπανση του περιβάλλοντος: Η ρύπανση των υδάτων με βαρέα μέταλλα (μόλυβδος, υδράργυρος), με πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCB), με πάσης φύσεως φυτοφάρμακα και λιπάσματα, καταλήγει στο πιάτο μας μέσω της μεταφοράς τους στην τροφική αλυσίδα και οδηγεί στην εμφάνιση πολλών μορφών καρκίνου και λευχαιμιών.

ε) Ακτινοβολία: Είτε η φυσική υπεριώδης ακτινοβολία του ήλιου, είτε η έκλυση ραδιενέργειας από ατυχήματα σε πυρηνικούς σταθμούς, ακόμη και οι ακτινογραφίες σε κάποιο βαθμό ενοχοποιούνται για την ανάπτυξη καρκίνων. [13]

στ) Κληρονομικότητα: Κάποιοι άνθρωποι διατρέχουν πολύ υψηλότερο κίνδυνο από ότι οι υπόλοιποι εξαιτίας κάποιας γονιδιακής μετάλλαξης (βλάβης) που κληρονόμησαν από τους προγόνους τους. Είναι ήδη γνωστές περισσότερες από 50 γονιδιακές μεταλλάξεις που αυξάνουν τις πιθανότητες ανάπτυξης καρκίνου και σε νεότερες από το συνηθισμένο ηλικίες, όπως το BRCA1 που αυξάνει την προδιάθεση καρκίνου του μαστού. [14]

ζ) Διατροφή: Είμαστε ότι τρώμε. Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι οι επεξεργασμένες τροφές που καταναλώνουμε και το αλκοόλ ευθύνονται για πάνω από 20% των περιστατικών καρκίνου. [13] Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι όσοι καταναλώνουν επεξεργασμένα κρέατα με μεγάλη συχνότητα, διατρέχουν 20-50% μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου από όσους δεν το κάνουν. [15]

1.4 Καρκίνος του παχέος εντέρου

Είδαμε ότι ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι τα τελευταία χρόνια σταθερά στην 3^η θέση των πιο συνηθισμένων μορφών, ενώ σκαρφαλώνει στη 2^η θέση όσον αφορά στη θνητότητα από αυτόν. Εκτιμάται ότι, παγκοσμίως, περίπου 1,9 εκατομμύρια άνθρωποι νόσησαν από αυτόν το 2020 και 935.000 πέθαναν, σχεδόν 1 στις 10 περιπτώσεις καρκίνου (10%) και θανάτου από αυτόν (9,4%). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, στις ανεπτυγμένες χώρες με υψηλά εισοδήματα, αποτελεί την 7^η κατά σειρά γενική αιτία θανάτου. [16]

Κατά ένα ποσοστό 5-10% οφείλεται σε κληρονομικά αίτια, αλλά η γενικότερη αιτιολογία περιλαμβάνει έναν περίπλοκο συνδυασμό μεταξύ κληρονομικότητας και περιβαλλοντικών παραγόντων. Ο κίνδυνος αυξάνει με την ηλικία, τη διατροφή με μειωμένη πρόσληψη φυτικών ινών και αυξημένη κατανάλωση λιπών και κρεάτων, το διαβήτη τύπου II, την υπέρταση, την παχυσαρκία, το μακροχρόνιο κάπνισμα και την αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ. Από την άλλη πλευρά, η τακτική άσκηση, η λήψη ορμονικής θεραπείας αποκατάστασης και η λήψη ΜΣΑΦ (μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα) φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης. Τα υψηλότερα ποσοστά εμφανίζονται σε αστικές περιοχές και στις δυτικές χώρες. [17]

1.5 Καρκινογένεση και στάδια του καρκίνου

Η καρκινογένεση δεν είναι μια άμεση αλλά μια μακροχρόνια διαδικασία που εξελίσσεται σε διαφορετικά στάδια. Συνδυάζει διάφορες επιγενετικές αλλαγές DNA με μεταλλάξεις των ογκογόνων ή και των γονιδίων καταστολής όγκων. Για να γίνει η μετάβαση από αδένωμα σε καρκίνωμα θα απαιτηθούν μέχρι και 7 ξεχωριστές γενετικές αλλαγές.

Τα στάδια που αναγνωρίζει η σημερινή ογκολογία είναι:

- 1) Η έναρξη, που περιλαμβάνει τις πρώτες γενετικές αλλοιώσεις οι οποίες προκύπτουν είτε αυθόρμητα, είτε μετά από έκθεση σε καρκινογόνο παράγοντα και οδηγούν σε δυσλειτουργία τις διεργασίες που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.
- 2) Η προώθηση, είναι η φάση μεταξύ της αρχικής βλάβης και της ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου. Θεωρείται αναστρέψιμη διαδικασία συσσώρευσης προνεοπλασματικών κυττάρων.
- 3) Η εξέλιξη, είναι το τελικό στάδιο στο οποίο συμβαίνουν αλλαγές στο γενετικό κώδικα και στο φαινότυπο του κυττάρου, με γρήγορη αύξηση του μεγέθους του όγκου.
- 4) Η μετάσταση, κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα εξαπλώνονται και σε άλλα σημεία του οργανισμού με τη βοήθεια του κυκλοφορικού ή και του λεμφικού συστήματος. [17]

1.6 Διάγνωση και θεραπεία

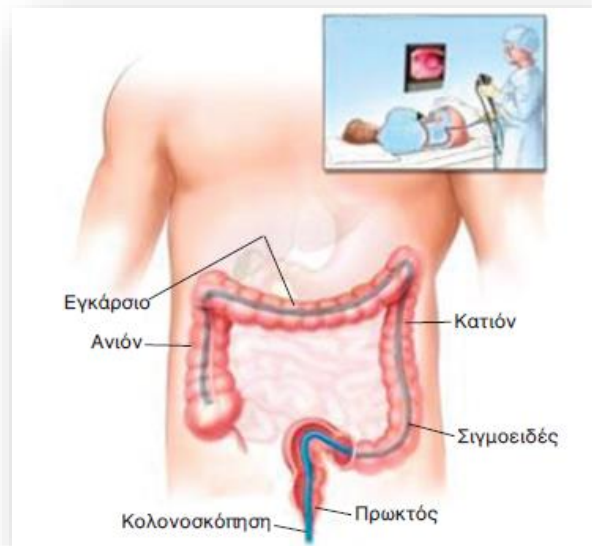
Ο καρκίνος μπορεί να γίνει μια χρόνια, αλλά ιάσιμη νόσος αν διαγνωστεί εγκαίρως. Από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας εκτιμάται ότι με την έγκαιρη διάγνωση μπορεί να θεραπευτεί άνω του 40% των περιπτώσεων. [1] Σε όσο πιο αρχικό στάδιο εντοπιστεί ο καρκίνος, τόσο καλύτερη πρόγνωση έχει η θεραπεία. Γι' αυτό το σκοπό έχουν καθιερωθεί πλέον κάποιες προληπτικές εξετάσεις (π.χ. τεστ ΠΑΠ, μαστογραφία). Με τη διάγνωση πρέπει να διαπιστωθεί ο τύπος και η θέση του διότι έτσι θα μπορέσει ο γιατρός να προβλέψει τον τρόπο εξέλιξης και να προγραμματίσει την κατάλληλη θεραπεία. [18]

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι διάγνωσης, γενικές αλλά και εξειδικευμένες ανάλογα με το είδος του καρκίνου όπως ακτινογραφία ακτίνων X, αξονική ή μαγνητική τομογραφία, τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET scanning), υπερηχογραφία, αλλά και μαστογραφία, τεστ ΠΑΠ, κολονοσκόπηση, έλεγχος του προστατικού αντιγόνου και φυσικά βιοψία.

Κάποιες από τις θεραπευτικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται (πολλές φορές και συνδυαστικά) για την θεραπεία του καρκίνου είναι η χημειοθεραπεία, ορμονοθεραπεία, ακτινοθεραπεία και χειρουργική επέμβαση. Ο γιατρός επιλέγει την κατάλληλη ανάλογα με το είδος, τον τύπο και το στάδιο καθώς και τη γενικότερη κλινική εικόνα του ασθενή. [19]

Ειδικότερα, για τον καρκίνο του παχέος εντέρου η διάγνωση μπορεί να γίνει με αξονική τομογραφία (CT), με ακτινολογικό έλεγχο με κλύσμα βαρίου, ή με κολονογραφία μέσω υπολογιστικής τομογραφίας. Επίσης μπορεί να γίνει με ψηφιακή ορθική εξέταση, πρωκτοσκόπηση, αλλά και με άμεση ενδοσκοπική απεικόνιση. Η κολονοσκόπηση κάνει ενδοσκοπική απεικόνιση του βλεννογόνου του εντέρου και κατά τη διάρκειά της γίνεται και λήψη βιοψίας για την ιστολογική επιβεβαίωση. Εναλλακτική και πιο ήπια εξέταση είναι η σιγμοειδοσκόπηση, η οποία φτάνει μόνο ως το σιγμοειδές και δεν προχωρά τόσο βαθιά

ως το κόλον, όμως είναι αποτελεσματική στη διάγνωση των περισσότερων όγκων στο παχύ έντερο. [17], [18]



Εικόνα 2: Ενδοσκοπική εξέταση κολονοσκόπησης. [2]

Πριν την έναρξη της θεραπείας είναι απαραίτητο να καθοριστεί το μέγεθος, η θέση, η επέκταση του όγκου και το ακριβές στάδιο της νόσου, δηλαδή η κατάταξή του σε ένα από τα δύο επιστημονικά συστήματα ταξινόμησης, το σύστημα σταδιοποίησης κατά Dukes ή το σύστημα σταδιοποίησης TNM (Tumor Node Metastases). [2]

Η μόνη στρατηγική θεραπείας του καρκίνου του παχέος εντέρου, μέχρι στιγμής, είναι η χειρουργική εκτομή. Δυστυχώς όμως, στα 2/3 των ασθενών θα εμφανιστεί είτε τοπική υποτροπή, είτε απομακρυσμένες μεταστάσεις εντός των επόμενων 2,5 ετών και η πρόγνωση επιβίωσης πέντε ετών είναι 50-60%. Αυτό προσπαθεί να το βελτιώσει η συστηματική θεραπεία. Αναλόγως με το στάδιο και τη θέση του όγκου η θεραπεία συχνά συμπληρώνεται με ανοσοενισχυτικές χημειοθεραπείες ή και ακτινοθεραπείες. Στόχος είναι να παραταθεί η επιβίωση με ελεγχόμενα συμπτώματα και η βελτίωση της ποιότητας ζωής σε περιπτώσεις με μεταστατική νόσο.

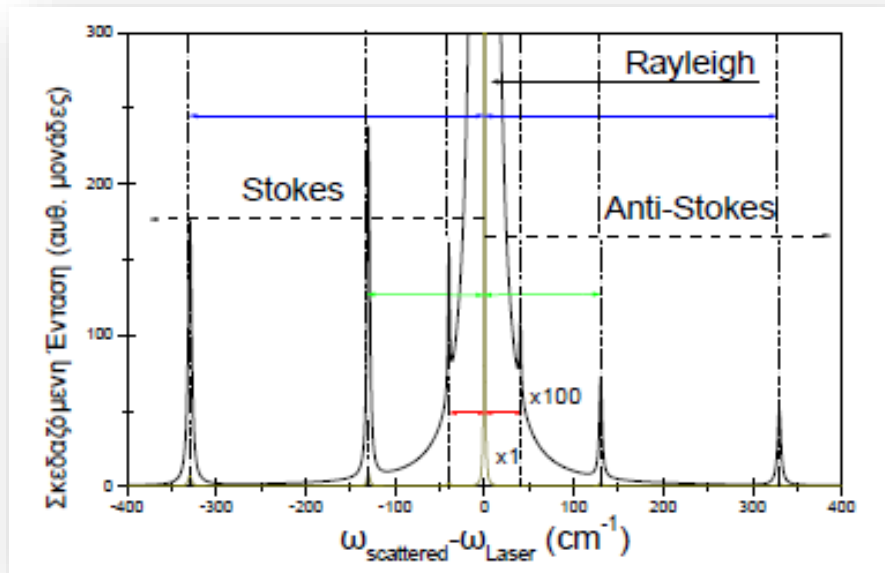
Στον καρκίνο του παχέος εντέρου που εμφανίζει διήθηση, απαιτείται πλήρης αφαίρεση του όγκου με απομάκρυνση και των περιφερειακών λεμφαδένων και αναστόμωση για την αποκατάσταση της συνέχειας της γαστρεντερικής οδού. Σε περιπτώσεις καρκίνου του ορθού, απαιτείται χειρουργική αφαίρεση με επαρκή υγιή περιθώρια και ολοκλήρωση της γαστρεντερικής οδού μέσω μόνιμης κολοστομίας (παρά φύση έδρα), συνδυαστικά με τοπική ακτινοθεραπεία και επικουρική χημειοθεραπεία που στοχεύει να καταστρέψει τυχόν μικρομεταστάσεις. [17]

Κεφάλαιο 2ο : Φασματοσκοπία Raman

2.1 Γενική περιγραφή Φασματοσκοπίας Raman

Πρόκειται για μία φασματοσκοπική μέθοδο μη-ελαστικής σκέδασης φωτός, η οποία ονομάστηκε έτσι από το φαινόμενο Raman, σύμφωνα με το οποίο: όταν κάποιο υλικό σύστημα ακτινοβολείται με μονοχρωματική ακτινοβολία, τότε η διάχυτη ακτινοβολία που σκεδάζεται στο υλικό περιέχει νέες φασματικές περιοχές, δηλαδή οι συχνότητες σκέδασης είναι διαφορετικές από αυτή της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Το υλικό σύστημα μπορεί να είναι αέριο, υγρό ή στερεό, άμορφο ή κρυσταλλικό και ακτινοβολείται συνήθως με laser στο ορατό φάσμα. Προκύπτει έτσι ένα φάσμα Raman, όπου γίνεται η καταγραφή της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε συνάρτηση με τη συχνότητα. [20]

Το κάθε διαφορετικό άτομο ή μόριο εμφανίζει κορυφές σε διαφορετικές συχνότητες στις νέες φασματικές περιοχές, αποδίδοντας ένα μοναδικό φάσμα Raman που αποτελεί το «δακτυλικό αποτύπωμά» του. Η μέθοδος, το φαινόμενο και το φάσμα πήραν το όνομά τους από τον Ινδό φυσικό C. V. Raman ο οποίος ήταν ένας από τους επιστήμονες που μελέτησαν το φαινόμενο. Το 1928 κατάφερε να το αποδείξει πειραματικά και γι' αυτό το 1930 τιμήθηκε με το Nobel Φυσικής. [21]



Εικόνα 3: Χαρακτηριστικό φάσμα σκέδασης Raman.
Διακρίνεται στο κέντρο η ζώνη ελαστικής σκέδασης Rayleigh και εκατέρωθεν οι ζώνες μη-ελαστικής σκέδασης Stokes και Anti-Stokes.
[20]

Στην εικόνα 3 όπου απεικονίζεται ένα τυπικό φάσμα Raman, διακρίνουμε στο κέντρο την ζώνη ελαστικής σκέδασης Rayleigh σε συχνότητα ίδια με τη συχνότητα διέγερσης ($\omega_{\text{scattered}} = \omega_{\text{laser}}$) και πολύ μεγάλη ένταση και εκατέρωθεν τις πλευρικές ζώνες που εμφανίζονται σε νέες συχνότητες, οι οποίες ισαπέχουν από την ω_{laser} , αλλά δεν έχουν όμοιες εντάσεις. Οι ζώνες Stokes βρίσκονται σε συχνότητες χαμηλότερες από την ω_{laser} και

έχουν υψηλότερες εντάσεις, ενώ οι ζώνες Anti-Stokes παρατηρούνται σε συχνότητες μεγαλύτερες από την ω_{laser} και εμφανίζουν μικρότερες εντάσεις. [20]

Εφόσον και οι δύο ζώνες παρέχουν την ίδια πληροφορία όσον αφορά τις συχνότητες, συνήθως επιλέγουμε να παίρνουμε μετρήσεις στη ζώνη Stokes αφού αυτή έχει μεγαλύτερη ένταση. [22]

2.2 Το φαινόμενο Raman

Η αλληλεπίδραση της εισερχόμενης μονοχρωματικής ακτινοβολίας (laser) με τις ταλαντώσεις του υλικού του συστήματος, είτε αυτές είναι μονοσωματιδιακές (ελεύθερα ηλεκτρόνια, άτομα ή προσμίξεις) είτε συλλογικές (φωνόνια, πλασμόνια ή μαγνόνια) προκαλεί το φαινόμενο εμφάνισης των πλευρικών ζωνών σκέδασης των φασμάτων Raman. Ανάλογα με τον τρόπο περιγραφής της αλληλεπίδρασης της συχνότητας διέγερσης με τις ταλαντώσεις προκύπτει η κλασική ή η κβαντική περιγραφή (ερμηνεία) του φαινομένου Raman.

2.2.1 Κλασική περιγραφή

Η κλασική περιγραφή στηρίζεται στην θεμελιώδη έννοια της **πολωσιμότητας** $\tilde{\alpha}$ των υλικών (polarizability) που ορίζεται ανά μόριο, μονάδα όγκου ή μοναδιαία κυψελίδα, ανάλογα με το υλικό σύστημα που μελετάμε.

Το υλικό σύστημα, υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου \vec{E} , αναπτύσσει μια επαγόμενη **πόλωση** \vec{P} (polarization) που είναι η διπολική ροπή ανά μόριο, μονάδα όγκου ή μοναδιαία κυψελίδα, ανάλογα με το σύστημα και είναι ανάλογη του ηλεκτρικού πεδίου.

$$\vec{P} = \tilde{\alpha} \vec{E}$$

Αν το ηλεκτρικό πεδίο είναι η διεγείρουσα ακτινοβολία του φαινομένου Raman, δηλ. εναλλασσόμενο μονοχρωματικό ηλεκτρομαγνητικό κύμα (laser) τότε

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \sin(\omega_i t) \quad \text{και} \quad \vec{P} = \tilde{\alpha} \vec{E}_0 \sin(\omega_i t) \quad (1)$$

Η ταλάντωση της πόλωσης έχει ως αποτέλεσμα τη (δευτερογενή) εκπομπή ακτινοβολίας με συχνότητα ίδια με της διεγείρουσας ω_i (ή ω_{laser}) που είναι η ελαστική σκέδαση Rayleigh η οποία αναφέρθηκε στη γενική περιγραφή.

Σε περίπτωση που το υπό μελέτη σύστημα εκτελεί επιπλέον και μια εσωτερική κίνηση με συχνότητα ω_{01} , π.χ. έναν κανονικό τρόπο ταλάντωσης $\vec{q}_1 = \vec{q}_{01} \sin(\omega_{01} t)$ όπου \vec{q}_{01} το πλάτος της ταλάντωσης του, αυτή η εσωτερική κίνηση θα επηρεάσει και την πολωσιμότητα $\tilde{\alpha}$ η οποία για μικρά πλάτη ταλάντωσης έχει γραμμική σχέση με το \vec{q} και γίνεται:

$$\tilde{\alpha} = \tilde{\alpha}_0 + \tilde{\beta} \sin(\omega_{01} t) \quad (2)$$

όπου $\tilde{\beta}$ το πλάτος μεταβολής της πολωσιμότητας λόγω της ταλάντωσης \vec{q} .

Αντικαθιστώντας τη (2) στην (1) έχουμε για την πόλωση:

$$\vec{P} = [\vec{\alpha}_0 + \vec{\beta} \sin(\omega_{01} t)] E_0 \sin(\omega_i t) = \vec{\alpha}_0 E_0 \sin(\omega_i t) + \vec{\beta} E_0 \sin(\omega_{01} t) \sin(\omega_i t)$$

μετατρέποντας το γινόμενο των τριγωνομετρικών συναρτήσεων σε άθροισμα έχουμε:

$$\vec{P} = \vec{\alpha}_0 E_0 \sin(\omega_i t) + \frac{\vec{\beta} E_0}{2} [\cos(\omega_i - \omega_{01}) t - \cos(\omega_i + \omega_{01}) t] \quad (3)$$

Παρατηρούμε ότι το 2ο μέρος του αθροίσματος έχει τη μορφή φέροντος κύματος με συχνότητα ω_i , το οποίο έχει υποστεί διαμόρφωση κατά πλάτος από την εσωτερική ταλάντωση του συστήματος με συχνότητα ω_{01} .

Η σκεδαζόμενη ακτινοβολία του συστήματος έπεται από τη διέγερσή του με laser συχνότητας ω_i περιέχει:

- Τη συχνότητα ω_i της ελαστικής σκέδασης Rayleigh
- Τη συχνότητα $\omega_i - \omega_{01}$ που αντιστοιχεί στη ζώνη Stokes
- Τη συχνότητα $\omega_i + \omega_{01}$ που αντιστοιχεί στη ζώνη Anti-Stokes

Αυτό ισχύει για κάθε ζευγάρι κορυφών που εμφανίζονται εκατέρωθεν της $\omega_i=0$ στην Εικόνα 3 (για $\omega_{02}, \omega_{03}, \omega_{04}$, κλπ)

Επιστρέφοντας στην έκφραση (2), μπορούμε να τη θεωρήσουμε ως ένα ανάπτυγμα Taylor της πολωσιμότητας γύρω από το σημείο ισορροπίας $\vec{\alpha}_0$ σε πρώτη τάξη, ως προς τον κανονικό τρόπο ταλάντωσης $\vec{q}_1 = \vec{q}_{01} \sin(\omega_{01} t)$ δηλαδή

$$\vec{\alpha} = \vec{\alpha}_0 + \left[\left(\frac{\partial \vec{\alpha}}{\partial q_1} \right)_{q_1=0} q_{01} \right] \sin(\omega_{01} t) \quad \text{και} \quad \vec{\beta} = \left[\left(\frac{\partial \vec{\alpha}}{\partial q_1} \right)_{q_1=0} q_{01} \right]$$

από την (3) παρατηρούμε ότι από την τιμή του $\vec{\beta}$ εξαρτάται η ύπαρξη των πλευρικών ζωνών και ότι αν $\vec{\beta} = 0$ οι πλευρικές ζώνες της μη-ελαστικής σκέδασης δεν υπάρχουν και η σκεδαζόμενη ακτινοβολία περιέχει μόνο την ελαστική σκέδαση Rayleigh. [20], [22]

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι ένας κανονικός τρόπος ταλάντωσης q_1 και συχνότητας ω_{01} είναι παρατηρήσιμος στο φάσμα Raman, MONO όταν η παράγωγος της πολωσιμότητας, υπολογιζόμενη στο σημείο ισορροπίας $q_1 = 0$ είναι διάφορη του μηδενός

$$\text{δηλαδή όταν} \quad \left(\frac{\partial \vec{\alpha}}{\partial q} \right)_{q_1=0} \neq 0$$

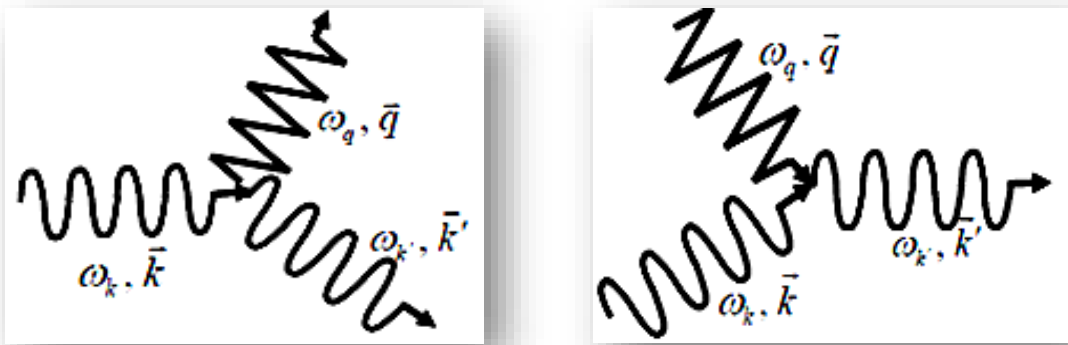
2.2.2 Κβαντική περιγραφή

Εδώ η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία εκλαμβάνεται ως ροή φωτονίων με συχνότητα $\omega_k = ck$ όπου c η ταχύτητα του ηλεκτρομαγνητικού κύματος και $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ το μέτρο του κυματανύσματος διάδοσης \vec{k} . Κάθε φωτόνιο έχει καλά καθορισμένη ενέργεια $E_i = \hbar \omega_k$ και ορμή $\vec{p}_i = \hbar \vec{k}$

Οι πλεγματικές ταλαντώσεις θεωρούνται ως ένα αέριο φωνονίων που χαρακτηρίζεται από τη σχέση διασποράς $\omega_q = \omega_q(\vec{q})$ και κάθε φωνόνιο έχει καλά καθορισμένη ενέργεια $E_0 = \hbar\omega_q$ και ορμή $\vec{p}_0 = \hbar\vec{q}$

Όταν η εισερχόμενη ακτινοβολία πέφτει στο υλικό, ένα φωτόνιο εισέρχεται σε αυτό, σκεδάζεται μέσω αυτού και τελικά από το υλικό εξέρχεται ένα νέο φωτόνιο με διαφορετική ενέργεια E' , ορμή k' και συχνότητα $\omega_{k'}$ από ότι το εισερχόμενο.

Όταν παρατηρείται έξοδος φωτονίου με μικρότερη ενέργεια, σημαίνει ότι η ενέργεια που έχασε το προσπίπτον φωτόνιο μεταφέρθηκε στο υλικό (απορροφήθηκε) για τη δημιουργία ενός φωνονίου (διαδικασία Stokes), ενώ όταν εξέρχεται φωτόνιο με μεγαλύτερη ενέργεια, η επιπλέον ενέργεια προσφέρεται από την καταστροφή ενός φωνονίου (διαδικασία Anti-Stokes). [23]



Εικόνα 4: Αριστερά - Δημιουργία φωνονίου (διαδικασία Stokes)
Δεξιά - Καταστροφή φωνονίου (διαδικασία Anti-Stokes) [20]

Από την κβαντική περιγραφή μπορεί να προκύψει και η αναλογία των εντάσεων Stokes/Anti-Stokes για το ίδιο φωνόνιο

$$\frac{I_{Anti-Stokes}}{I_{Stokes}} = \left(\frac{\omega_{AS}}{\omega_S}\right)^4 e^{\frac{\hbar\omega_q}{k_B T}}$$

2.3 Πειραματική διάταξη - Φασματοσκόπιο Raman

Σε ένα πείραμα σκέδασης Raman δύο στοιχεία είναι απαραίτητα:

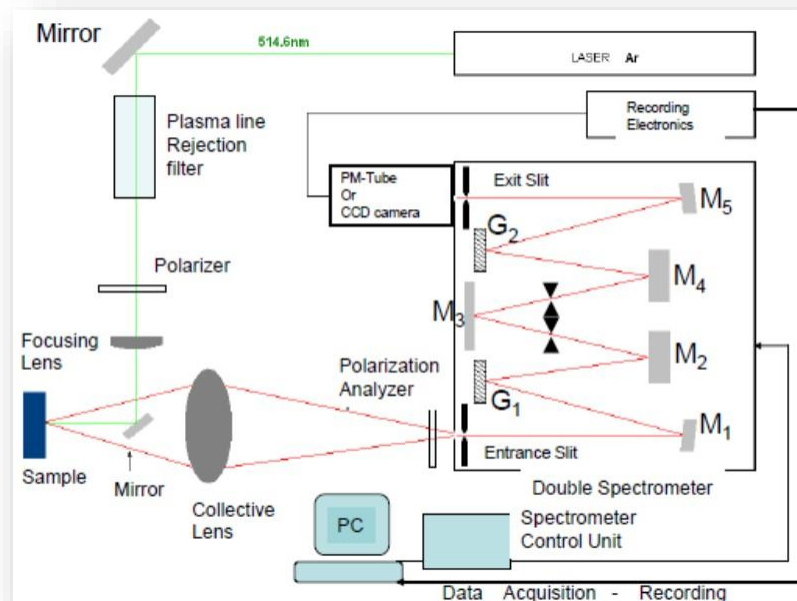
1. μια μονοχρωματική πηγή φωτός για τη διέγερση του δείγματος (γι' αυτό και η ανάπτυξη των πηγών laser έδωσε μεγάλη ώθηση στη φασματοσκοπία Raman)
2. το μέσο ανάλυσης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας

Το μήκος κύματος του laser επιλέγεται με ζητούμενο να έχει όσο γίνεται μεγαλύτερη απόδοση στο φάσμα σκέδασης. Επιλέγοντας διαφορετικά μήκη κύματος μπορούμε να επιβεβαιώσουμε αν το φάσμα που πήραμε είναι φάσμα Raman ή κάτι άλλο π.χ. φωταύγεια.

Αν έχουμε πράγματι ζώνες Raman αυτές θα διατηρούν τη σχετική τους απόσταση από τη συχνότητα του laser.

Η δέσμη του laser περνάει πρώτα από ένα «Φίλτρο αποκοπής γραμμών πλάσματος» (Plasma line Rejection filter) και από έναν Πολωτή ή περιστροφέα πόλωσης (Polarizer) για να γίνει μονοχρωματικό και να καθοριστεί η πόλωσή του και ακολούθως εστιάζεται από ένα φακό (Focusing Lens). Η ακτίνα της τελικής εστιασμένης δέσμης δίνεται από τον τύπο $w_0 \approx \frac{\lambda f}{\pi w}$ όπου w η αρχική ακτίνα, λ το μήκος κύματος και f η εστιακή απόσταση του φακού, η επιλογή της οποίας καθορίζει τη χωρική διακριτική ικανότητα του φασματομέτρου και την πυκνότητα ισχύος του laser πάνω στο δείγμα.

Με τη βοήθεια ενός κατόπτρου (Mirror), η δέσμη οδηγείται στο δείγμα (Sample) και το σκεδαζόμενο φως συλλέγεται από έναν Φακό συλλογής (Collective Lens) και οδηγείται μέσω ενός αναλυτή πόλωσης (Polarization Analyzer) στη σχισμή εισόδου (Entrance Slit)



Εικόνα 5: Πειραματική διάταξη φασματοσκοπίας Raman [24]

Το φασματόμετρο που φαίνεται στην εικόνα 5 είναι διπλός μονοχρωμάτορας (Double Spectrometer) με 2 ολογραφικά φράγματα (G_1 , G_2), 4 σχισμές και 5 καθρέπτες (M_1 - M_5). Στην έξοδο του φασματόμετρου, το αναλυόμενο φως συλλέγεται από έναν φωτοπολλαπλασιαστή (PM-Tube) ή μια CCD κάμερα (CCD camera), η οποία ψύχεται με υγρό άζωτο έτσι ώστε να έχει χαμηλό ρεύμα σκότους. Ακολούθως το ηλεκτρικό σήμα ενισχύεται και μορφοποιείται-ψηφιοποιείται από τη μονάδα ηλεκτρονικής καταγραφής (Recording Electronics) και τέλος οδηγείται στη μονάδα καταμέτρησης ενός υπολογιστή, που παράλληλα ελέγχει και την κίνηση του φασματόμετρου (Spectrometer Control Unit).

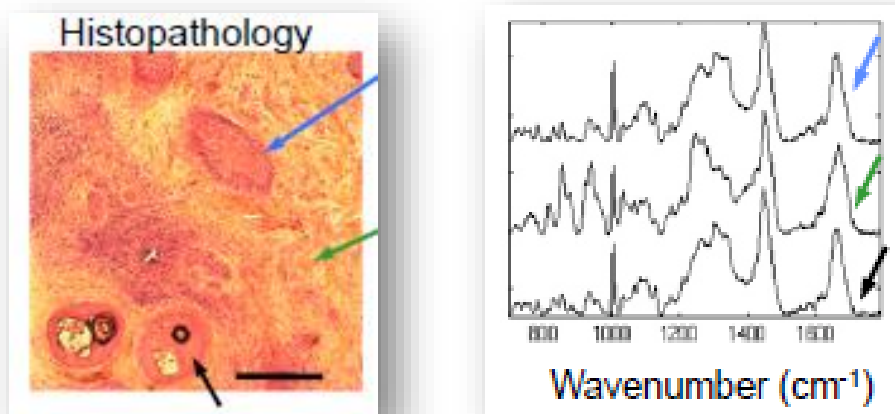
Τα φάσματα καταγράφονται γραμμικά ως προς τη συχνότητα σε μονάδες κυματαριθμών (wavenumbers) και όχι ως προς το μήκος κύματος της ακτινοβολίας.

$$\text{Ορισμός κυματαριθμού} \quad \omega [cm^{-1}] = \frac{1}{\lambda [cm]}$$

2.4 Raman στον καρκίνο

Η φασματοσκοπία Raman είναι μια τεχνική καταγραφής φασματικών αποτυπωμάτων με μεγάλη ευαισθησία και χωρική διακριτική ικανότητα μερικών μμ. Κάθε διαφορετικός ιστός (βιοδομή) παράγει, μετά την αλληλεπίδρασή του με ακτινοβολία laser, ένα μοναδικό φασματικό αποτύπωμα που τον χαρακτηρίζει μονοσήμαντα. Κάθε καρκινική αλλοίωση δημιουργεί βιοχημικές μεταβολές στον ιστό και συνακόλουθα προκαλεί χαρακτηριστικές μεταβολές στα φασματικά αποτυπώματα. Η ακρίβεια και η ευαισθησία της τεχνικής Raman για τον σαφή διαχωρισμό μεταξύ υγιών και καρκινικών κυττάρων ή/και ιστών, έχει πιστοποιηθεί από τη διεθνή βιβλιογραφία τόσο *ex vivo* αλλά και *in vivo*. Όμως, τα δεδομένα που υπάρχουν είναι ελλιπή, μη προσβάσιμα και δεν έχουν ακόμη δημιουργηθεί αρκετές βιβλιοθήκες φασμάτων ανθρώπινων βιοδομών που θα επέτρεπαν τον άμεσο χαρακτηρισμό των ιστών. Επιπλέον, δεν έχει γίνει αρκετή διερεύνηση και δεν έχει ακόμη αντιμετωπιστεί με επιτυχία το πολύ σημαντικό ζήτημα της *in vivo* ακριβούς οριοθέτησης μικρών καρκινικών εστιών.

Η φασματοσκοπία Raman έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στην έρευνα για βελτιωμένες μεθόδους διάγνωσης διαφόρων μορφών καρκίνου διότι έχει το πλεονέκτημα ότι είναι μη επεμβατική μέθοδος και με μεγάλη διακριτική ικανότητα. Στη χειρουργική μέθοδο αντιμετώπισης του καρκίνου, μέχρι στιγμής είναι απαραίτητη η ιστοπαθολογική εξέταση (βιοψία), η οποία είναι η πιο διαδεδομένη και ακριβής μέθοδος διάγνωσης καρκίνου, όμως χρειάζεται τομή και κατάλληλη προετοιμασία του ιστού, και δεν είναι άμεση, αλλά παίρνει αρκετό χρόνο για να δώσει το αποτέλεσμα. Επίσης, εφόσον το αποτέλεσμα βγαίνει ερμηνεύοντας τις εικόνες του μικροσκοπίου, εξαρτάται από την εμπειρία του διαγνώστη και εμφανίζει μεταβλητότητα.

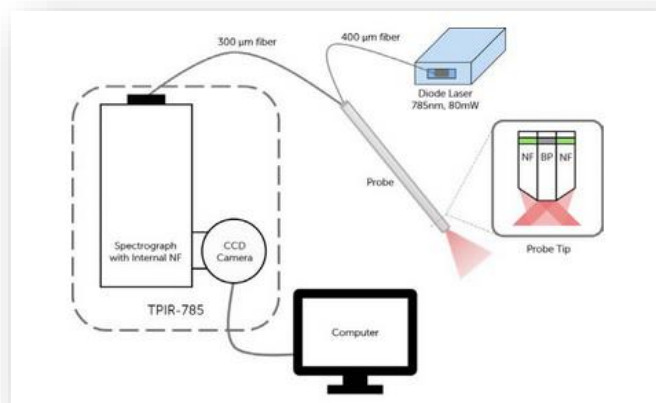


Εικόνα 6: Απεικόνιση ιστολογικής εξέτασης (βιοψίας) για ανίχνευση βασικοκυτταρικού καρκίνου του δέρματος (αριστερά) και φασμάτων Raman που προκύπτουν από τις περιοχές που σημαίνονται με τα βέλη (δεξιά). [25]

Είναι απαραίτητο να μπορεί να γίνεται αυτοματοποιημένη και άμεση εντός του χειρουργείου διάκριση των ορίων του όγκου ώστε αυτός να αφαιρεθεί πλήρως. Σε έρευνα

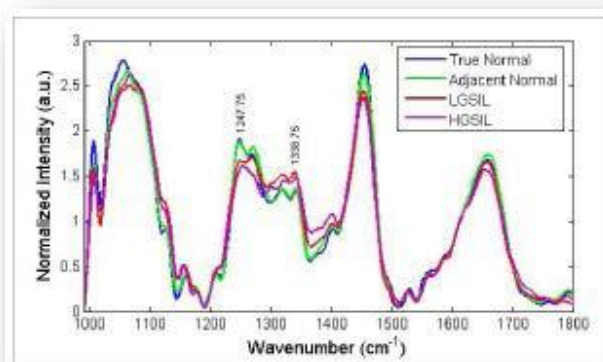
προς αυτή την κατεύθυνση βρέθηκε ότι το φάσμα Raman σε κύτταρα βασικοκυτταρικού καρκίνου του δέρματος που επισημαίνεται στην εικόνα 6 με μπλε βέλος παρουσιάζει έντονες κορυφές σε ζώνες DNA (788 cm^{-1} , $1,098\text{ cm}^{-1}$), ενώ στον υγιή ιστό του δέρματος που επισημαίνεται στην εικόνα 6 με πράσινο βέλος, κυριαρχούσαν ζώνες που δείχνουν ίνες κολλαγόνου (851 and 950 cm^{-1}). (Με το μαύρο βέλος επισημαίνεται ένα τριχοθυλάκιο και το αντίστοιχο φάσμα του). [25]

Προσπάθειες έχουν γίνει και για την αποτελεσματική ενδοσκοπική διάγνωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Με συλλογή πολλών μετρήσεων φασμάτων υγιών και καρκινικών ιστών τραχήλου διαφόρων σταδίων καρκίνου και κατάταξή τους με βάση τα αντίστοιχα αποτελέσματα των βιοψιών, έγινε εκπαίδευση ενός αλγόριθμου με σύστημα μηχανικής μάθησης, που να μπορεί συγκρίνοντας να κατατάσσει το φάσμα που παίρνει από το ενδοσκόπιο σε 4 κατηγορίες: υγιές, καλόηθες, 1^ο καρκινικό στάδιο, 2^ο-3^ο καρκινικό στάδιο.



Εικόνα 7: Σχεδιάγραμμα του ενδοσκοπίου για τη διάγνωση του καρκίνου της μήτρας [26]

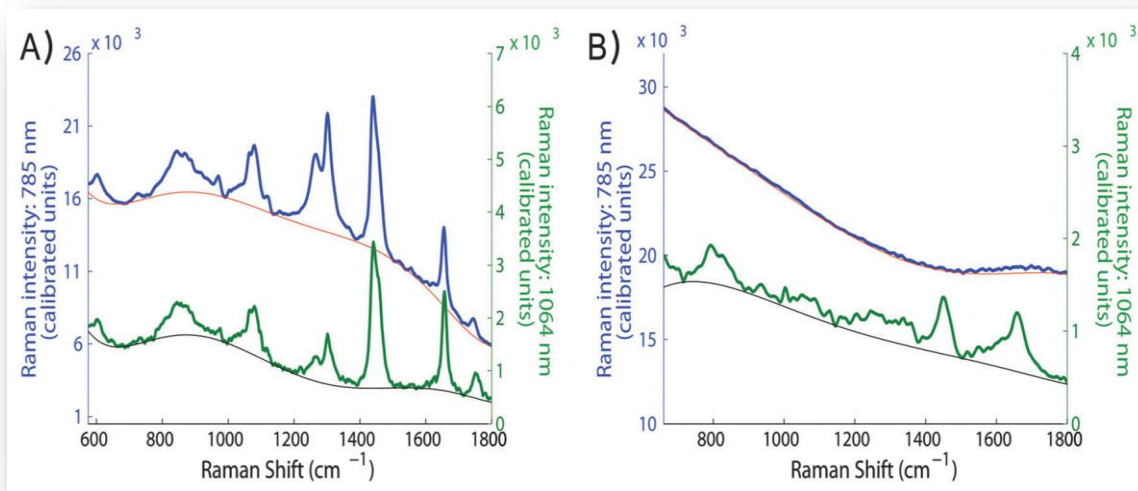
Παρατηρήθηκε ότι τα φάσματα που προέκυπταν από υγιείς περιοχές παρουσίαζαν πολύ μεγάλες διακυμάνσεις και αυτό δυσκόλευε την ορθή κατάταξή τους. Όμως, λαμβάνοντας υπόψη και τις διαφοροποιήσεις που προκαλούν στα φάσματα τα επίπεδα των ορμονών (ανάλογα με τη φάση του κύκλου ή και την εμμηνόπαυση) η ακρίβεια της μεθόδου κατάταξης αυξήθηκε από το 88 στο 97%. [26]



Εικόνα 8: Μέσα κανονικοποιημένα φάσματα από διαφορετικές περιοχές του τραχήλου της μήτρας. [26]

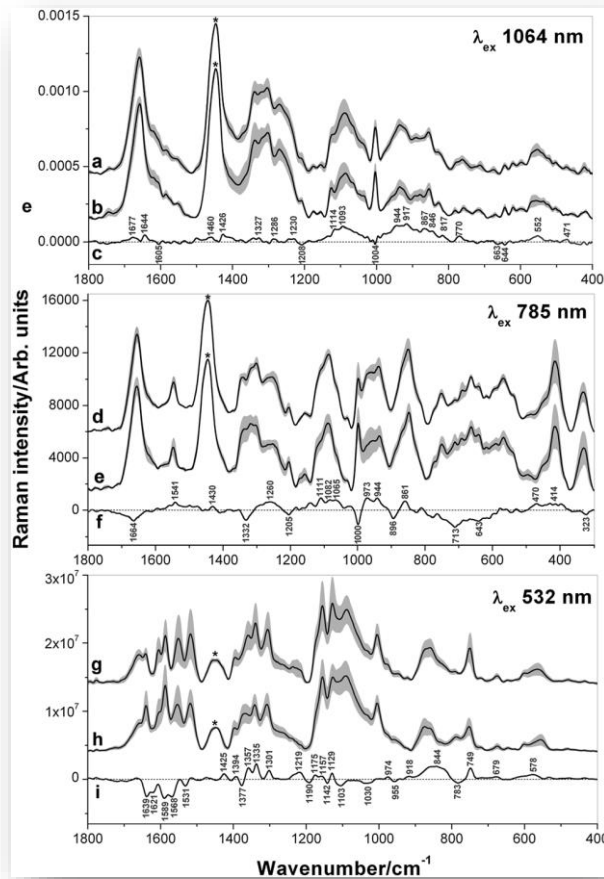
Μελέτες έχουν γίνει και για την *in vivo* ενδοσκοπική διάγνωση με Raman του οισοφάγου του Barrett, που είναι μια κατάσταση δυσπλασίας του οισοφάγου η οποία εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς με γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση. Αρχικά εμφανίζεται χαμηλόβαθμη δυσπλασία, έπειτα υψηλόβαθμη και τέλος αδενοκαρκίνωμα. Ερευνητές πέτυχαν διάκριση κανονικού ιστού από ιστό χωρίς δυσπλασία ή ιστό με υψηλόβαθμη δυσπλασία με ευαισθησία 84,7% και 87% αντίστοιχα. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα και δημιουργία ευρύτερων και εμπειριστατωμένων βιβλιοθηκών με φάσματα καρκινικών ιστών.

Σε κάποιες περιπτώσεις αποδείχθη ότι είναι κρίσιμη η επιλογή του κατάλληλου laser διέγερσης. Στην εικόνα 9 βλέπουμε φάσματα από ιστούς στήθους (A) και νεφρού (B) από δύο διαφορετικά laser διέγερσης 785 nm (με μπλε χρώμα) και 1064 nm (με κόκκινο χρώμα) (Διακρίνεται και η γραμμή της πολυωνυμικής προσαρμογής για την αφαίρεση του υπόβαθρου φωταύγειας). Το έντονο σήμα Raman στον ιστό του στήθους είναι διακριτό και με τα δύο laser, ενώ το ασθενές σήμα του νεφρού δεν ξεχωρίζει από τη φωταύγεια με διέγερση στα 785 nm αλλά απαιτεί διέγερση στα 1064 nm για να γίνει αρκετά έντονο και να μπορεί να μελετηθεί σωστά.[27]



Εικόνα 9: Φάσματα Raman πριν την αφαίρεση του υπόβαθρου της φωταύγειας σε ιστό A) στήθους και B) νεφρού με laser διέγερσης 785nm (μπλε) και 1064nm (πράσινο) [27]

Παρότι δίνει σημαντικές πληροφορίες για την κατάσταση και σύνθεση των βιολογικών δειγμάτων, η μέθοδος Raman έχει μειονεκτήματα στα οποία κυριαρχούν ο χαμηλός λόγος του σήματος ως προς θόρυβο (signal-to-noise ratio) και η φωταύγεια. Με τη χρήση κατάλληλου μήκους κύματος διέγερσης μπορούν να μειωθούν αυτά τα προβλήματα. Σε νωπούς ιστούς, τα μεγάλα μήκη κύματος (785, 1064 nm) δίνουν χαμηλό υπόβαθρο, ενώ τα μικρά μήκη κύματος (532, 632, 647 nm) δίνουν μεν υψηλότερη ένταση σήματος, συνοδευόμενη όμως από έντονη φωταύγεια.



Εικόνα 10: Η μέση κανονικοποιημένη τιμή και η τυπική απόκλιση των φασμάτων υγιών (a, d, g) και καρκινικών (b, e, h) δειγμάτων παχέος εντέρου καθώς και η αντίστοιχη διαφορά υγιούς-καρκινικού φάσματος (c, f, i) για 3 διαφορετικά laser διέγερσης. Η κανονικοποίηση έχει γίνει στην κορυφή 1447 cm^{-1} που σημαίνεται με αστερίσκο[28]

Σε μελέτη με χρήση τριών διαφορετικών μηκών κύματος laser διέγερσης (1064, 785, 523 nm) φάνηκε ότι, στα φάσματα ιστών με καρκίνο του παχέος εντέρου οι ζώνες των πρωτεϊνικών δομών μειώνονται, ενώ αντιθέτως οι ζώνες των νουκλεοτιδίων και των αρωματικών αμινοξέων εμφανίζουν αύξηση στην ένταση σε σύγκριση με τους υγιείς ιστούς. Δεν φαίνεται να υπάρχει κάποιο από τα 3 μήκη κύματος που να αποδίδει συνολικά καλύτερα αποτελέσματα από τα υπόλοιπα. Ο συνδυασμός των τριών βοηθά στο να αντιμετωπίζονται τα μειονεκτήματα του καθενός ξεχωριστά και δίνει περισσότερες πιθανότητες στην καλύτερη ανίχνευση των καρκινικών περιοχών. [28]

2.5 Ερευνητικό πρόγραμμα ΒΙΟΦΑΣΜΑ

Ένα ακόμη βήμα προς την προσπάθεια βελτίωσης των μεθόδων διάγνωσης και θεραπείας του καρκίνου του εντέρου γίνεται και με το ερευνητικό πρόγραμμα ΒΙΟΦΑΣΜΑ, του οποίου μικρό μέρος αποτελεί και η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία.

Ο πλήρης τίτλος του είναι: «Ανάπτυξη προηγμένου φορητού βιοφωτονικού συστήματος για την εξατομικευμένη φασματοσκοπικά διάκριση καρκινικών

ιστών/ορίων» (Development of advanced portable biophotonic system for the personalized spectroscopic discrimination of cancer margins/tissues) και χρηματοδοτείται από το ΕΣΠΑ 2014-2020. Συντονιστής του έργου είναι ο Αν. Καθηγητής της ΣΕΜΦΕ ΕΜΠ, Κόντος Αθανάσιος και επιστημονική υπεύθυνη η καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικής του ΔΠΘ, Λαμπροπούλου Μαρία.

Στόχος του ερευνητικού προγράμματος είναι η δημιουργία ενός προηγμένου φορητού βιοφωτονικού εργαλείου, το οποίο θα μπορεί κατά τη διάρκεια ανοικτού χειρουργείου να κάνει εξατομικευμένη διάγνωση των καρκινικών δομών και άμεση, σαφή διάκριση των ορίων τους στο παχύ έντερο και το ορθό. Θα πραγματοποιεί *in vivo* λήψη, καταγραφή, συλλογή και ανάλυση των χαρακτηριστικών φασματικών αποτυπωμάτων των ιστών του εντέρου και του ορθού μέσω φασματοσκοπίας Raman, έτσι ώστε να μπορεί να κάνει τη διάκριση μεταξύ καρκινικών και υγιών ιστών σε πραγματικό χρόνο.

Το ερευνητικό πρόγραμμα ΒΙΟΦΑΣΜΑ έχει συνοπτικά τα ακόλουθα αντικείμενα:

α) την καταγραφή και συγκέντρωση χαρακτηριστικών φασματικών αποτυπωμάτων από ανθρώπινα δείγματα παχέος εντέρου ή/και ορθού, *ex vivo*, μέσω φασματοσκοπίας Raman, σε συνδυασμό με τα αντίστοιχα ιατρικά ιστορικά και τα αποτελέσματα των βιοψιών των δειγμάτων, με στόχο τη δημιουργία μίας ολοκληρωμένης βάσης δεδομένων η οποία, χρησιμοποιώντας αλγορίθμους μηχανικής μάθησης, θα μπορεί να χαρακτηρίζει τα φάσματα που πρόκειται να ληφθούν αργότερα *in vivo*.

β) Την ανάπτυξη σε προκλινικό περιβάλλον και την πιλοτική εφαρμογή του προηγμένου βιοφωτονικού συστήματος BIOSPECT *in situ* σε πειραματόζωα

γ) Τη διερεύνηση της πιλοτικής εφαρμογής του συστήματος σε εθελοντές ασθενείς, *in vivo* σε ανοικτό χειρουργείο.

Οι φορείς που αποτελούν την κοινοπραξία για την υλοποίησή του είναι:

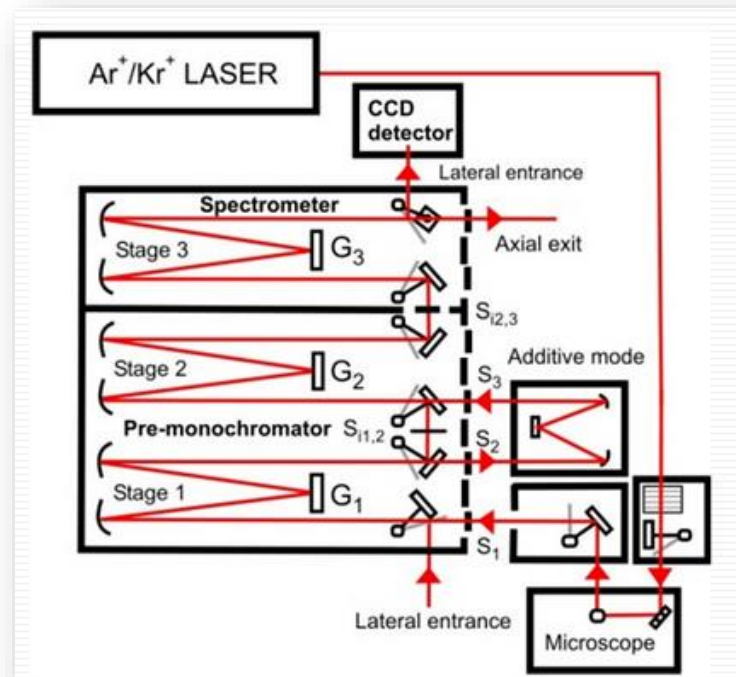
- Το Εργαστήριο Προηγμένων Υλικών και Μικρο-Νανο-Διατάξεων της Σχολής ΕΜΦΕ του ΕΜΠ και πιο συγκεκριμένα η ομάδα οπτικής φασματοσκοπίας.
- Το Τμήμα Ιατρικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης (ΔΠΘ) που συμμετέχει με το Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής και εργαστήρια από τον Μορφολογικό-Κλινικοεργαστηριακό Τομέα και από τον Χειρουργικό Τομέα.
- Η Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) που συμπράττει με εργαστήριά της από τον Τομέα της Χειρουργικής και της Ιατρικής Φυσικής (Β' Εργαστήριο Ακτινολογίας, ΠΓΝ "Αττικών").
- Η εταιρία Alpha ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΕ η οποία παρέχει ολοκληρωμένες λύσεις σε συστήματα πληροφορικής.

Στο σύστημα Raman του εργαστηρίου Προηγμένων Υλικών και Μικρο-Νανο-Διατάξεων (ΣΕΜΦΕ/ΕΜΠ) θα πραγματοποιηθούν *ex vivo* μετρήσεις με στόχο να δημιουργηθεί μια φασματική βιβλιοθήκη με συλλογή και καταγραφή φασματικών αποτυπωμάτων τεσσάρων ειδών ιστών, φυσιολογικών, φλεγμονών, καλοήθων υπερπλασιών και καρκινικών. Τα φρέσκα ανθρώπινα δείγματα θα λαμβάνονται από το ΔΠΘ και το ΕΚΠΑ κατά τη διάρκεια χειρουργικών επεμβάσεων στο έντερο και το ορθό. Τα εξαγόμενα φάσματα θα ταυτοποιούνται με τα αποτελέσματα της βιοψίας που θα γίνεται στο ίδιο δείγμα και θα χαρακτηρίζονται με κατάλληλες μεθόδους στατιστικής επεξεργασίας. Η ομάδα οπτικής Φασματοσκοπίας του εργαστηρίου θα συμμετάσχει επίσης στο σχεδιασμό και την ανάπτυξη του βιοφωτονικού εργαλείου BIOSPECT για την *in vivo* διάγνωση των βιοδομών σε συνεργασία με την εταιρία Alpha ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΕ. [29], [30], [31]

Κεφάλαιο 3ο : Πειραματικές Διατάξεις και Τεχνικές - Όργανα και συστήματα

3.1 Πειραματική διάταξη Τομέα Φυσικής, ΣΕΜΦΕ, ΕΜΠ

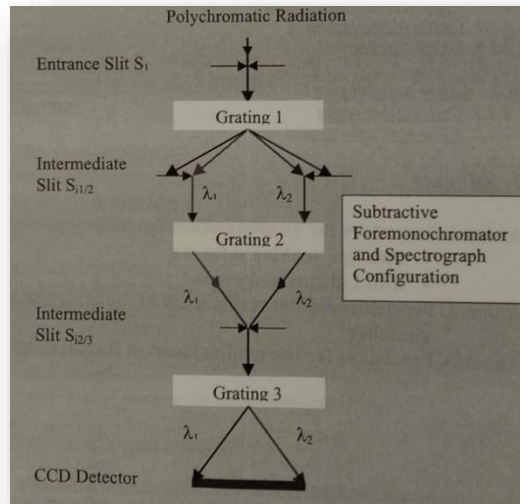
Το πρώτο μέρος των μετρήσεων που θα παρουσιαστούν στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Micro-Raman, της ερευνητικής ομάδας Οπτικής φασματοσκοπίας, που ανήκει στο θεσμοθετημένο εργαστήριο «Προηγμένων υλικών και Μικρο-Νανοδιατάξεων» του Τομέα Φυσικής. Βρίσκεται στο υπόγειο του κτηρίου Φυσικής και διαθέτει το φασματόμετρο T64000 της Jobin-Yvon με τριπλό μονοχρωμάτορα. [32]



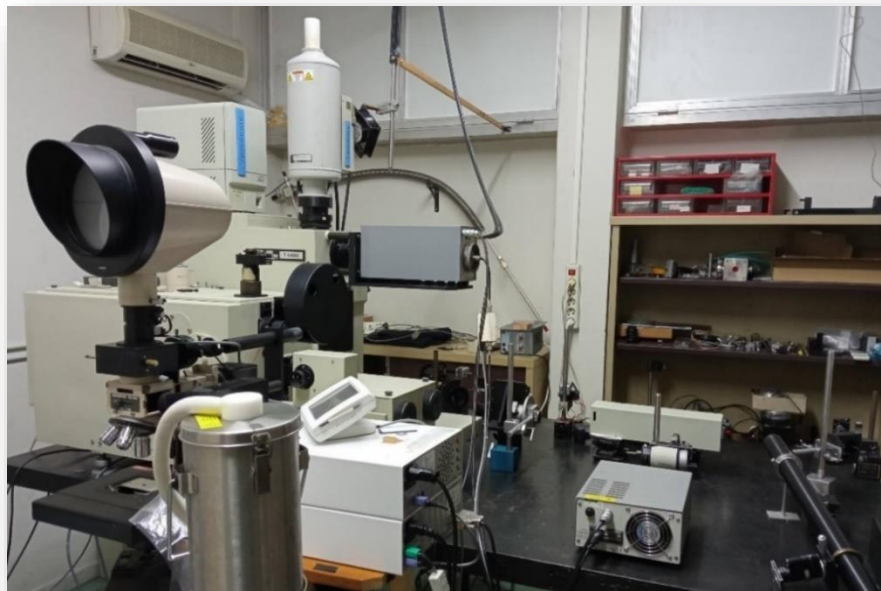
Εικόνα 11: Μπλοκ διάγραμμα του T64000 της Jobin-Yvon [33]

Στην εικόνα 11 διακρίνουμε στο διάγραμμα έναν διπλό προ-μονοχρωμάτορα (Pre-monochromator, stages 1 and 2) και τον κυρίως φασματογράφο (spectrometer, stage 3) που είναι ο τελικός αναλυτής της πολυχρωματικής ακτινοβολίας. Το φασματόμετρο έχει τρία ολογραφικά φράγματα περίθλασης (G1-3) με 1800 σχισμές/mm. Το σύστημα αυτό μπορεί να λειτουργεί είτε σε additive mode (από S_2 , S_3 και όχι από $S_{1,2}$) όπου τα φράγματα περίθλασης κάνουν σειριακά τρεις φορές την ανάλυση της σκεδαζόμενης δέσμης και έτσι βελτιώνεται η διακριτική ικανότητα, είτε σε subtractive mode (από $S_{1,2}$ και όχι από S_2 , S_3), λειτουργία που χρησιμοποιείται πολύ συχνότερα, κατά την οποία ο διπλός προ-μονοχρωμάτορας λειτουργεί σαν ρυθμιζόμενο φασματικό φίλτρο, αποκόπτει με ακρίβεια τις συχνότητες κοντά στην ελαστική σκέδαση Rayleigh και επιτρέπει τη λήψη μετρήσεων σε συχνότητες πολύ κοντά στη συχνότητα διέγερσης του laser. Σε λειτουργία subtractive

mode, αρχικά η σκεδαζόμενη δέσμη εισέρχεται από τη σχισμή S_1 και αναλύεται στο φράγμα περίθλασης G_1 . Στη συνέχεια, η σχισμή $S_{1,2}$ επιτρέπει τη διέλευση μόνο μιας ζώνης μεταξύ λ_1 και λ_2 αποκόπτοντας τις συχνότητες της ελαστικής σκέδασης. Το φράγμα περίθλασης G_2 ανασυνθέτει τη νέα δέσμη (η οποία περιλαμβάνει μόνο το φάσμα μεταξύ λ_1 και λ_2) επανεστιάζοντας την στη σχισμή $S_{2,3}$. Τέλος, η πολυχρωματική δέσμη αναλύεται και πάλι στο G_3 σε λ_1 - λ_2 και οδηγείται στον ανιχνευτή (φωτοπολλαπλασιαστή ή CCD) [33].



Εικόνα 12: Σχεδιαγραμματική ανάλυση του φασματόμετρου.



Εικόνα 13: Άποψη του εργαστηρίου με την οπτική τράπεζα και το φασματόμετρο T64000

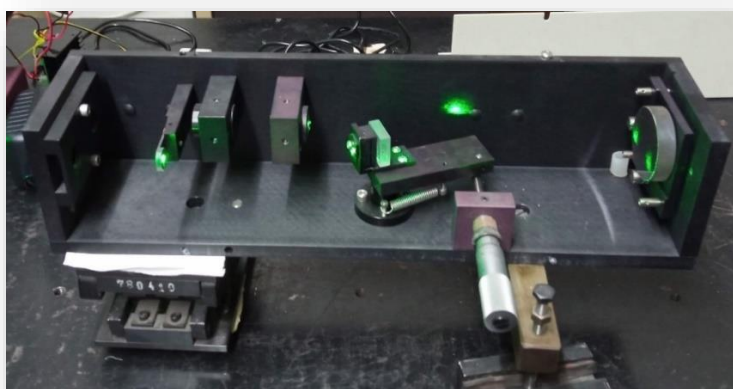
Το σύστημα μας είναι Micro-Raman δηλαδή ο φακός εστίασης της δέσμης του laser είναι ο αντικειμενικός φακός του μικροσκοπίου και ταυτόχρονα είναι και ο φακός συλλογής του σκεδαζόμενου φωτός. Η τυπική διατομή της δέσμης άρα και η χωρική διακριτική του ικανότητα είναι της τάξης του 1-10 μm . Για τη συλλογή του σκεδαζόμενου φωτός διαθέτει φωτοπολλαπλασιαστή PMT αλλά και CCD κάμερα η οποία ψύχεται στους $-140\text{ }^\circ\text{C}$ με υγρό άζωτο, έτσι ώστε να παραμένει χαμηλό το ρεύμα σκότους και να αποφεύγεται ο θερμικός θόρυβος.

Η διέγερση γίνεται με το laser στερεάς κατάστασης Verdi-V5 της Coherent, στα 532 nm (πράσινο), κάθετης πόλωσης, με διάμετρο δέσμης 2,25 mm και μέγιστη ισχύ εξόδου 5W. [34]



Εικόνα 14: Laser διέγερσης Verdi-V5 της Coherent [34]

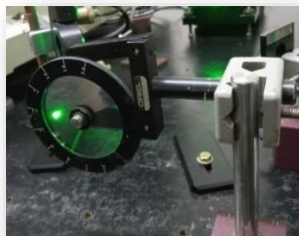
Η δέσμη του laser, πριν φτάσει στο φακό εστίασης, διέρχεται μέσα από ένα ρυθμιζόμενο μονοχρωματικό φίλτρο έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι γραμμές πλάσματος.



Εικόνα 15: Φίλτρο διέγερσης - μονοχρωμάτορας
(SPEX 1450 Tunable Excitation Filter monochromator)

Πριν ξεκινήσουν οι μετρήσεις πρέπει να ρυθμίσουμε την ισχύ της δέσμης. Όταν από το ρυθμιστή ισχύος του laser δώσουμε 0,25 W, μετά το φίλτρο του μονοχρωμάτορα

εξέρχεται δέσμη με ισχύ 0,25 W. Ακολούθως όμως η δέσμη διέρχεται από ρυθμιζόμενο λογαριθμικό φίλτρο-απορροφητή (όταν η ένδειξη είναι 0 δίνει $10^0 = 1$ δηλαδή περνάει όλη η εισερχόμενη ακτινοβολία, ενώ όταν είναι στη θέση π.χ. 0,2 η ένταση της εξερχομένης δέσμης μειώνεται κατά τον παράγοντα $10^{-0,2}$ δηλαδή στο 63 %). Μετράμε την ισχύ που φτάνει στο δείγμα με κατάλληλο όργανο (ισχυόμετρο), χωρίς το φακό μικροσκοπίου, και γυρίζουμε κυκλικά το φίλτρο-απορροφητή ώσπου να πετύχουμε την επιθυμητή ισχύ των 3mW.



Εικόνα 16: Λογαριθμικό φίλτρο-απορροφητής

Στο μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκαν φακοί 10x για την αρχική εστίαση και 100x long distance για τις μετρήσεις. Η συνολική πυκνότητα ισχύος στα δείγματα είναι της τάξης των $3\text{mW}/\mu\text{m}^2$ που είναι ανεκτή τιμή σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Τα φάσματα απεικονίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος LabSpec.

3.2 Πειραματική διάταξη ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Το δεύτερο φασματομέτρο που χρησιμοποιήσαμε βρίσκεται στο εργαστήριο Raman του Τομέα Φυσικοχημείας, στο Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».



Εικόνα 17: Το σύστημα Raman του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Πρόκειται για το In-Via Raman Microscope της Renishaw το οποίο είναι αρκετά πιο καινούριο και πιο αυτοματοποιημένο από εκείνο του ΕΜΠ. Διαθέτει κάμερα με την οποία μπορούμε, μέσω του προγράμματος WiRE, να ρυθμίσουμε την εστίαση, αλλά και να αποθηκεύσουμε την εικόνα του δείγματος πριν τη μέτρηση. Ο CCD ανιχνευτής του έχει μεγάλη ευαισθησία και ψύχεται με θερμοηλεκτρικό στοιχείο για μείωση του θερμικού θορύβου. Επίσης διαθέτει σύστημα X-Y μετακίνησης του δείγματος (stage controller) μεγάλης ακρίβειας. [35]



Εικόνα 18: Άποψη του εσωτερικού του φασματόμετρου της Renishaw

Στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» πήραμε μετρήσεις με διοδικό laser διέγερσης που εκπέμπει στα 514,5 nm, αρχικά με φακό 50x μεγάλης εστιακής απόστασης και στη συνέχεια με υδατοκαταδυτικό φακό Olympus LUM Plan FLN 40x/0,80w.

3.3 Δείγματα ιστών

3.3.1 Προέλευση και συντήρηση

Τα προς μελέτη δείγματα προέρχονται από χειρουργικές επεμβάσεις αφαίρεσης καρκίνου του παχέος εντέρου και του ορθού που πραγματοποιούνται στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικών». Τμήματα των αφαιρούμενων ιστών τοποθετούνται σε κατάλληλους περιέκτες, εντός του ειδικού συντηρητικού υγρού Z7 και διατηρούνται συνεχώς σε ψύξη. Το Z7 είναι νέας γενιάς συντηρητικό με βάση τον ψευδάργυρο, που έχει σταθεροποιητική επίδραση παρόμοια με της φορμόλης, χωρίς όμως να είναι τοξικό, καρκινογόνο ή ευαίσθητο στη θερμοκρασία. [36]

Η μεταφορά των δειγμάτων γίνεται σε ειδικά μονωτικά δοχεία από φελιζόλ, με χρήση παγοκύστεων και εντός του εργαστηρίου διατηρούνται σε ψυγείο που προορίζεται μόνο για τα δείγματα. Η διαχείρισή τους γίνεται ακολουθώντας όλα τα σχετικά πρωτόκολλα και μετά τις μετρήσεις επιστρέφονται στο νοσοκομείο ώστε να απορριφθούν με την ειδική

διαδικασία για τα βιολογικά απόβλητα που ακολουθείται εκεί. Από κάθε χειρουργείο παραδίδεται ένα σετ τεσσάρων δειγμάτων (η κατάσταση των οποίων επιβεβαιώνεται κατόπιν με βάση τα αποτελέσματα των σχετικών βιοψιών) ως εξής:

- 1) Φαινομενικά υγιής ιστός μακριά από τον όγκο
- 2) Φαινομενικά υγιής ιστός κοντά στα όρια του όγκου
- 3) Καρκινικός ιστός στο κέντρο του όγκου
- 4) Καρκινικός ιστός κοντά στα όρια με τον υγιή



Εικόνα 19: Δείγματα ιστών εντός του ψυγείου

3.3.2 Χειρισμός και προετοιμασία

Η διαχείριση των ιστών γίνεται σε ειδικούς χώρους διαμορφωμένους κατάλληλα.



Εικόνα 20: Τραπέζι προετοιμασίας ιστών στο εργαστήριο του ΕΜΠ

Η προετοιμασία των ιστών για τη μέτρηση είναι η εξής: Αρχικά ο ιστός αφαιρείται από το συντηρητικό υγρό, στραγγίζεται ελαφρώς και τοποθετείται σε τριβλίο. Εκεί ξεπλένεται από το συντηρητικό με τη βοήθεια σύριγγας, ρίχνοντας πάνω του φυσιολογικό ορό. Κατόπιν, τοποθετείται σε ειδικό απορροφητικό χαρτί που δεν αφήνει χνούδι για να αφαιρεθεί η υγρασία και να στεγνώσει αρκετά.



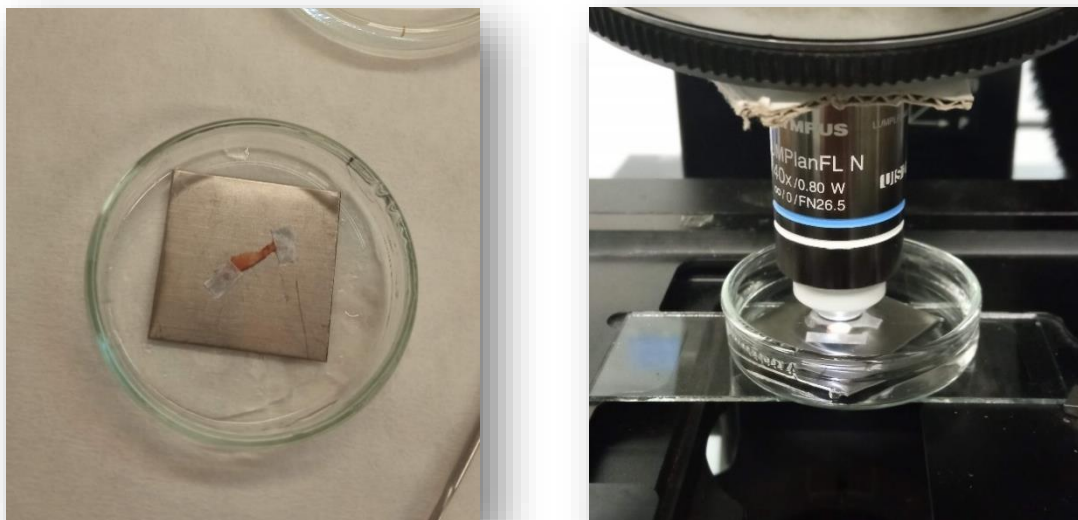
Εικόνα 21: Προετοιμασία ιστών: Αφαίρεση συντηρητικού (αριστερά) και στέγνωμα (δεξιά)

Τέλος, ο ιστός τοποθετείται στο ανοξειδωτο υπόστρωμα όπου πιέζεται ελαφρώς με μια σπάτουλα για να γίνει επίπεδος.



Εικόνα 22: Προετοιμασία ιστών: Τοποθέτηση και επίστρωση

Στην περίπτωση που η μέτρηση θα γίνει με τον καταδυτικό φακό χρειάζεται το ανοξείδωτο υπόστρωμα να τοποθετηθεί μέσα σε τριβλίο το οποίο θα γεμίσει ως κάποια στάθμη με φυσιολογικό ορό. Όμως, για να μην αιωρείται ο ιστός εντός του υγρού και χαλάει η εστίαση, πριν την τοποθέτηση εντός του υγρού ο ιστός σταθεροποιείται πάνω στο υπόστρωμα με τη χρήση αυτοκόλλητων ραμμάτων.



Εικόνα 23: Προετοιμασία ιστών για καταδυτικό φακό

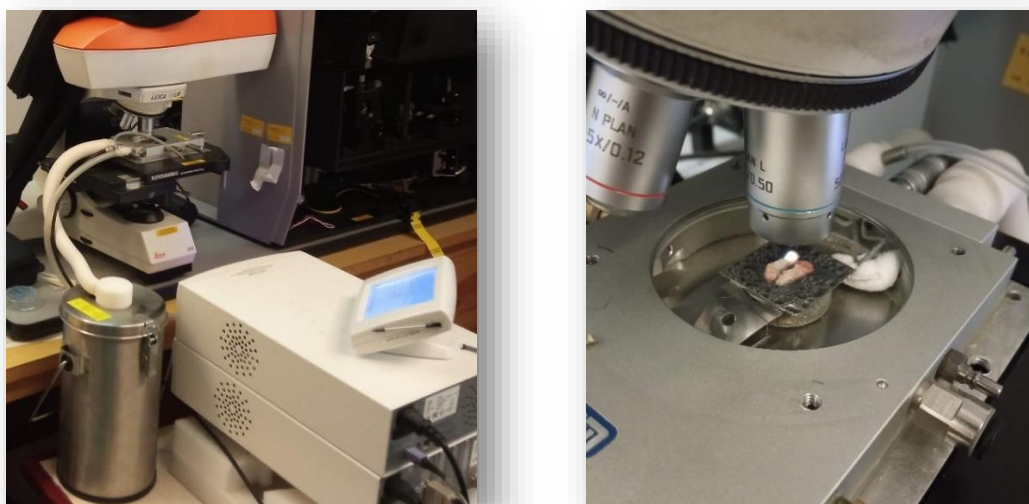
3.4 Προβλήματα εστίασης – Κυψελίδα ψύξης

Ένα από τα κυριότερα προβλήματα που προέκυψαν στις πρώτες απόπειρες μετρήσεων, ήταν το γεγονός ότι η εστίαση δεν μπορούσε να διατηρηθεί σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της μέτρησης επειδή ο νωπός ιστός εκτεθειμένος στην ατμόσφαιρα στέγνωσε σε σύντομο χρονικό διάστημα με αποτέλεσμα τη γρήγορη συρρίκνωσή του. Το φαινόμενο αυτό έκανε αδύνατη τη λήψη αξιόπιστων φασμάτων και απαιτούσε αντιμετώπιση. Η λύση που βρέθηκε ήταν η θερμοστάτιση του ιστού σε αρκετά χαμηλή θερμοκρασία αλλά λίγο πάνω από 0°C έτσι ώστε να μην καταψύχεται και αλλάζει η δομή του. Με τον τρόπο αυτό αποτρέπεται η σταδιακή αφυδάτωση του ιστού και η εστίαση παραμένει σταθερή.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ειδική συσκευή η οποία διατηρεί τον ιστό σε σταθερή θερμοκρασία ψύξης και συγκεκριμένα η διάταξη THMS600 System της Linkam. [37] Η συσκευή αυτή χρησιμοποιεί υγρό άζωτο ως ψυκτικό μέσο αλλά διαθέτει και θερμαντικό στοιχείο για να μπορεί να ρυθμίζει στο επιθυμητό επίπεδο τη θερμοκρασία στην πλατφόρμα πάνω στην οποία τοποθετούνται τα δείγματα.

Στην αριστερή πλευρά της εικόνας 24 βλέπουμε την διάταξη και το ανοξείδωτο δοχείο τροφοδοσίας (dewar) για το υγρό άζωτο, ενώ στη δεξιά με μεγαλύτερη λεπτομέρεια την θερμοκρασιακή κυψελίδα όπου μπορούμε να διακρίνουμε πάνω στο ανοξείδωτο

υπόστρωμα σταγόνες που προέρχονται από την υγροποίηση των υδρατμών της ατμόσφαιρας πάνω στην ψυχρή επιφάνεια.



Εικόνα 24: Σύστημα ψύξης THMS600 System της Linkam.

Η συσκευή THMS600 System της Linkam χρησιμοποιείται ακόμα και σε περιπτώσεις που απαιτείται θέρμανση ή ψύξη της πλατφόρμας με συγκεκριμένο ρυθμό και έχει και πολλές επιπλέον δυνατότητες που στο δικό μας πείραμα ήταν περιττές αφού απλώς χρειαζόμαστε μια σταθερή χαμηλή θερμοκρασία λίγο πάνω από τους 0 °C. Με την χρήση αυτής της συσκευής, λύθηκε μεν το πρόβλημα της εστίασης, όμως ήταν ογκώδης και δύσχρηστη και απαιτούσε συχνή τροφοδοσία με υγρό άζωτο, γι' αυτό αναζητήθηκαν εναλλακτικές λύσεις για την ψύξη των ιστών. Χρειαζόμασταν μια συσκευή που να μπορεί να κρατά τα προς μέτρηση δείγματα σε σταθερή θερμοκρασία 2-3 °C αλλά να είναι μικρή και εύχρηστη και να μην απαιτεί υγρό άζωτο για την ψύξη.

3.5 Κατασκευή συσκευής ψύξης δειγμάτων

Αναζητώντας μία εναλλακτική μέθοδο ψύξης των ιστών κατά τη διάρκεια της μέτρησης, με τρόπο που δεν θα απαιτούσε χρήση υγρού αζώτου, σχεδιάστηκε και κατασκευάστηκε μια νέα συσκευή φορητή, ελαφριά και εύελικτη που χρησιμοποιεί το φαινόμενο Peltier για να επιτυγχάνει την ψύξη.

3.5.1 Φαινόμενο Peltier

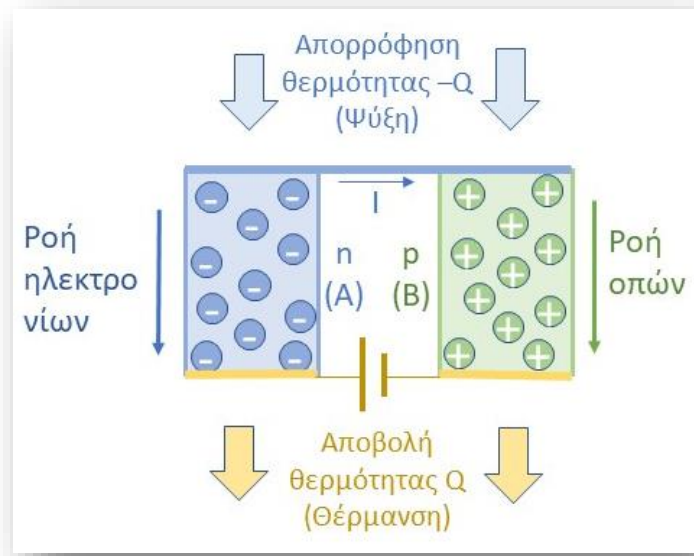
Το φαινόμενο Peltier πήρε το όνομά του από τον Γάλλο φυσικό Jean Charles Athanase Peltier ο οποίος το ανακάλυψε το 1834. [38] Παρατηρείται στον κόμβο (επαφή) δηλαδή στο σημείο ένωσης δύο διαφορετικών αγωγών και πρόκειται ουσιαστικά για το αντίστροφο του φαινομένου Seebeck. Σύμφωνα με το φαινόμενο Seebeck, αν δύο θερμοηλεκτρικά υλικά A και B ενωθούν ηλεκτρικά σε σειρά (θερμοζεύγος) ενώ τα άκρα

και των δύο βρίσκονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες, εμφανίζουν ηλεκτρεγερτική δύναμη ανάλογη της διαφοράς θερμοκρασίας. [39]

Αντιστρόφως, κατά το φαινόμενο Peltier, αν ένα θερμοζεύγος τροφοδοτηθεί από πηγή συνεχούς τάσης ώστε να διαρρέεται από ρεύμα I , ο ένας κόμβος-επαφή μεταξύ A και B απορροφά θερμότητα ($-Q$), ενώ ο δεύτερος αποβάλλει θερμότητα ($+Q$). [40] Μάλιστα αν η τάση τροφοδοσίας αντιστραφεί και το ρεύμα έχει αντίθετη φορά, τότε ο κόμβος που προηγουμένως απορροφούσε τώρα αποβάλλει και αντίστοιχα εκείνος που πριν απέβαλλε τώρα απορροφά. Ο ρυθμός μεταβολής της θερμότητας δίνεται από τον τύπο

$$\dot{Q} = \pi_{AB}I = (\pi_A - \pi_B)I$$

όπου π_A και π_B οι συντελεστές Peltier του υλικού των αγωγών A και B αντίστοιχα, π_{AB} ο συντελεστής peltier του συνολικού κυκλώματος και I το ηλεκτρικό ρεύμα από το A στο B. [41]



Εικόνα 25: Φαινόμενο Peltier – Θερμοηλεκτρικό στοιχείο ψύξης

Οι συντελεστές Peltier π_A και π_B αντιπροσωπεύουν τη θερμότητα που μεταφέρεται ανά μονάδα φορτίου. Συντελεστής Peltier ονομάζεται η θερμική ενέργεια που απορροφάται ή δημιουργείται σε μια από τις συνδέσεις ενός θερμοστοιχείου όταν η σύνδεση διαρρέεται από ρεύμα ενός αμπερ για ένα δευτερόλεπτο ($1 \text{ A} * 1 \text{ sec}$ δηλαδή 1 coulomb). Συμβολίζεται με π και η μονάδα του είναι volt (ή W/A).

Αν η θερμότητα που απορροφάται ή εκλύεται σε μια σύνδεση θερμοστοιχείου συμβολίζεται με H , τότε:

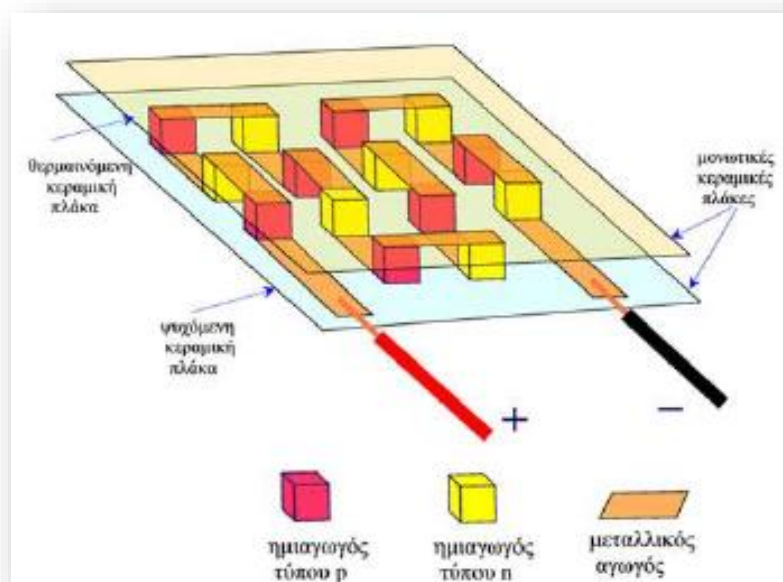
$$\pi = \frac{H}{I * t} \quad \Leftrightarrow \quad H = \pi * I * t.$$

Στην εικόνα 25 βλέπουμε ότι στο n υλικό η ροή της θερμότητας είναι αντίθετη από τη φορά του ρεύματος στο κύκλωμα (οι ροές ηλεκτρικού και θερμικού ρεύματος είναι αντίρροπες) ενώ στο p υλικό η ροή της θερμότητας είναι προς την ίδια φορά με το ρεύμα του κυκλώματος (οι ροές ηλεκτρικού και θερμικού ρεύματος είναι ομόρροπες). Τα υλικά τύπου p μεταφέρουν την θερμότητα προς την ίδια κατεύθυνση με τη φορά του ηλεκτρικού ρεύματος, ενώ τα τύπου n προς την αντίθετη. [42]

Ο συντελεστής Peltier μπορεί κατά μία άλλη έκφραση να οριστεί ως ο λόγος μεταξύ των πυκνοτήτων θερμικού ρεύματος J_Q και ηλεκτρικού ρεύματος J που διαρρέει τη διάταξη

$$\pi = \frac{J_Q}{J} \quad [43]$$

Μια συσκευή Peltier (Peltier plate) αποτελείται από πολλά θερμοηλεκτρικά στοιχεία ψύξης συνδεδεμένα σε σειρά ώστε να διαρρέονται από το ίδιο ρεύμα. Υπάρχουν λοιπόν πολλοί κόμβοι στη σειρά όπου, λόγω του σχετικού φαινομένου, εναλλάξ χάνουν ή κερδίζουν θερμότητα. Τα διαδοχικά θερμοηλεκτρικά στοιχεία τοποθετούνται με τέτοιο τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται η ηλεκτρική συνέχεια αλλά παράλληλα οι κόμβοι με την παρόμοια θερμοκρασία να βρίσκονται όλοι στην ίδια πλευρά (εικόνα 26). Οι κόμβοι με την όμοια θερμοκρασία καλύπτονται με κεραμική πλάκα έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η μεταφορά της θερμότητας αλλά και η ηλεκτρική μόνωση. [41]



Εικόνα 26: Σχηματικό διάγραμμα θερμοηλεκτρικής διάταξης (Peltier plate) [42]

Στο εμπόριο διατίθενται πλακίδια Peltier πολλών τύπων, σε διαφορετικά μεγέθη, που περιέχουν από ένα ως μερικές εκατοντάδες θερμοστοιχεία (από τελλουριούχο βισμούθιο - Bi_2Te_3) τα οποία αναπτύσσονται σε ένα ή περισσότερα επίπεδα, ενώ το ρεύμα, η τάση λειτουργίας καθώς και η απόδοσή τους στην άντληση θερμότητας ποικίλουν επίσης.

Στον κωδικό τους μπορούμε να δούμε το μέγεθος, τα επίπεδα, τον αριθμό των στοιχείων και το ρεύμα λειτουργίας. [44]



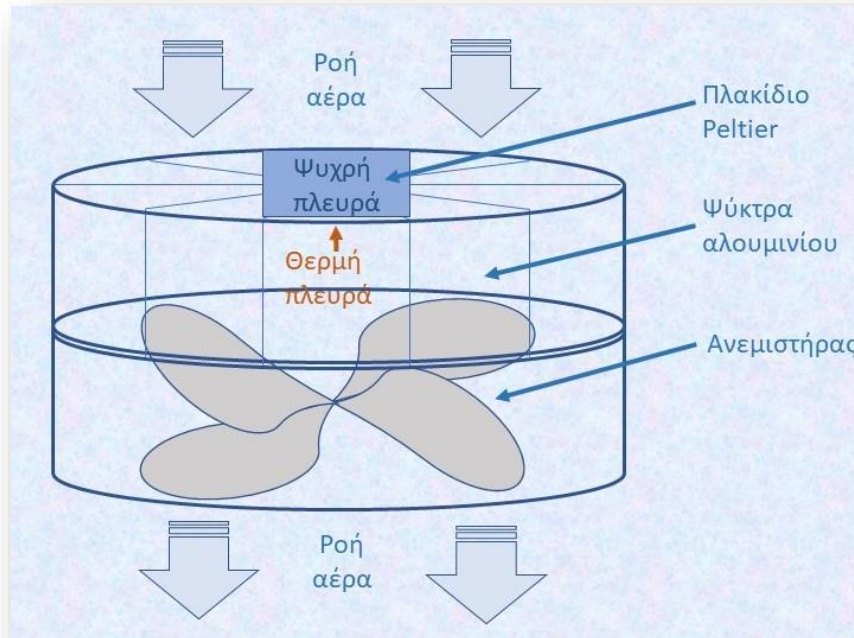
Εικόνα 27: Πλακίδιο Peltier και ανάλυση των στοιχείων του κωδικού του

3.5.2 Κατασκευή διάταξης

Για την κατασκευή χρησιμοποιήθηκαν:

- Peltier Plate TEC1-12709: με 127 θερμοηλεκτρικά ζεύγη, ισχύ 100w, τάση λειτουργίας 0-15,4 V DC και ρεύμα 0-9 A DC [45]
- Σταθεροποιημένο τροφοδοτικό 12V / 10A / 120W [46]
- Θερμοστάτης: Ψηφιακός 12 V DC με οθόνη LED, relay control με 8 Προγράμματα, με NTC (Negative Temperature Coefficient) αδιάβροχο αισθητήρα και ακρίβεια μέτρησης 0,1 °C [47]
- Σύνδεσμος 230 V AC με ενσωματωμένο διακόπτη και ασφαλειοθήκη [48]
- Ψύκτρα CPU με ανεμιστήρα, χαμηλού προφίλ, Arctic Alpine 12 V [49]
- Κουτί και λοιπά υλικά σύνδεσης καλωδιώσεων [50]

Αρχικά κατασκευάστηκε η πλατφόρμα ψύξης. Έγινε η σύνδεση του πλακιδίου Peltier με ψύκτρα αλουμινίου ώστε να επιτυγχάνεται η απαγωγή της θερμότητας από τη θερμή πλευρά του. Χωρίς αυτή, πολύ σύντομα η θερμή πλευρά επηρεάζει την ψυχρή μειώνοντας δραματικά την ψυκτική απόδοση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ψύκτρα από CPU ηλεκτρονικού υπολογιστή. Επιλέχθηκε αυτή που είχε το χαμηλότερο ύψος έτσι ώστε το συνολικό ύψος της πλατφόρμας ψύξης να μπορεί να χωρά στον διαθέσιμο χώρο κάτω από το μικροσκόπιο του φασματόμετρου στο εργαστήριο του ΕΜΠ.



Εικόνα 28: Σχεδιάγραμμα πλατφόρμας ψύξης

Η θερμή πλευρά του πλακιδίου Peltier εφαρμόστηκε στη θέση της CPU με τη βοήθεια θερμοαγωγικής πάστας και στην ψυχρή στερεώθηκε μηχανικά ο αισθητήρας θερμοκρασίας (και αυτός με χρήση θερμοαγωγικής πάστας). Στις πρώτες δοκιμές παρατηρήθηκε ότι ο ανεμιστήρας της ψύκτρας ήταν τοποθετημένος ώστε να διοχετεύει τον αέρα προς την CPU. Αυτό όμως είχε ως αποτέλεσμα ο θερμός αέρας να έρχεται προς την ψυχρή πλευρά και να επηρεάζει ανεπιθύμητα την απόδοση ψύξης. Επειδή δεν υπήρχε δυνατότητα αντιστροφής της φοράς κίνησης του ανεμιστήρα μέσω της αντιστροφής της τάσης τροφοδοσίας του, το όλο σύστημα αποσυναρμολογήθηκε και επανασυνδέθηκε έτσι ώστε η ροή του θερμού αέρα να κατευθύνεται αντίθετα από την ψύκτρα αλουμινίου και το Peltier πλακίδιο και έτσι να ανανεώνεται καλύτερα ο ψυχρός αέρας.



Εικόνα 29: Πρόχειρη σύνδεση για τις πρώτες δοκιμές και πρόδος της κατασκευής

Ακολούθως συνδέθηκε ο ψηφιακός ελεγκτής (θερμοστάτης). Στην οθόνη του εμφανίζει στην κάτω γραμμή με μπλε χρώμα την επιθυμητή θερμοκρασία που ρυθμίζεται με κουμπί, ενώ στην πάνω γραμμή εμφανίζει με κόκκινο την θερμοκρασία που μετρά ο αισθητήρας. Όσο το ρελέ του είναι κλειστό (άγει) ανάβει ένα κόκκινο LED δίπλα στην μπλε ένδειξη επιθυμητής θερμοκρασίας. Μόλις επιτευχθεί η επιθυμητή θερμοκρασία το ρελέ ανοίγει (δεν άγει) και το φωτάκι σβήνει.

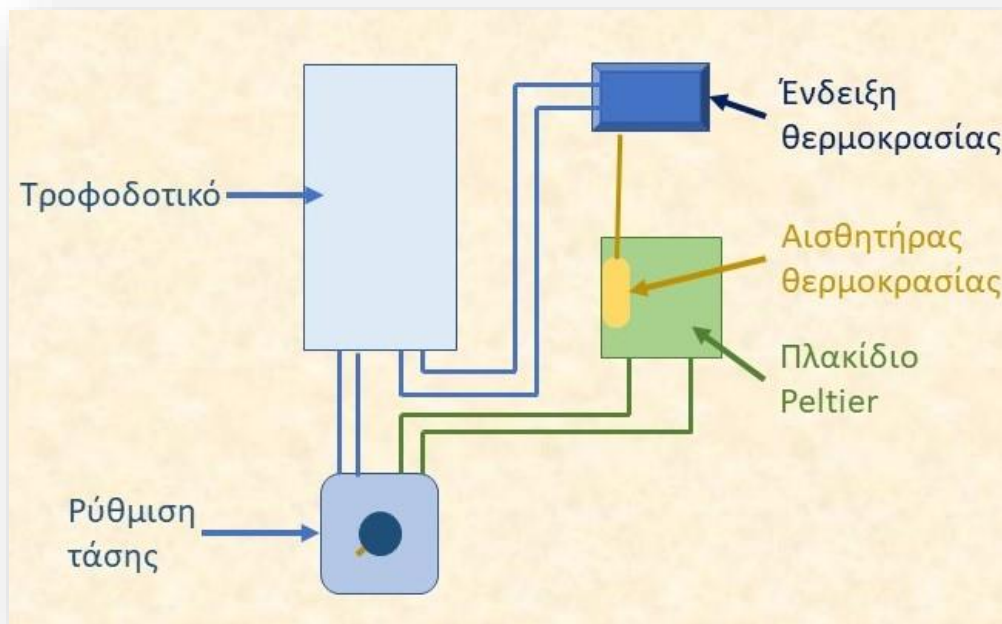


Εικόνα 30: Πρώτη κατασκευή με τον ψηφιακό θερμοστάτη-ρυθμιστή

Χρησιμοποιώντας τον ψηφιακό θερμοστάτη και έχοντας ρυθμίσει την επιθυμητή θερμοκρασία στους 2 °C διαπιστώθηκαν τα εξής: Ξεκινώντας από θερμοκρασία δωματίου περίπου 25 °C το ρελέ άγει, το Peltier τροφοδοτείται και μετά από 8-10 δευτερόλεπτα φτάνει τους 2 °C οπότε το ρελέ κόβει την τροφοδοσία. Η θερμοκρασία όμως συνεχίζει να πέφτει και φτάνει σχεδόν τους 0 °C (0,2 °C) μέχρις ότου λόγω της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος να αρχίσει να ξανανεβαίνει. Όταν η θερμοκρασία πιάσει τους 4 °C το ρελέ ανοίγει πάλι την τροφοδοσία του Peltier, όμως ώσπου να αρχίσει να αποδίδει η ψύξη του, η θερμοκρασία προλαβαίνει να ξανανέβει στους 8-10 °C, με αποτέλεσμα την περιοδική αυξομείωση της θερμοκρασίας μεταξύ 0-10 °C σε κύκλους περίπου 30 δευτερολέπτων. Όταν η συσκευή δοκιμάστηκε στο φασματόμετρο παρατηρήθηκε ότι αυτή η περιοδική διακύμανση της θερμοκρασίας προκαλεί ανάλογη περιοδική διακύμανση της εστίασης της δέσμης του laser. Μάλιστα τώρα οι αλλαγές στην εστίαση είναι συνεχείς αφού ακολουθούν τις γρήγορες εναλλαγές της θερμοκρασίας (από 0-10 °C σε περίπου 15 δευτερόλεπτα) και το πρόβλημα αντί να βελτιωθεί χειροτέρευσε. Ακόμη και αν ρυθμίζαμε τον θερμοστάτη να ανοίγει και πάλι το ρελέ στους 2,1 °C (αντί στους 4 °C) και πάλι λόγω της καθυστέρησης στην απόκριση του Peltier θα είχαμε μια διακύμανση 0-4 °C που δεν θα έλυνε το πρόβλημα. Ενδεχομένως να μπορούσε να βρεθεί ή να σχεδιαστεί ένας ρυθμιστής που να ανοιγοκλείνει το κύκλωμα αρκετά γρήγορα ώστε να σταθεροποιηθεί η θερμοκρασία, όμως το συνεχές άνοιγμα και κλείσιμο του κυκλώματος θα επηρέαζε αρνητικά μειώνοντας κατά πολύ τη

διάρκεια ζωής του πλακιδίου, έτσι λοιπόν η χρήση του ψηφιακού θερμοστάτη-ρυθμιστή απορρίφθηκε.

Το πρόβλημα προσεγγίστηκε με διαφορετικό τρόπο και αντί το Peltier να τροφοδοτείται με on-off από τα 12 V μέσω του ρελέ, έγινε ρύθμιση της τάσης τροφοδοσίας του. Χρησιμοποιήθηκε ένα dimmer για ταινίες φωτισμού led 12-24 V DC (360-720 w) με ποτενσιόμετρο, μέσω του οποίου ρυθμίζεται η τάση τροφοδοσίας του Peltier από 0-12 V DC. [51] Το τροφοδοτικό του Peltier αποσυνδέθηκε από το ρελέ του θερμοστάτη-ρυθμιστή και συνδέθηκε στο dimmer για να ρυθμίζεται η τάση από το ποτενσιόμετρο. Όμως συνεχίσαμε να χρησιμοποιούμε τον αισθητήρα του θερμοστάτη και την οθόνη του για τη μέτρηση της θερμοκρασίας.



Εικόνα 31: Σχεδιάγραμμα τελικής κατασκευής

Η συσκευή δοκιμάστηκε για κάποιες μέρες μόνη της, χωρίς ιστό και laser, ξεκινώντας από θερμοκρασία περιβάλλοντος 25-26 °C. Ανεξάρτητα από τη θέση του ποτενσιόμετρου, μετά το άνοιγμα, μέσα σε χρόνο περίπου 2 λεπτών είχε επιτευχθεί μια σταθερή θερμοκρασία, η οποία και παρέμενε σταθερή $\pm 0,2$ °C για πάνω από μία ώρα που διαρκούσε η δοκιμή. Παρατηρήθηκε ότι παρότι το ποτενσιόμετρο αφηνόταν σταθερά στην ίδια θέση, από μέρα σε μέρα δεν επιτυγχάνονταν η ίδια τελική θερμοκρασία, πιθανότατα επειδή άλλαζε η θερμοκρασία περιβάλλοντος, όμως πάντοτε μετά από 2 λεπτά έφτανε σε οριακή σταθερή θερμοκρασία. Χρειάζονται λοιπόν κάποιες δοκιμές τα πρώτα λεπτά της χρήσης ώστε να βρεθεί η ακριβής θέση του ποτενσιόμετρου που θα μας δώσει την επιθυμητή θερμοκρασία.



Εικόνα 32: Τελική μορφή κατασκευής τοποθετημένη στο φασματόμετρο

Κατά την πραγματική χρήση στο φασματόμετρο, με τον ιστό ακτινοβολούμενο από το laser, διαπιστώθηκε μια τάση για αύξηση της τελικής οριακής θερμοκρασίας της τάξης των 0,3-0,4°C. Πιθανότατα, η ακτινοβολία από το laser ή και η λειτουργία της λάμπας του μικροσκοπίου κατά την εστίαση θερμαίνουν σταδιακά ελαφρώς τον ιστό και αλλάζουν τη θερμική ισορροπία. Όμως η αλλαγή αυτή συνέβαινε με πολύ αργό ρυθμό (~ 0,1 °C σε 5 λεπτά) και τελικά δεν επηρέαζε καθόλου την εστίαση. Η συσκευή που κατασκευάσαμε λοιπόν, μπορεί να μην επιτυγχάνει απόλυτα σταθερή θερμοκρασία, όμως ανεξαρτήτως αυτού εξασφαλίζει τη σταθερή εστίαση παρά τη μικρή μεταβολή της θερμοκρασίας.

Κεφάλαιο 4ο : Παρουσίαση και Ανάλυση μετρήσεων

Στην παρούσα εργασία θα γίνει επεξεργασία και παρουσίαση μόνο των δειγμάτων 1 και 3 που αντιστοιχούν σε υγιείς και καρκινικούς ιστούς αντίστοιχα.

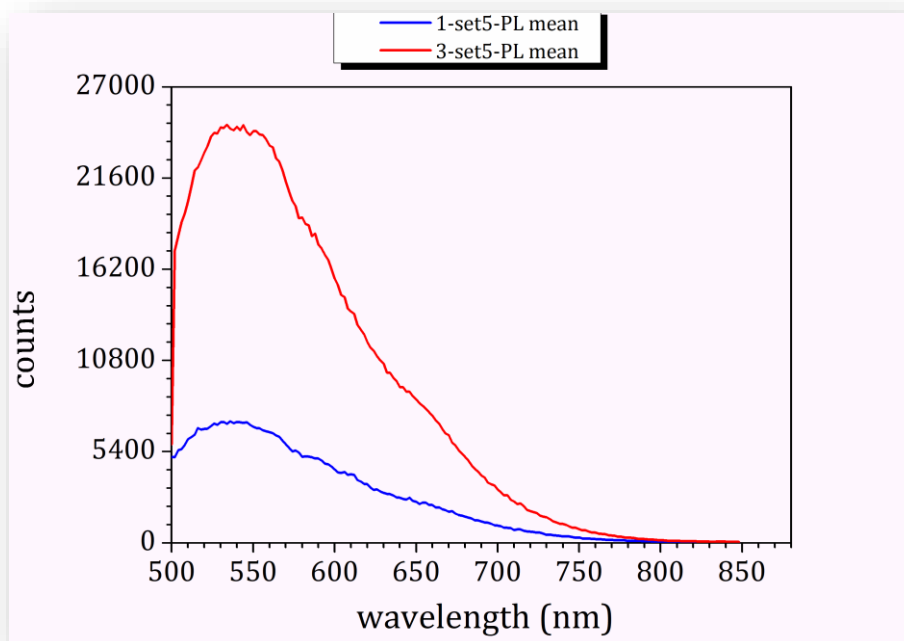
4.1 Φωταύγεια - Υπόβαθρο φασμάτων

4.1.1 Φωταύγεια ανθρώπινων ιστών

Μετρήσεις φωταύγειας έγιναν στο εργαστήριο του ΕΜΠ με laser διέγερσης στα 450nm, με φακό 100x μεγάλης εστιακής απόστασης. Οι μετρήσεις στους καρκινικούς ιστούς έδωσαν αισθητά μεγαλύτερη φωταύγεια σε σχέση με αυτές στους υγιείς ιστούς.

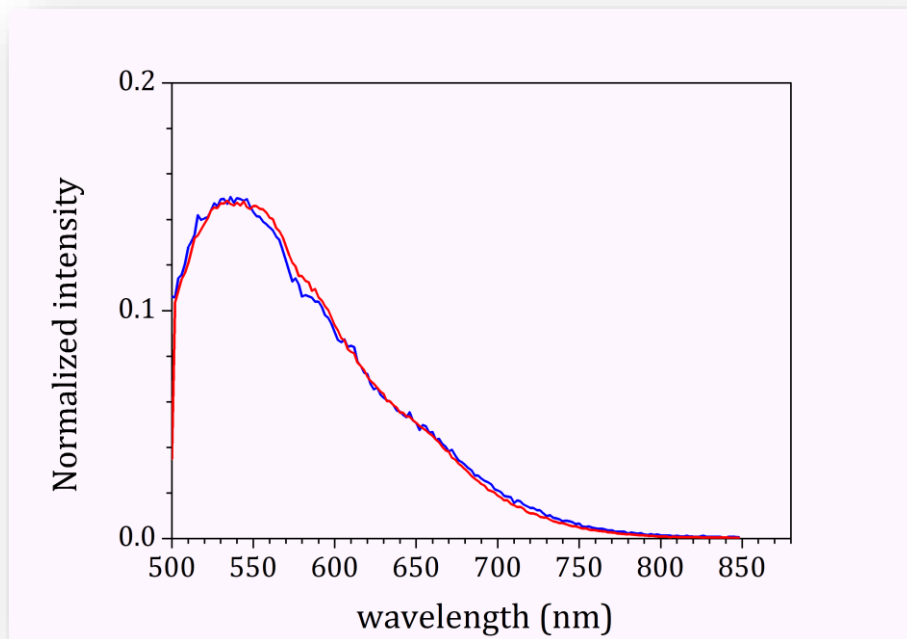
Ο εγγενής φθορισμός στους όγκους εμφανίζεται εντονότερος από αυτόν των υγιών ιστών. Αυτό συμβαίνει επειδή στην περίπτωση του όγκου αυξάνεται το πάχος του βλεννογόνου ο οποίος εμφανίζει εντονότερο φθορισμό από ότι τα βαθύτερα στρώματα, αλλά και από την απορρόφηση από την αιμοσφαιρίνη η οποία είναι αυξημένη στους καρκινικούς ιστούς [52].

Στους βιολογικούς ιστούς η αυτοφωταύγεια προκαλείται από ποικίλα ενδογενή στοιχεία όπως το κολλαγόνο, η ελαστίνη, η κερατίνη και το συνένζυμο NADH. Η υπέρθεση των επιμέρους κορυφών τους δίνει ένα ευρύ φάσμα που εμφανίζει μέγιστο μεταξύ 440-450 nm και στα 490 nm. Άλλα στοιχεία που συνεισφέρουν στην αυτοφωταύγεια είναι τα ρετινοειδή, το αραχιδονικό οξύ (ένα πολυακόρεστο ωμέγα-6 λιπαρό οξύ) του οποίου η ευρεία κορυφή φτάνει ως και τα 550 nm καθώς και η οξυαιμοσφαιρίνη και η μη οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη [53].

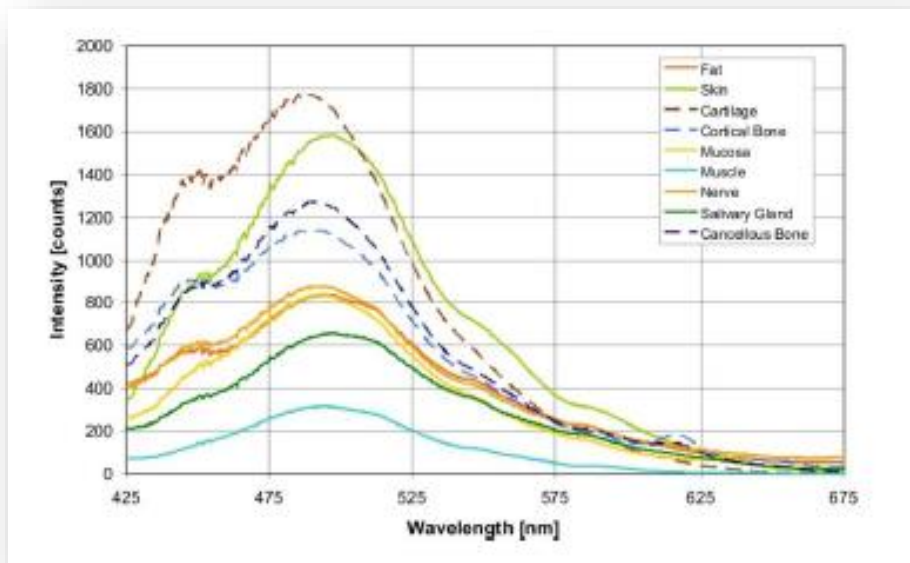


Εικόνα 33: Μετρήσεις φωταύγειας σε υγιείς (μπλε γραμμή) και καρκινικούς (κόκκινη γραμμή) ιστούς

Επίσης διαπιστώθηκε πειραματικά ότι μετρήσεις που επαναλαμβάνονταν στο ίδιο σημείο έδιναν σταδιακά μειούμενη φωταύγεια.

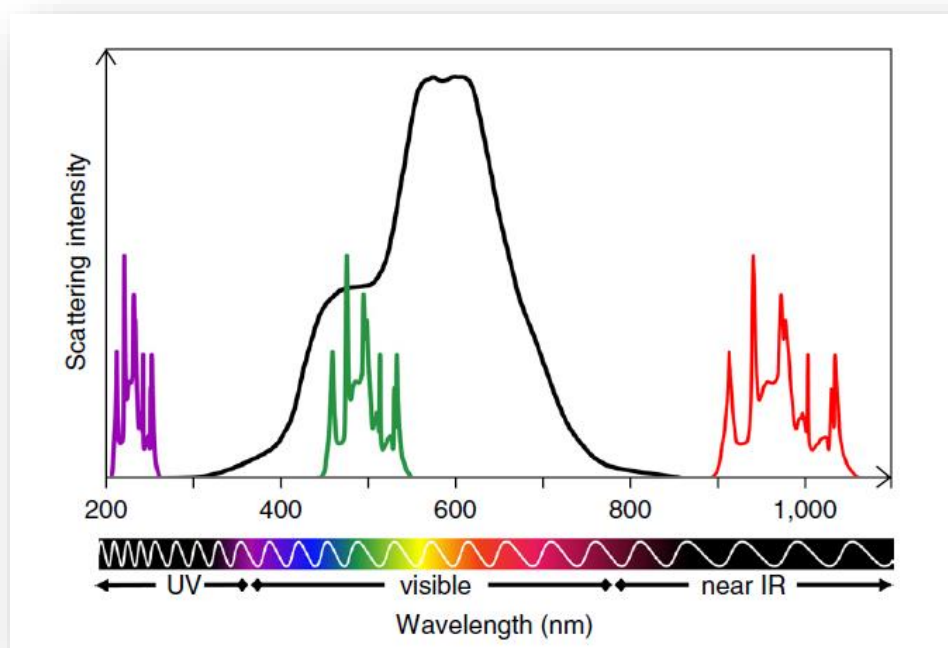


Εικόνα 34: Μετρήσεις φωταύγειας σε υγιείς (μπλε γραμμή) και καρκινικούς (κόκκινη γραμμή) κανονικοποιημένες



Εικόνα 35: Μέσος όρος φωταύγειας διάφορων βιολογικών στοιχείων [53]

Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ότι για τη φασματοσκοπία Raman σε βιολογικούς ιστούς προτιμώνται τα μεγαλύτερα μήκη κύματος στο laser διέγερσης (785 nm και 1064 nm)) διότι εμφανίζουν σχετικά μικρότερη φωταύγεια, έναντι των μικρότερων (532 nm, 632 nm και 647 nm) τα οποία δίνουν εντονότερο υπόβαθρο [28].

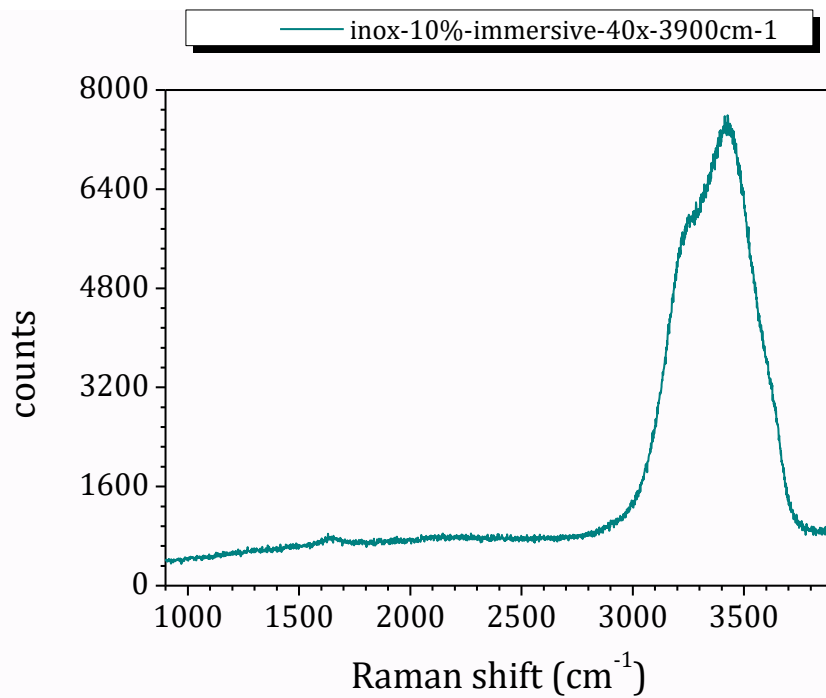


Εικόνα 36: Απλουστευμένη σχηματική απεικόνιση της επίδρασης της φωταύγειας στα φάσματα που προκύπτουν από laser διέγερσης στο UV (με μωβ), στο ορατό (με πράσινο χρώμα) και στο NIR (με κόκκινο) [54]

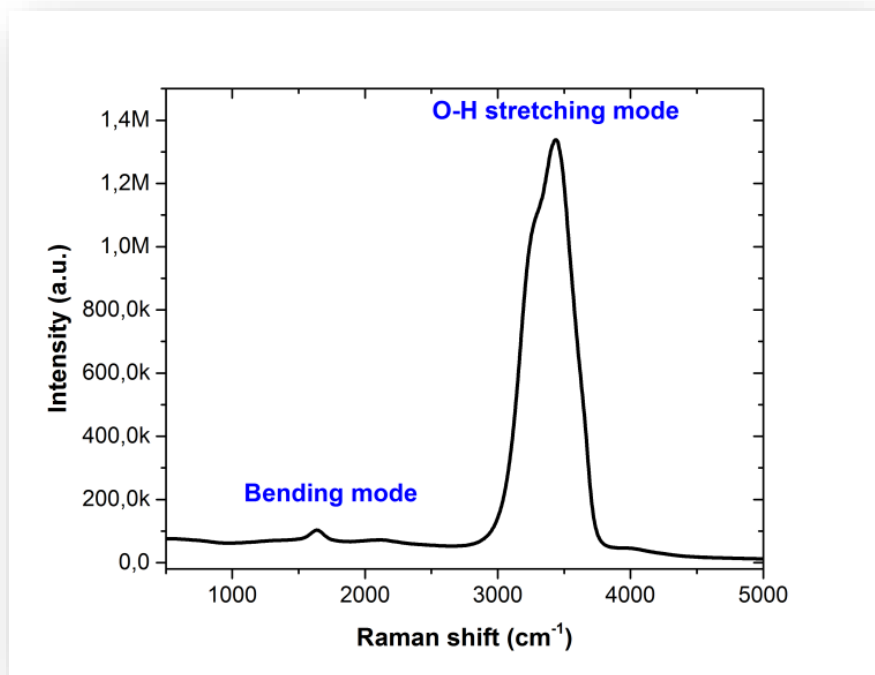
4.1.2 Υπόβαθρο νερού

Εφόσον πάρθηκαν μετρήσεις και με υδατοκαταδυτικό (immersive) φακό με χρήση φυσιολογικού ορού, κρίθηκε σκόπιμο να γίνει και διερεύνηση του φάσματος Raman του ορού. Πήραμε λοιπόν μια μέτρηση μόνο με το ανοξείδωτο υπόστρωμα μέσα σε τριβλίο με φυσιολογικό ορό, στο φασματόμετρο του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» με το laser των 514,5nm, από 500-3200 cm^{-1} με τον καταδυτικό φακό Olympus LUM Plan FL N 40x/0.80w

Η μέτρησή μας είναι αντίστοιχη με της βιβλιογραφίας για το καθαρό νερό και παρουσιάζει ισχυρότατη κορυφή σε συχνότητες από 3200 ως 3600 cm^{-1} λόγω δονήσεων συμμετρικής έκτασης OH καθώς και δευτερεύουσα κορυφή στα 1645 cm^{-1} λόγω δονήσεων κάμψης HOH. Αυτές οι κορυφές αναμένεται να εμφανίζονται ως παρασιτικές κορυφές στα φάσματα που παίρνουμε με τον υδατοκαταδυτικό φακό στους ιστούς.



Εικόνα 37: Μέτρηση INOX - Νερού



Εικόνα 38: Φάσμα Raman του καθαρού νερού από βιβλιογραφία [55]

4.2 Μετρήσεις και επεξεργασία φασμάτων από το φασματόμετρο T64000 της Jobin-Yvon στο ΕΜΠ

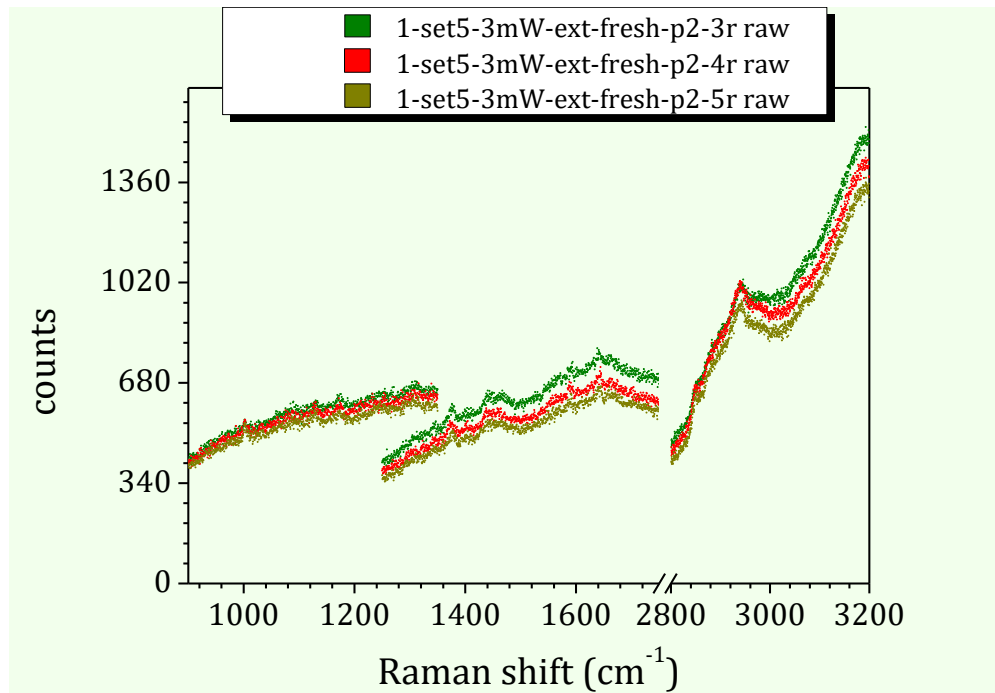
4.2.1 Μετρήσεις με το laser διέγερσης των 532 nm

Οι μετρήσεις με το laser διέγερσης των 532 nm έγιναν στο εργαστήριο micro-Raman του ΕΜΠ και πραγματοποιήθηκαν με το φασματόμετρο T64000 της Jobin-Yvon σε subtractive mode. Η φασματική ρύθμιση έγινε σε εκτεταμένη φασματική περιοχή όμως, επειδή το όργανο δεν έχει τη δυνατότητα να σαρώσει απευθείας όλο το φάσμα, έγινε ορισμός τριών επιμέρους περιοχών Α) 850-1350 cm^{-1} Β) 1250-1750 cm^{-1} και Γ) 2790-3200 cm^{-1} . Οι δύο πρώτες περιοχές αλληλεπικαλύπτονται ενώ η τρίτη είναι απομακρυσμένη.

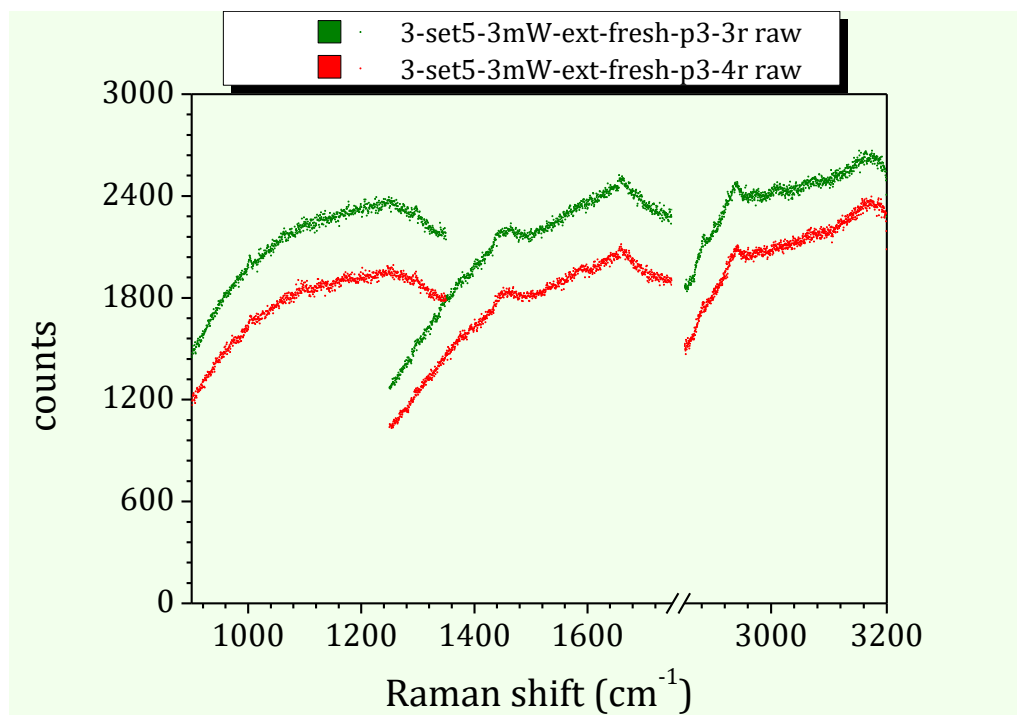
Τα πρώτα δείγματα (σετ 4 και 5) ήταν ακανόνιστα και σχετικά μεγάλα σε μέγεθος (αρκετά mm) ενώ τα τελευταία (πχ. σετ 18) τεμαχίζονται σε φέτες πάχους περίπου 1 mm ώστε να είναι πιο επίπεδα και να διευκολύνεται περισσότερο η σταθερή εστίαση του laser και η παρατήρησή τους στο οπτικό μικροσκόπιο.

Έγιναν συνολικά 98 μετρήσεις 53 σε υγιή δείγματα (sample1) και 45 σε καρκινικά (sample 3).

Οι μετρήσεις που παρουσιάζονται στην ίδια εικόνα έχουν παρθεί διαδοχικά από το ίδιο ακριβώς σημείο. Παρατηρούμε ότι το υπόβαθρο μειώνεται σταδιακά από μέτρηση σε μέτρηση.



Εικόνα 39: Ενδεικτικά ανεπεξεργαστα φάσματα υγιούς ιστού από το σετ 5.

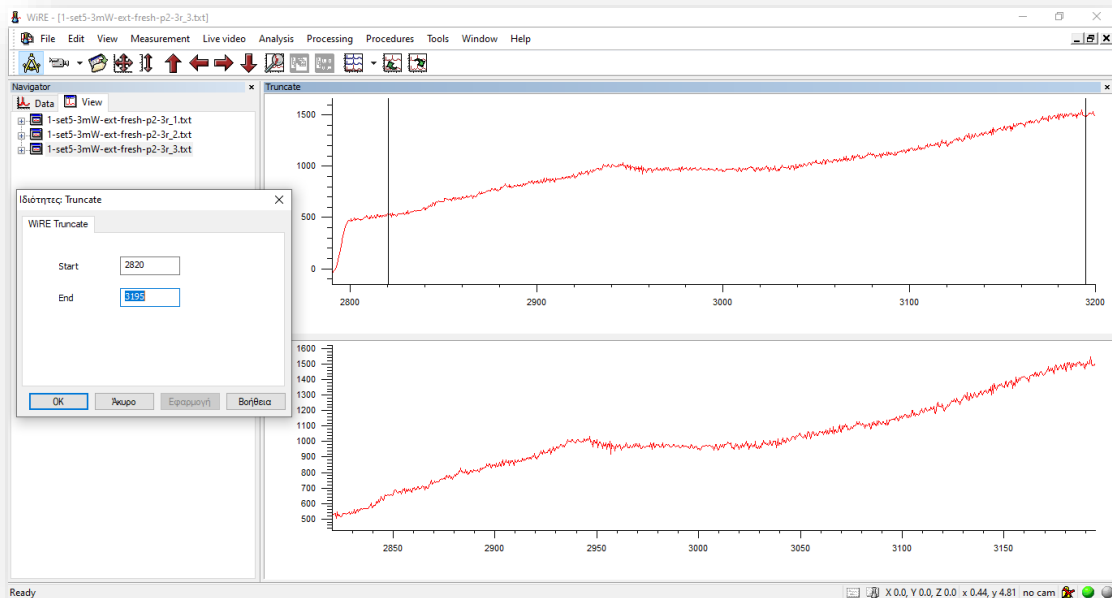


Εικόνα 40: Ενδεικτικά ανεπεξεργαστα φάσματα καρκινικού ιστού από το σετ 5

4.2.2 Επεξεργασία φασμάτων

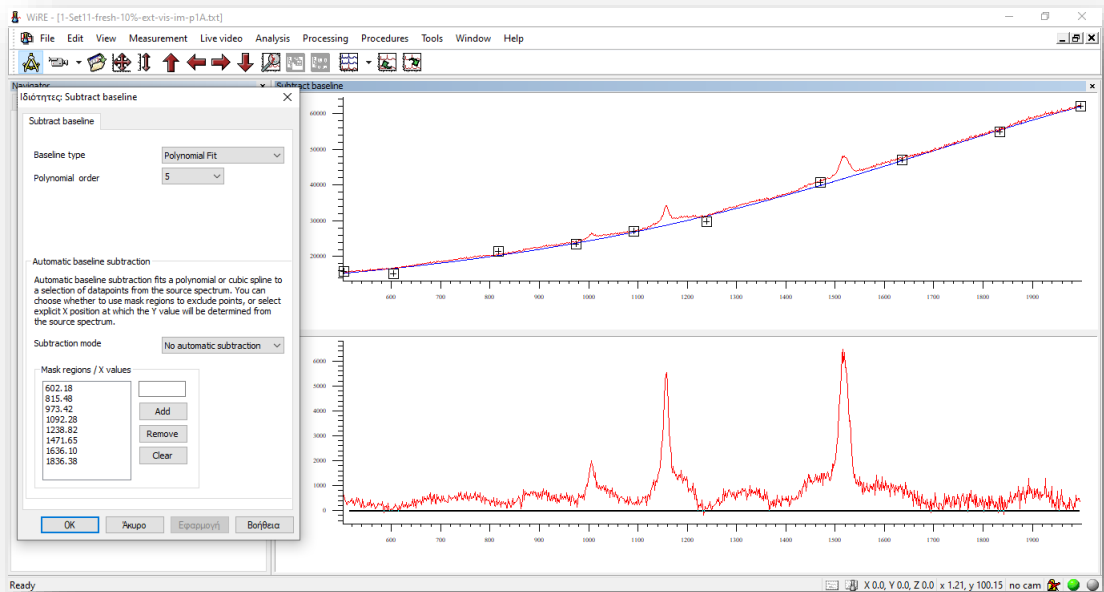
Για να μπορέσουμε να εξάγουμε το καθαρό φάσμα Raman από τις μετρήσεις μας (raw spectra) είναι απαραίτητο να εξαλείψουμε το σήμα της φωταύγειας έτσι ώστε να μπορέσει τελικά να γίνει σωστά η φασματική ανάλυση. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες τεχνικές για αυτό το σκοπό και προτιμότερες είναι κάποιες μαθηματικές μέθοδοι που μπορούν να εφαρμοστούν εκ των υστέρων μέσω κάποιου υπολογιστικού προγράμματος χωρίς να χρειαστεί επέμβαση στο πραγματικό σύστημα μετρήσεων. Κάθε μία από αυτές έχει τα δικά της πλεονεκτήματα οπότε η επιλογή εξαρτάται από την περίπτωση και γίνεται μετά από μελέτη των συγκεκριμένων συνθηκών. Μια από τις πιο απλές και ακριβείς μεθόδους διαχωρισμού του σήματος της φωταύγειας είναι η πολυωνυμική προσαρμογή (polynomial fitting) κατά την οποία αφαιρείται από το μεικτό φάσμα (raw spectra) ένα πολυώνυμο κατάλληλου βαθμού ώστε να περιγράψει ομαλά τη νοητή γραμμή βάσης πάνω από την οποία ξεχωρίζουν οι έντονες κορυφές του σήματος Raman [27].

Για την αρχική επεξεργασία και την αφαίρεση του υπόβαθρου της φωταύγειας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα WiRE. Τα δεδομένα των μετρήσεων (raw data) από τις τρεις περιοχές A) 850-1350 cm^{-1} B) 1250-1750 cm^{-1} και G) 2790-3200 cm^{-1} κόπηκαν μέσω του εργαλείου truncate ώστε να αφαιρεθούν οι λανθασμένες οριακές τιμές καθώς και η αλληλοεπικαλυπτόμενη περιοχή των A και B.



Εικόνα 41: Ενδεικτική απεικόνιση της επεξεργασίας αποκοπής των φασματικών άκρων.

Τα αρχικά δεδομένα κόπηκαν σε Α) 900-1280 cm^{-1} , Β) 1280-1750 cm^{-1} και Γ) 2800-3195 cm^{-1} και ακολούθησε η επεξεργασία αφαίρεσης του υπόβαθρου φωταύγειας με το εργαλείο subtract baseline

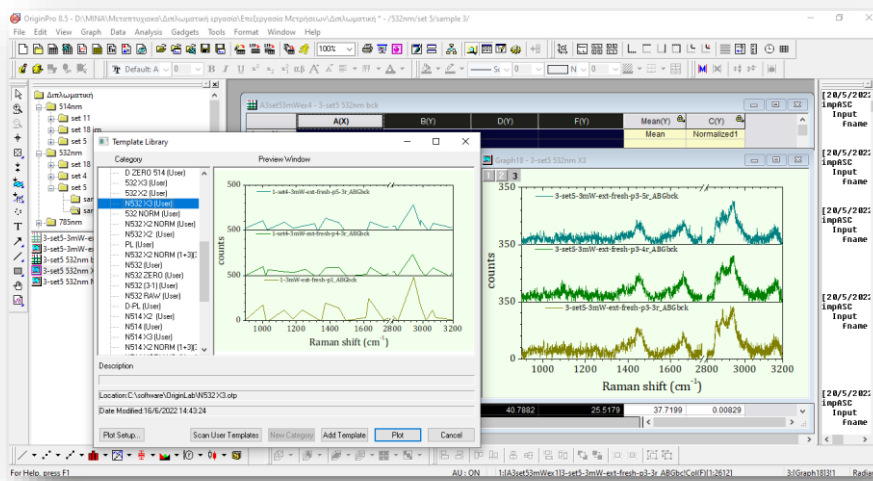


Εικόνα 42: Ενδεικτική απεικόνιση της επεξεργασίας αφαίρεσης του υπόβαθρου φωταύγειας.

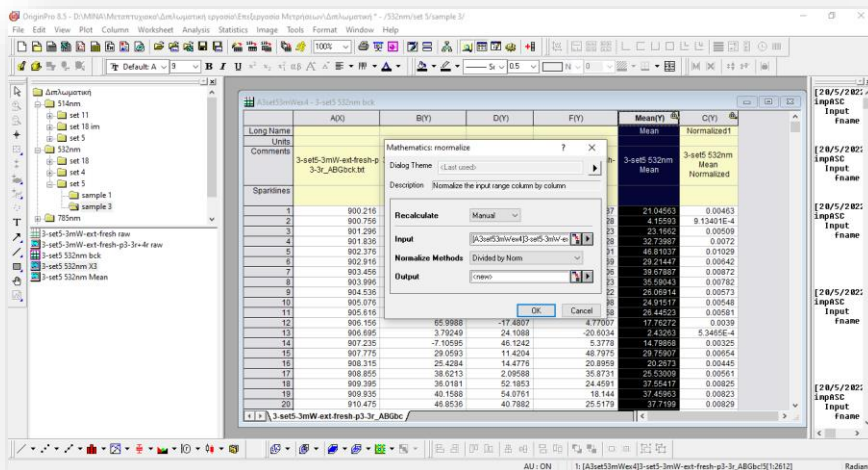
Στον τύπο πολυωνύμου επιλέχθηκε το πολυώνυμο 5^{ης} τάξης (polynomial fit order 5) και χρησιμοποιήθηκαν 8+2 σημεία για την δημιουργία της καμπύλης που αφαιρείται. Η κάθε περιοχή επεξεργάστηκε χωριστά και προέκυψαν τρία κομμάτια του επεξεργασμένου σήματος Raman (background corrected) τα οποία εντέλει ενώθηκαν σε ένα κοινό αρχείο txt με το όνομα του σημείου.

Η υπόλοιπη επεξεργασία για την τελική απεικόνιση των φασμάτων σε γραφική παράσταση και για την κανονικοποίησή τους, έγινε με το πρόγραμμα OriginPro 8.5. Η κανονικοποίηση έγινε με τη ρύθμιση “Divided by norm”

$$(\text{Norm: } \|v\| = \sqrt{V_1^2 + V_2^2 + \dots + V_n^2})$$



Εικόνα 43: Ενδεικτική απεικόνιση της τελικής επεξεργασίας και παρουσίας των φασμάτων.



Εικόνα 44: Ενδεικτική απεικόνιση της κανονικοποίησης των φασμάτων

4.2.3 Αποτελέσματα Σετ 4 και Σετ 5

Laser: 532nm (πράσινο) με ισχύ 3mW, μετρημένο πριν το δείγμα χωρίς το φακό.

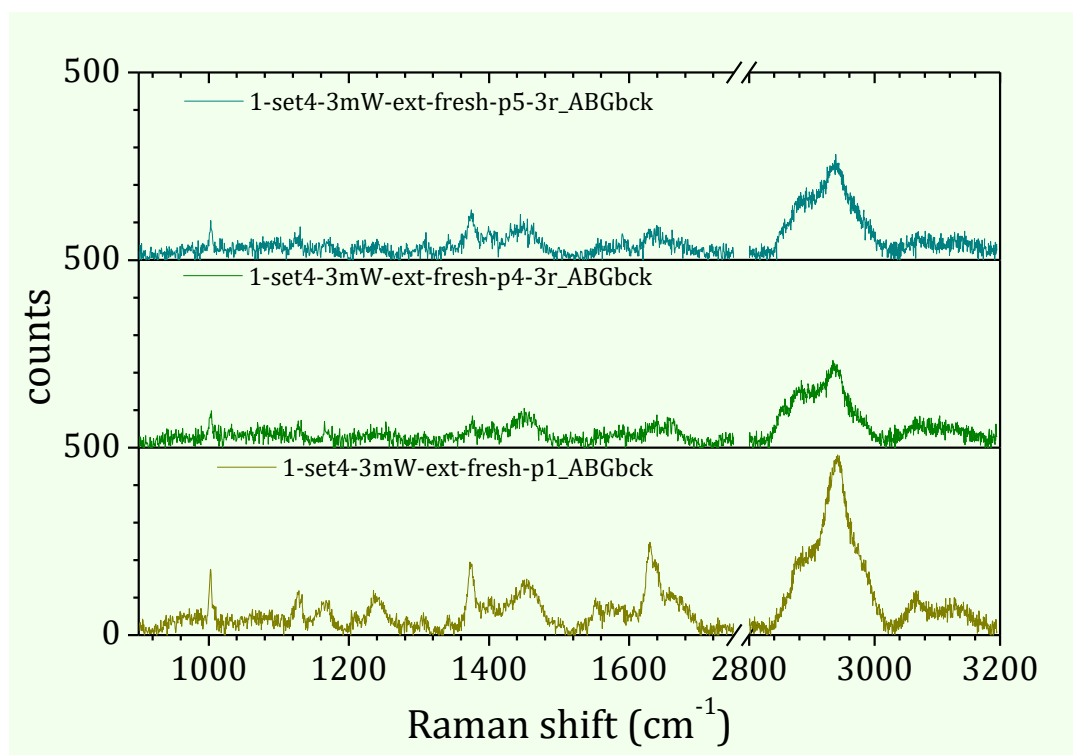
Φακός: Olympus 100x long distance.

Μετρήσεις: Extended Range σε τρεις περιοχές A) 850-1350 cm^{-1} B) 1250-1750 cm^{-1} και G) 2790-3200 cm^{-1} με χρόνο έκθεσης 60 sec και 5 scans

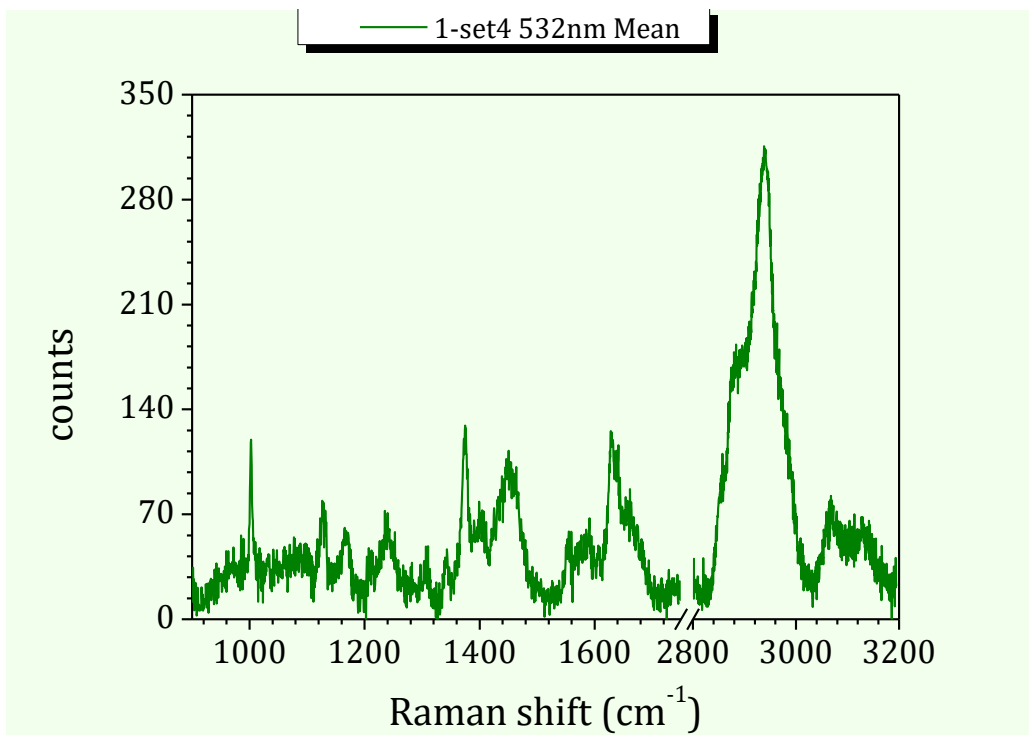
Ψύξη: Συσκευή THMS600 System της Linkam

Πάρθηκαν περίπου 15 μετρήσεις για κάθε δείγμα (υγιές και καρκινικό) για κάθε σετ, αλλά παρουσιάζονται ενδεικτικά τα 3 φάσματα από κάθε δείγμα που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ένταση. Υπήρξαν και σημεία που δεν έδωσαν καθόλου κορυφές. Η ένταση των κορυφών εξαρτάται από το σημείο που θα επιλεγεί αλλά και είναι επίσης πιθανό να χάθηκε για κάποιο λόγο η εστίαση ή το εξαιρετικά ασθενές σήμα Raman να καλύπτεται από το ισχυρότερο της φωταύγειας (όπως απεικονίστηκε στην εικόνα 36 κατά την ανάλυση της φωταύγειας).

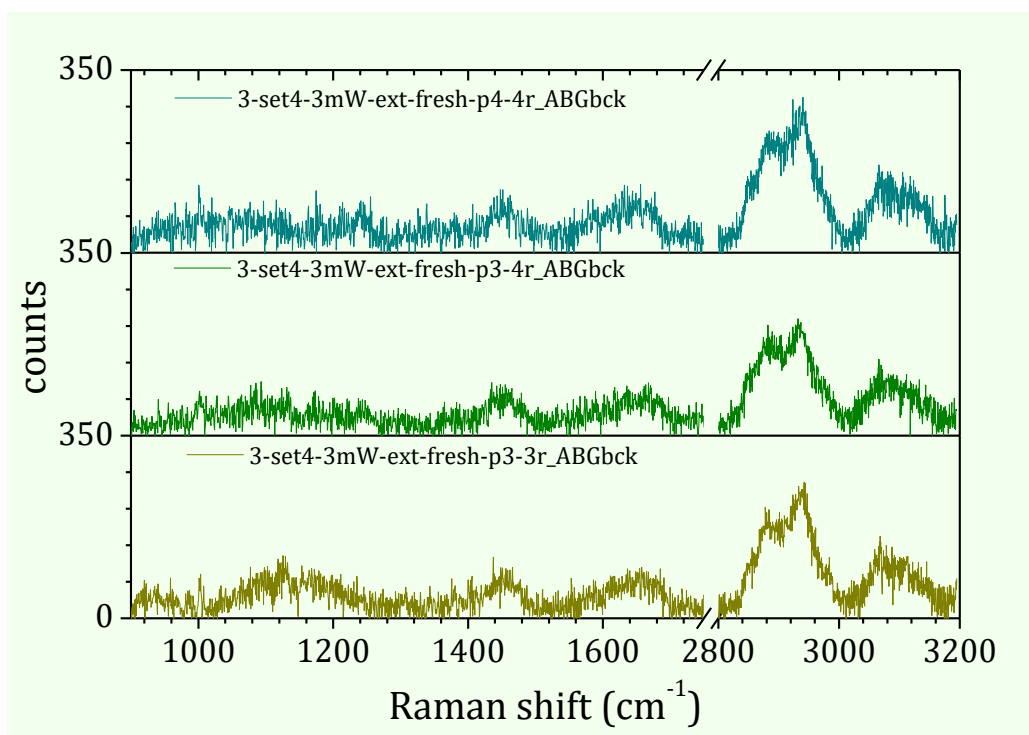
ΣΕΤ 4



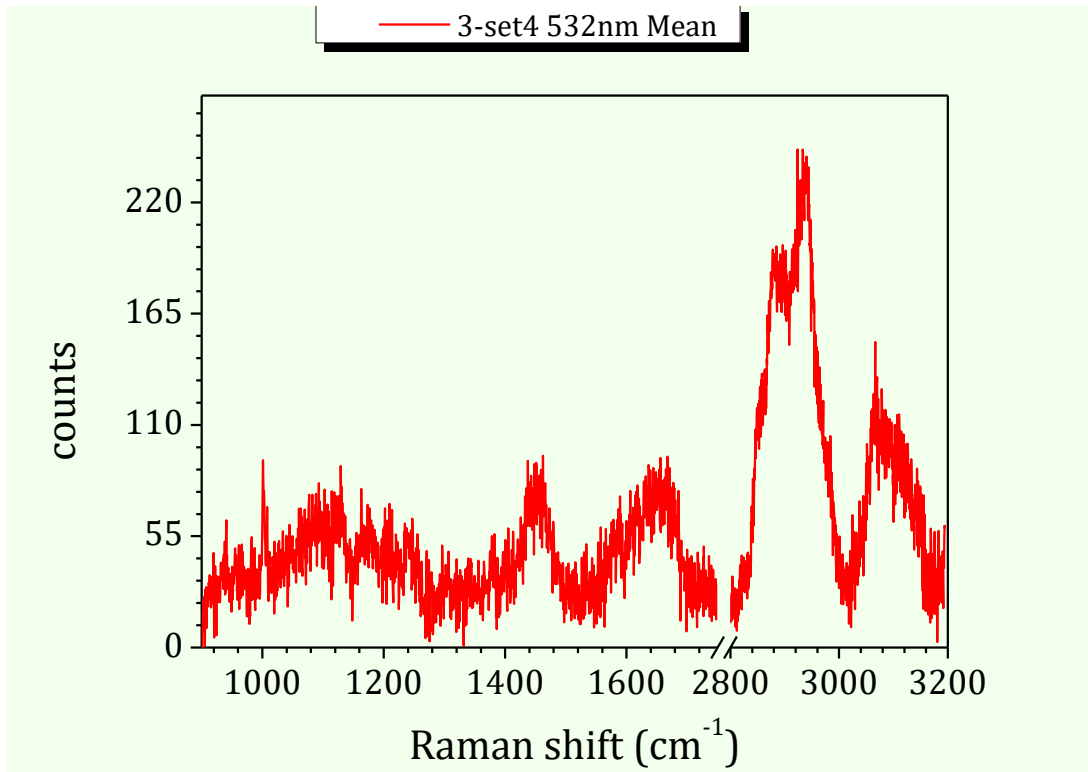
Εικόνα 45: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων υγιούς ιστού του σετ 4



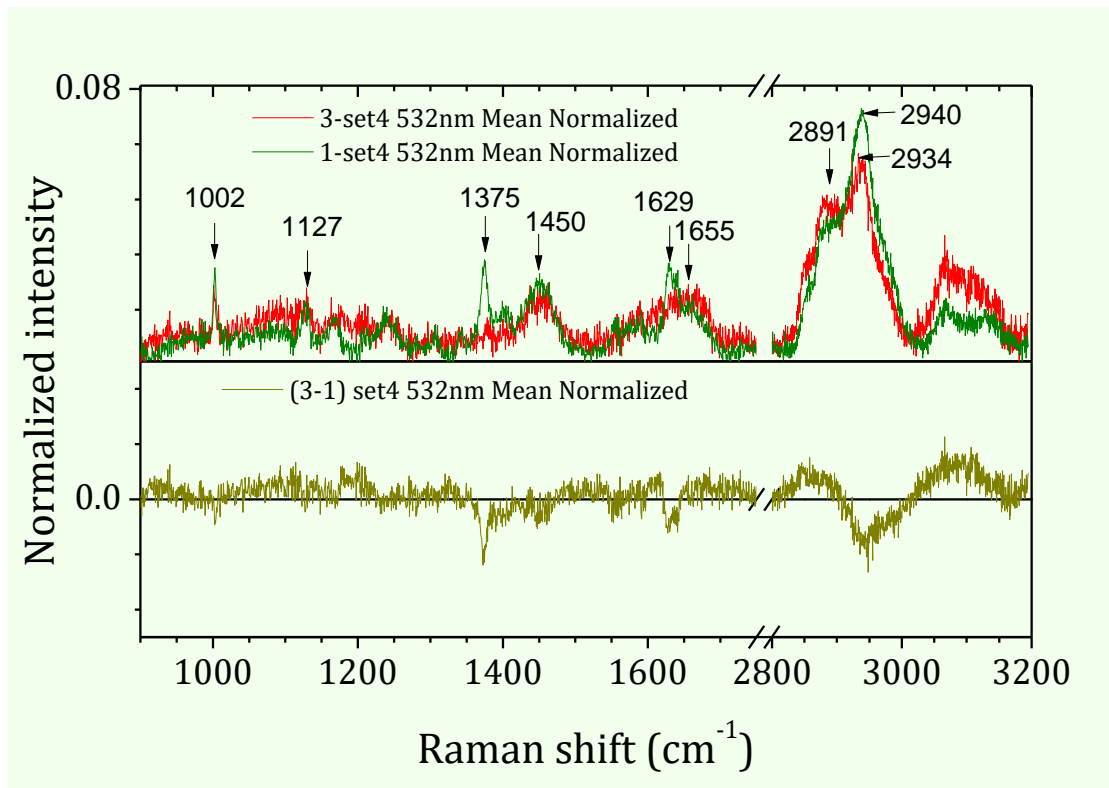
Εικόνα 46: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων υγιούς ιστού του σετ 4



Εικόνα 47: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων καρκινικού ιστού του σετ 4



Εικόνα 48: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων καρκινικού ιστού του σετ 4



Εικόνα 49: Απεικόνιση της μέσης κανονικοποιημένης τιμής και των 2 δειγμάτων και της διαφοράς καρκινικού-υγιούς μέσου κανονικοποιημένου φάσματος του σετ 4

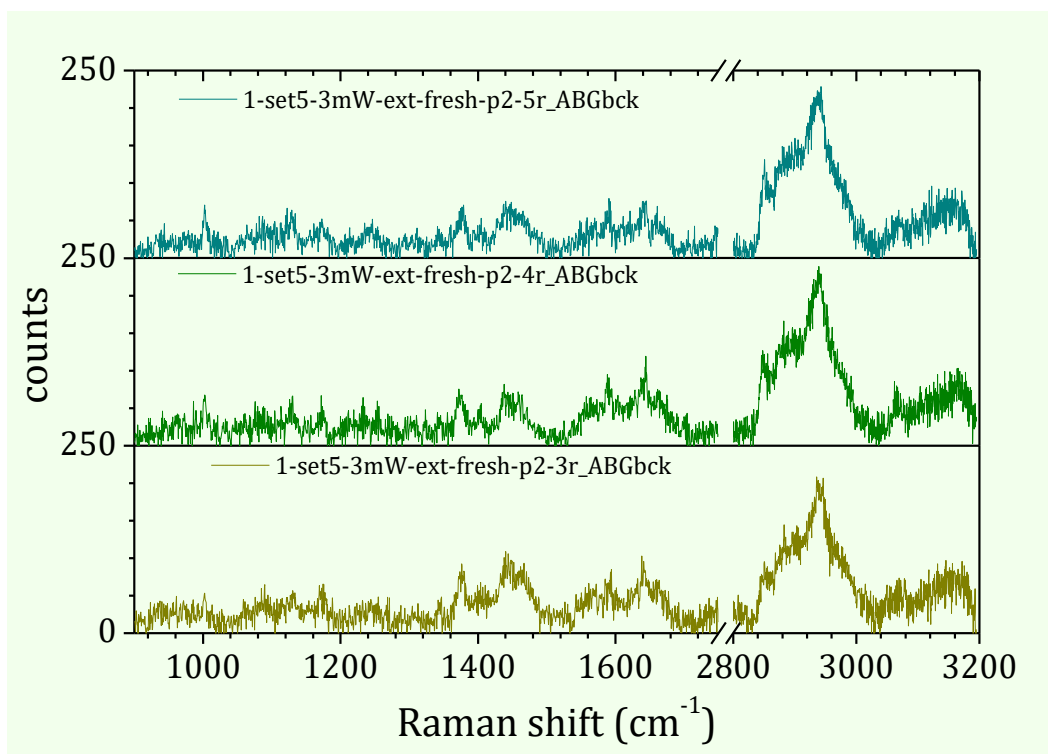
Με τη βοήθεια του προγράμματος Origin εντοπίστηκαν οι θέσεις των ισχυρότερων κορυφών και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Laser	Σετ	Δείγμα	Θέσεις κύριων κορυφών (cm ⁻¹)						
532nm	4	1	1002	1127	1375	1450	1629		2940
		3	1002	1129		1452	1655	2891	2934

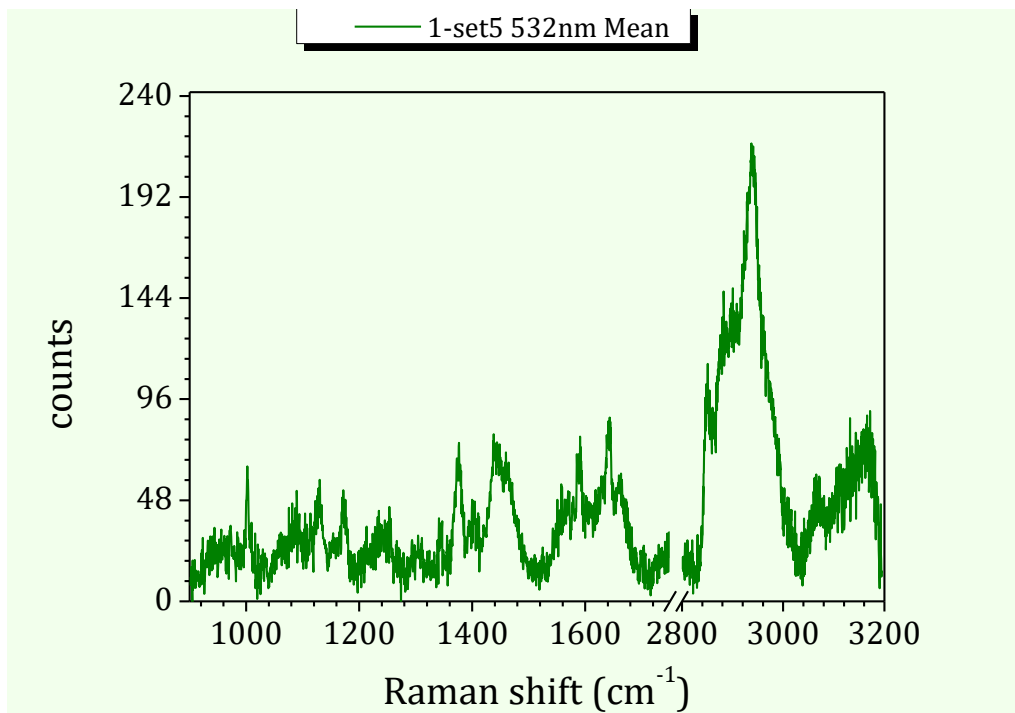
Παρατηρούμε ότι το υγιές φάσμα εμφανίζει μια έξτρα κορυφή στα 1375 cm⁻¹ ενώ το καρκινικό στα 2891 cm⁻¹ και εμφανίζεται μια μικρή μετατόπιση του μεγίστου σε μια κορυφή του καρκινικού σε σχέση με του υγιούς (1655 αντί 1629 cm⁻¹), όμως σε γενικές γραμμές τα φάσματα μοιάζουν αρκετά.

Οι κύριες περιοχές στις οποίες το υγιές φάσμα υπερισχύει του καρκινικού είναι μεταξύ 1360-1410 cm⁻¹, 1620-1640 cm⁻¹ και 2920-3000 cm⁻¹ ενώ το καρκινικό επικρατεί του υγιούς στις περιοχές 2830-2885 cm⁻¹ και 3035-3145 cm⁻¹, όμως οι εκτιμήσεις αυτές είναι με αρκετά μεγάλο σφάλμα λόγω του θορύβου του σήματος.

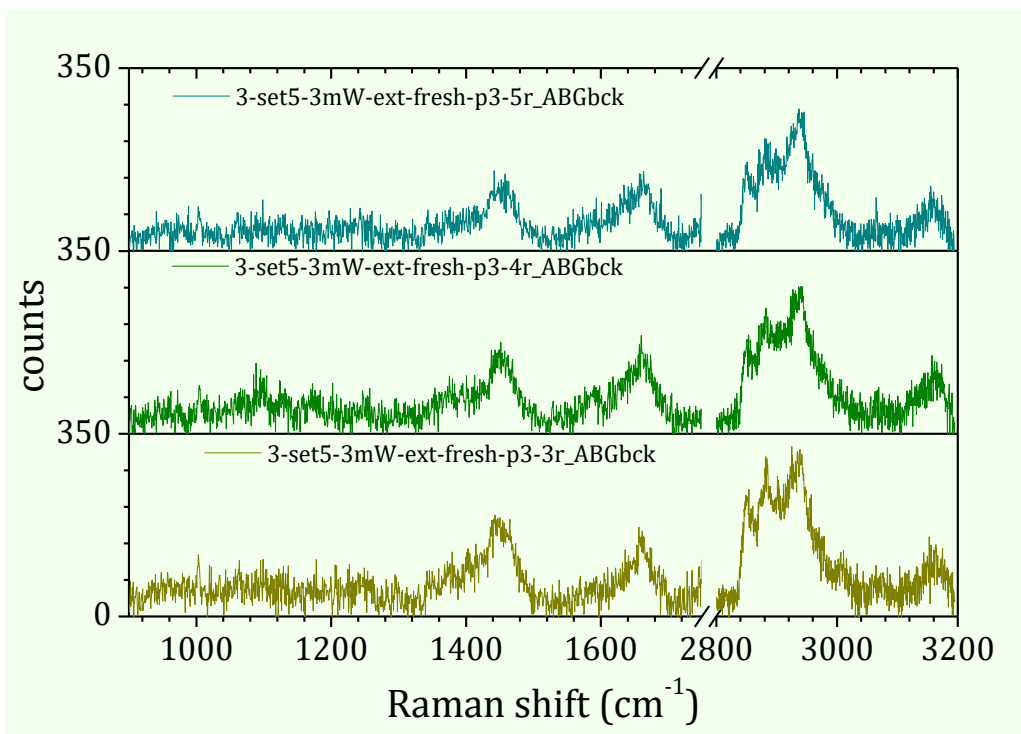
ΣΕΤ 5



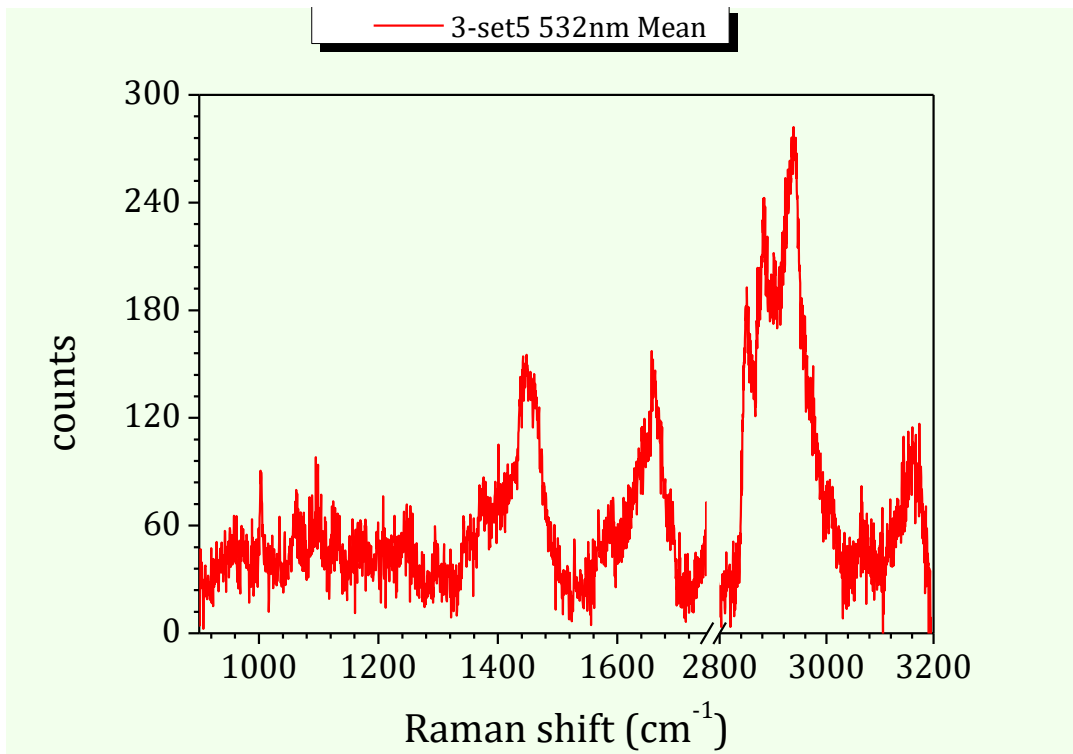
Εικόνα 50: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων υγιούς ιστού του σετ5



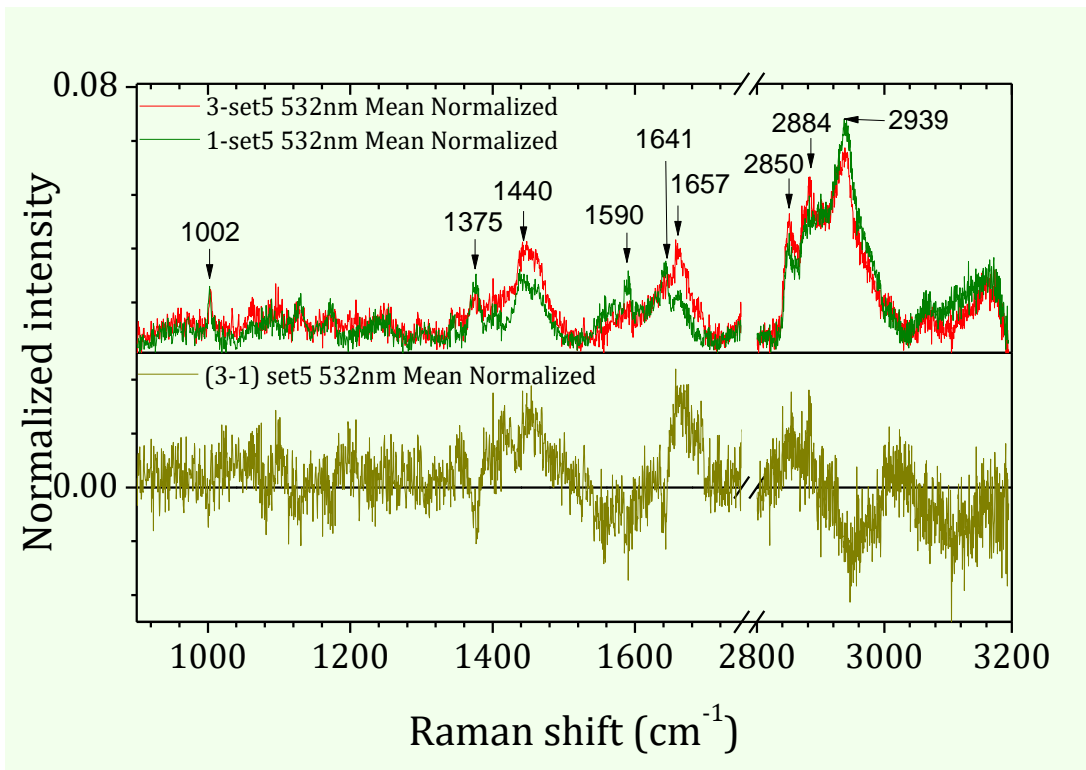
Εικόνα 51: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων υγιούς ιστού του σετ 5



Εικόνα 52: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων καρκινικού ιστού του σετ 5



Εικόνα 53: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων καρκινικού ιστού του σετ 5



Εικόνα 54: Απεικόνιση της μέσης κανονικοποιημένης τιμής και των 2 δειγμάτων και της διαφοράς καρκινικού-υγιούς μέσου κανονικοποιημένου φάσματος του σετ 5

Η θέση των κύριων κορυφών παρουσιάζεται στον πιο κάτω πίνακα

Laser	Σετ	Δείγμα	Θέσεις κύριων κορυφών (cm ⁻¹)								
532 nm	5	1	1002	1377	1440	1590	1641		2852	2884	2939
		3	1004	1375	1445	1589		1657	2850	2882	2939

Παρατηρούμε ότι και εδώ τα 2 δείγματα έχουν περίπου ίδια μορφή και ότι σε αυτό το σετ διαχωρίζονται περισσότερες φασματικές ζώνες σε σχέση με το σετ 4.

Στη θέση 1641 cm⁻¹ εμφανίζει μια υποψία κορυφής και το καρκινικό φάσμα και στη θέση 1657 cm⁻¹ εμφανίζεται κορυφή και στο υγιές φάσμα αλλά με ελάχιστη ένταση και γι' αυτό δεν σημειώθηκαν στον πίνακα.

Οι περιοχές όπου το καρκινικό φάσμα είναι μεγαλύτερο είναι από περίπου 1385-1490 cm⁻¹, 1650-1695 cm⁻¹, 2845-2880 cm⁻¹ ενώ το υγιές υπερिशύει μεταξύ 1545-1595 cm⁻¹, 2930-2995 cm⁻¹ και από τα 3070 και πάνω. Οι περιοχές αυτές γενικά δεν ταυτίζονται με τις αντίστοιχες στο σετ 4.

4.2.4 Αποτελέσματα ΣΕΤ 18 με υδατοκαταδυτικό φακό χωρίς ψύξη

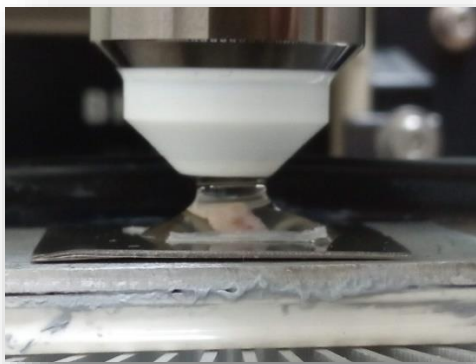
Laser: 532nm (πράσινο) με ισχύ 3mw, μετρημένο πριν το δείγμα χωρίς το φακό.

Φακός: Immersive Olympus LUM Plan FL N 40x/0.80w

Μετρήσεις: Extended Range σε τρεις περιοχές A) 850-1350 cm⁻¹ B) 1250-1750 cm⁻¹ και G) 2790-3200 cm⁻¹ με χρόνο έκθεσης 60 sec και 5 scans

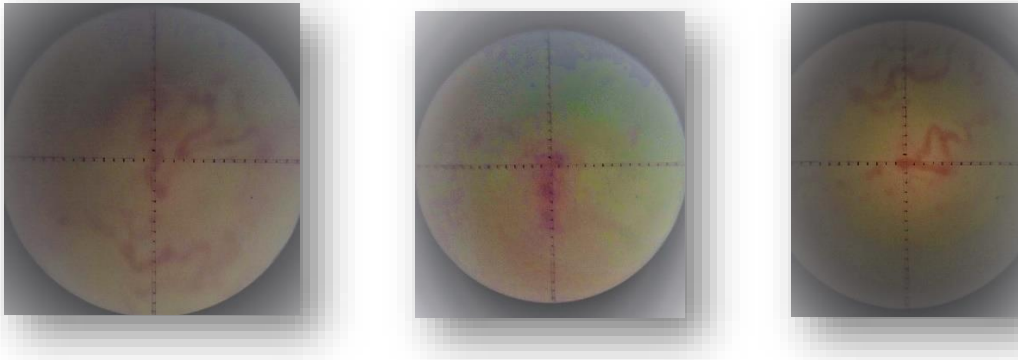
Αρχικά πάρθηκαν 25 μετρήσεις (17 στο υγιές και 8 στο καρκινικό) χωρίς σύστημα ψύξης εφόσον με τον υδατοκαταδυτικό φακό δεν είναι απαραίτητο γιατί το δείγμα είναι συνεχώς ενυδατωμένο και δεν είναι επιρρεπές σε αστάθεια στην εστίαση του laser.

Στις μετρήσεις του σετ 18 δεν χρησιμοποιήθηκε τριβλίο για την τοποθέτηση του δείγματος εντός φυσιολογικού ορού αλλά μόνο μια πολύ μεγάλη σταγόνα την οποία ο φακός έλκει προς τα πάνω σχηματίζοντας μηνίσκο.

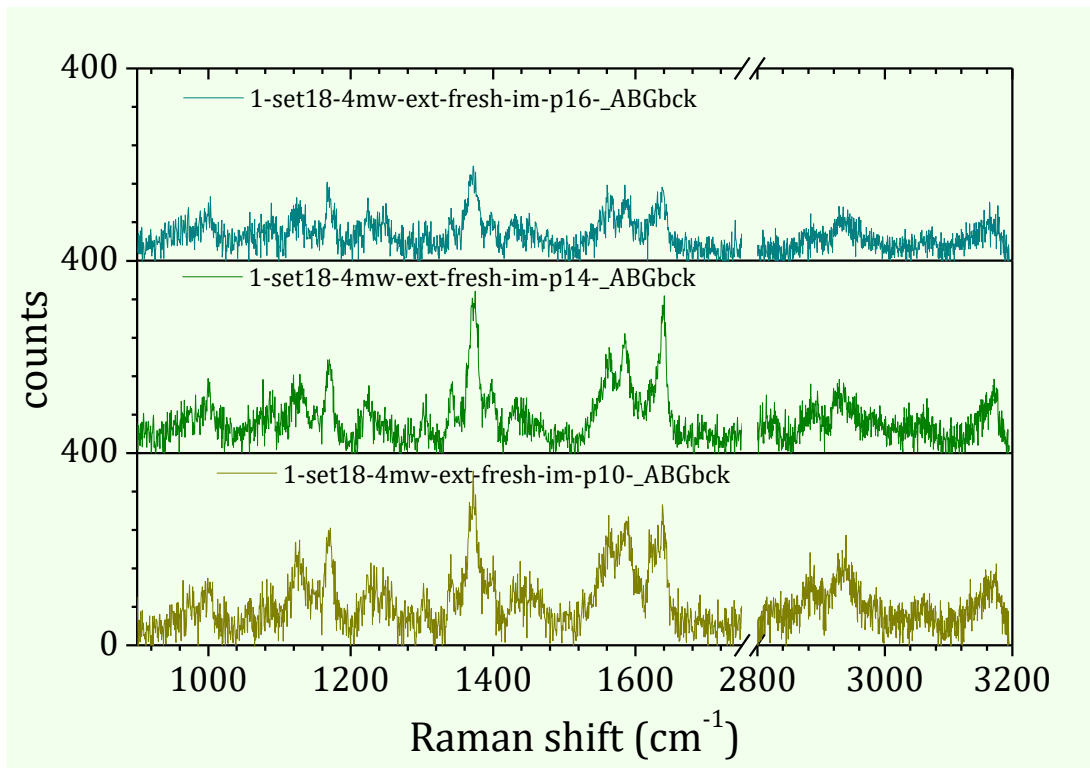


Εικόνα 55: Εικόνα του μηνίσκου που σχηματίζεται από τον φυσιολογικό ορό μεταξύ δείγματος και φακού.

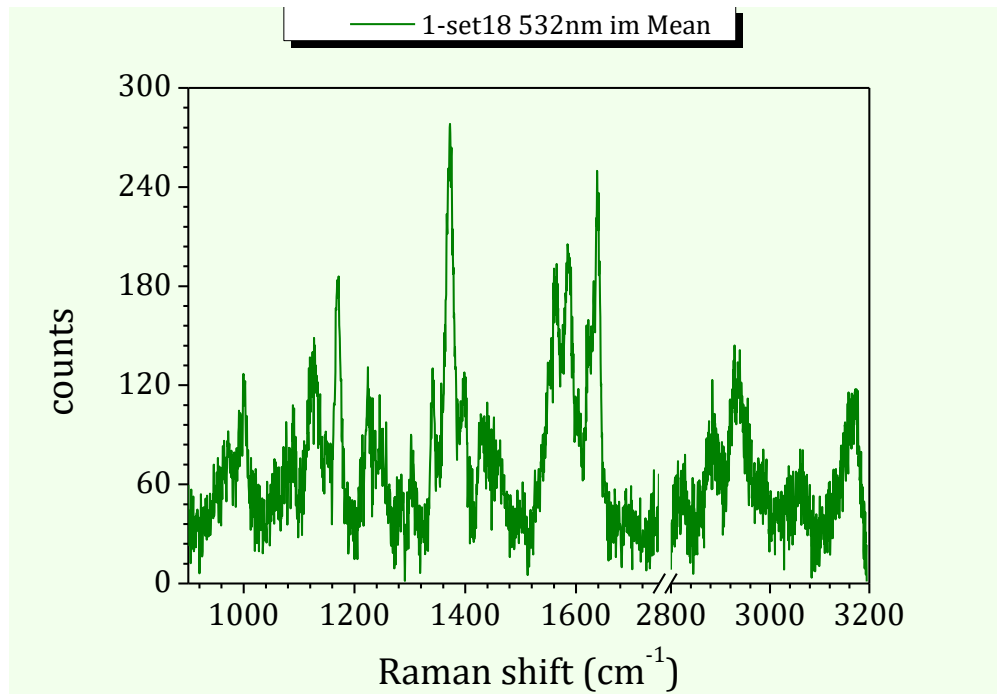
Τις μετρήσεις συνοδεύουν φωτογραφίες του σημείου εστίασης. Επειδή έχει παρατηρηθεί από μετρήσεις σε προηγούμενα σετ ότι δεν δίνουν όλα τα σημεία κορυφές Raman αλλά κυρίως τα πιο σκούρα ή ερυθρά σημεία (πχ. αγγεία) εδώ παρουσιάζονται χωριστά οι κόκκινες και οι λευκές περιοχές με προφανή διαφορά στις εντάσεις στο προκύπτον φάσμα. Παρουσιάζονται ενδεικτικά τα 3 φάσματα από κάθε δείγμα που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ένταση και 1 ή 2 από τις λευκές περιοχές που δεν δίνουν έντονο σήμα.



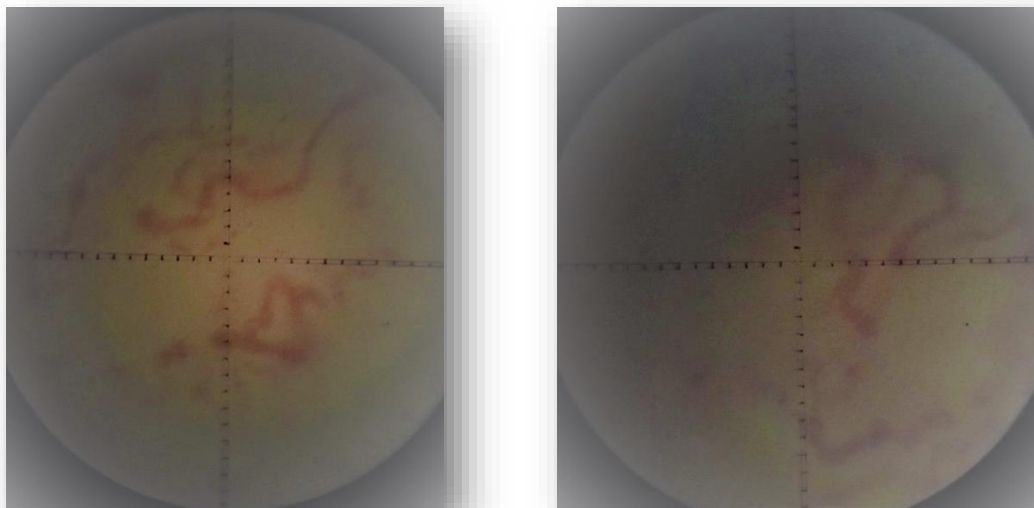
Εικόνα 56: Φωτογραφίες από το μικροσκόπιο των κόκκινων σημείων υγιούς ιστού p16, p14 και p10 (από αριστερά)



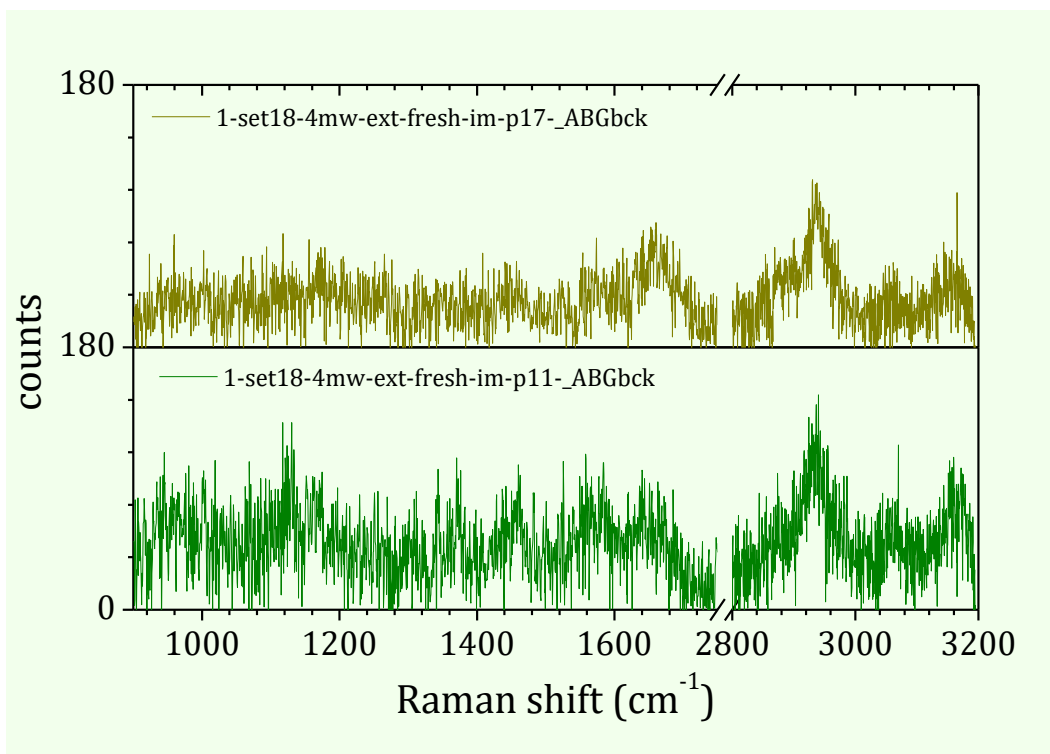
Εικόνα 57: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων κόκκινων σημείων υγιούς ιστού του σετ 18 im



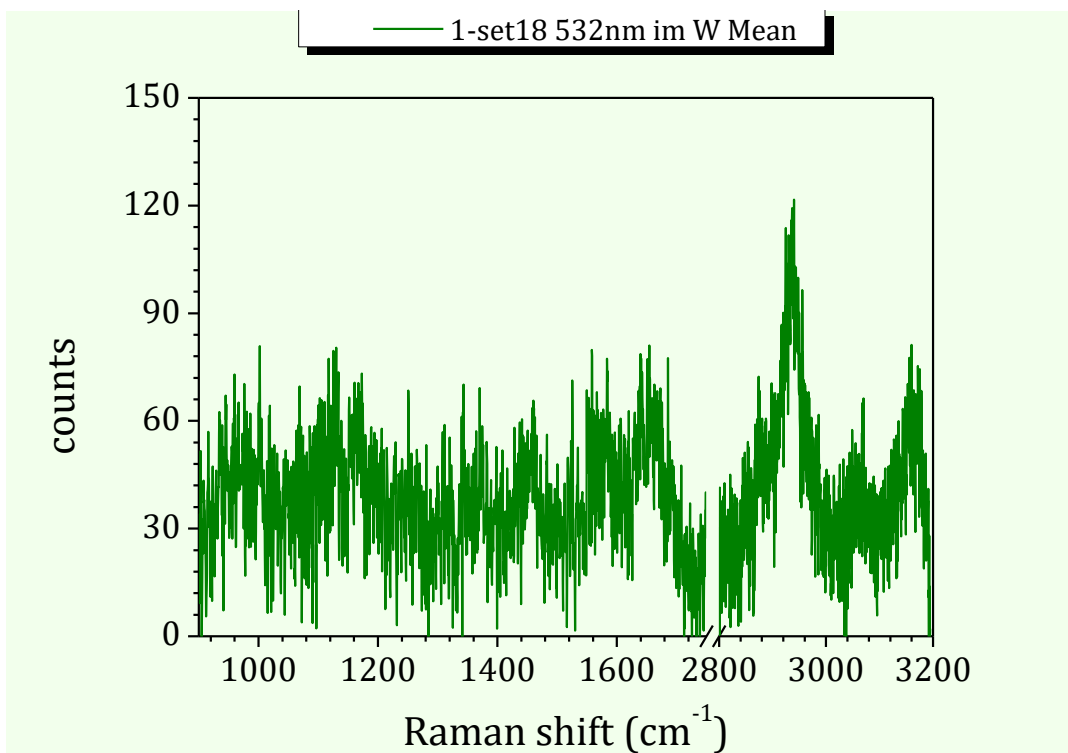
Εικόνα 58: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων των κόκκινων σημείων υγιούς ιστού του σετ 18 im



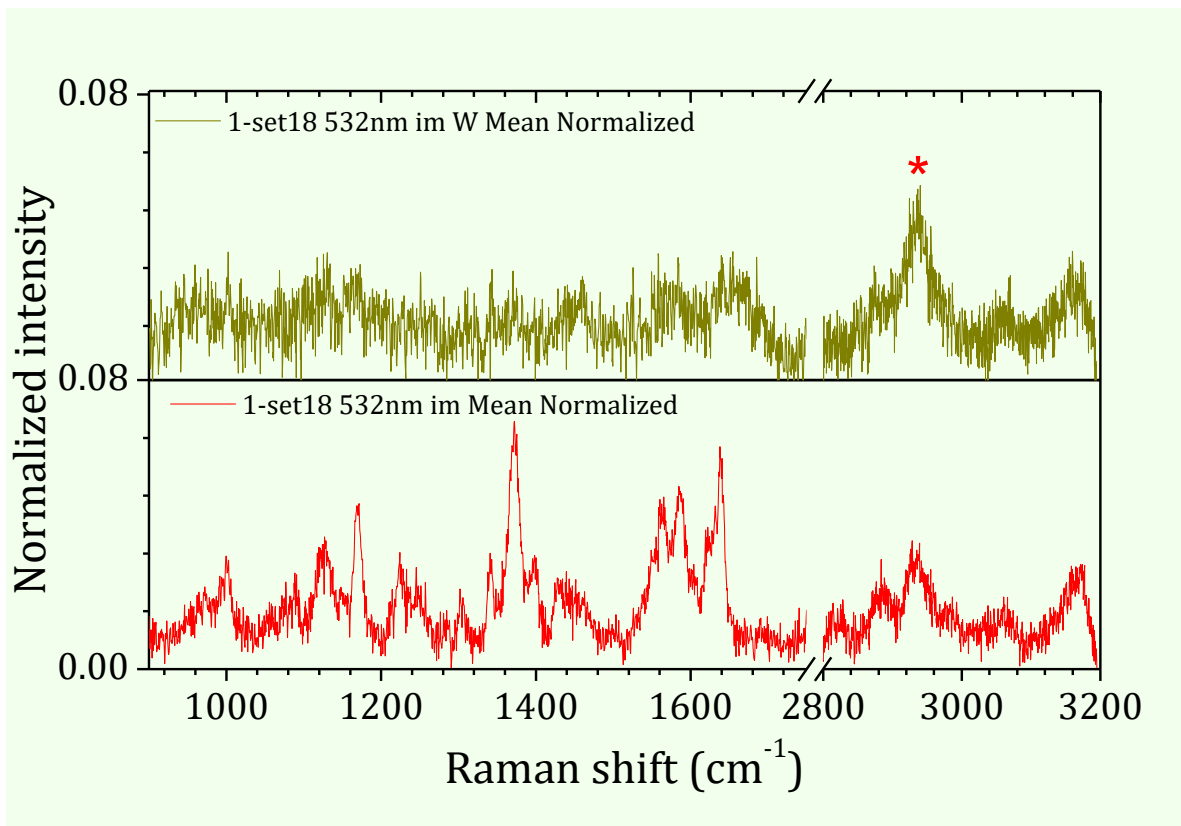
Εικόνα 59: Φωτογραφίες από το μικροσκόπιο των λευκών σημείων υγιούς ιστού p11 και p17 (από αριστερά)



Εικόνα 60: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων λευκών σημείων υγιούς ιστού του σετ 18

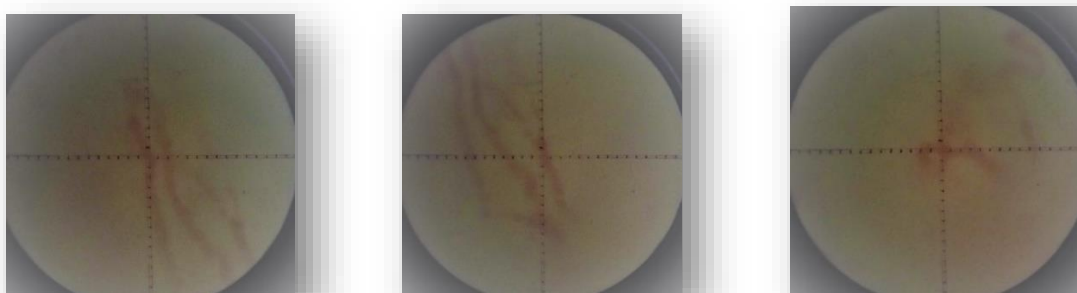


Εικόνα 61: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων των λευκών σημείων υγιούς ιστού του σετ18

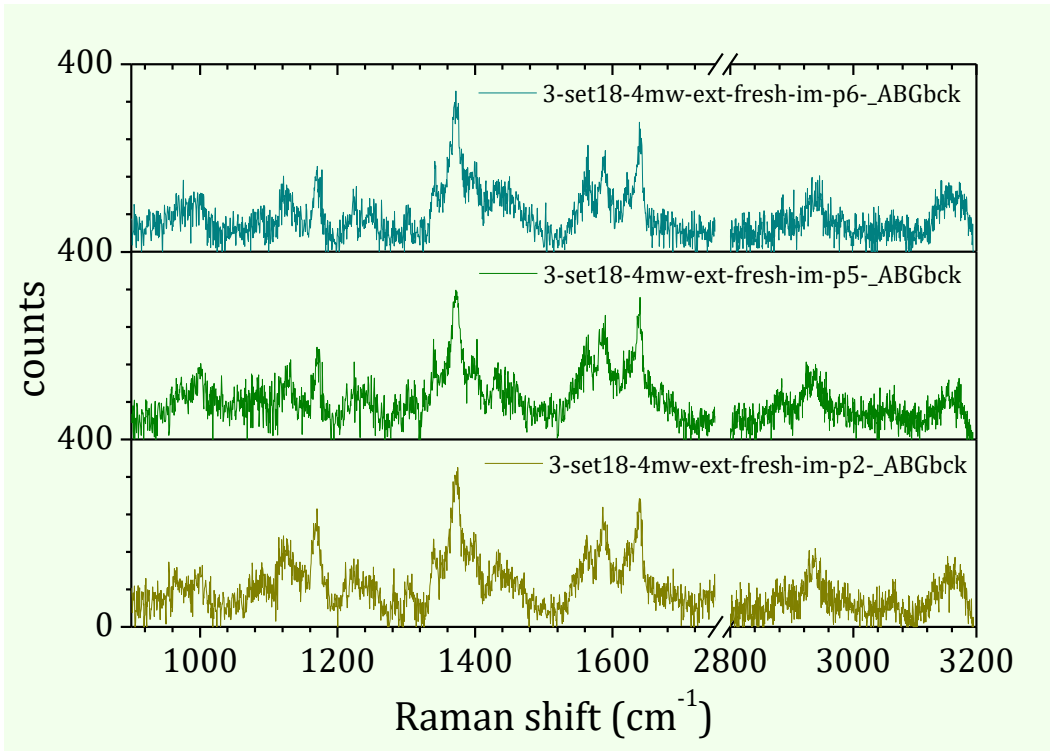


Εικόνα 62: Σύγκριση μέσης τιμής κανονικοποιημένων φασμάτων κόκκινων και λευκών σημείων υγιούς ιστού στο σετ 18

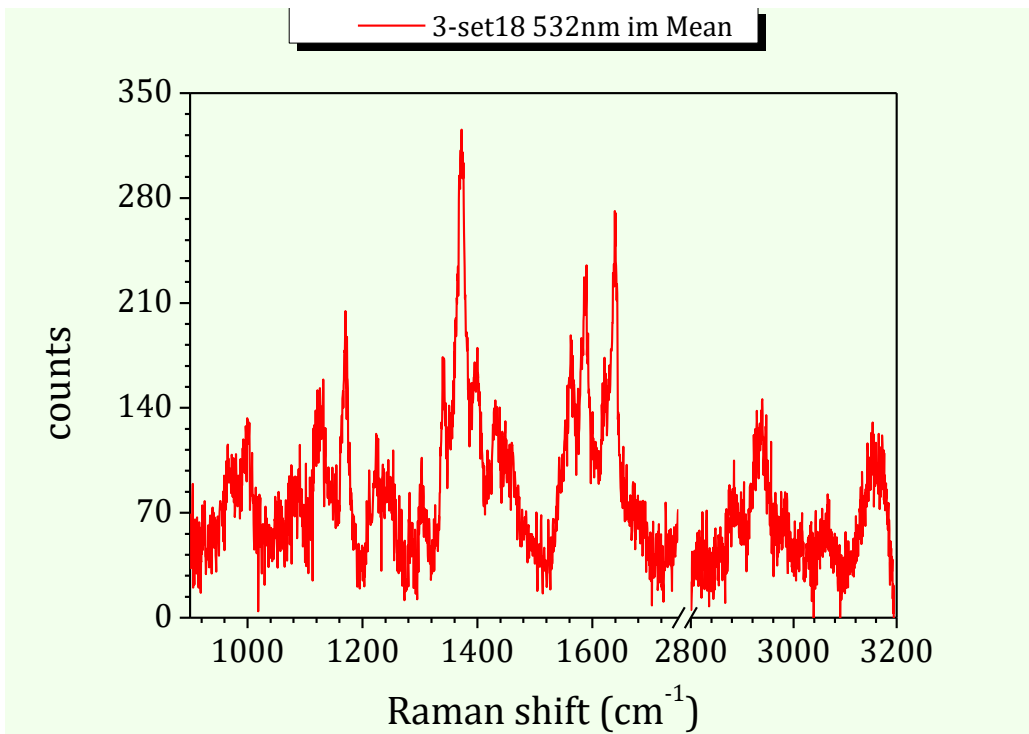
Παρατηρούμε ότι υπάρχει μεγάλη διαφορά ανάμεσα στο φάσμα που δίνουν τα λευκά και τα κόκκινα σημεία. Στο λευκό σημείο δεν ξεχωρίζουν καθόλου κορυφές στην περιοχή από 900-1750 cm^{-1} παρά μόνο μια στις υψηλές συχνότητες που σημαίνεται με αστερίσκο.



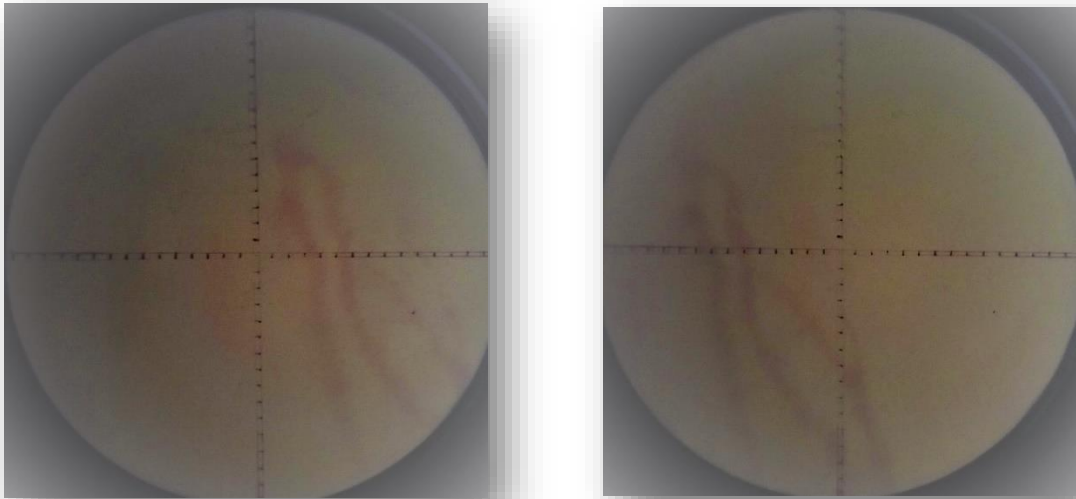
Εικόνα 63: Φωτογραφίες από το μικροσκόπιο των κόκκινων σημείων καρκινικού ιστού p6, p5 και p2 (από αριστερά)



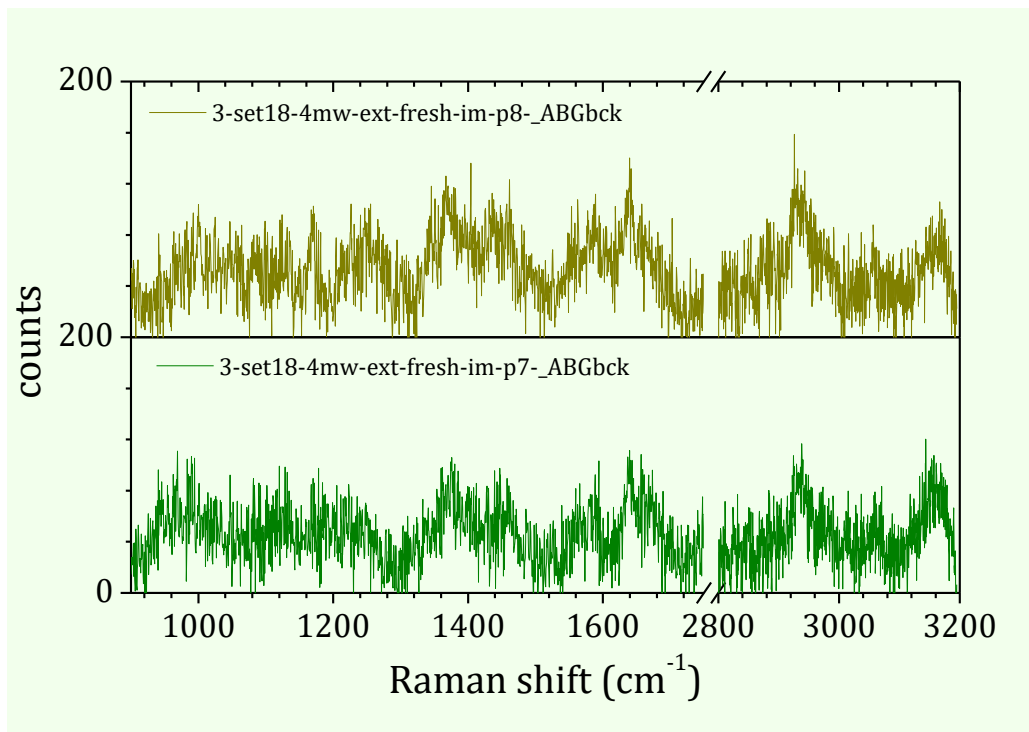
Εικόνα 64: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων κόκκινων σημείων καρκινικού ιστού του σετ18



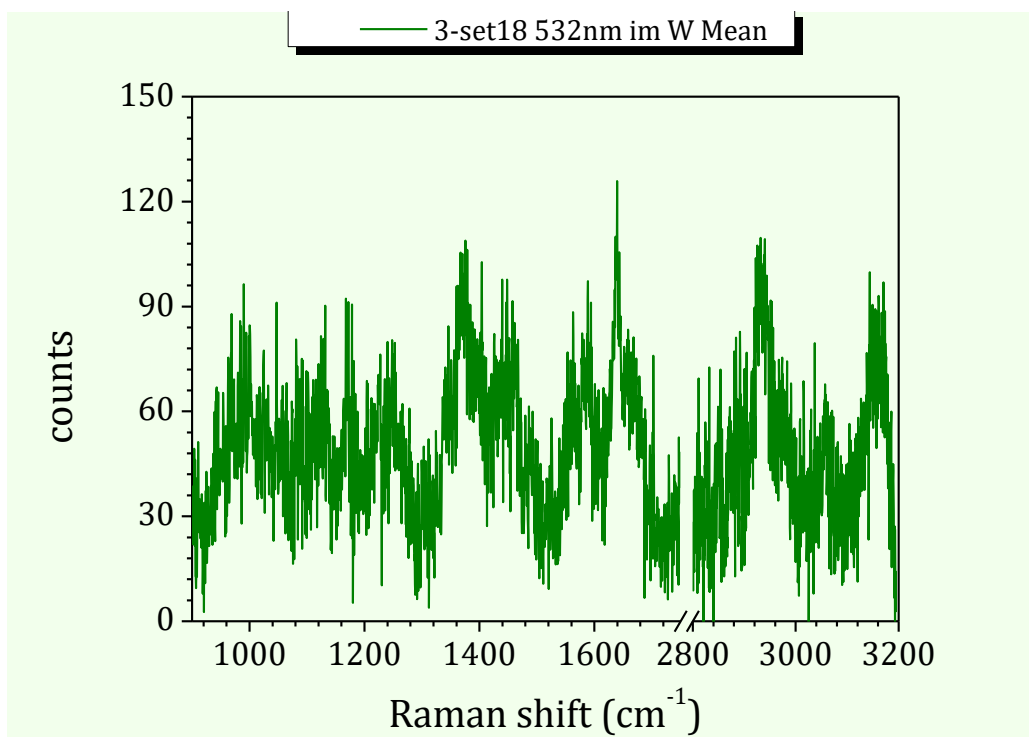
Εικόνα 65: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων των κόκκινων σημείων καρκινικού ιστού του σετ18



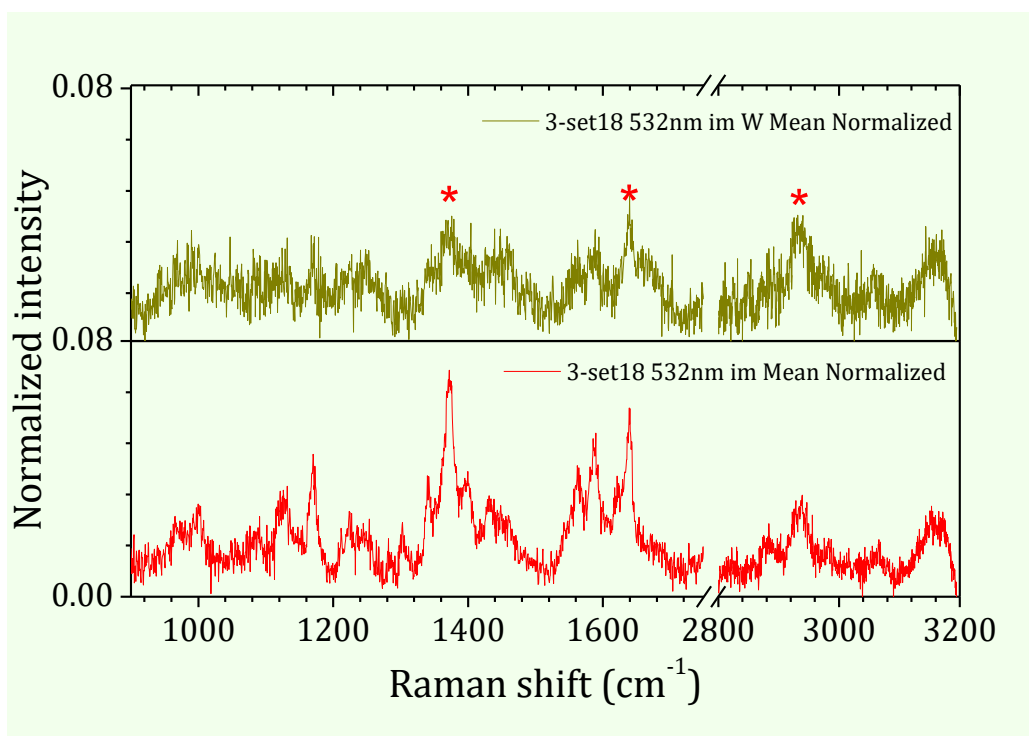
Εικόνα 66: Φωτογραφίες από το μικροσκόπιο των λευκών σημείων καρκινικού ιστού p7 και p8 (από αριστερά)



Εικόνα 67: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων λευκών σημείων καρκινικού ιστού του σετ 18



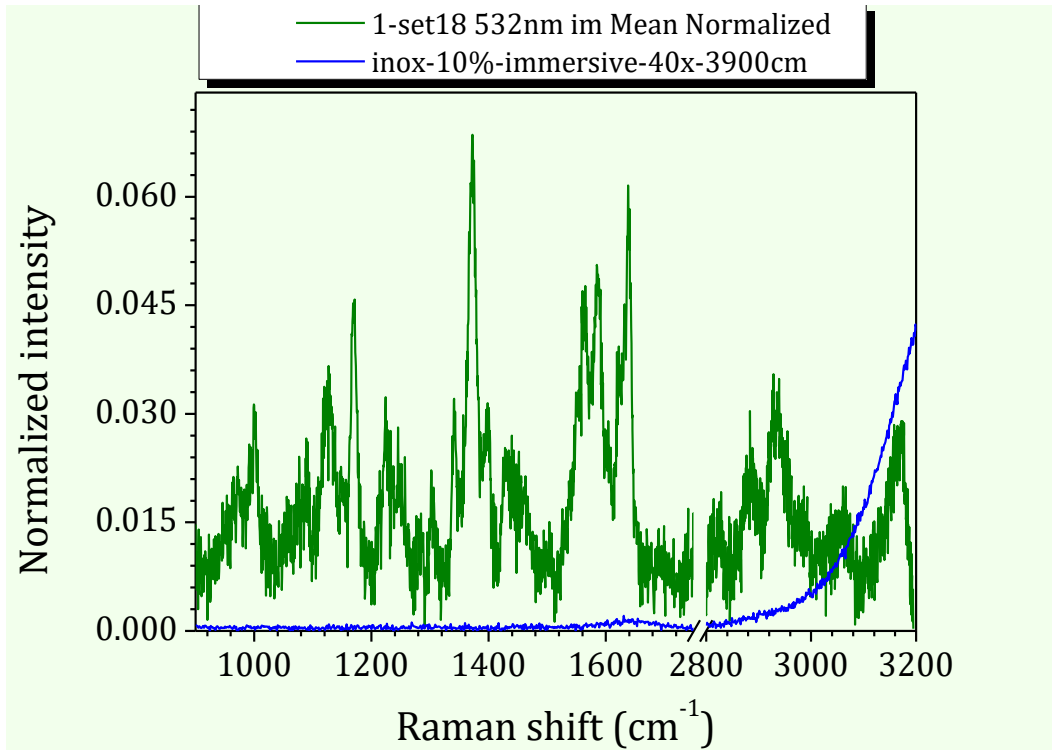
Εικόνα 68: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων των λευκών σημείων καρκινικού ιστού του σετ18



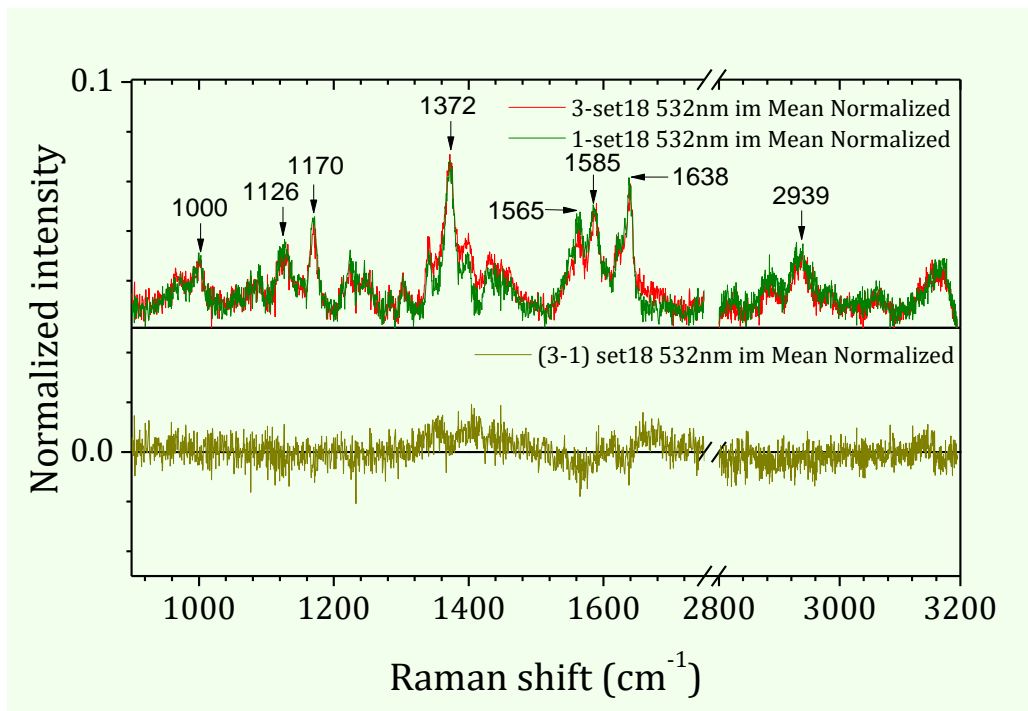
Εικόνα 69: Σύγκριση μέσης τιμής κανονικοποιημένων φασμάτων κόκκινων και λευκών σημείων (W) καρκινικού ιστού στο σετ 18

Παρατηρούμε ότι οι κορυφές στα λευκά σημεία είναι ιδιαίτερα δυσδιάκριτες, έχουν πολύ χαμηλή ένταση και καλύπτονται από το υπόβαθρο γι' αυτό και δεν θα

συμπεριληφθούν στους μέσους όρους που ακολουθούν. Οι συχνότητες που κάπως ξεχωρίζουν σημειώνονται με αστερίσκο.



Εικόνα 70: Απεικόνιση μέσω κανονικοποιημένου υγιούς φάσματος των κόκκινων σημείων μαζί με το φάσμα του νερού (φυσιολογικού ορού)



Εικόνα 71: Απεικόνιση της μέσης κανονικοποιημένης τιμής και των 2 δειγμάτων και της διαφοράς καρκινικού-υγιούς μέσου κανονικοποιημένου φάσματος των κόκκινων σημείων του σετ 18 im

Και στο σετ 18 παρατηρούμε ότι τα φάσματα καρκινικού και υγιούς ιστού δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ τους.

Από την εικόνα 70 μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η τελευταία κορυφή που εμφανίζεται στις μετρήσεις με υδατοκαταδυτικό φακό πάνω από τα περίπου 3100 cm^{-1} πιθανότατα οφείλεται στην έντονη σκέδαση του νερού σε αυτή την περιοχή. Αντιθέτως η άλλη ασθενής σκέδαση Raman του νερού στα 1640 cm^{-1} δεν δείχνει να επηρεάζει το φάσμα που εκεί παρουσιάζει εμφανώς πολύ εντονότερες κορυφές από άλλα αίτια.

Στα λευκά σημεία υπάρχει μόνο υποψία κορυφών που να ξεχωρίζουν από το υπόβαθρο. Στο υγιές δείγμα ξεχωρίζει σαφώς μόνο μια κορυφή στα 2941 cm^{-1} ενώ στο καρκινικό ξεχωρίζουν κάπως κορυφές στα 1375 , 1639 και 2933 cm^{-1} (σημειώνονται στις αντίστοιχες εικόνες με αστερίσκο).

Η θέση των κύριων κορυφών των κόκκινων σημείων παρουσιάζεται στον πιο κάτω πίνακα:

Laser	Σετ	Δείγμα	Θέσεις κύριων κορυφών (cm^{-1})							
532 nm	18	1	1000	1127	1171	1372	1565	1585	1638	2935
	im	3	1002	1126	1170	1372	1562	1588	1639	2939

Σε αυτό το σετ στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων (πάνω από τα 2800 cm^{-1}) τα φάσματα υγιούς και καρκινικού ιστού έχουν ελάχιστες διαφορές. Στις χαμηλότερες συχνότητες μπορούμε να διακρίνουμε δύο περιοχές στις οποίες επικρατεί το καρκινικό φάσμα και μία που το υγιές είναι κάπως μεγαλύτερο. Με μεγάλα περιθώρια σφάλματος διότι το σήμα είναι πολύ θορυβώδες, μπορούμε χοντρικά να εκτιμήσουμε τις περιοχές $1325\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ και $1645\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ για το καρκινικό και $1545\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ για το υγιές.

4.2.5 Αποτελέσματα ΣΕΤ 18 με ψύξη (immersive-cold)

Laser: 532nm (πράσινο) με ισχύ 3mw, μετρημένο πριν το δείγμα χωρίς το φακό.

Φακός: Immersive Olympus LUM Plan FL N 40x/0.80w

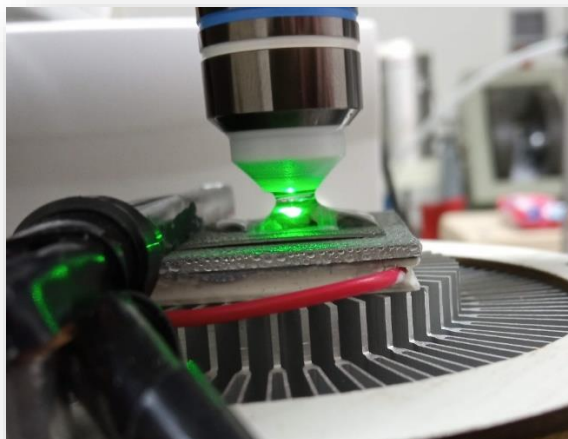
Μετρήσεις: Extended Range σε τρεις ζώνες με χρόνο έκθεσης 60 sec και 5 scans

Ψύξη: Συσκευή που κατασκευάστηκε στο ΕΜΠ με πλακίδιο Peltier

Παρότι με τον υδατοκαταδυτικό φακό δεν υπάρχουν προβλήματα εστίασης και γι' αυτό δεν απαιτείται ψύξη των δειγμάτων, εντούτοις για να δοκιμαστεί στην πράξη η χρήση της νέας ψυκτικής πλατφόρμας που κατασκευάστηκε στο ΕΜΠ, πάρθηκαν μετρήσεις και με ψύξη των ιστών, 12 μετρήσεις (7 στο υγιές και 5 στο καρκινικό). Παρατηρήθηκε ότι με την ψύξη εμφανίζονται ελαφρώς πιο ενισχυμένες οι κορυφές σε σχέση με τις μετρήσεις σε θερμοκρασία δωματίου.

Για να μπορεί να ψύχεται το δείγμα πιο αποτελεσματικά, δεν χρησιμοποιήθηκε ούτε σε αυτές τις μετρήσεις τριβλίο για την τοποθέτηση του δείγματος, αλλά ακολουθήθηκε και εδώ η μέθοδος της σταγόνας. Το ανοξειδωτο υπόστρωμα με το δείγμα τοποθετήθηκε απ' ευθείας πάνω στην πλατφόρμα ψύξης του peltier. Με την ψύξη διαπιστώθηκε ότι ήταν

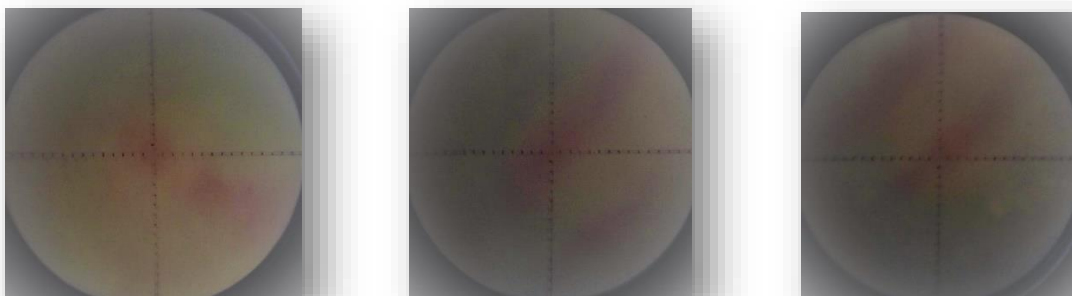
αρκετά πιο δύσκολο να διατηρηθεί η σταγόνα στη θέση της πράγμα που ήταν απαραίτητο για να μην χαθεί η επαφή του φακού με τον ορό. Λόγω της συμπύκνωσης των υδρατμών της ατμόσφαιρας πάνω στο ψυχόμενο ανοξείδωτο υπόστρωμα, συγκεντρωνόταν επιπλέον υγρασία περιμετρικά της σταγόνας και κάποια στιγμή αυτή άπλωνε τόσο που ο μηνίσκος έσπαζε και η μέτρηση έμενε στη μέση. Για να διορθωθεί το πρόβλημα, τοποθετήθηκαν περιμετρικά του δείγματος επιπλέον αυτοκόλλητα ράμματα από αυτά που χρησιμοποιούνται για τη στερέωση του ιστού, τα οποία λειτούργησαν σαν “φράγματα” που περιόριζαν τη σταγόνα στη θέση της και οι μετρήσεις ολοκληρώθηκαν χωρίς άλλα προβλήματα.



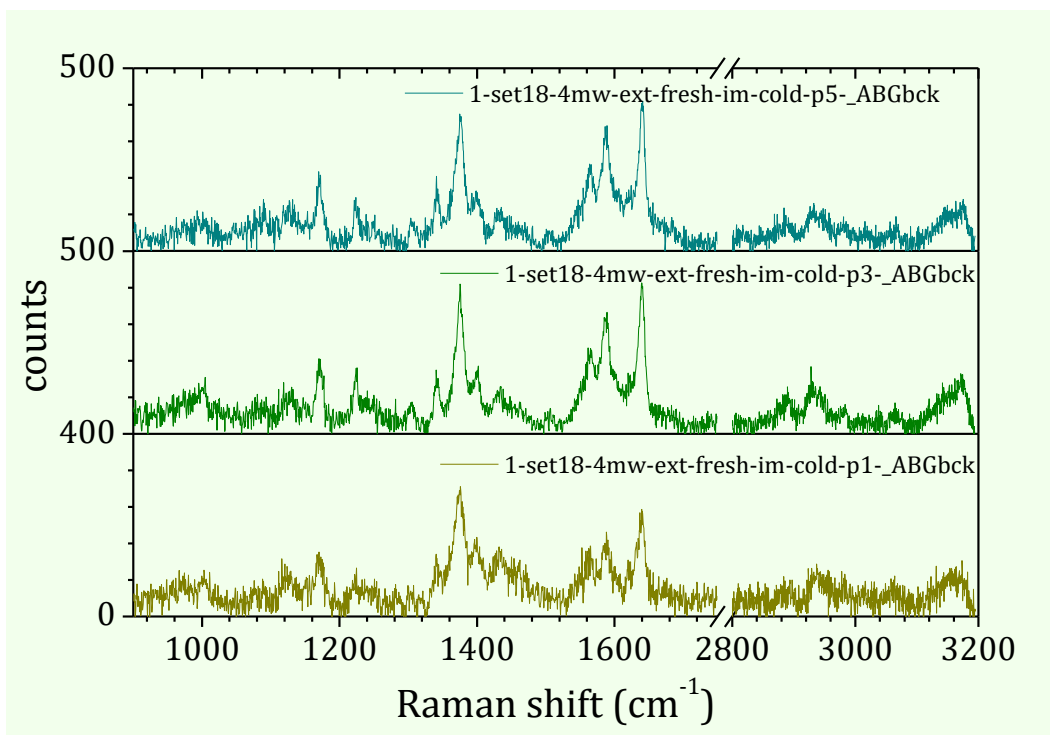
Εικόνα 72: Απεικόνιση της συσσώρευσης της ατμοσφαιρικής υγρασίας στην ψυχόμενη επιφάνεια

Τις μετρήσεις συνοδεύουν φωτογραφίες του σημείου εστίασης. Όπως και στην προηγούμενη ανάλυση του σετ 18 παρουσιάζονται χωριστά οι κόκκινες και οι λευκές περιοχές.

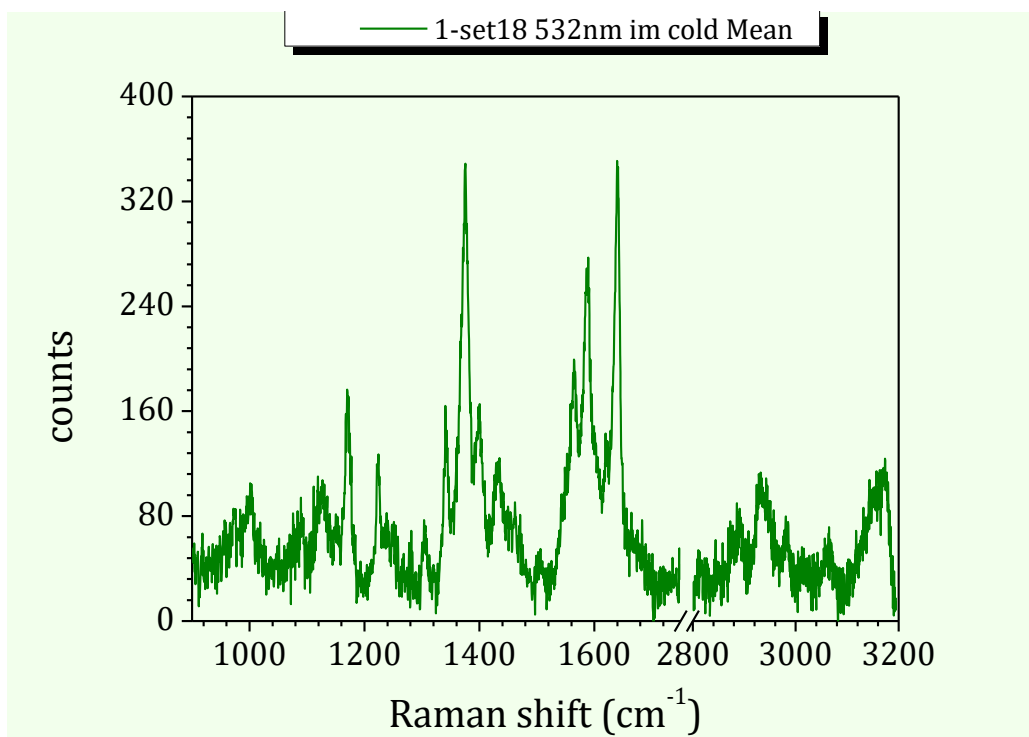
Παρουσιάζονται ενδεικτικά τα 3 φάσματα από κάθε δείγμα που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ένταση και 1 ή 2 από τις λευκές περιοχές που δεν δίνουν έντονο σήμα



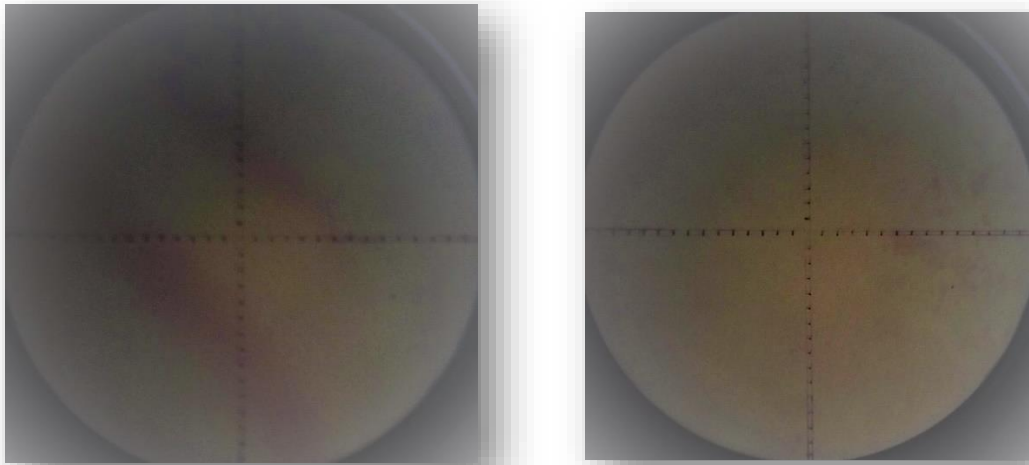
Εικόνα 73: Φωτογραφίες από το μικροσκόπιο των κόκκινων σημείων υγιούς ιστού p1, p3 και p5 (από αριστερά)



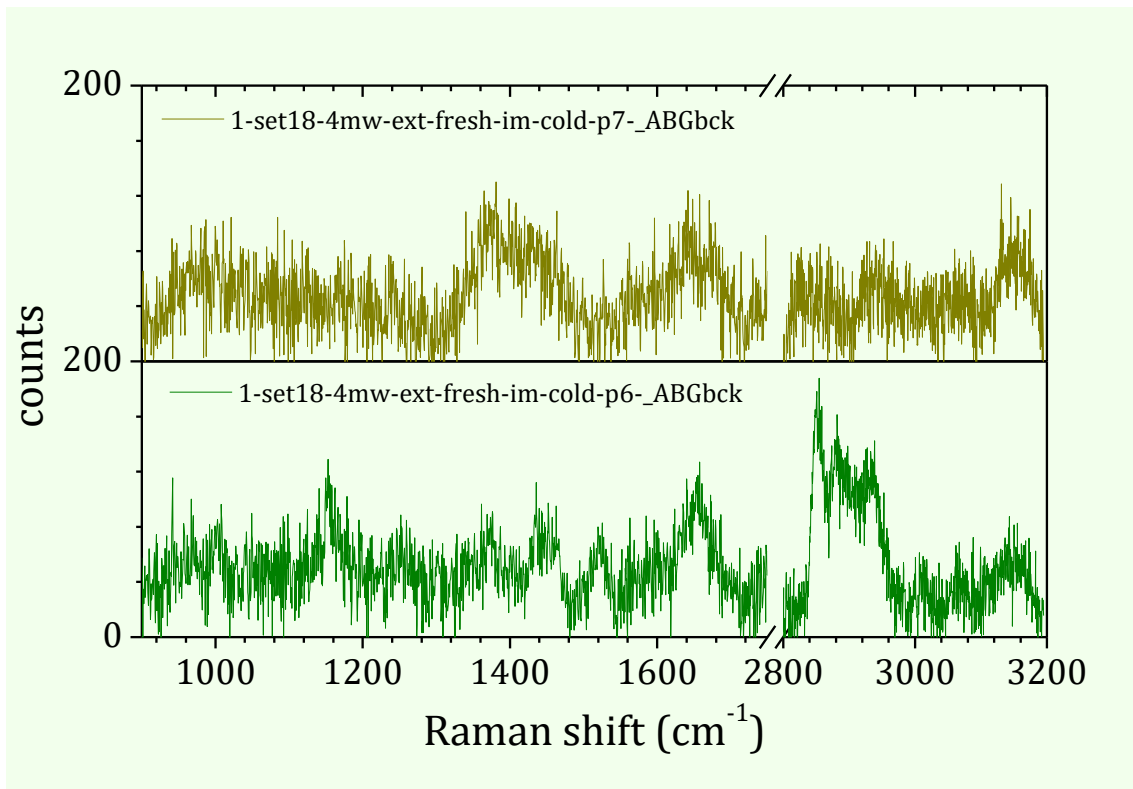
Εικόνα 74: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων κόκκινων σημείων υγιούς ιστού του σετ 18 im cold



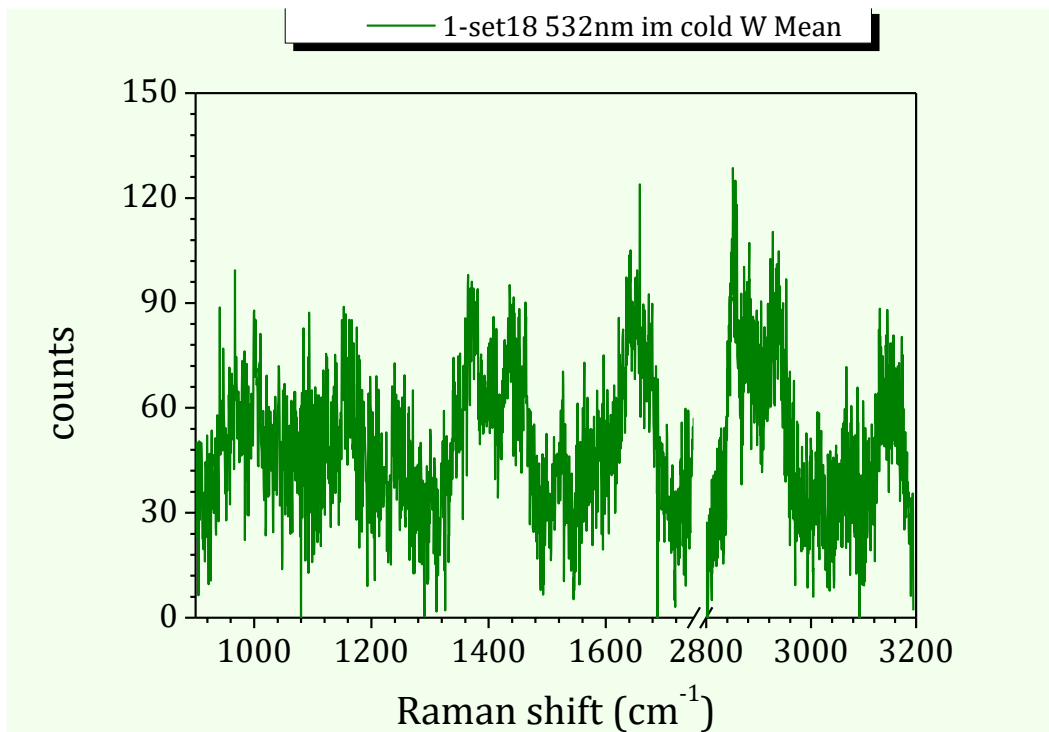
Εικόνα 75: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων των κόκκινων σημείων υγιούς ιστού του σετ 18 im cold



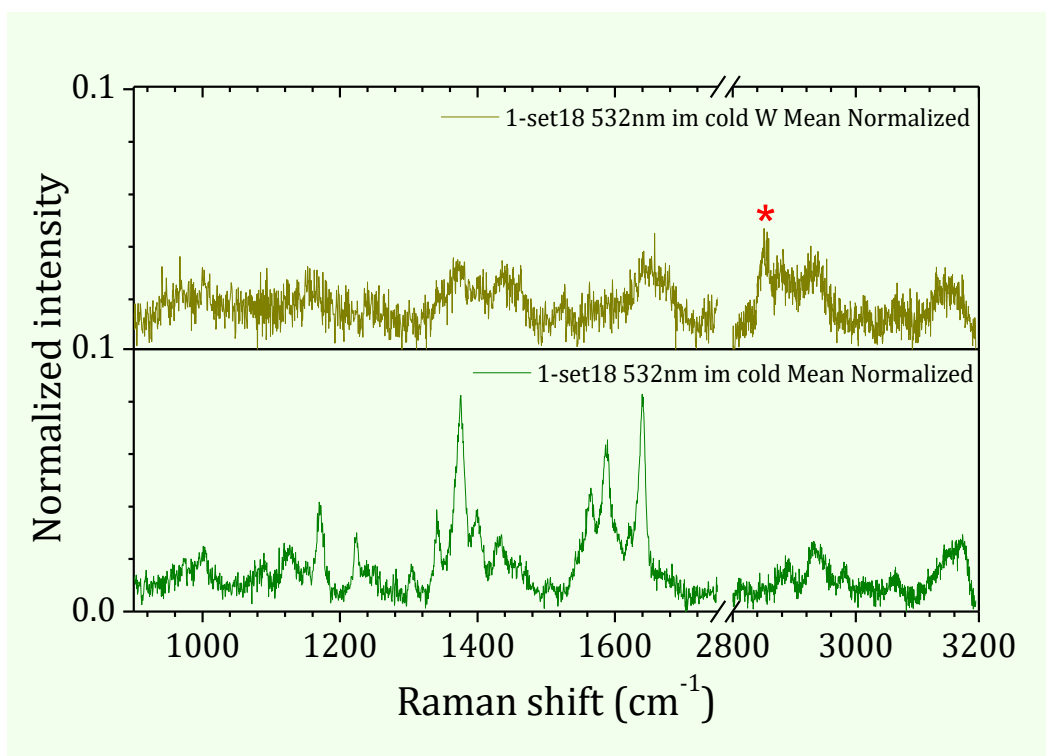
Εικόνα 76: Φωτογραφίες από το μικροσκόπιο των λευκών σημείων υγιούς ιστού p6 και p7 (από αριστερά)



Εικόνα 77: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων λευκών σημείων υγιούς ιστού του σετ 18 im cold

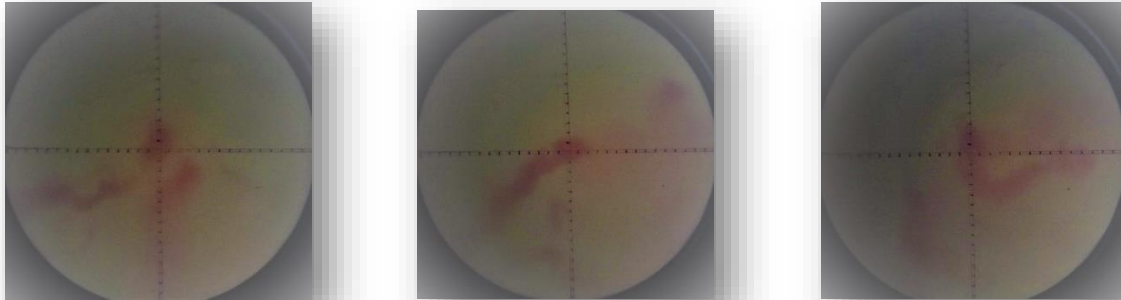


Εικόνα 78: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων των λευκών σημείων υγιούς ιστού του σετ18 im cold

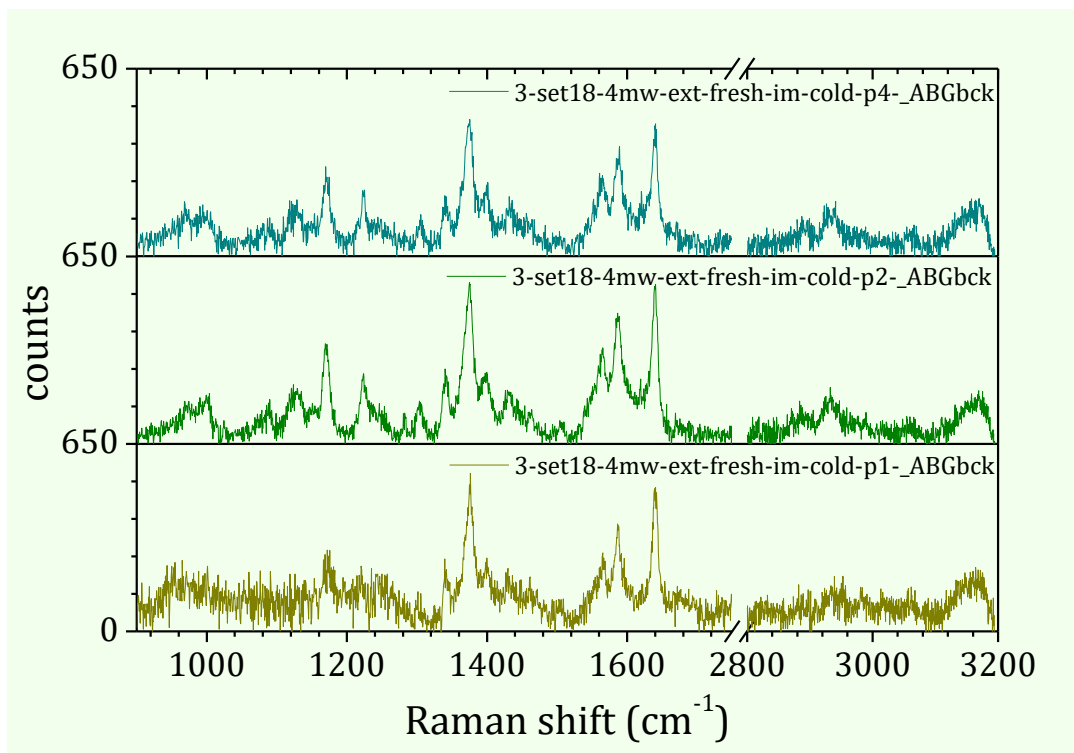


Εικόνα 79: Σύγκριση μέσης τιμής κανονικοποιημένων φασμάτων κόκκινων και λευκών σημείων υγιούς ιστού στο σετ 18 im cold

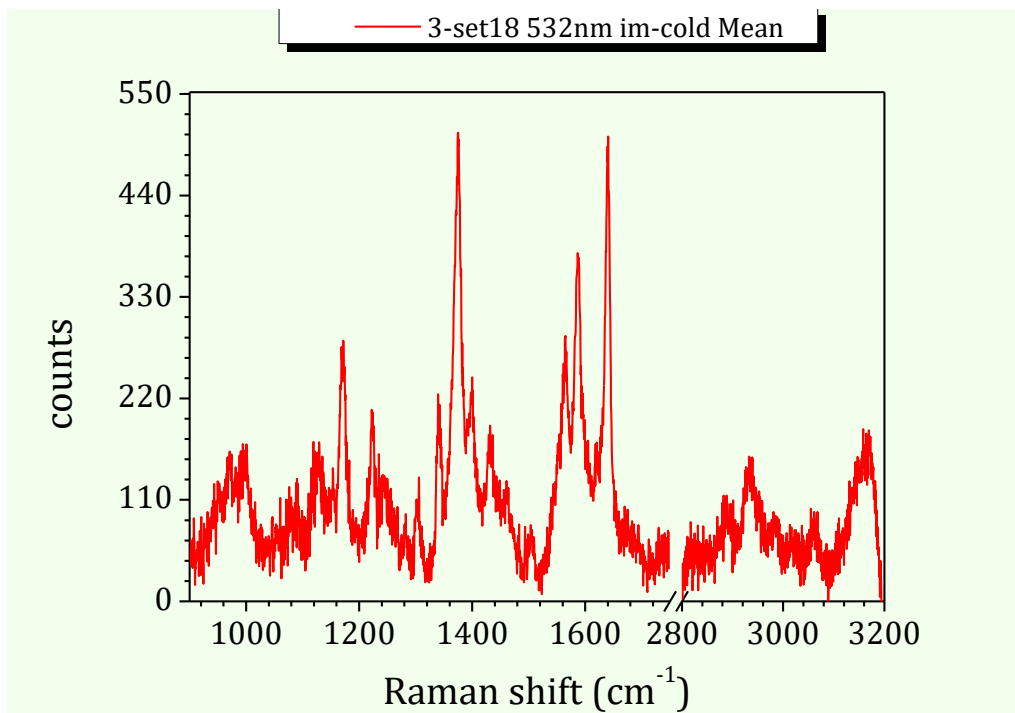
Στα λευκά σημεία υπάρχει μόνο υποψία κορυφών που δεν ξεχωρίζουν εύκολα από το υπόβαθρο, ιδιαίτερα στην περιοχή κάτω από 1750 cm^{-1} όπου τα κόκκινα σημεία δίνουν έντονα ευδιάκριτες κορυφές. Μόνο στις υψηλές συχνότητες φαίνεται κάπως να ξεχωρίζει μια κορυφή (σημειώνεται με αστερίσκο)



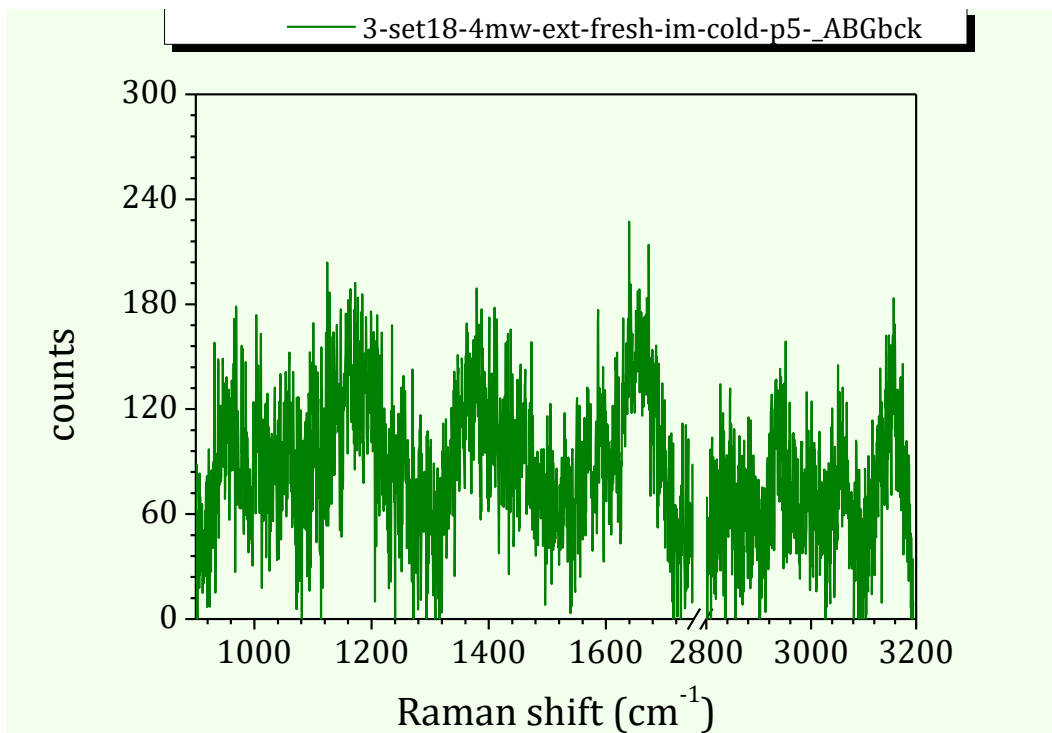
Εικόνα 80: Φωτογραφίες από το μικροσκόπιο των κόκκινων σημείων καρκινικού ιστού p1 p2 και p4 (από αριστερά)



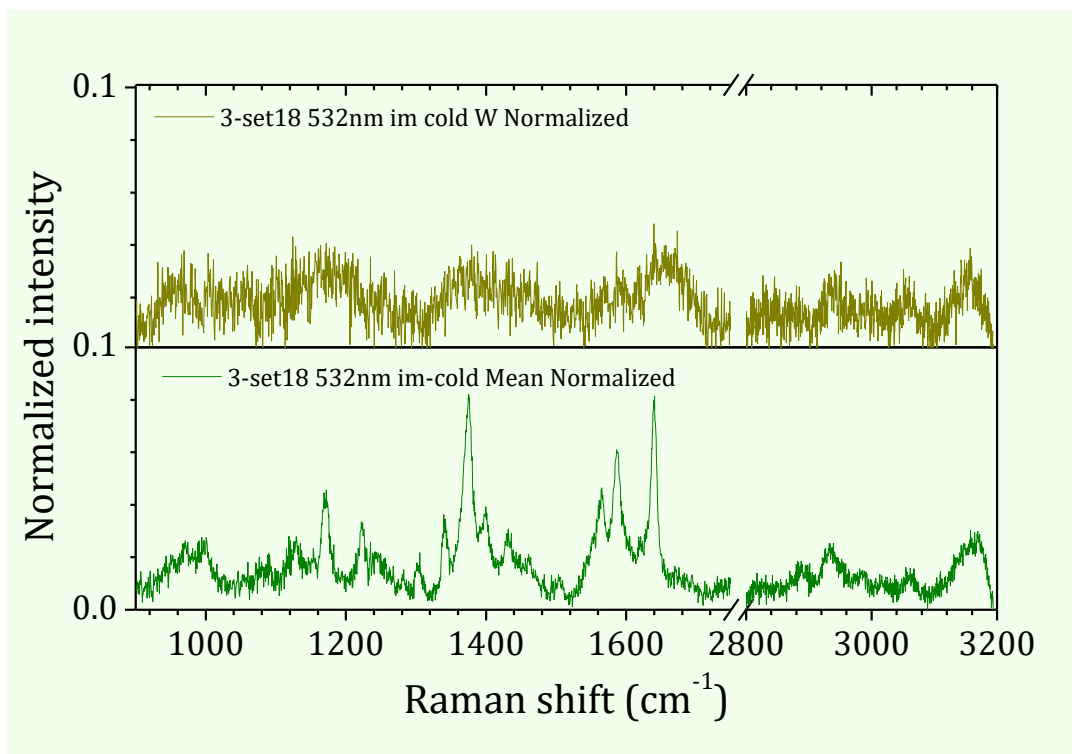
Εικόνα 81: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων κόκκινων σημείων καρκινικού ιστού του σετ18 im cold



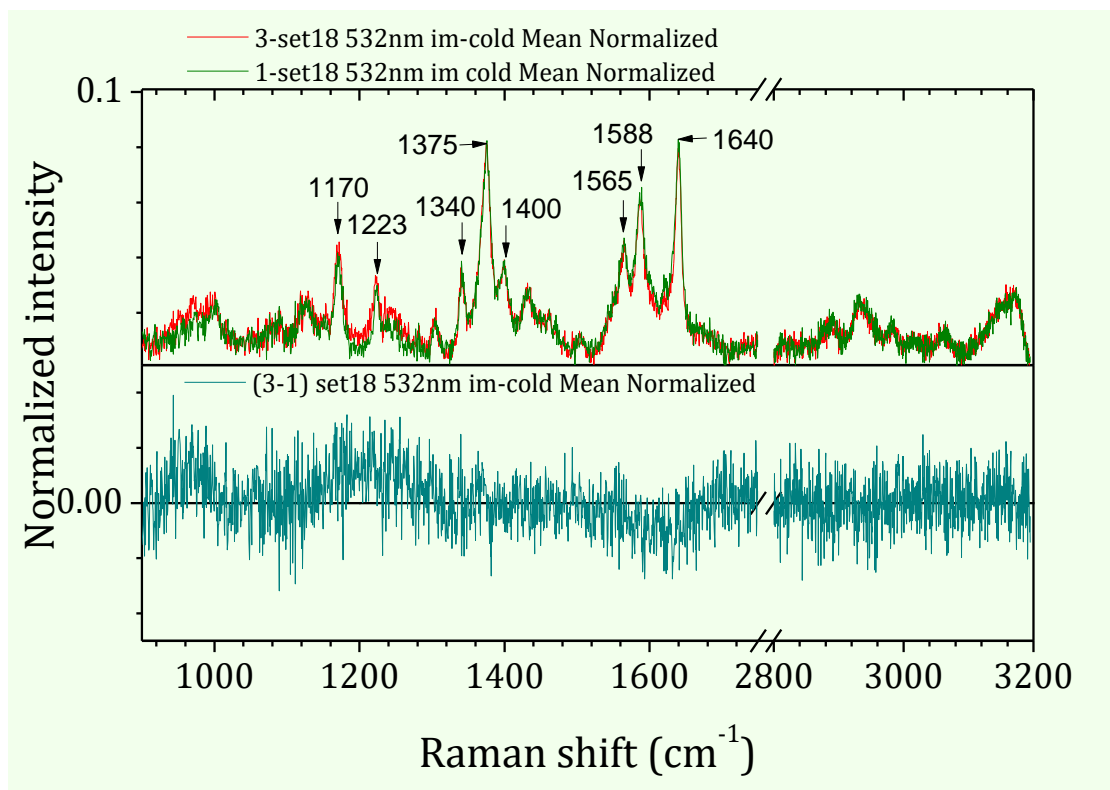
Εικόνα 82: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων των κόκκινων σημείων καρκινικού ιστού του σετ18 im cold



Εικόνα 83: Απεικόνιση χαρακτηριστικού φάσματος λευκού σημείου καρκινικού ιστού του σετ 18 im cold



Εικόνα 84: Σύγκριση μέσης τιμής κανονικοποιημένων φασμάτων κόκκινων και λευκών σημείων καρκινικού ιστού στο σετ 18 im cold



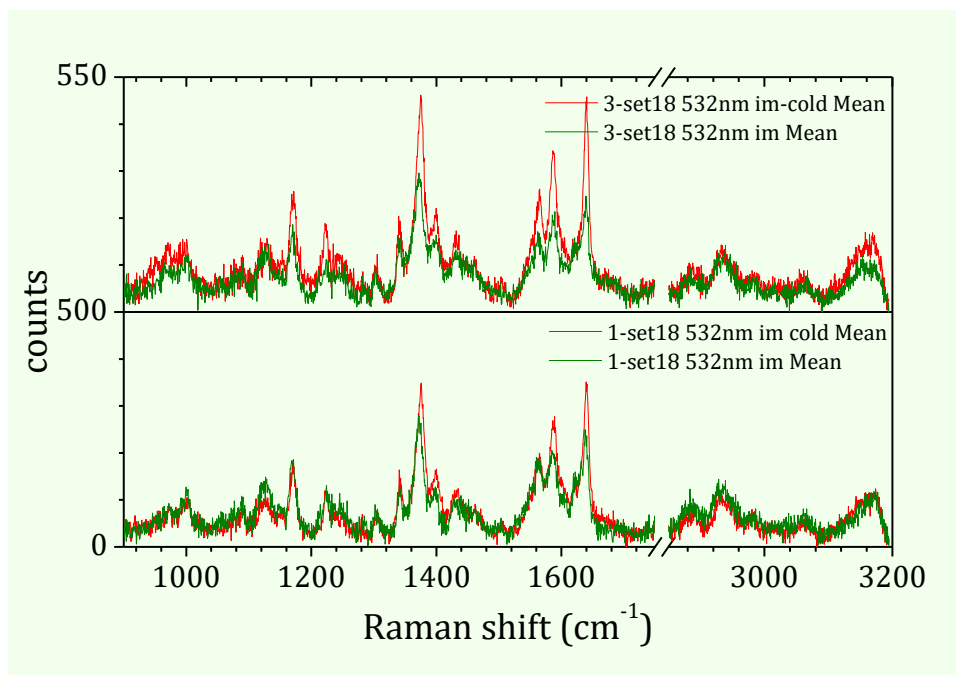
Εικόνα 85: Απεικόνιση της μέσης κανονικοποιημένης τιμής και των 2 δειγμάτων και της διαφοράς καρκινικού-υγιούς μέσου κανονικοποιημένου φάσματος των κόκκινων σημείων του σετ 18 im cold

Παρατηρούμε στις εικόνες 79 και 84 ότι στα λευκά σημεία δεν διακρίνονται σχεδόν καθόλου κορυφές γι' αυτό και τα αποτελέσματά τους δεν συμπεριλήφθηκαν στους τελικούς μέσους όρους που υπολογίστηκαν. Μόνο στα κόκκινα σημεία μπορούμε να διαπιστώσουμε σαφώς την ύπαρξη φάσματος Raman. Οι κορυφές εμφανίζονται στα ίδια σημεία και για τα δύο φάσματα, απλώς αλλάζουν σε ορισμένες περιπτώσεις οι εντάσεις τους.

Η θέση των κύριων κορυφών των κόκκινων σημείων παρουσιάζεται στον πιο κάτω πίνακα

Laser	Σετ	Δείγμα	Θέσεις κύριων κορυφών (cm ⁻¹)							
532 nm	18 im cold	1	1170	1223	1340	1376	1400	1565	1588	1640
		3	1172	1223	1340	1375	1400	1565	1587	1640

Στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων τα φάσματα υγιούς και καρκινικού σχεδόν ταυτίζονται αλλά δεν παρουσιάζουν έντονες κορυφές. Στις πιο χαμηλές συχνότητες μπορούμε με μεγάλα περιθώρια σφάλματος να εκτιμήσουμε ότι στο σετ 18 με ψύξη οι εντάσεις των φασματικών γραμμών στους καρκινικούς ιστούς είναι μεγαλύτερες του υγιούς στις περιοχές 935-1000 cm⁻¹ και 1150-1270 cm⁻¹ (διαφορετικές φασματικές περιοχές από το σετ 18 χωρίς ψύξη) ενώ το υγιές υπερτερεί σε ένταση της περιοχή 1570-1650 cm⁻¹ (παρόμοια περιοχή με του 18 χωρίς ψύξη).



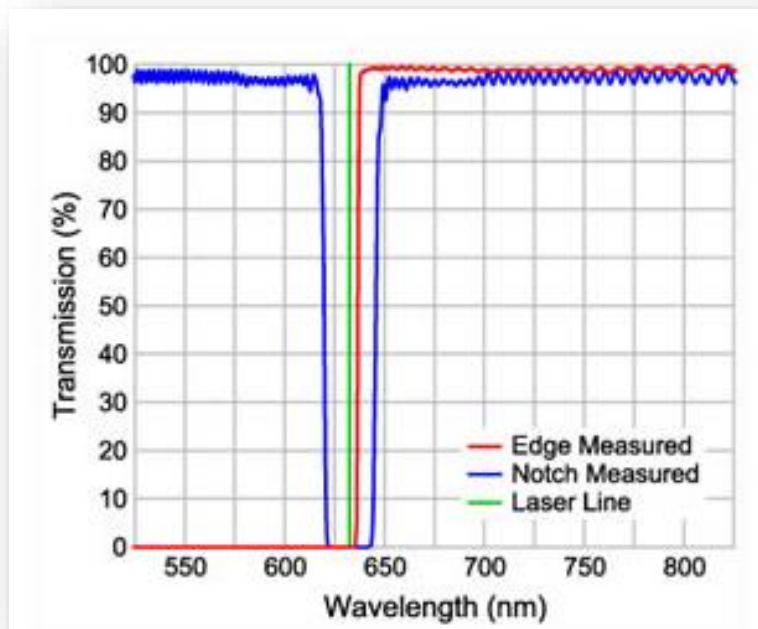
Εικόνα 86: Συγκεντρωτική απεικόνιση υγιών (κάτω) και καρκινικών (πάνω) μέσων φασμάτων των κόκκινων σημείων, με ψύξη (κόκκινη γραμμή) και χωρίς ψύξη (πράσινη γραμμή).

Παρατηρούμε ότι οι εντάσεις των φασματικών κορυφών με την ψύξη εμφανίζονται ελαφρώς πιο ενισχυμένες στις περισσότερες φασματικές περιοχές, ειδικά στον καρκινικό ιστό. Όμως απαιτούνται περισσότερες μετρήσεις για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της ψύξης στην ενίσχυση του σήματος.

4.3 Μετρήσεις και επεξεργασία φασμάτων από το φασματόμετρο Renishaw στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

4.3.1 Μετρήσεις με το laser διέγερσης των 514.5 nm

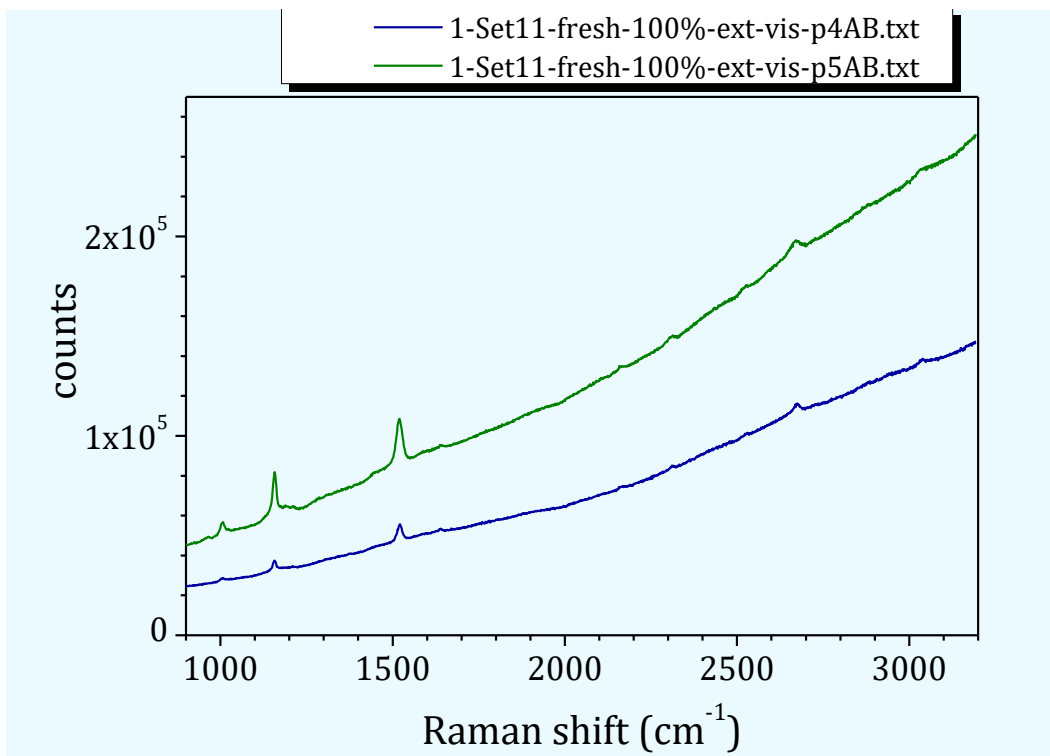
Οι μετρήσεις με το laser διέγερσης των 514,5 nm έγιναν στο εργαστήριο Raman του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» και πραγματοποιήθηκαν με το In-Via Raman Microscope της Renishaw. Το συγκεκριμένο φασματόμετρο διαθέτει edge filter για την αποκοπή των ελαστικών σκεδάσεων Rayleigh (αντί για διπλό προ-μονοχρωμάτορα). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα κάποιες φορές στα φάσματα να παρατηρούνται συμβολομετρικοί κροσσοί που προκαλούνται από το συμβολομετρικό φίλτρο αποκοπής (edge filter), δηλαδή προκύπτουν κάποιες περιοδικές καμπύλες (όπως διακρίνονται στην εικόνα 87) που δεν θα πρέπει να συγχέονται με φάσμα Raman.



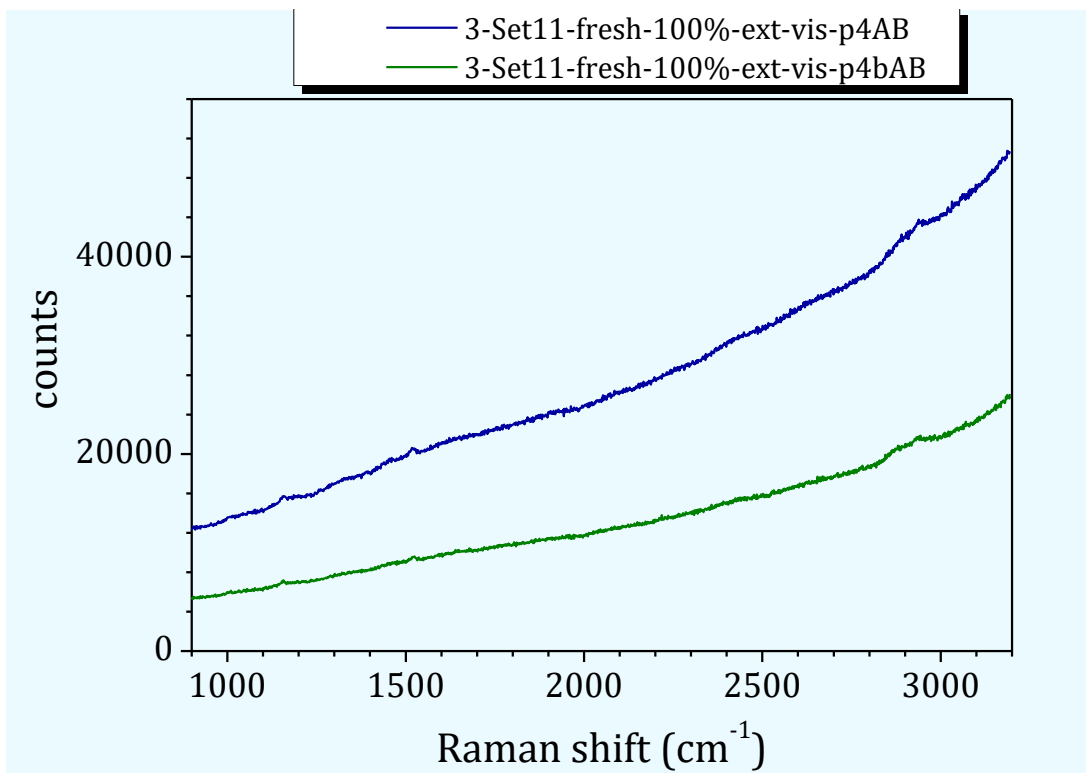
Εικόνα 87: Απεικόνιση αποκοπής των ελαστικών σκεδάσεων Rayleigh από Edge filter. [56]

Η φασματική ρύθμιση έγινε σε εκτεταμένη φασματική περιοχή από 500 cm^{-1} ως 3200 cm^{-1} με τη βοήθεια του προγράμματος WiRE και εδώ μπορούσε να σαρωθεί απευθείας όλο το φάσμα.

Έγιναν συνολικά 62 μετρήσεις 35 σε υγιή δείγματα (sample1) και 27 σε καρκινικά (sample 3).



Εικόνα 88: Ενδεικτικά ανεπεξέργαστα φάσματα υγιούς ιστού (set 11)



Εικόνα 89: Ενδεικτικά ανεπεξέργαστα φάσματα καρκινικού ιστού (set 11)

4.3.2 Επεξεργασία φασμάτων

Για την αφαίρεση του υπόβαθρου της φωταύγειας χρησιμοποιήθηκε και πάλι το πρόγραμμα WiRE. Το φάσμα ήταν μονοκόμματο από 500-3200 cm^{-1} αλλά έτσι ήταν δύσκολο να εφαρμοστεί το εργαλείο του polynomial fitting για να γίνει η πολυωνυμική προσαρμογή. Γι' αυτό το λόγο, το φάσμα κόπηκε με το εργαλείο truncate σε δύο μέρη A) 900-2000 cm^{-1} (900 cm^{-1} για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα με αυτά που αναλύθηκαν προηγουμένως από τις μετρήσεις στο ΕΜΠ) και B) 2000-3200 cm^{-1} . Ακολούθησε η πολυωνυμική προσαρμογή για την αφαίρεση του υπόβαθρου σε κάθε κομμάτι ξεχωριστά με το εργαλείο subtract baseline, χρησιμοποιώντας πολυώνυμο 5^{ης} τάξης και 8+2 σημεία και κατόπιν τα background corrected κομμάτια A και B επανενώθηκαν σε ένα ενιαίο txt αρχείο. Τα δεδομένα αυτά απεικονίστηκαν σε γραφικές παραστάσεις με τη βοήθεια του προγράμματος Origin. Με το ίδιο πρόγραμμα έγινε και η κανονικοποίηση των φασμάτων όπου ήταν απαραίτητο, χρησιμοποιώντας τη ρύθμιση divided by norm όπως και στην επεξεργασία των προηγούμενων αποτελεσμάτων.

4.3.3 Αποτελέσματα Σετ 5

Laser: 514,5nm (πράσινο) με ισχύ 100%

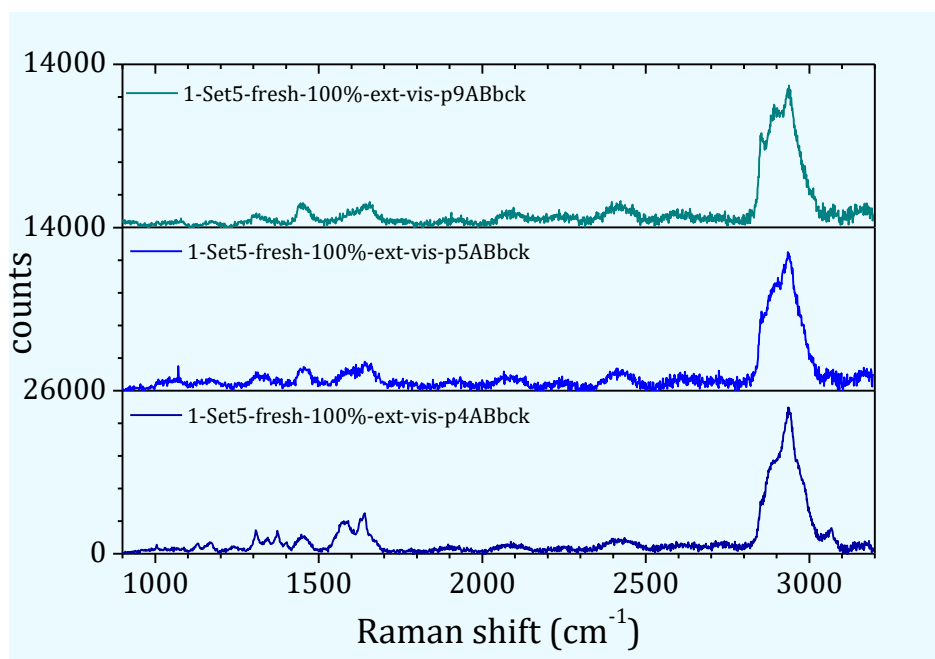
Φακός: Leica 100x long distance.

Μετρήσεις: Extended Range 500-3200 cm^{-1} με χρόνο έκθεσης 60 sec και 5 scans

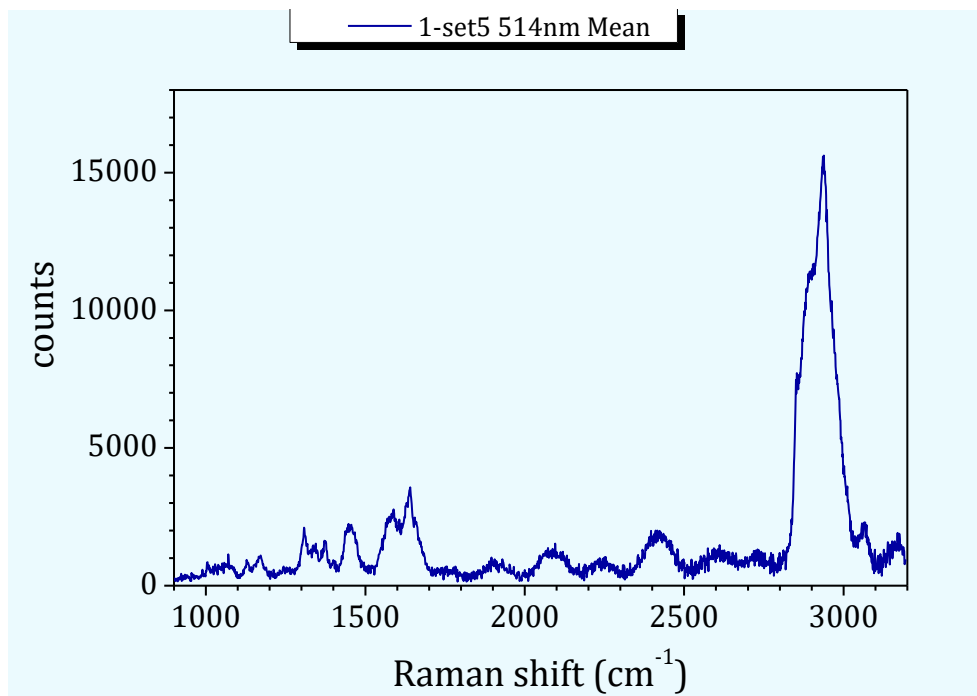
Bleaching time: 60 sec για τους υγιείς ιστούς και 240 sec για τους καρκινικούς

Ψύξη: Συσκευή THMS600 System της Linkam

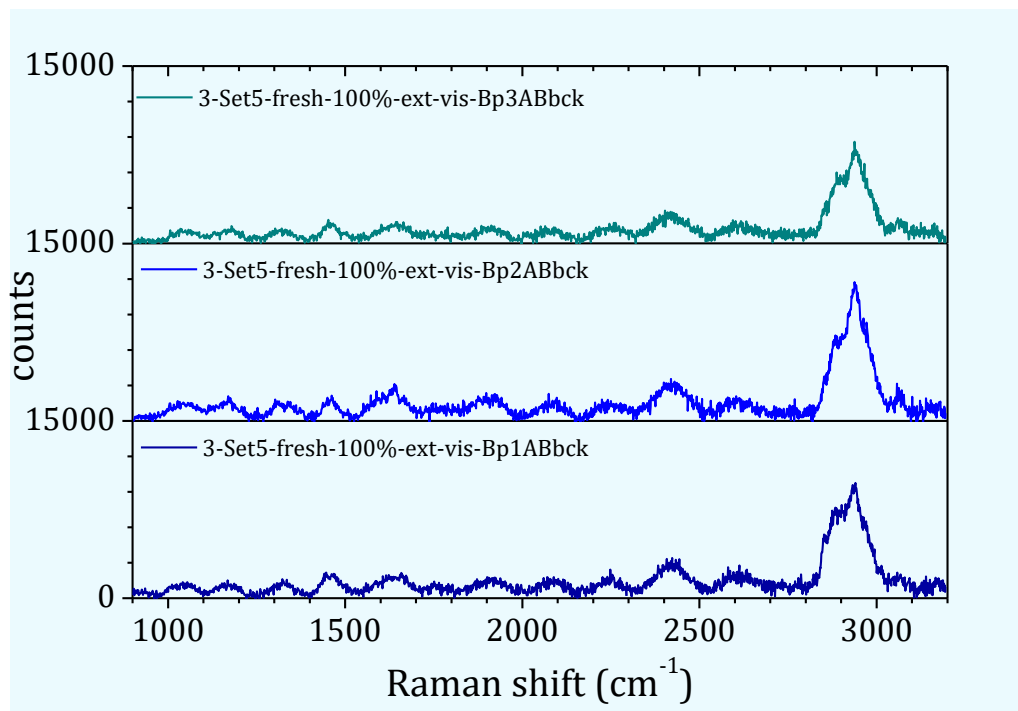
Πάρθηκαν 16 μετρήσεις συνολικά (9 για υγιείς και 7 για καρκινικό), αλλά παρουσιάζονται ενδεικτικά τα 3 φάσματα από κάθε δείγμα που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ένταση.



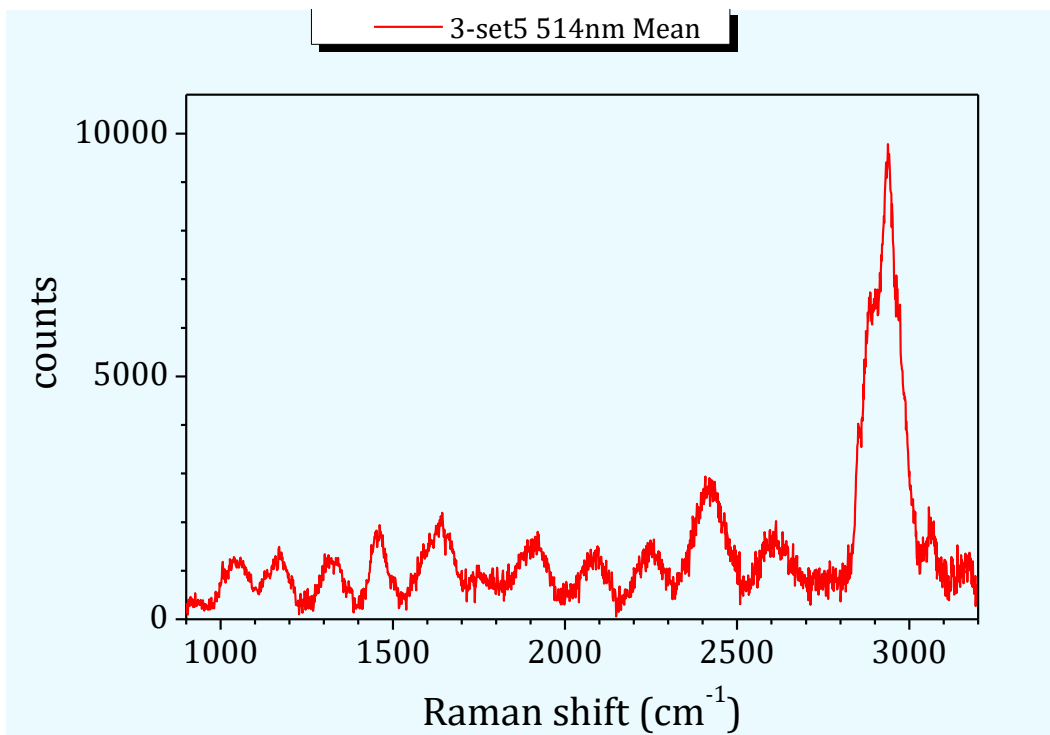
Εικόνα 90: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων υγιούς ιστού του σετ 5



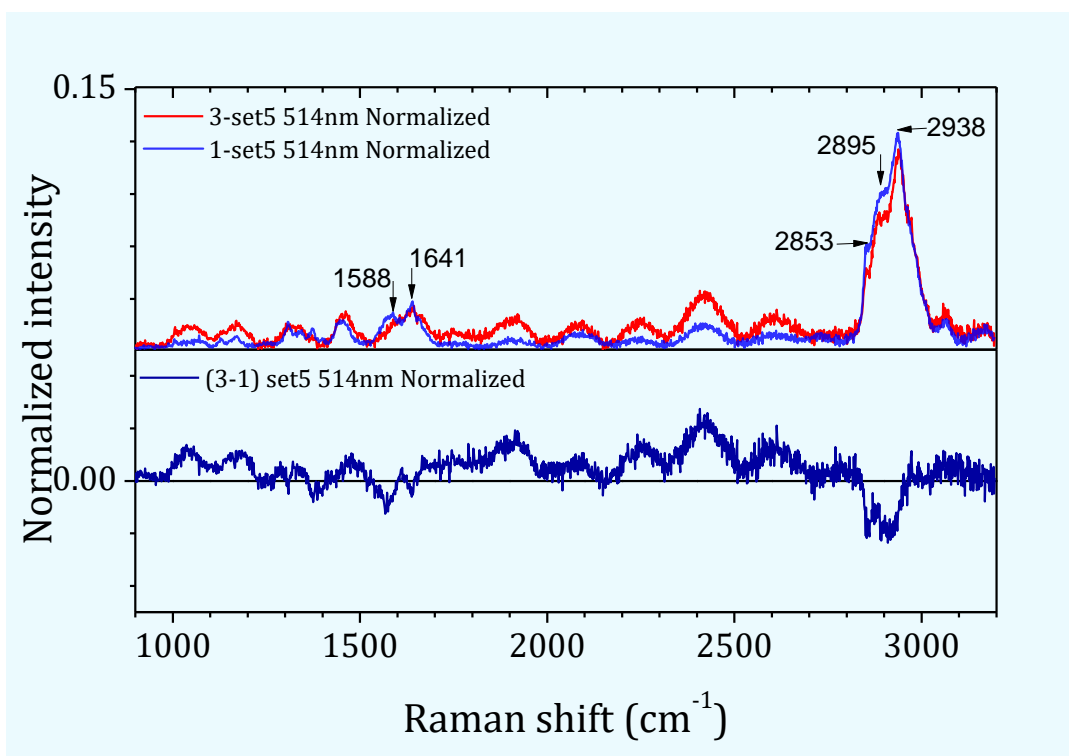
Εικόνα 91: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων υγιούς ιστού του σετ 5



Εικόνα 92: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων καρκινικού ιστού του σετ 5



Εικόνα 93: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων καρκινικού ιστού του σετ 5



Εικόνα 94: Απεικόνιση της μέσης κανονικοποιημένης τιμής και των 2 δειγμάτων και της διαφοράς καρκινικού-υγιούς μέσου κανονικοποιημένου φάσματος του σετ 5

Διακρίνονται έντονα οι συμβολομετρικοί κροσσοί από το edge filter ιδιαίτερα στον καρκινικό ιστό όπου ειδικά στις χαμηλές συχνότητες συγχέονται με τις κορυφές.

Η θέση των κύριων κορυφών παρουσιάζεται στον πιο κάτω πίνακα

Laser	Σετ	Δείγμα	Θέσεις κύριων κορυφών (cm ⁻¹)				
514.5nm	5	1	1588	1641	2853	2894	2938
		3			2852	2895	2939

Η περιοχή 1750-2800 cm⁻¹ αγνοήθηκε διότι δεν είναι γνωστό να υπάρχουν εκεί κορυφές Raman και δεν μελετήθηκε και στις μετρήσεις που πάρθηκαν με το προηγούμενο φασματόμετρο. Επίσης στο καρκινικό φάσμα οι κορυφές που εμφανίζονται στις χαμηλές συχνότητες θεωρήθηκε ότι αποτελούν περιοδικές κορυφές των συμβολομετρικών κροσσών και αγνοήθηκαν. Στο υγιές ξεχωρίζουν κάπως πιο έντονα και θεωρήθηκε ότι πρόκειται για κορυφές Raman.

Στην απεικόνιση της διαφοράς καρκινικού-υγιούς φάσματος στο μεγαλύτερο μέρος φαίνεται να επικρατεί το καρκινικό φάσμα όμως αυτό ενδεχομένως να είναι εσφαλμένο συμπέρασμα λόγω των έντονων συμβολομετρικών κροσσών.

Στις υψηλές συχνότητες όπου εμφανίζονται οι έντονες κορυφές Raman στο διάστημα μεταξύ 2842-2950 cm⁻¹ φαίνεται να επικρατεί το υγιές φάσμα.

4.3.4 Αποτελέσματα Σετ 11

Laser: 514,5nm (πράσινο) με ισχύ 100%

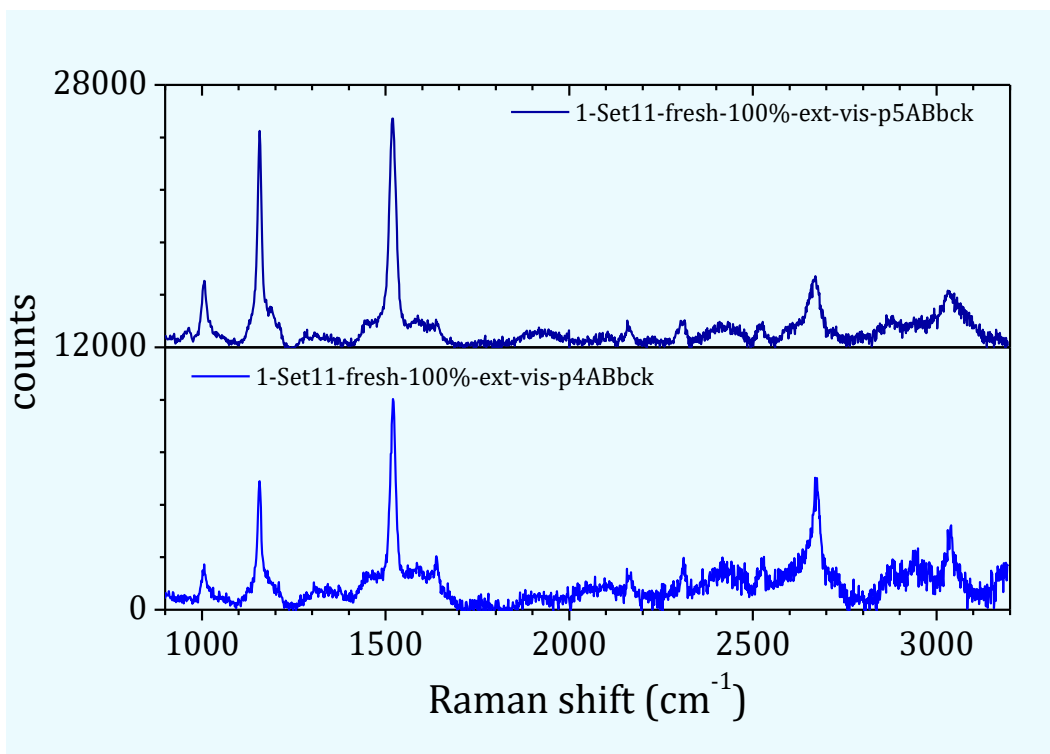
Φακός: Leica 50x long distance.

Μετρήσεις: Extended Range 500-3200 cm⁻¹ με χρόνο έκθεσης 60 sec και 5 scans

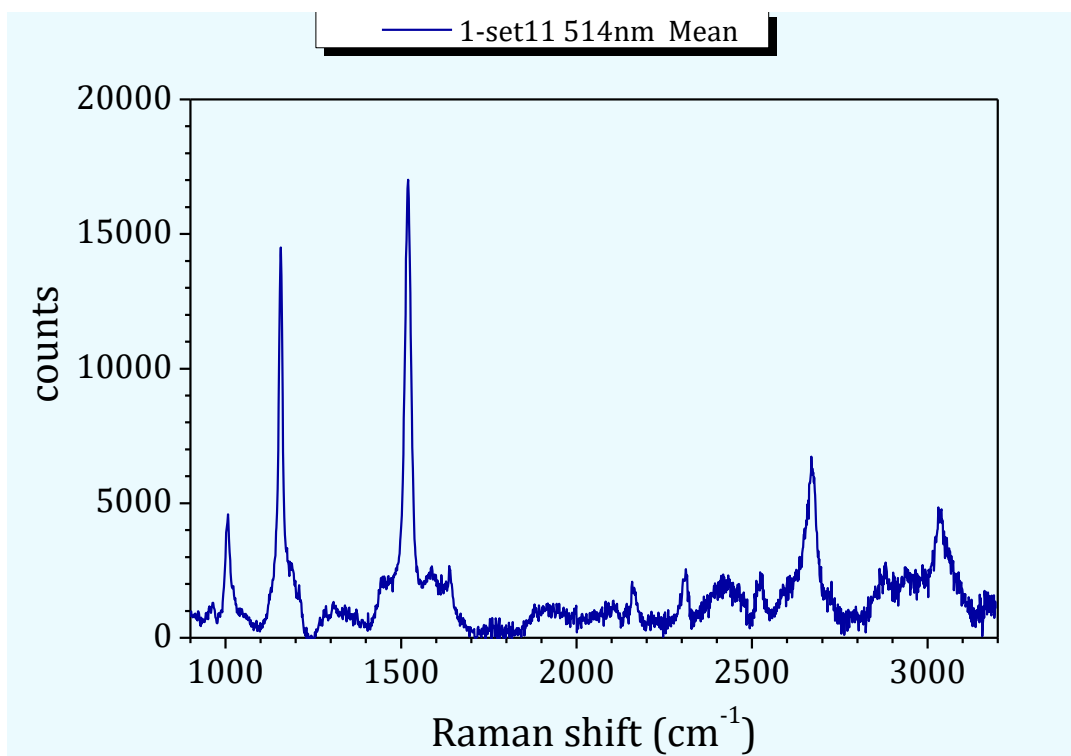
Bleaching time: 60-120 sec

Ψύξη: Συσκευή THMS600 System της Linkam

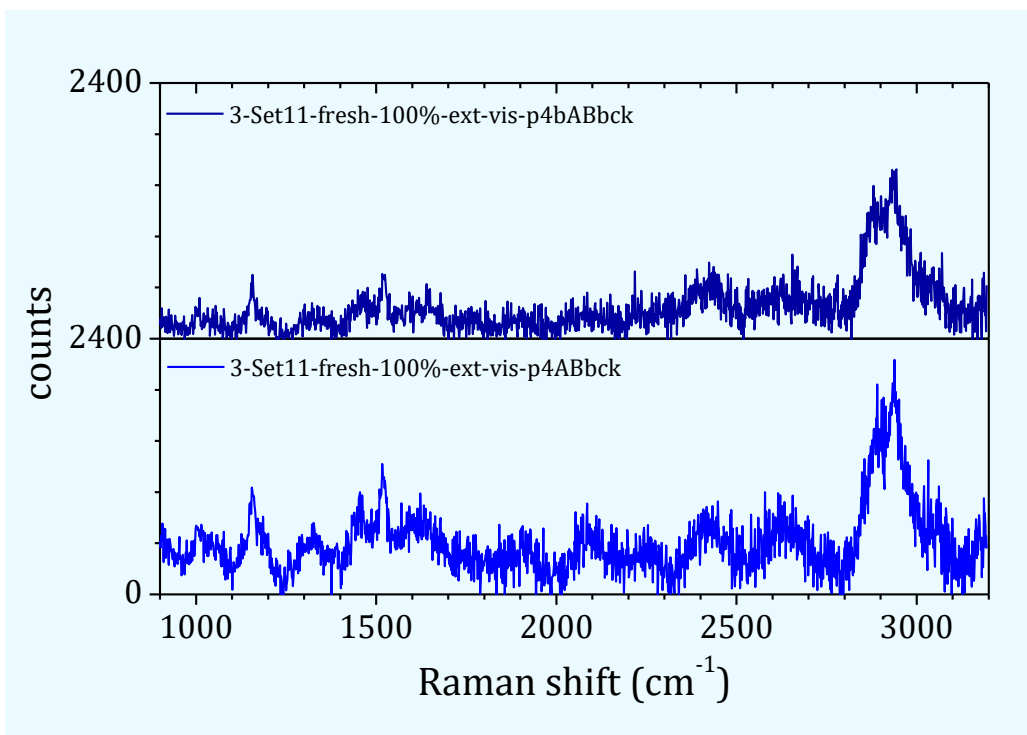
Πάρθηκαν 16 μετρήσεις συνολικά (8 για υγιές και 8 για καρκινικό), αλλά παρουσιάζονται ενδεικτικά τα 2 φάσματα από κάθε δείγμα που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ένταση.



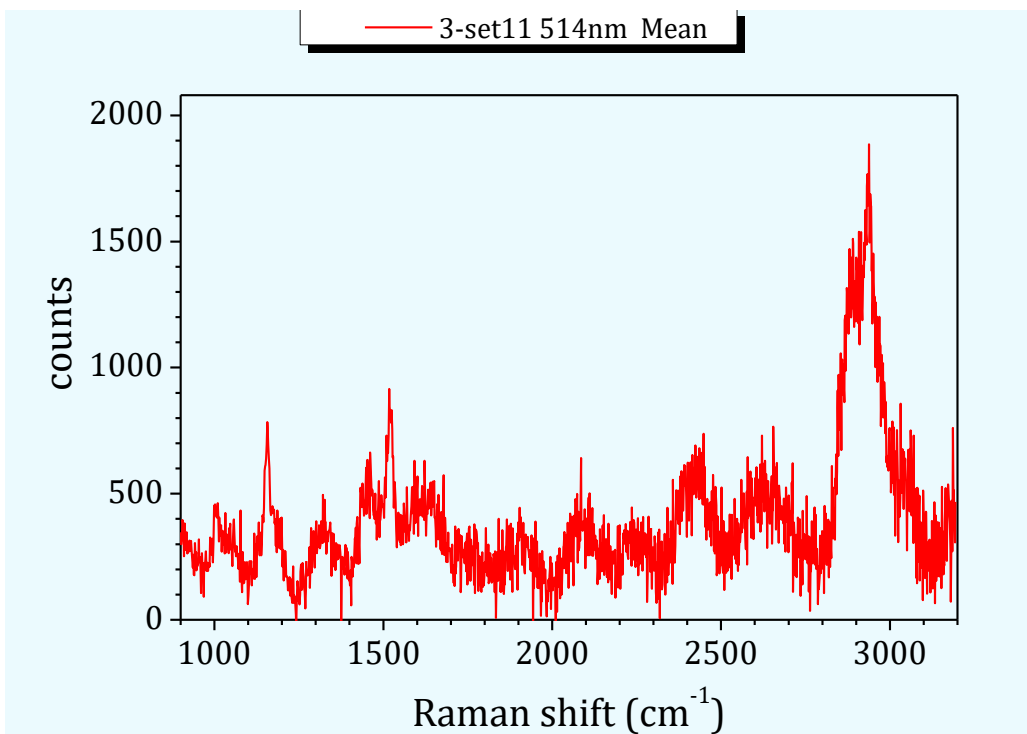
Εικόνα 95: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων υγιούς ιστού του σετ 11



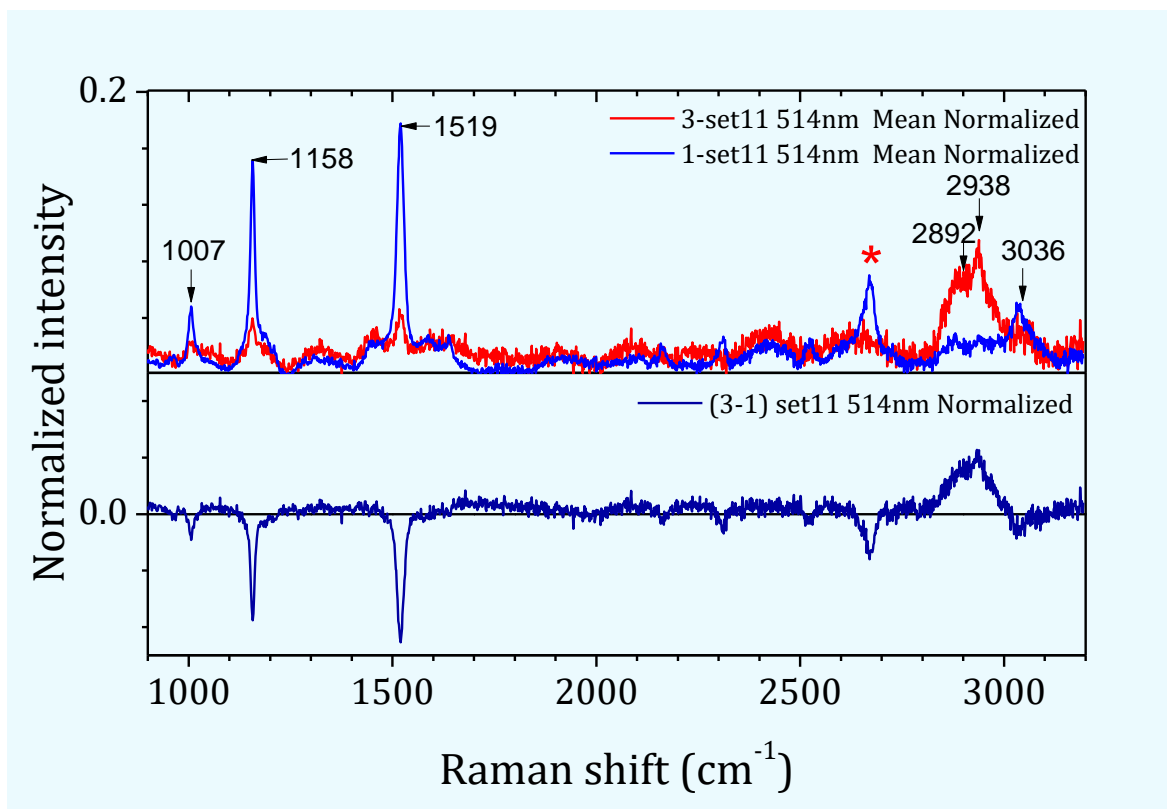
Εικόνα 96: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων υγιούς ιστού του σετ 11



Εικόνα 97: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων καρκινικού ιστού του σετ 11



Εικόνα 98: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων καρκινικού ιστού του σετ 11



Εικόνα 99: Απεικόνιση της μέσης κανονικοποιημένης τιμής και των 2 δειγμάτων και της διαφοράς καρκινικού-υγιούς μέσου κανονικοποιημένου φάσματος του σετ 11

Η θέση των κύριων κορυφών παρουσιάζεται στον πιο κάτω πίνακα

Laser	Σετ	Δείγμα	Θέσεις κύριων κορυφών (cm ⁻¹)					
514.5nm	11	1	1007	1158	1519			3036
		3		1158	1519	2892	2938	

Το υγιές δείγμα εμφανίζει εξαιρετικά έντονες κορυφές και μάλιστα σε θέσεις που δεν είχαμε παρατηρήσει τέτοια αποτελέσματα ως τώρα. Η κορυφή που εμφανίζεται γύρω στα 2650 cm⁻¹ (σημαίνεται με το αστεράκι) και η διαφορά που προκαλεί δεν θα ληφθεί υπόψη διότι ανήκει στο διάστημα 1750-2800 cm⁻¹ που δεν εξετάζουμε διότι δεν παρουσιάζει ενδιαφέρον. Στο καρκινικό παρατηρείται και σε αυτό το σετ μια περιοδική σειρά κορυφών που προέρχονται από το συμβολομετρικό φίλτρο εντούτοις όμως ξεχωρίζουν ελαφρώς και κάποιες κορυφές του φάσματος.

Όσον αφορά στις διαφορές καρκινικού-υγιούς φάσματος εμφανίζονται περιοχές όπου το υγιές είναι πολύ μεγαλύτερο του καρκινικού λόγω των έντονων κορυφών που ήδη σχολιάσαμε. Αυτές είναι : 995-1025 cm⁻¹, 1132-1218 cm⁻¹ και 1478-1588 cm⁻¹. Μια πολύ μικρότερη υπέρβαση του υγιούς παρατηρείται και στο διάστημα 3024-3055 cm⁻¹. Σε μια μόνο περιοχή φαίνεται να επικρατεί το καρκινικό φάσμα, μεταξύ 2810-3010 cm⁻¹.

4.3.5 Αποτελέσματα Σετ 11 με υδατοκαταδυτικό φακό

Laser: 514,5nm (πράσινο) με ισχύ 10%

Φακός: : Immersive Olympus LUM Plan FL N 40x/0.80w

Μετρήσεις: Extended Range 500-3200 cm^{-1} με χρόνο έκθεσης 30 sec και 5 scans

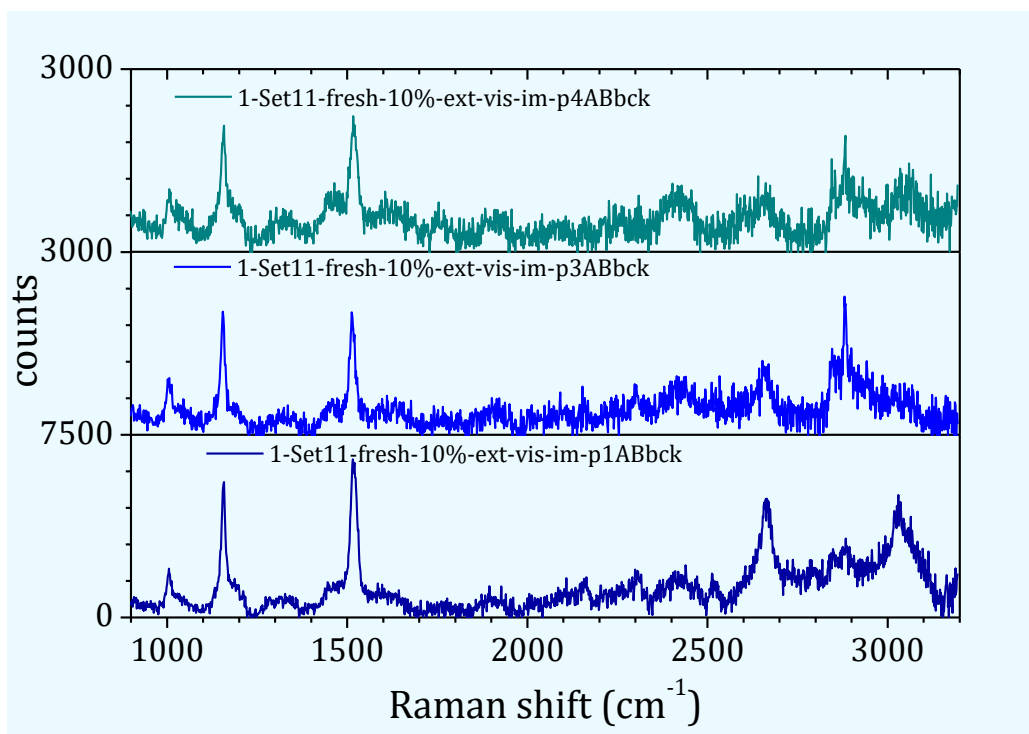
Bleaching time: no bleaching time

Ψύξη: χωρίς ψύξη

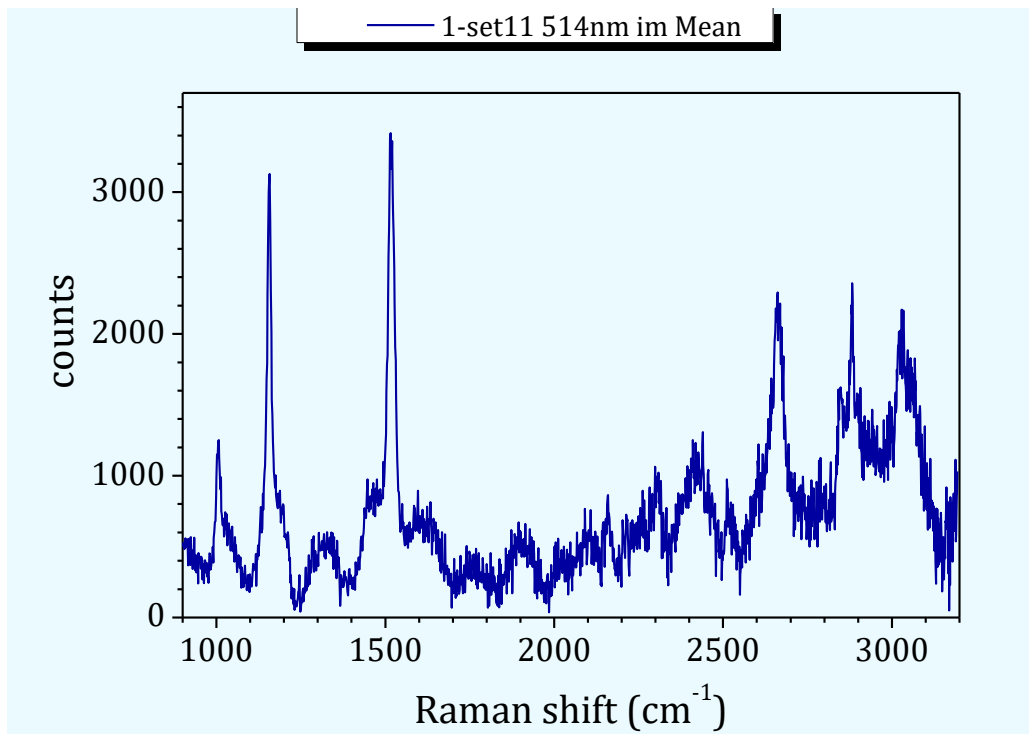
Πάρθηκαν 18 μετρήσεις συνολικά (12 για υγιές και 6 για καρκινικό), αλλά παρουσιάζονται ενδεικτικά τα 3 φάσματα από κάθε δείγμα που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ένταση μαζί με τις φωτογραφίες από το μικροσκόπιο. Στον υγιή ιστό οι μετρήσεις πάρθηκαν πάνω σε σημεία που ήταν πολύ έντονα λευκά.



Εικόνα 100: Φωτογραφίες από το μικροσκόπιο των σημείων υγιούς ιστού p1, p3 και p4 (από αριστερά)



Εικόνα 101: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων υγιούς ιστού του σετ 11 im

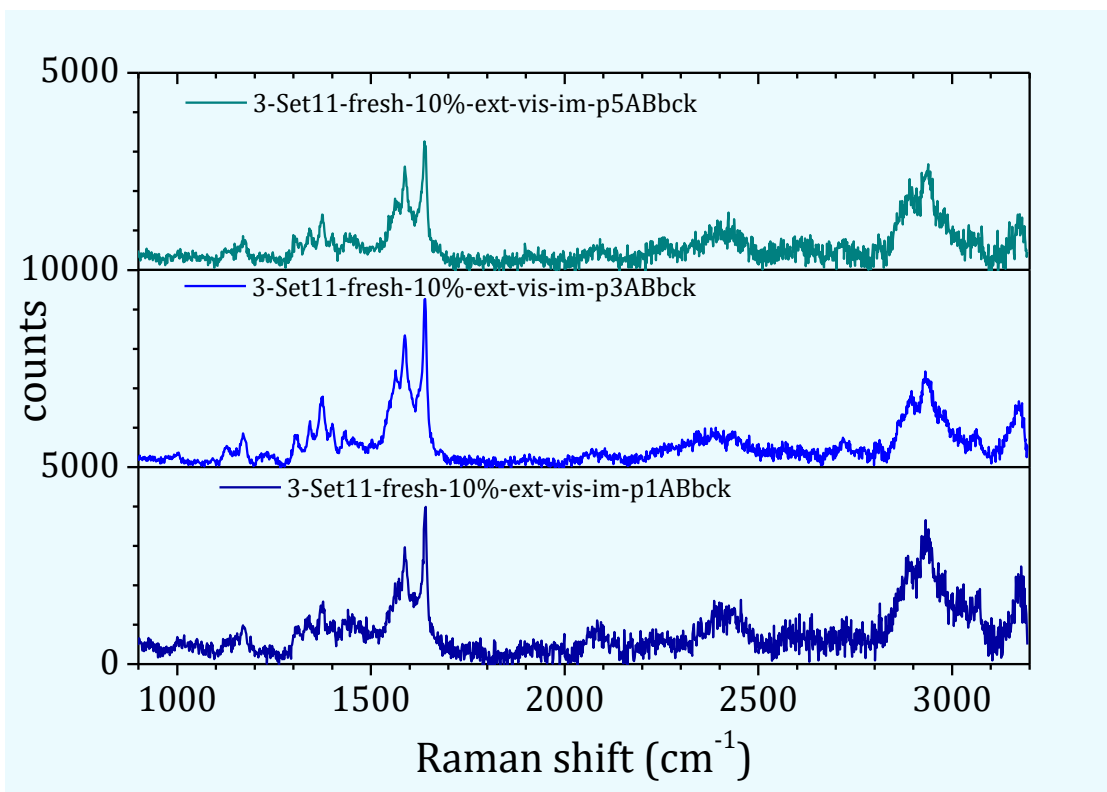


Εικόνα 102: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων υγιούς ιστού του σετ 11 im

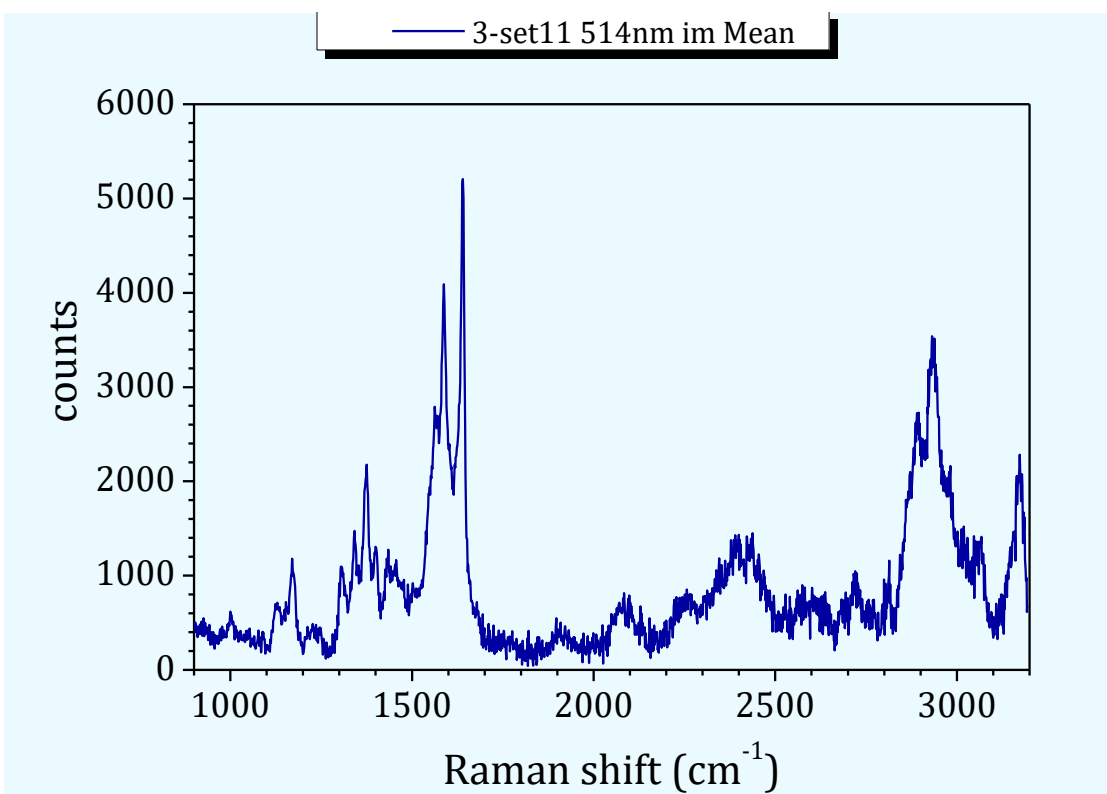


Εικόνα 103: Φωτογραφίες από το μικροσκόπιο των σημείων καρκινικού ιστού p1 p3 και p5 (από αριστερά)

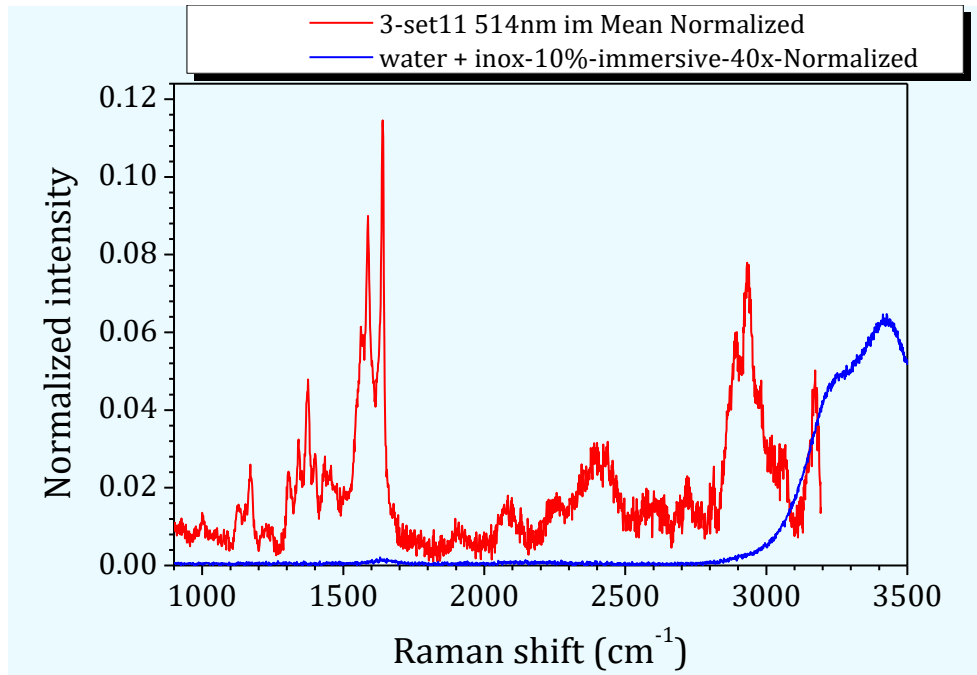
Στις καρκινικές περιοχές οι μετρήσεις πάρθηκαν σε σκούρα ή κοκκινωπά σημεία. Γι' αυτό το λόγο σε αυτό το σετ διαπιστώνουμε έντονη διαφορά μεταξύ των μορφών του υγιούς φάσματος από το καρκινικό.



Εικόνα 104: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων καρκινικού ιστού του σετ 11 im

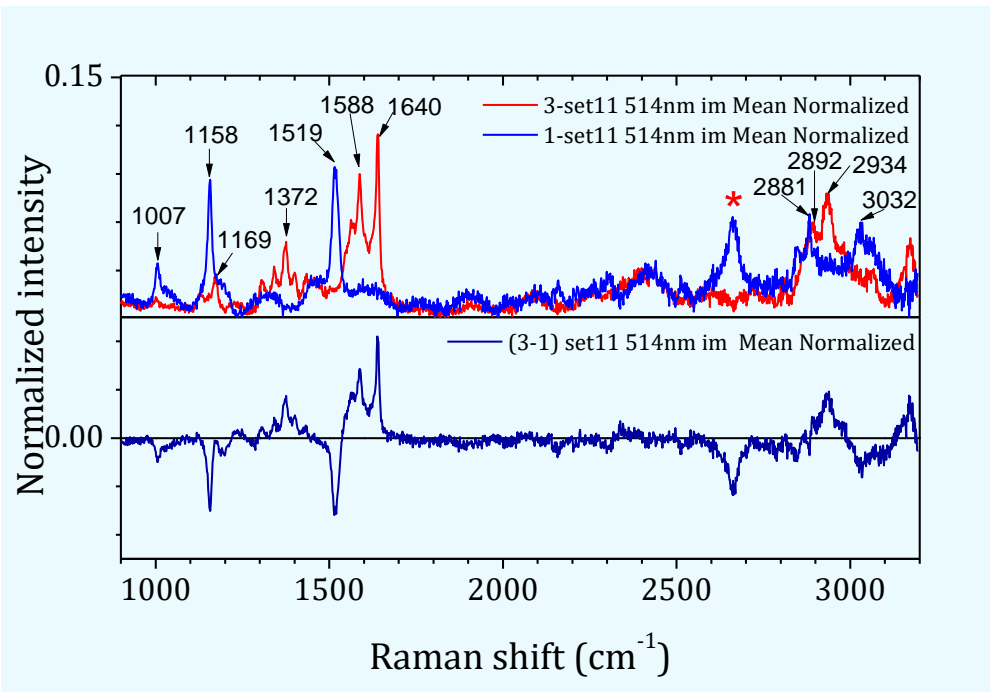


Εικόνα 105: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων καρκινικού ιστού του σετ 11 im



Εικόνα 106: Απεικόνιση μέσης κανονικοποιημένης τιμής των φασμάτων καρκινικού ιστού του σετ 11 im και φυσιολογικού ορού.

Παρατηρούμε ότι η κορυφή που εμφανίζεται στις υψηλές συχνότητες στο όριο των μετρήσεων λογικά οφείλεται στην έντονη σκέδαση Raman του νερού στην περιοχή και θα αγνοηθεί στην ανάλυση του φάσματος.



Εικόνα 107: Απεικόνιση της μέσης κανονικοποιημένης τιμής και των 2 δειγμάτων και της διαφοράς καρκινικού-υγιούς μέσου κανονικοποιημένου φάσματος του σετ 11 im

Η θέση των κύριων κορυφών παρουσιάζεται στον πιο κάτω πίνακα:

Laser	Σετ	Δείγμα	Θέσεις κύριων κορυφών (cm ⁻¹)								
			1007	1158			1519			2881	
514.5 nm	11 im	1									
		3			1169	1372		1588	1640	2892	2934

Εκτός από τις κορυφές του πίνακα στο υγιές εμφανίζεται και μια επιπλέον κορυφή στην άκρη του φάσματος στα 3032 cm⁻¹. Σε αυτό το σετ παρατηρούμε πολύ έντονες διαφορές μεταξύ υγιούς και καρκινικού φάσματος. Ενώ στις μέχρι τώρα μετρήσεις τα φάσματα υγιούς και καρκινικού δεν παρουσίαζαν ιδιαίτερα μεγάλες διαφορές μεταξύ τους, εδώ παρατηρούμε ότι οι κορυφές εμφανίζονται σε τελείως διαφορετικές θέσεις στο υγιές από ότι στο καρκινικό. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι οι μετρήσεις του υγιούς έγιναν σε σημεία με λαμπερό λευκό χρώμα ενώ του καρκινικού σε κοκκινωπά σημεία και φυσικά αυτή η διαφορά επηρεάζει και τις περιοχές στις οποίες φαίνεται να υπερέχει το ένα ή το άλλο φάσμα.

Το υγιές φάσμα επικρατεί σε 6 περιοχές, μεταξύ 985-1070 cm⁻¹, 1130-1215 cm⁻¹, 1272-1290 cm⁻¹, 1475-1538 cm⁻¹ και 2992-3125 cm⁻¹, ενώ το καρκινικό σε λιγότερες (3), μεταξύ 1300-1440 cm⁻¹, 1540-1698 cm⁻¹, 2887-2985 cm⁻¹ αλλά με εξίσου έντονες διαφορές. (Η διαφορά στο 2580-2858 cm⁻¹ δεν αναφέρεται διότι προέρχεται από την κορυφή που σημαίνεται με αστεράκι η οποία αγνοήθηκε επειδή δεν ανήκει στο διάστημα που μελετάμε).

4.3.6 Αποτελέσματα Σετ 18 immersive

Laser: 514,5nm (πράσινο) με ισχύ 100%

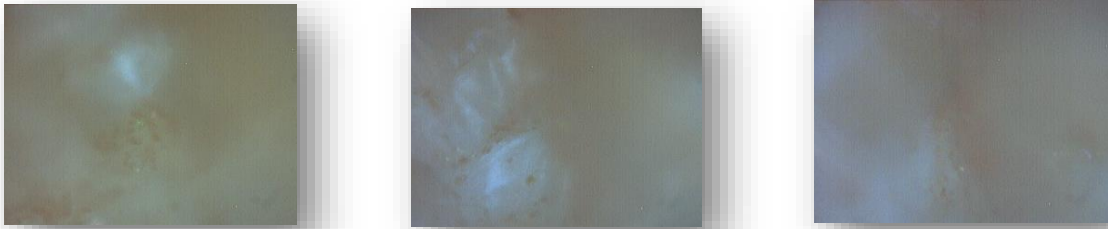
Φακός: : Immersive Olympus LUM Plan FL N 40x/0.80w

Μετρήσεις: Extended Range 500-3200 cm⁻¹ με χρόνο έκθεσης 60 sec και 5 scans

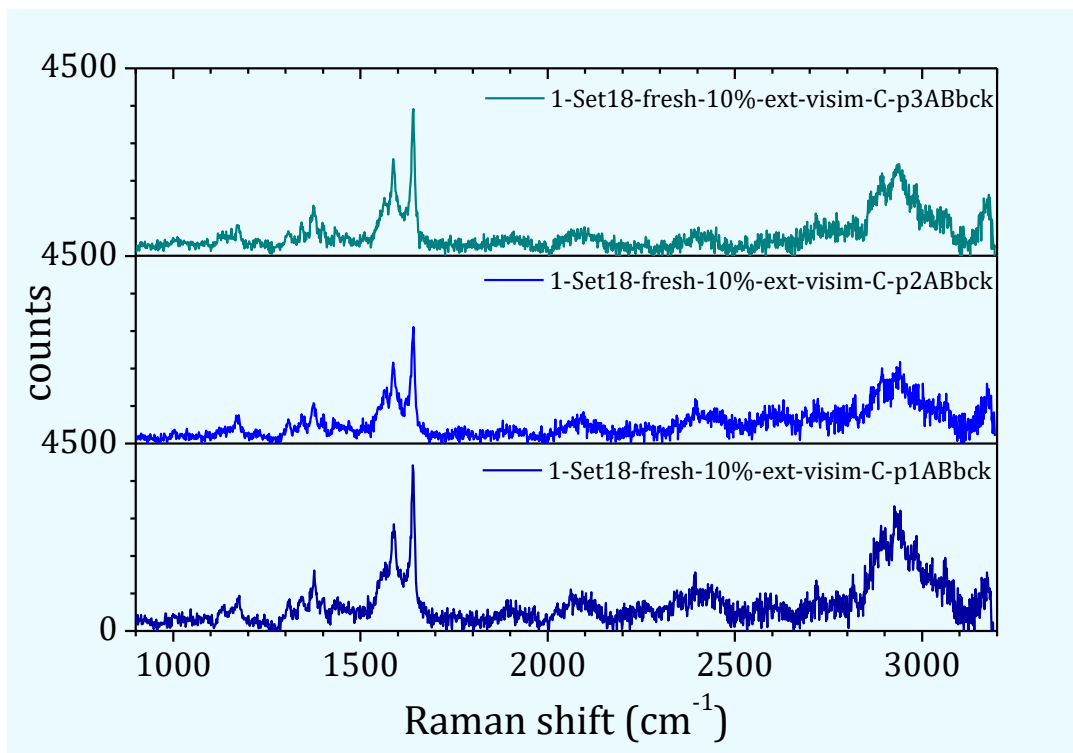
Bleaching time: no bleaching time

Ψύξη: χωρίς ψύξη

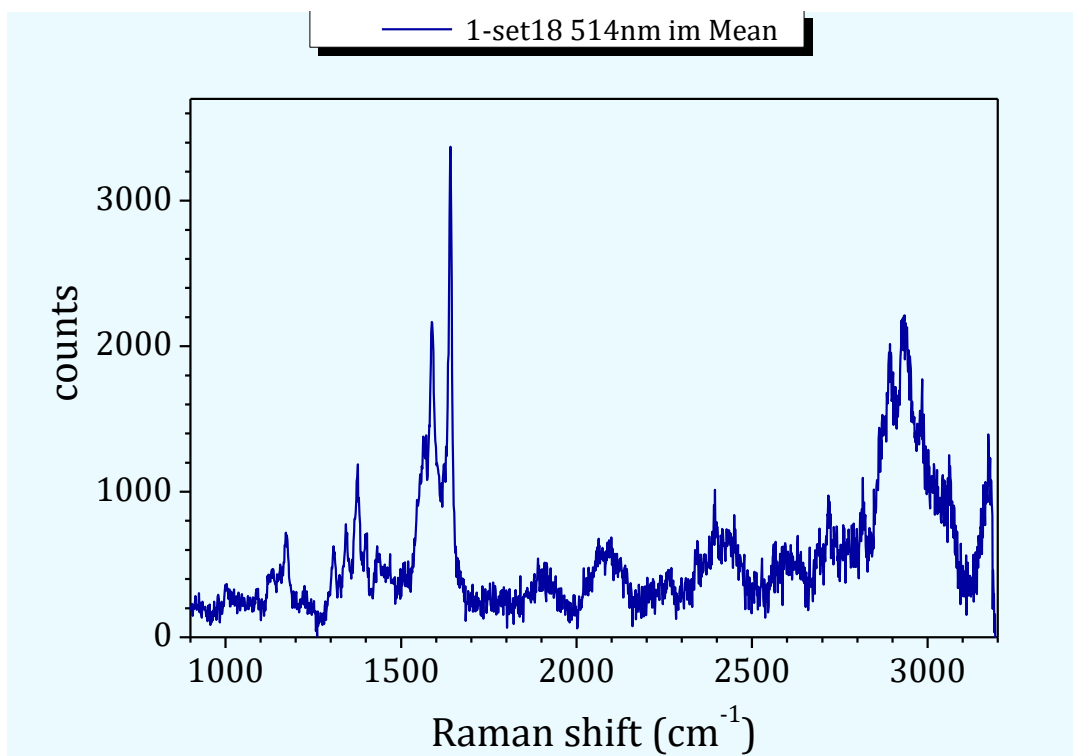
Πάρθηκαν 12 μετρήσεις συνολικά (6 για υγιές και 6 για καρκινικό), και παρουσιάζονται 4 υγιή φάσματα και 5 καρκινικά αυτά που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ένταση και με διάκριση σε λευκά και κόκκινα σημεία.



Εικόνα 108: Φωτογραφίες από το μικροσκόπιο κόκκινων σημείων υγιούς ιστού p1, p2 και p3 (από αριστερά)



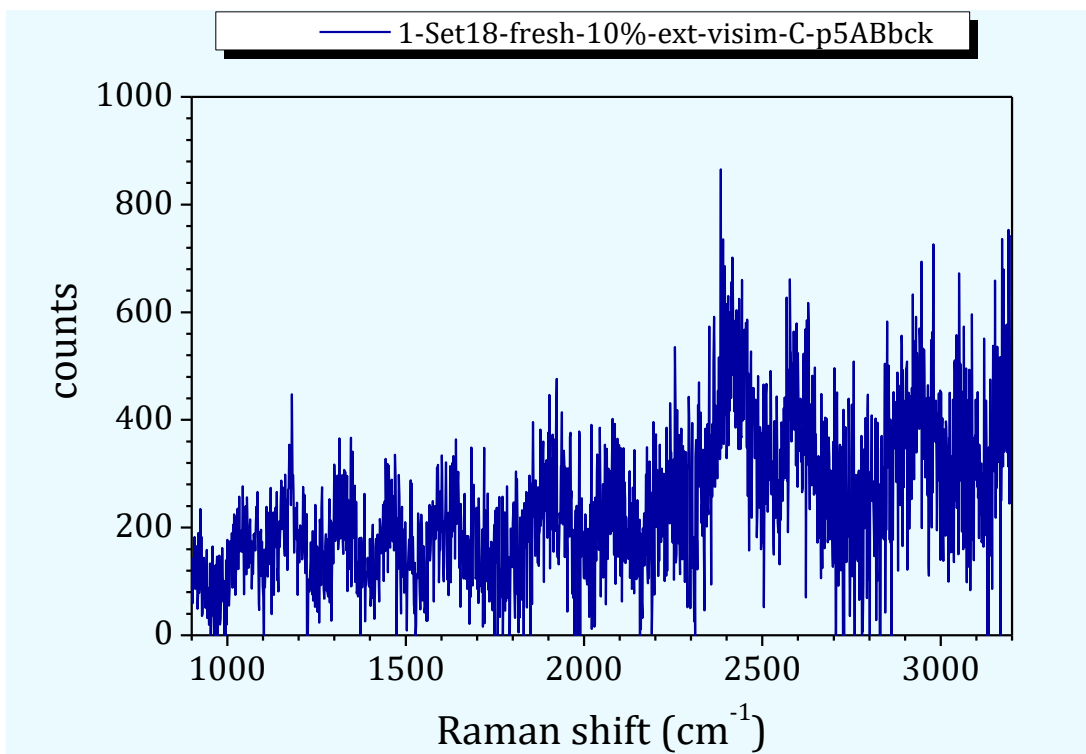
Εικόνα 109: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων κόκκινων σημείων υγιούς ιστού του σετ 18 im



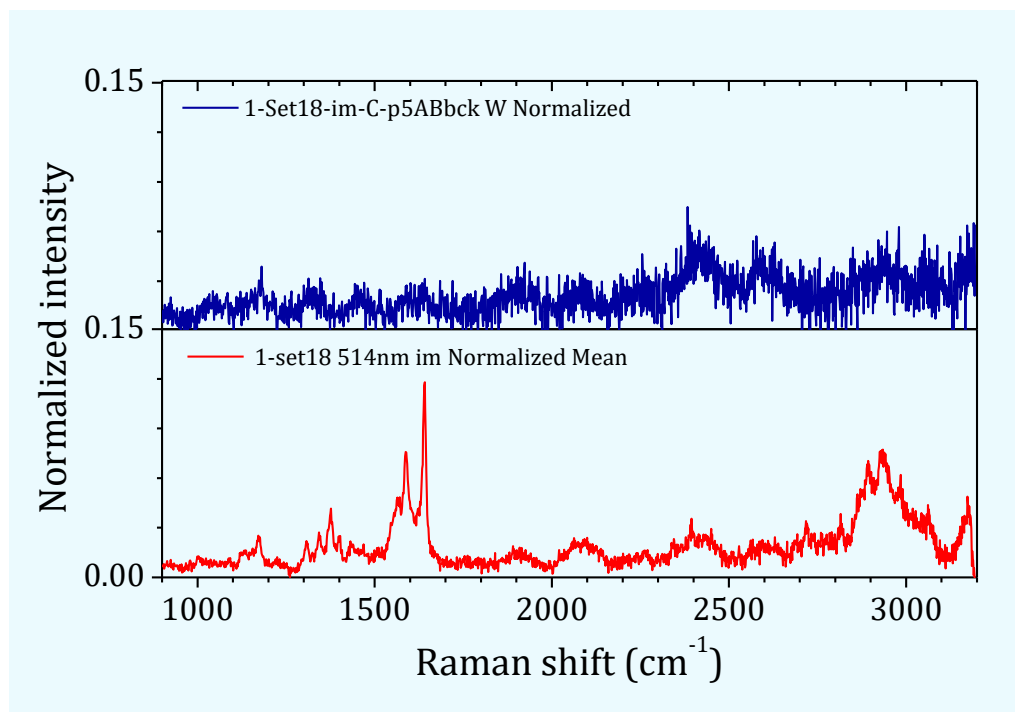
Εικόνα 110: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων των κόκκινων σημείων υγιούς ιστού του σετ 18 im



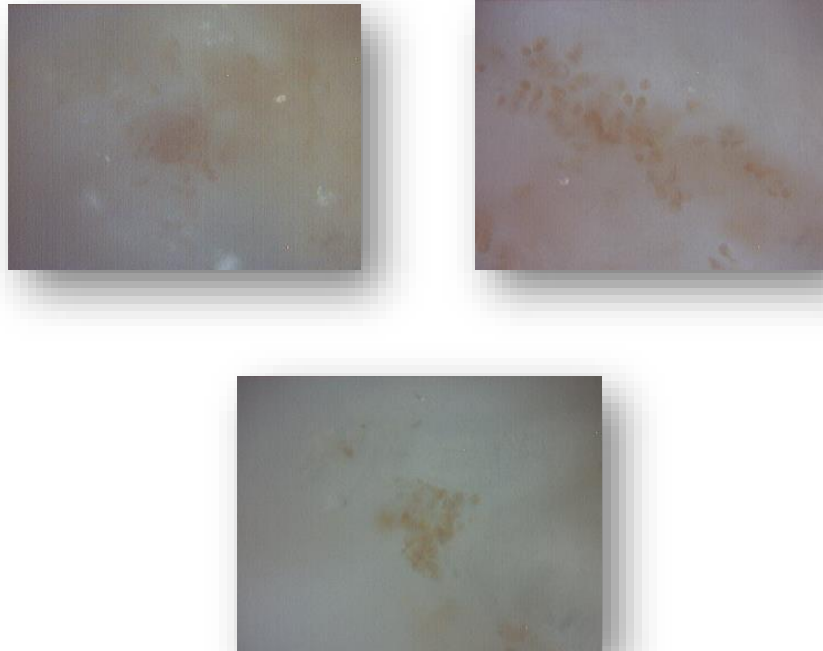
Εικόνα 111: Φωτογραφία από το μικροσκόπιο του λευκού σημείου υγιούς ιστού p5



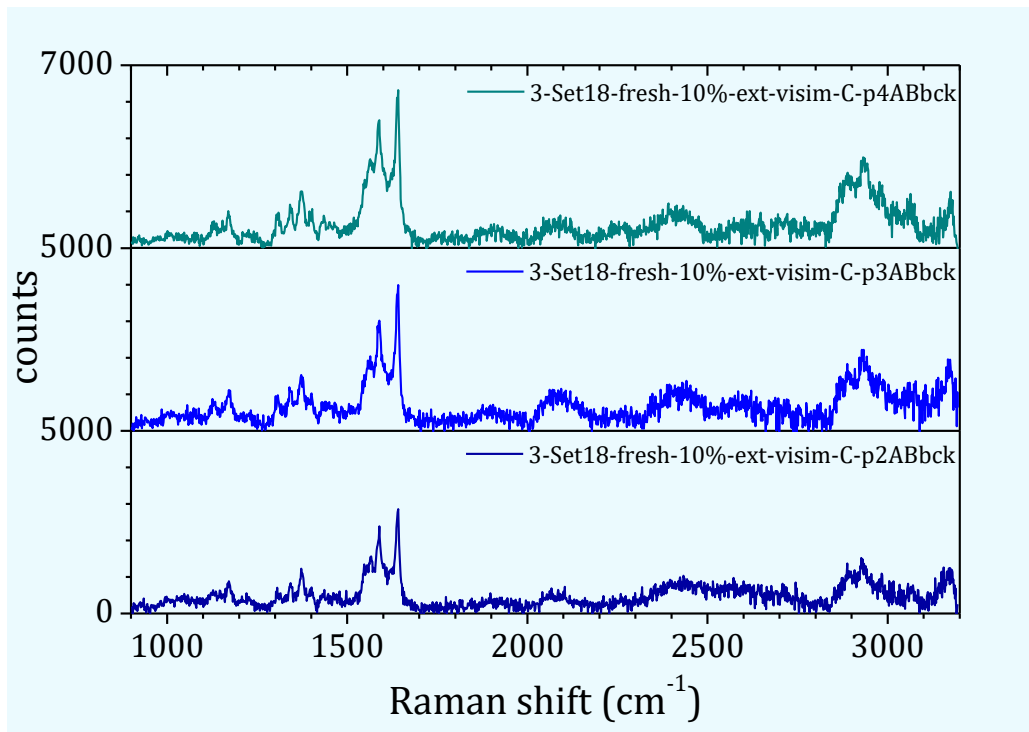
Εικόνα 112: Απεικόνιση χαρακτηριστικού φάσματος λευκού σημείου υγιούς ιστού του σετ 18 im



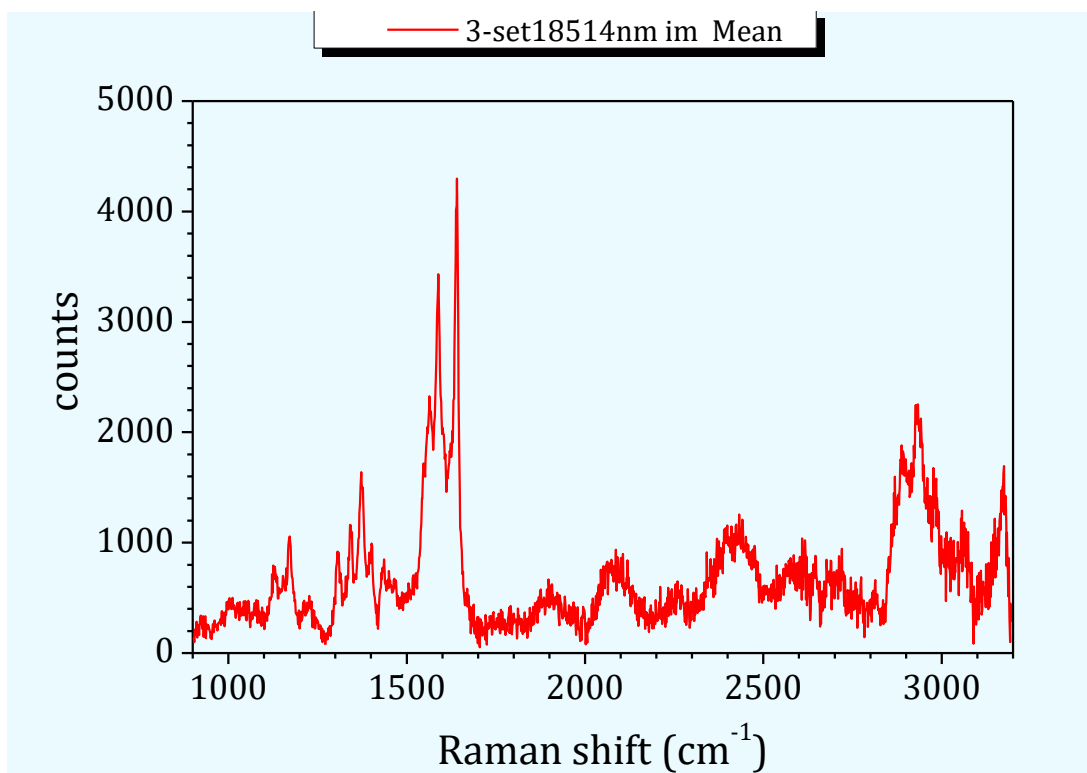
Εικόνα 113: Σύγκριση μέσης τιμής κανονικοποιημένων φασμάτων κόκκινων και λευκού σημείου υγιούς ιστού στο σετ 18 im



Εικόνα 114: Φωτογραφίες από το μικροσκόπιο των κόκκινων σημείων καρκινικού ιστού p2 p3 και p4 (από αριστερά)



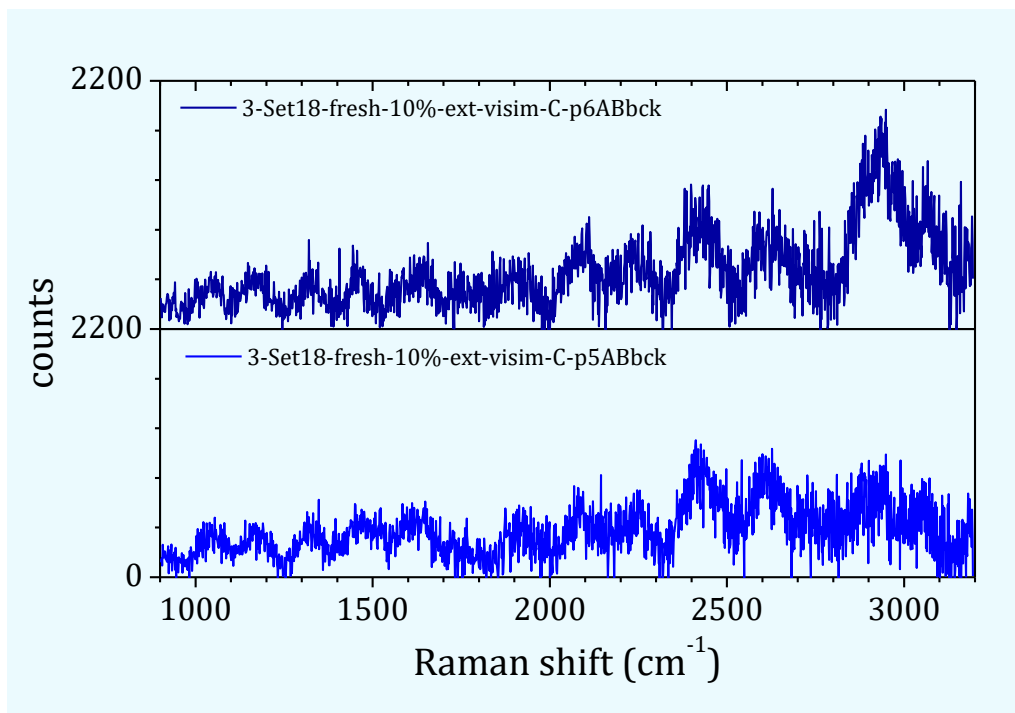
Εικόνα 115: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων κόκκινων σημείων καρκινικού ιστού του σετ18 im



Εικόνα 116: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων των κόκκινων σημείων καρκινικού ιστού του σετ18 im

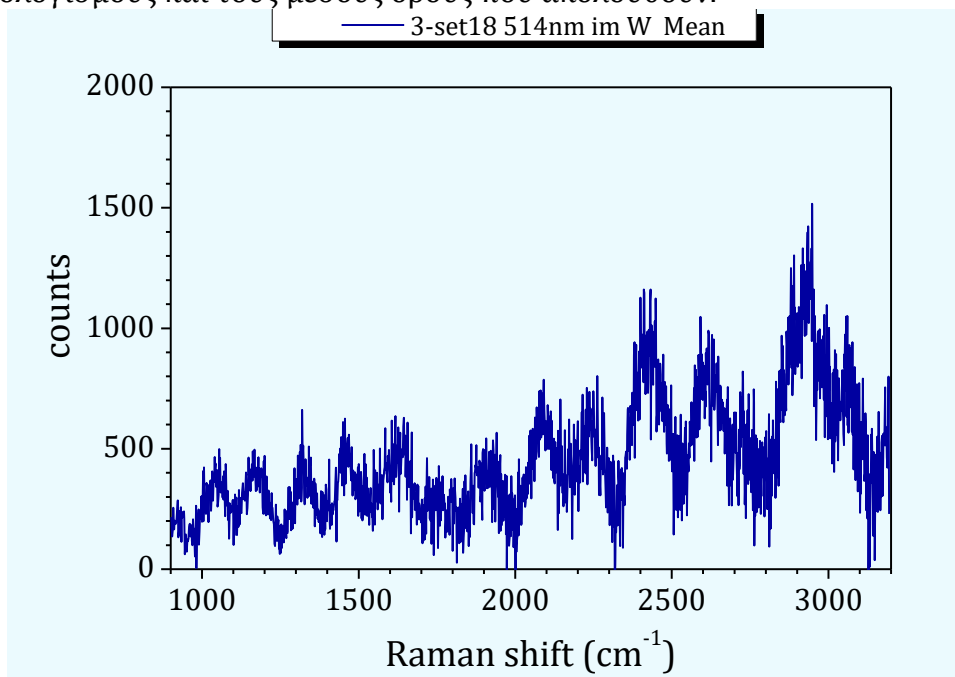


Εικόνα 117: Φωτογραφίες από το μικροσκόπιο των λευκών σημείων καρκινικού ιστού p5 και p6 (από αριστερά)

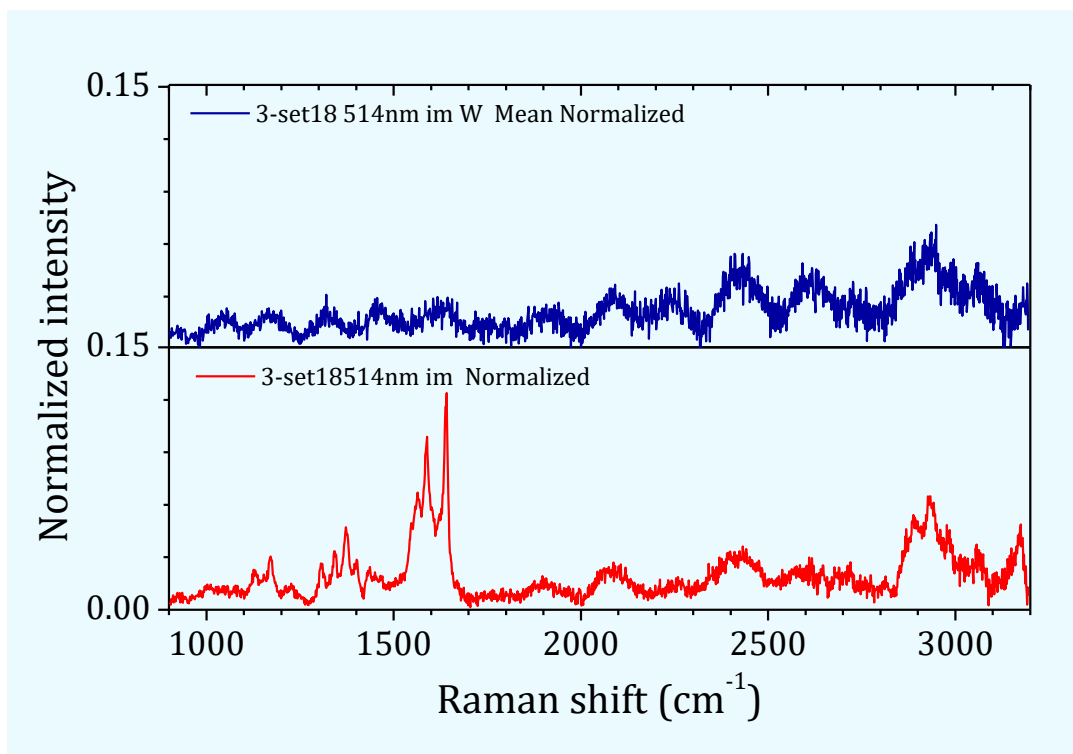


Εικόνα 118: Απεικόνιση χαρακτηριστικών φασμάτων λευκών σημείων καρκινικού ιστού του σετ 18 im

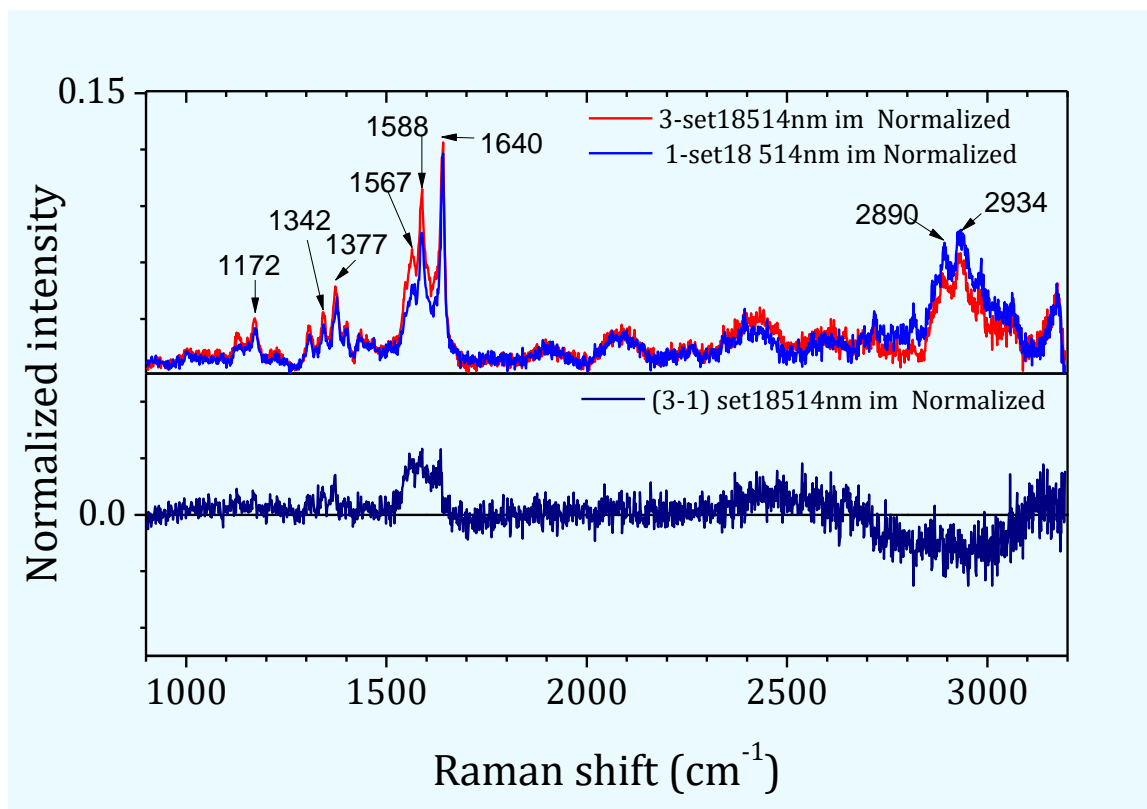
Στα λευκά σημεία και του υγιούς και του καρκινικού δεν εμφανίζονται κορυφές Raman παρά μόνοι πολύ έντονοι συμβολομετρικοί κροσσοί, οπότε δεν θα ληφθούν υπόψη στους υπολογισμούς και τους μέσους όρους που ακολουθούν.



Εικόνα 119: Απεικόνιση μέσης τιμής των φασμάτων των λευκών σημείων καρκινικού ιστού του σετ18 im



Εικόνα 120: Σύγκριση μέσης τιμής κανονικοποιημένων φασμάτων κόκκινων και λευκών σημείων καρκινικού ιστού στο σετ 18 im



Εικόνα 121: Απεικόνιση της μέσης κανονικοποιημένης τιμής και των 2 δειγμάτων και της διαφοράς καρκινικού-υγιούς μέσου κανονικοποιημένου φάσματος των κόκκινων σημείων του σετ 18 im

Σε αυτό το σετ παρατηρούμε μικρές διαφορές μεταξύ υγιούς και καρκινικού φάσματος. Στις υψηλές συχνότητες βλέπουμε και σε αυτό το σετ όπως και στο προηγούμενο που μετρήθηκε με τον καταδυτικό φακό, την κορυφή που εμφανίζεται στο όριο των μετρήσεων και οφείλεται στην σκέδαση Raman του νερού. Βλέπουμε επίσης και πάλι τη μεγάλη διαφορά στα φάσματα που προκύπτουν ανάλογα με το αν θα επιλεγεί λευκή ή κόκκινη περιοχή για τη μέτρηση. Στις λευκές περιοχές είτε πρόκειται για υγιή είτε για καρκινικό ιστό, το φάσμα παρουσιάζει μόνο τους κροσσούς συμβολής από το φίλτρο και μια υποψία κορυφών μόνο στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων, γι' αυτό δεν θα γίνει ανάλυσή τους.

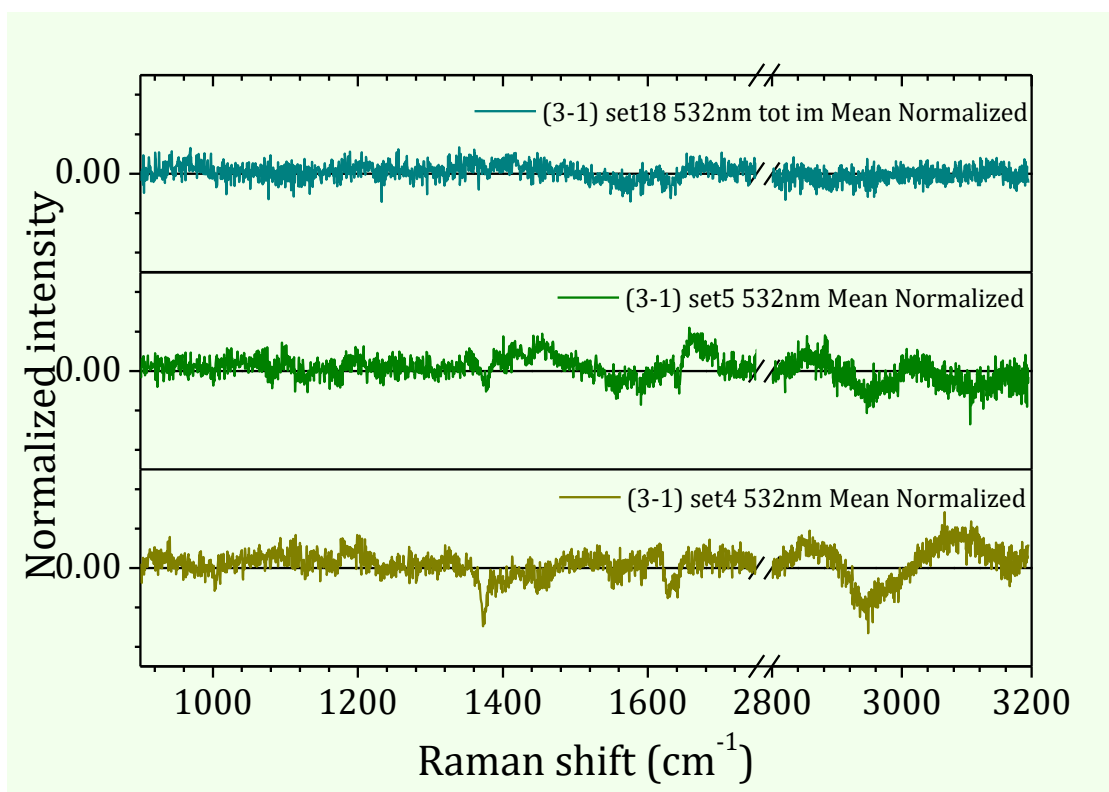
Η θέση των κύριων κορυφών των κόκκινων σημείων παρουσιάζεται στον πιο κάτω πίνακα:

Laser	Σετ	Δείγμα	Θέσεις κύριων κορυφών (cm ⁻¹)							
514.5nm	18	1	1172	1343	1377	1567	1588	1640	2893	2934
	im	3	1172	1342	1372	1564	1589	1641	2888	2933

Εφόσον τα φάσματα καρκινικού και υγιούς ιστού εδώ μοιάζουν πολύ μεταξύ τους, οι περιοχές που παρατηρούμε διαφορές είναι πολύ λίγες. Το υγιές φάσμα επικρατεί μόνο μεταξύ 2718-3056 cm⁻¹ ενώ το καρκινικό μεταξύ 1525-1655 cm⁻¹ και 2395-2586 cm⁻¹.

4.4 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα

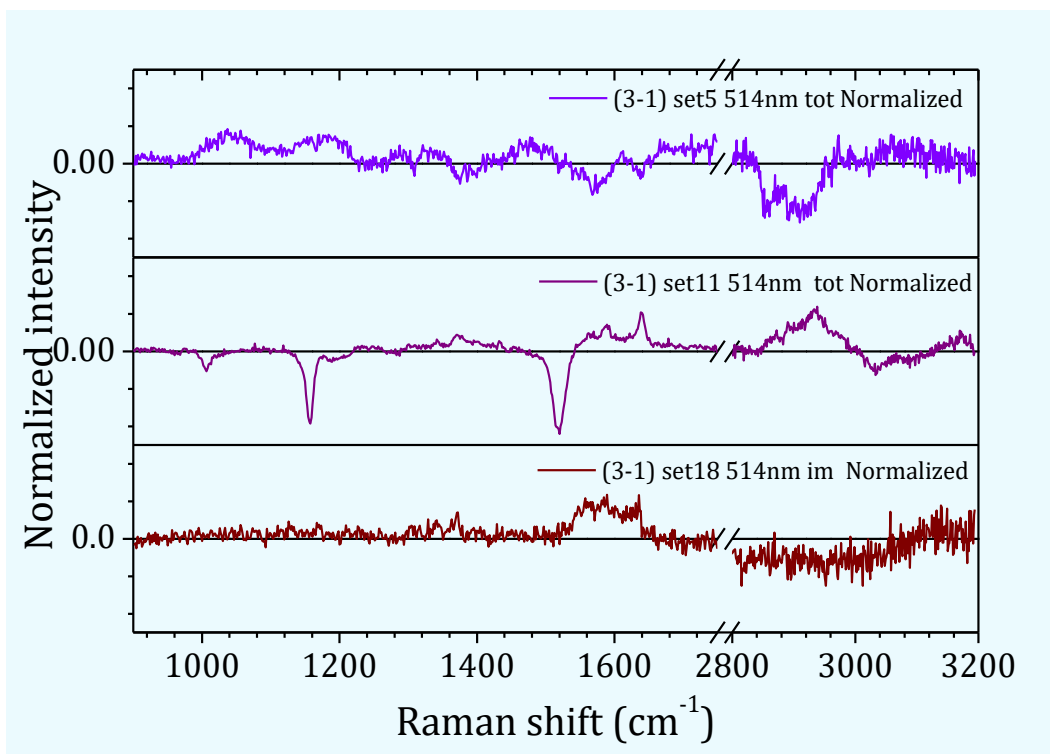
Σε αυτή την ενότητα αρχικά γίνεται η σύγκριση μεταξύ των διαφορών καρκινικού-υγιούς φάσματος για τα 3 σετ του κάθε laser διέγερσης και κατόπιν δίνονται οι μέσοι όροι όλων των σετ για κάθε laser διέγερσης. Τέλος, παρουσιάζονται οι κύριες κορυφές τους και γίνεται αναγνώριση των θέσεων τους με δεδομένα από τη βιβλιογραφία, έτσι ώστε να προκύψουν γενικότερα συμπεράσματα.



Εικόνα 122: Συγκεντρωτική απεικόνιση των διαφορών καρκινικού-υγιούς φάσματος κόκκινων σημείων για όλα τα σετ που μετρήθηκαν με το laser 532 nm

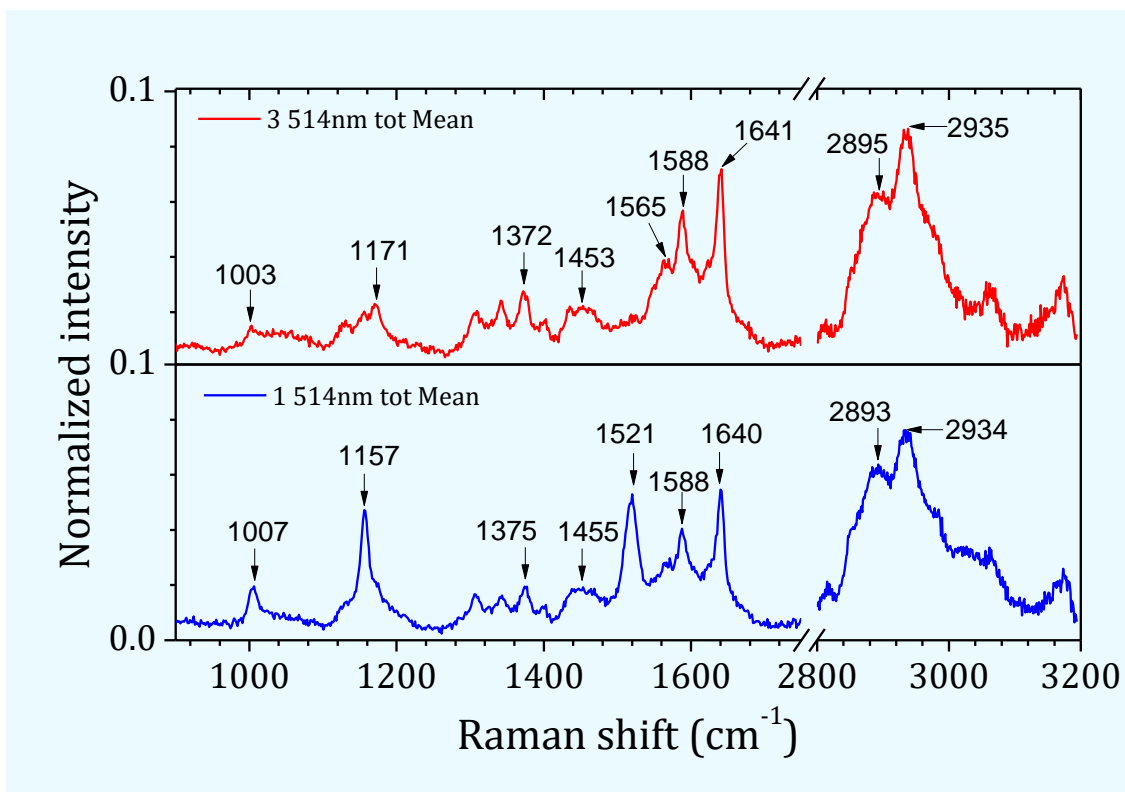
Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τα διαφορετικά σετ που μετρήθηκαν με laser διέγερσης 532nm, παρατηρούμε ότι τα σετ 4 και 5 που μετρήθηκαν με φακό 100x παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες μεταξύ τους ενώ το σετ 18 που μετρήθηκε με τον υδατοκαταδυτικό φακό δεν δείχνει ουσιώδεις διαφορές των φασμάτων.

Ο υδατοκαταδυτικός φακός παρότι κερδίζει σε σταθερότητα στην εστίαση του laser διέγερσης εδώ απέδωσε σχεδόν πανομοιότυπα φάσματα ασθενούς-καρκινικού ιστού με ελάχιστες διαφορές που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στη διάκρισή τους. Με τον 100x φακό όμως παρατηρούμε περιοχές στις οποίες υπερτερεί το ένα ή το άλλο φάσμα και μάλιστα στις περισσότερες περιπτώσεις στις ίδιες περιοχές. Πάντως αυτές οι διαφορές μεταξύ των φακών θεωρούνται τυχαίες διότι δεν αναμένεται να έχει τόσο μεγάλη επίδραση στο φάσμα η αλλαγή του φακού.



Εικόνα 123: Συγκεντρωτική απεικόνιση των διαφορών καρκινικού-υγιούς φάσματος για όλα τα σετ που μετρήθηκαν με το laser 514 nm

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τα διαφορετικά σετ που μετρήθηκαν με laser διέγερσης 514,5 nm, παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει επαναληψιμότητα στις φασματικές περιοχές που διαφοροποιούνται σε ένταση τα φάσματα υγιών και καρκινικών ιστών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικού τύπου σημεία (έντονα λευκά ή κόκκινα) τα οποία εμφανίζουν πολύ διαφορετικά φάσματα. Αυτό δεν σημαίνει απαραίτητα ότι τέτοιες διαφορές δεν υπάρχουν. Προτείνουμε να γίνουν περαιτέρω συστηματικές μετρήσεις με το laser που εκπέμπει στα 514,5 nm με προσοχή και πολύ καλό καθορισμό των σημείων διέγερσης ώστε να βγουν αξιολογήσιμα αποτελέσματα με καλή επαναληψιμότητα.



Εικόνα 124: Απεικόνιση της μέσης κανονικοποιημένης τιμής και των 2 δειγμάτων συνολικά για όλα τα σετ που μετρήθηκαν με το laser 514,5 nm.

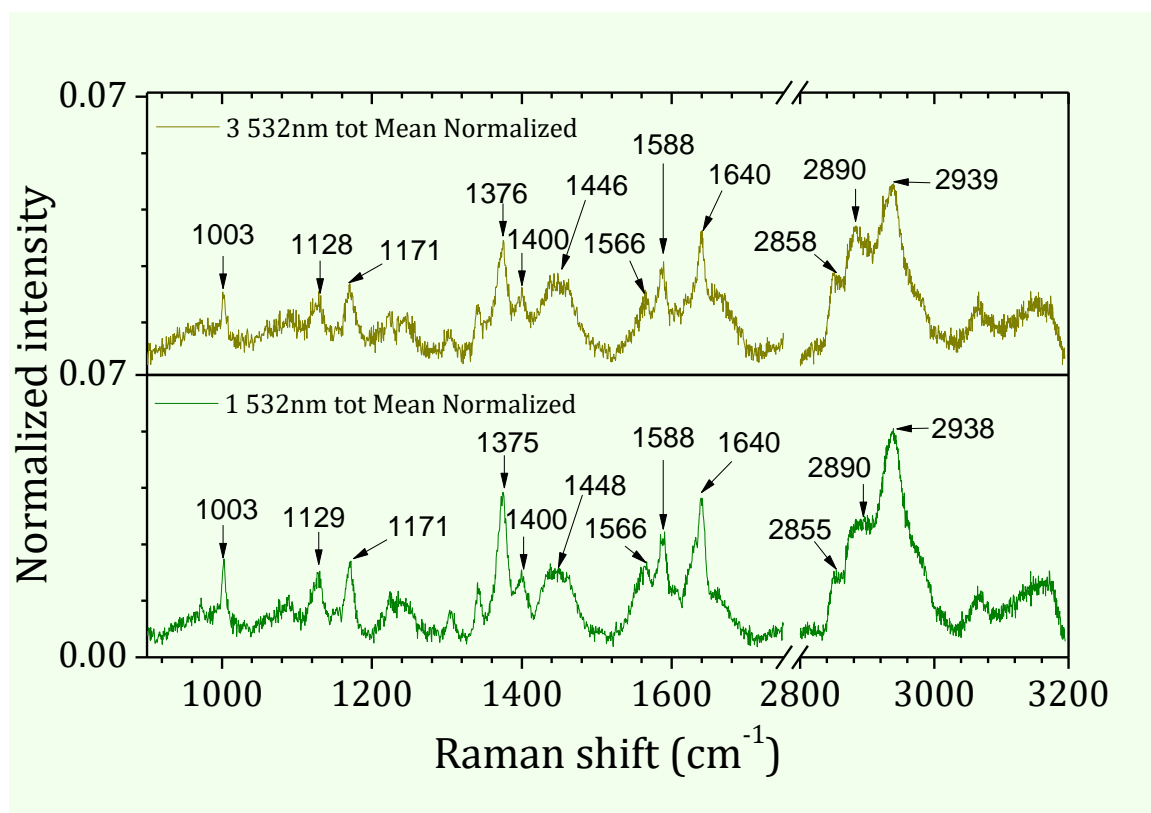
Η θέση των κύριων κορυφών στη μέση τιμή όλων των σετ που μετρήθηκαν με laser διέγερσης 514,5nm παρουσιάζεται στους παρακάτω πίνακες

Laser	tot	Δείγμα	Θέσεις κύριων κορυφών (cm ⁻¹)				
514.5nm		1	1007	1157	1375	1455	
		3	1003		1171	1372	1453

συνέχεια πίνακα

Laser	tot	Δείγμα	Θέσεις κύριων κορυφών (cm ⁻¹)				
514.5nm		1	1521	1588	1640	2893	2934
		3	1565	1588	1641	2895	2935

(Οι δύο επιπλέον έντονες κορυφές που παρατηρούνται στο μέσο όρο του υγιούς φάσματος στα σημεία 1157 και 1521 cm⁻¹ προέρχονται από τις μετρήσεις στα πολύ έντονα λευκά σημεία.)



Εικόνα 125: Απεικόνιση της μέσης κανονικοποιημένης τιμής και των 2 δειγμάτων συνολικά για τα κόκκινα σημεία όλων των σετ που μετρήθηκαν με το laser 532 nm

Η θέση των κύριων κορυφών στη μέση τιμή όλων των σετ που μετρήθηκαν με laser διέγερσης 532nm παρουσιάζεται στους πίνακες:

Laser	tot	Δείγμα	Θέσεις κύριων κορυφών (cm ⁻¹)					
532 nm		1	1003	1129	1171	1375	1400	1448
		3	1003	1128	1171	1376	1400	1446

συνέχεια πίνακα

Laser	tot	Δείγμα	Θέσεις κύριων κορυφών (cm ⁻¹)					
532 nm		1	1566	1588	1640	2855	2890	2938
		3	1566	1588	1640	2858	2890	2939

Δεν υπάρχουν πολλές μελέτες για διάκριση καρκινικών ιστών παχέος εντέρου με laser διέγερσης στα 532nm (δεν μπορέσαμε να βρούμε ούτε μία στα 514,5 nm) και διαπιστώθηκε ότι οι περισσότερες γίνονται χρησιμοποιώντας 785nm και πάνω έτσι ώστε να αποφεύγεται ο “βραχνάς” της φωταύγειας.

Στον πίνακα που ακολουθεί βλέπουμε συγκεντρωτικά τις κύριες κορυφές που εμφανίζονται στα σετ για κάθε διαφορετικό δείγμα και laser διέγερσης καθώς και τα συστατικά στοιχεία του ιστού στα οποία αποδίδονται σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.

Laser 532 nm		Laser 514.5 nm		Συστατικά στοιχεία
Δείγμα1	Δείγμα3	Δείγμα1	Δείγμα3	
1002	1004			φαινυλαλανίνη
		1007		καροτενοειδή
1127	1129			κορεσμένα λιπαρά οξέα
		1158	1158	καροτενοειδή
1170	1170	1172	1172	μονοφωσφορική γουανοσίνη, πυριμιδίνη
1223	1223			Αμίδη III, φωσφολιπίδια
1340	1340	1343	1342	αίμη
1375	1375	1377	1372	αίμη
1400	1400			αίμη
1440	1445			λιπαρά οξέα, λιπίδια
1450	1452			λιπαρά οξέα, λιπίδια
		1519	1519	καροτενοειδή
1565	1565	1567	1564	αίμη
1588	1588	1588	1588	οξυαιμοσφαιρίνη
1640	1640	1640	1640	αίμη
2852	2850	2853	2852	λιπαρά οξέα, λιπίδια (CH ₂ συμμετρική κάμψη)
2884	2882	2881	2888	λιπίδια, πρωτεΐνες (CH ₂ αντισυμμετρική κάμψη)
2940	2939	2938	2939	λιποπρωτεΐνες

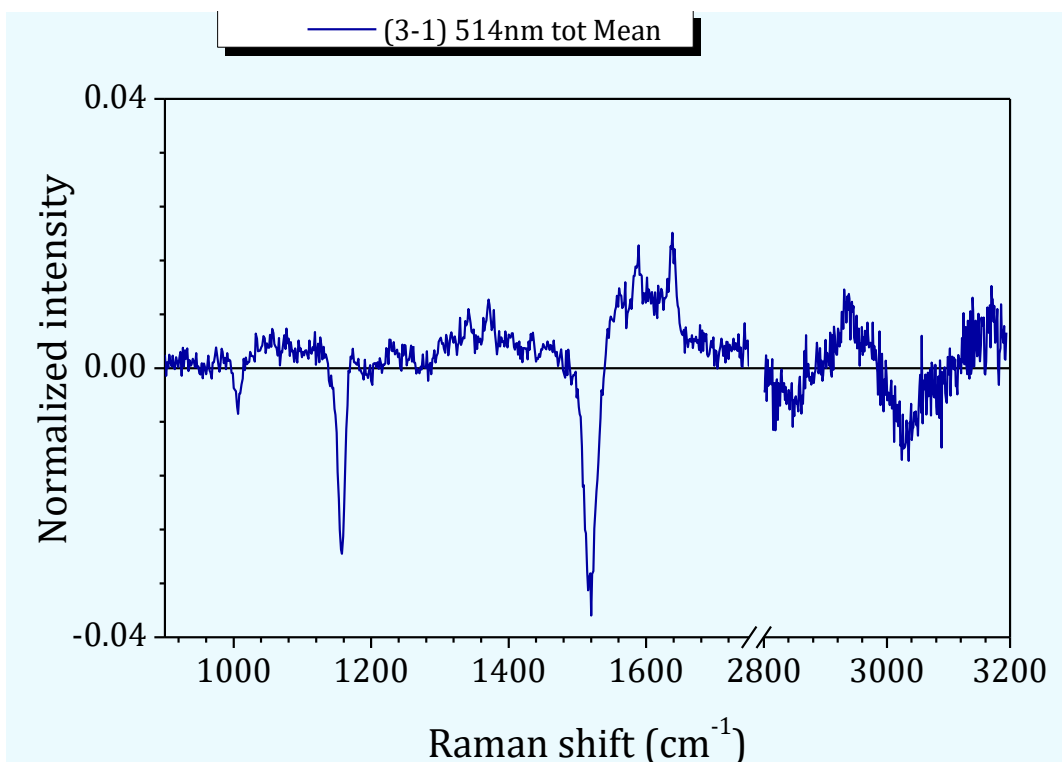
Από τη διαθέσιμη βιβλιογραφία βρίσκουμε την αντιστοιχία των πιο συνηθισμένων κορυφών με τα στοιχεία του ιστού (οι θέσεις είναι σε cm^{-1}):

1004 φαινυλαλανίνη, 1130 κορεσμένα λιπαρά οξέα, 1170 μονοφωσφορική γουανοσίνη, πυριμιδίνη, 1224 Αμίδη III, φωσφολιπίδια, 1375 οξυαιμοσφαιρίνη, 1450 λιπίδια, λιπαρά οξέα, πρωτεΐνες.

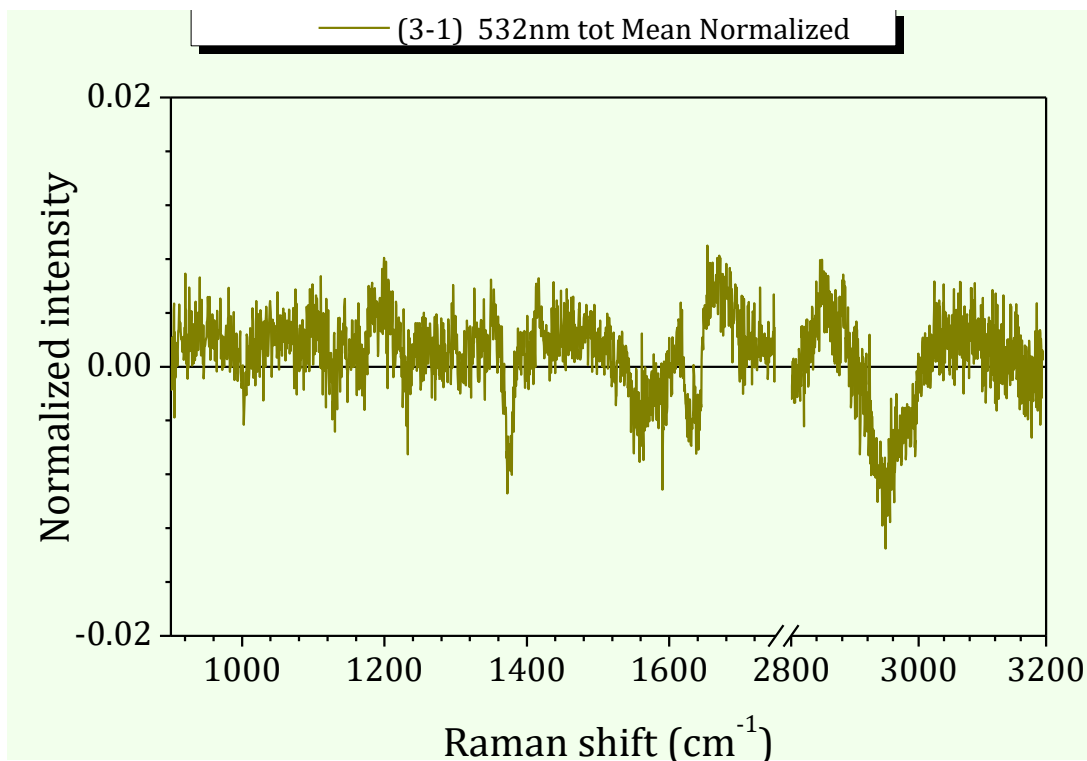
Οι θέσεις 1340, 1400, 1565, 1640 αποδίδονται στην αίμη, μια σιδηροπορφυρίνη που προκύπτει κυρίως από την μυοσφαιρίνη, σχηματίζει διάφορα σύμπλοκα ευαίσθητα στη οξείδωση και παρουσιάζει ενίσχυση συντονισμού Raman όταν διεγείρεται με laser 532nm και στους υγιείς και στους καρκινικούς ιστούς. Οι κορυφές που εμφανίζονται στα κόκκινα σημεία των δειγμάτων οφείλονται κυρίως στις ζώνες της αίμης. Οι θέσεις αυτών των ζωνών Raman της αίμης εξαρτώνται από την οξείδωση της αιμοσφαιρίνης και της μυοσφαιρίνης πχ. οι κορυφές στα 1641 και 1587 cm^{-1} δείχνουν οξυαιμοσφαιρίνη, ενώ στα 1607 και 1552 cm^{-1} δείχνουν μη οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη.

Οι ισχυρές διαφορετικές κορυφές που εμφανίστηκαν στο δείγμα στο οποίο οι μετρήσεις έγιναν σε έντονα λευκά σημεία οφείλονται σε καροτενοειδή στα οποία συμβαίνει ενίσχυση συντονισμού Raman όταν διεγείρονται με laser στο ορατό φάσμα.

Στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων τα δεδομένα της βιβλιογραφίας είναι ακόμη περισσότερο περιορισμένα. Αποδίδονται σε λιπίδια και λιπαρά οξέα (CH₂ συμμετρική κάμψη) στη συχνότητα 2850 cm^{-1} , λιπίδια και πρωτεΐνες (CH₂ αντισυμμετρική κάμψη) στη συχνότητα 2885 cm^{-1} και σε λιποπρωτεΐνες στα 2940 cm^{-1} [28] [57] [58] [59] [60] [61].



Εικόνα 126: Απεικόνιση της διαφοράς καρκινικού-υγιούς μέσω κανονικοποιημένου φάσματος συνολικά για όλα τα σετ που μετρήθηκαν με το laser 514,5 nm.



Εικόνα 127: Απεικόνιση της διαφοράς καρκινικού-υγιούς μέσω κανονικοποιημένου φάσματος συνολικά για όλα τα σετ που μετρήθηκαν με το laser 532 nm.

Παρατηρώντας στην εικόνα 126 την παρουσίαση της συνολικής διαφοράς καρκινικών-υγιών φασμάτων για το laser 514,5 nm, βλέπουμε ότι στις θέσεις της φαινυλαλανίνης (1004 cm^{-1}) και των καρτενοειδών ($1007, 1158, 1515, 1519\text{ cm}^{-1}$) υπερισχύει το υγιές φάσμα, ενώ στις ζώνες της αίμης ($1342, 1375, 1587, 1640\text{ cm}^{-1}$) και των λιπαρών οξέων-λιπιδίων (1455 cm^{-1}) το καρκινικό εμφανίζει τη μεγαλύτερη ένταση. Στις θέσεις 1172 cm^{-1} (αίμη) και 1444 cm^{-1} (λιπίδια), δεν υπάρχει σαφής διαφορά. Επίσης παρατηρούμε ότι οι διαφορετικές έντονες κορυφές που εμφανίστηκαν στο φάσμα του υγιούς ιστού στα σετ 11 στα πολύ έντονα λευκά σημεία οφείλονται σε καρτενοειδή.

Παρατηρώντας στην εικόνα 127 την παρουσίαση της συνολικής διαφοράς καρκινικών-υγιών φασμάτων για το laser 532 nm, βλέπουμε ότι στην πλειοψηφία των συνήθων κορυφών δηλαδή στις θέσεις $1003, 1130, 1170, 1375, 1563, 1640, 1587$ και 2940 cm^{-1} , έχουμε επικράτηση του υγιούς φάσματος, το καρκινικό επικρατεί στις θέσεις $1340, 2850$ και 2885 cm^{-1} ενώ στη συχνότητα 1224 cm^{-1} δεν υπάρχει ουσιαστική διαφορά.

Για τις παρατηρήσεις μας σε συχνότητες $1003, 1130, 1170, 1587, 2940\text{ cm}^{-1}$ και το 1340 cm^{-1} στα φάσματα που ελήφθησαν με διέγερση στα 532 nm μπορούμε να βρούμε παρόμοια αποτελέσματα στη βιβλιογραφία, όμως στις υπόλοιπες συχνότητες έχουμε σημαντικές διαφοροποιήσεις σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία. Εδώ βέβαια ίσως αξίζει να αναφέρουμε ότι κάποιες φορές στις δημοσιεύσεις που χρησιμοποιήσαμε για τη σύγκριση, υπήρχαν αντικρουόμενα αποτελέσματα και μάλιστα ακόμη και σε διαφορετικές μελέτες του ίδιου ερευνητή. Γενικά τα αποτελέσματα επηρεάζονται και από τον τρόπο επεξεργασίας και συντήρησης του ιστού. Στη βιβλιογραφία εμφανίζονται διαφορές ανάλογα με το αν ο ιστός είναι νωπός σε διαφορετικά συντηρητικά μέσα (πχ. η φορμόλη επηρεάζει το φάσμα), αν έχει προηγηθεί στερέωση του ιστού με παραφίνη ή αν αντί για ιστό μελετώνται κύτταρα καλλιεργημένα στο εργαστήριο.

Διαπιστώθηκε ότι οι μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις στις μετρήσεις μας αφορούν περισσότερο το είδος του σημείου και όχι το αν είναι υγιές ή καρκινικός ο ιστός. Τα υπόλευκα σημεία δεν δίνουν ιδιαίτερες κορυφές, τα λαμπερά λευκά δίνουν έντονες κορυφές καρτενοειδών και τα κοκκινωπά έντονα στοιχεία αίμης. Επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία ότι στα φάσματα Raman που προκύπτουν από ορατό laser διέγερσης (532 nm) επικρατούν οι ζώνες από τα χρωμοφόρα στοιχεία του ιστού (καρτενοειδή και αίμη) λόγω της ενίσχυσης συντονισμού Raman που εμφανίζουν αυτά. [28]

Ο περιορισμένος αριθμός μετρήσεων που πραγματοποιήσαμε δεν βοηθάει στο να καταλήξουμε σε σαφή τρόπο διαχωρισμού καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου. Το παχύ έντερο αν το εξετάσουμε ανατομικά, δηλαδή ως όργανο του ανθρώπινου οργανισμού, παρουσιάζει μεγάλη ανομοιογένεια και ποικιλομορφία διότι είναι ετερογενές και πολυστρωματικό (επιθήλιο, βλεννογόνο, υποβλεννογόνο και περιφερειακό λίπος) με διαφορετική σύσταση σε κάθε επίπεδο. Ως εκ τούτου για την ακριβή διάκριση καρκινικών περιοχών είναι απαραίτητο να συλλεχθεί πληθώρα φασμάτων από όλα τα συστατικά του.

Όπως ήδη αναφέραμε οι περισσότερες ως τώρα έρευνες γίνονται χρησιμοποιώντας lasers που εκπέμπουν σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (πάνω από 785 nm). Η παρούσα εργασία δείχνει ότι υπάρχει δυνατότητα να αξιοποιηθούν και τα laser διέγερσης ορατής ακτινοβολίας ($514,5$ και 532 nm) για την επιτυχή διάκριση καρκινικών κυττάρων στο παχύ έντερο. Θα ήταν πολύ χρήσιμο να ευοδωθούν οι προσπάθειες για αξιοποιήσιμες μετρήσεις με τα laser στο ορατό φάσμα μεταξύ άλλων επειδή ένα ενδοσκόπιο που θα είχε ορατό πράσινο σποτ θα ήταν πολύ πιο εύχρηστο σε έναν ιατρό-διαγνώστη ή ένα χειρουργό για να μπορεί να εντοπίζει και οπτικά την περιοχή που ελέγχει.

4.5 Συμπεράσματα

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί τη δεύτερη πιο θανατηφόρα μορφή καρκίνου συνεπώς είναι απαραίτητο να προκύψουν νέες επιστημονικές μέθοδοι για την αποτελεσματική διάγνωση και θεραπεία του. Μία από αυτές είναι η φασματοσκοπία Raman η οποία μπορεί να αποτελέσει σημαντική συνεισφορά προς αυτή την κατεύθυνση. Το ερευνητικό πρόγραμμα ΒΙΟΦΑΣΜΑ, μέρος του οποίου είναι και η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, στοχεύει στη δημιουργία ενός ενδοσκοπίου το οποίο θα μπορεί να κάνει *in vivo* διάκριση των καρκινικών περιοχών του παχέος εντέρου εντός του χειρουργείου. Στο πλαίσιο της εργασίας πραγματοποιήθηκαν συνολικά 160 μετρήσεις με τη βοήθεια 2 διαφορετικών φασματόμετρων Raman, ένα στο ΕΜΠ με laser διέγερσης στα 532nm και ένα στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» με laser διέγερσης στα 514,5nm. Μετρήθηκαν συνολικά 160 φάσματα σε 88 σημεία σε υγιείς ιστούς και 72 σε καρκινικούς και παρουσιάστηκαν τα 56 φάσματα που εμφάνισαν τις μεγαλύτερες εντάσεις (28 υγιή και 28 καρκινικά). Έγινε ανάλυση των κύριων κορυφών στις φασματικές περιοχές 900-1750 cm^{-1} και 2800-3200 cm^{-1} και παρουσιάστηκαν οι διαφορές που εμφανίζουν τα φάσματα καρκινικών και υγιών ιστών. Κατασκευάστηκε και δοκιμάστηκε ειδική συσκευή για την θερμοστατούμενη μέτρηση των ιστών σε θερμοκρασία περίπου 2 °C η οποία είναι απαραίτητη για την αποφυγή της αφυδάτωσης των ιστών και τη σταθεροποίηση της μικρομετρικής εστίασης του laser στο δείγμα. Από ένα τόσο μικρό δείγμα μετρήσεων δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για ουσιώδεις διαφορές στα φάσματα μεταξύ υγιών και καρκινικών ιστών. Η σαφής τελική διάκριση καρκινικών ιστών του παχέος εντέρου προϋποθέτει τη δημιουργία ευρύτατης βάσης δεδομένων με μετρήσεις φασμάτων από όλα τα ετερογενή στοιχεία του ιστού, οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν για την εκπαίδευση αλγορίθμων μηχανικής μάθησης, γεγονός που ξεπερνά τις προθέσεις και τις δυνατότητες της συγκεκριμένης εργασίας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας (⇐)
<https://eody.gov.gr/disease/karkinos/>
- [2] Ογκολογικό Κέντρο Τράπεζας Κύπρου (⇐)
<https://www.bococ.org.cy/el/mathe-gia-ton-karkino>
- [3] American Cancer Society (⇐)
<https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer/what-is-cancer.html>
- [4] Aenorasis – Institution in Healthcare (⇐)
<https://www.aenorasis.com/tomeis-drastiriotitas/ogkologia/>
- [5] National Cancer Institute (⇐)
<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/search/cancer/?searchMode=Begins>
- [6] Eurostat (⇐)
<https://ec.europa.eu/eurostat/en/web/products-euro-indicators/-/3-25112014-bp>
- [7] Eurostat (⇐)
<https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/tps00116/default/bar?lang=en>
- [8] Eurostat (⇐)
https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Archive:%CE%A3%CF%84%CE%B1%CF%84%CE%B9%CF%83%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%AD%CF%82_%CE%B1%CE%B9%CF%84%CE%B9%CF%8E%CE%BD_%CE%B8%CE%B1%CE%BD%CE%AC%CF%84%CE%BF%CF%85#CE.91.CE.B9.CF.84.CE.AF.CE.B5.CF.82_.CE.B8.CE.B1.CE.BD.CE.AC.CF.84.CE.BF.CF.85_.CF.83.CF.84.CE.B1_.CE.BA.CF.81.CE.AC.CF.84.CE.B7_.CE.BC.CE.AD.CE.BB.CE.B7_.CF.84.CE.B7.CF.82_.CE.95.CE.95-27_.CF.84.CE.BF_2017
- [9] American Cancer Society (⇐)
<https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21660>
- [10] American Cancer Society (⇐)
<https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21492>
- [11] American Cancer Society (⇐)
<https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21609>
- [12] National Cancer Institute (⇐)
<https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>

- [13] Healthy Living (⇌)
<https://www.healthyliving.gr/2013/09/11/karkinos-aities/>
- [14] Iatropedia (⇌)
<https://www.iatropedia.gr/ygeia/karkinos-tou-mastou-ke-klironomikotita-pagkosmia-imeras-kata-tis-nosou/32371/>
- [15] Santarelli, R. L., Pierre, F., & Corpet, D. E. (2008). Processed meat and colorectal cancer: A review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutrition and Cancer*, 60(2), 131-144. doi:10.1080/01635580701684872 (⇌)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2661797/>
- [16] World Health Organization (⇌)
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- [17] Αποστολοπούλου Ελεάννα – Πτυχιακή εργασία «Καρκίνος παχέος εντέρου και ο ρόλος του νοσηλευτή κατά τη διάρκεια νοσηλείας του ασθενούς» Πάτρα 2020, Τμήμα Νοσηλευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών (⇌)
<http://repository.library.teiwest.gr/xmlui/handle/123456789/8628>
- [18] Healthy Living (⇌)
<https://www.healthyliving.gr/2014/04/11/ti-einai-o-karkinos-diagnosh/>
- [19] Ιatronet (⇌)
<https://www.iatronet.gr/iatriko-lexiko/karkinos.html>
- [20] Ράπτης Ι. Συμπληρωματικές σημειώσεις για το εργαστήριο «Φασματοσκοπία Raman» του μαθήματος «Μέθοδοι χαρακτηρισμού των υλικών». Αθήνα 2016, ΕΜΠ (⇌)
- [21] Κάντα Δήμητρα – Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία «Μελέτη Μαστικού Ιστού με Φασματοσκοπία Ράμαν για τη Διάγνωση Καρκίνου του Μαστού» Αθήνα 2017, ΕΜΠ (⇌)
<https://dspace.lib.ntua.gr/xmlui/handle/123456789/45425>
- [22] J. R. Ferraro, K. Nakamoto, “Introductory Raman Spectroscopy”, Academic Press, CA 1994, σελ. 21 (⇌)
<https://www.elsevier.com/books/introductory-raman-spectroscopy/ferraro/978-0-12-254105-6>
- [23] Καρναχωρίτη Μαρία – Διπλωματική Μεταπτυχιακή Εργασία «Μελέτη Περοβσκιτών Cs₂SnX₆ (X=I, Br, Cl) σε Υψηλές Υδροστατικές Πιέσεις με Φασματοσκοπία Raman» Αθήνα 2018, ΕΜΠ (⇌)
<https://dspace.lib.ntua.gr/xmlui/handle/123456789/46797>

- [24] Ράπτης Ι. “Raman Spectroscopy: Principles, Techniques and Applications”
Παρουσίαση του μαθήματος «Φυσική ημιαγωγικών υλικών και διατάξεων» Αθήνα
2019, ΕΜΠ (⇐)
- [25] Kong, K., Rowlands, C. J., Varma, S., Perkins, W., Leach, I. H., Koloydenko, A. A., . . .
Notingher, I. (2013). Diagnosis of tumors during tissue-conserving surgery with
integrated autofluorescence and raman scattering microscopy. *Proceedings of the
National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(38), 15189-15194.
doi:10.1073/pnas.1311289110 (⇐)
<https://www.pnas.org/content/110/38/15189>
- [26] Teledyne Princeton Instruments (⇐)
[https://www.princetoninstruments.com/learn/raman/using-raman-spectroscopy-
to-detect-malignant-changes-in-tissues](https://www.princetoninstruments.com/learn/raman/using-raman-spectroscopy-to-detect-malignant-changes-in-tissues)
- [27] Pence, I., & Mahadevan-Jansen, A. (2016). Clinical instrumentation and applications
of raman spectroscopy. *Chemical Society Reviews*, 45(7), 1958-1979.
doi:10.1039/c5cs00581g (⇐)
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/CS/C5CS00581G>
- [28] Synytsya, A., Judexova, M., Hoskovek, D., Miskovikova, M., Petruzalka, L. (2014)
*Raman spectroscopy at different excitation wavelengths (1064, 785 and 532 nm) as a
tool for diagnosis of colon cancer*. *Journal of Raman Spectroscopy*, Wiley Online
Library (⇐)
[https://www.researchgate.net/publication/266025587_Raman_spectroscopy_at_dif-
ferent_excitation_wavelengths_1064_785_and_532_nm_as_a_tool_for_diagnosis_of_c-
olon_cancer](https://www.researchgate.net/publication/266025587_Raman_spectroscopy_at_dif-
ferent_excitation_wavelengths_1064_785_and_532_nm_as_a_tool_for_diagnosis_of_c-
olon_cancer)
- [29] ΕΥΔΕ – ΕΤΑΚ – Υπουργείο Ανάπτυξης και Επενδύσεων (⇐)
[http://www.eyde-
etak.gr/central.aspx?sid=106I495I1274I646I439523&olID=834&neID=841&neTa=
20254_2&ncID=0&neHC=0&tbid=0&lrID=2&oldUIID=aI834I0I106I495I1274I0I2&a-
ctionID=load](http://www.eyde-
etak.gr/central.aspx?sid=106I495I1274I646I439523&olID=834&neID=841&neTa=
20254_2&ncID=0&neHC=0&tbid=0&lrID=2&oldUIID=aI834I0I106I495I1274I0I2&a-
ctionID=load)
- [30] ΓΓΕΚ - Υπουργείο Ανάπτυξης και Επενδύσεων (⇐)
[http://www.gsrt.gr/central.aspx?sid=108I334I1106I646I444510&olID=671&neID=
=673&neTa=12_30605_1&ncID=0&neHC=0&tbid=0&lrID=2&oldUIID=aI671I0I106I
437I1172I0I2&actionID=load](http://www.gsrt.gr/central.aspx?sid=108I334I1106I646I444510&olID=671&neID=
=673&neTa=12_30605_1&ncID=0&neHC=0&tbid=0&lrID=2&oldUIID=aI671I0I106I
437I1172I0I2&actionID=load)
- [31] ΕΣΠΑ (2014-2020) – Ερευνών–Δημιουργώ–Καινοτομώ Β’ Κύκλος (⇐)
<https://www.espa.gr/el/Pages/Proclamationsfs.aspx?item=4315>
- [32] Optical-Spectroscopy Group, Department of Physics, SAMPS, NTUA (⇐)
<http://www.physics.ntua.gr/~yraptis/spectroscopy-group.html>
- [33] Laboratory for micro-Raman scattering spectroscopy (⇐)
http://www.solid.ipb.ac.rs/facilities/lab_uraman/index.htm

- [34] Coherent (⇐)
<https://www.coherent.com/lasers/cw-solid-state/verdi>
- [35] Renishaw (⇐)
<https://www.renishaw.com/en/invia-inspect-confocal-raman-microscope--45378>
- [36] Lykidis D., Van Noorden S., Armstrong A., Spencer-Dene B., Li J., Zhuang Z. & Stamp G. W. H. 2007, "Novel zinc-based fixative for high quality DNA, RNA and protein analysis", *Nucleic Acids Research*, Vol 35, No 12 e85. (⇐)
<https://academic.oup.com/nar/article/35/12/e85/1145660?login=false>
- [37] Linkam (⇐)
<https://www.linkam.co.uk/thms600>
- [38] Wikipedia (⇐)
https://en.wikipedia.org/wiki/Jean_Charles_Athanase_Peltier
- [39] Πρωτοψάλτης Κωνσταντίνος – Διπλωματική Εργασία «Προσομοίωση και βελτίωση απόδοσης θερμοηλεκτρικής διάταξης TEG με χρήση της μεθόδου των πεπερασμένων στοιχείων» Κοζάνη 2014, Τμήμα Μηχανολόγων Μηχανικών, ΠΔΜ (⇐)
<https://dspace.uowm.gr/xmlui/handle/123456789/72>
- [40] Μασούρας Α. – Σίσκος Ε. - Πτυχιακή εργασία «Φορτιστής σε συγκομιδή ενέργειας από ρεσώ» Θεσσαλονίκη 2015, Τμήμα Αυτοματισμού, ΑΤΕΙΘ (⇐)
<http://www.microengineering.teithe.gr/techprojects/>
- [41] Μαραντίδης Χαράλαμπος – Διπλωματική εργασία «Πειραματική διάταξη εκμετάλλευσης θερμικών απωλειών συστήματος ψύξης μηχανής εσωτερικής καύσης με χρήση θερμοηλεκτρικών μονάδων» Χανιά 2016, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης (⇐)
<https://dias.library.tuc.gr/view/66574>
- [42] Powder TechLab – University of Cyprus (⇐)
<http://www.eng.ucy.ac.cy/kyratsi/thermoelectrics/diataxeis.html>
- [43] Χριστοφόρου Ε. «Ηλεκτρονικά Υλικά» Αθήνα 2015, ΕΜΠ (⇐)
<https://repository.kallipos.gr/handle/11419/5792>
- [44] DroneBot Workshop - YouTube (⇐)
<https://www.youtube.com/watch?v=4X123rMAJuM>
- [45] Cableworks (⇐)
<https://www.cableworks.gr/ilektronika/arduino-and-microcontrollers/modules/peltier/tec1-12709-100w-peltier-thermoelectric-cooler-module-40mm/>

- [46] Cableworks (⇌)
<https://www.cableworks.gr/systimata-asfaleias/kleisto-kykloma-cctv/trofodotika-kameron/12v-10a-120w-cp1207-10a/>
- [47] Cableworks (⇌)
<https://www.cableworks.gr/ilektronika/arduino-and-microcontrollers/relays/relays-with-sensors/12v-digital-led-thermostat-thermometer-temperature-relay-control-module-ntc-sensor-w1209wk/>
- [48] Cableworks (⇌)
<https://www.cableworks.gr/ilektronika/arduino-and-microcontrollers/prototyping/connectors/power-socket-inlet-with-fuse-holder-and-switch-ice320-c14/>
- [49] Market24 (⇌)
<https://market24.gr/arctic-alpine-12-lp-cpu-air-cooler-low-profile>
- [50] Acdcshop (⇌)
<https://www.acdcshop.gr/enclosurewithpanelventedx218mmy237mmz92mmblack-p-39431.html>
- [51] Click4shop (⇌)
https://www.click4shop.gr/product/led-dimmer-%ce%b5%ce%be%cf%89%cf%84%ce%b5%cf%81%ce%b9%ce%ba%cf%8c-%ce%bc%ce%b5-%cf%80%ce%bf%cf%84%ce%b5%ce%bd%cf%83%ce%b9%cf%8c%ce%bc%ce%b5%cf%84%cf%81%ce%bf-12v-360w-24v-720w-globostar-50041/?skr_prm=WyI5ZTc2N2JkNS1kM2M2LTQ1MWItYTI2MS0wM2JlZWYxYTVlZTQiLDE2NDQzNDY4MTU0NDkseyJhcHBfdHlwZSI6IndlYilsImNwIjoiZilsInRhZ3MiOififV0
- [52] Huang, Z., Zheng, W., Xie, S., Chen, R., Zeng, H., McLean, D. I., & Lui, H. (2004). Laser-induced autofluorescence microscopy of normal and tumor human colonic tissue. *International Journal of Oncology*, 24(1), 59-63. doi:10.3892/ijo.24.1.59 (⇌)
<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.24.1.59>
- [53] Stelzle, F., Knipfer, C., Adler, W., Rohde, M., Oetter, N., Nkenke, E., . . . Tangermann-Gerk, K. (2013). Tissue discrimination by uncorrected autofluorescence spectra: A proof-of-principle study for tissue-specific laser surgery. *Sensors (Switzerland)*, 13(10), 13717-13731. doi:10.3390/s131013717 (⇌)
https://www.researchgate.net/publication/258038776_Tissue_Discrimination_by_Uncorrected_Autofluorescence_Spectra_A_Proof-of-Principle_Study_for_Tissue-Specific_Laser_Surgery

- [54] Butler, H. J., Ashton, L., Bird, B., Cinque, G., Curtis, K., Dorney, J., . . . Martin, F. L. (2016). Using raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nature Protocols*, 11(4), 664-687. doi:10.1038/nprot.2016.036 (⇐)
https://www.researchgate.net/publication/297747070_Using_Raman_spectroscopy_to_characterize_biological_materials
- [55] Thi Kim Cuong LE - These de Doctorat "Raman Spectroscopy of Soot Produced in Low Pressure Flames: ex situ Analyses and Online Gas Phase Studies" Paris 2017, L'Universite Paris-Saclay (⇐)
https://www.researchgate.net/figure/Raman-spectrum-of-pure-water_fig14_331895879
- [56] Semrock (⇐)
<https://www.semrock.com/edge-filters-vs-notch-filters-for-raman-instrumentation.aspx>
- [57] Brozek-Pluska, B. (2020). Statistics assisted analysis of raman spectra and imaging of human colon cell lines – label free, spectroscopic diagnostics of colorectal cancer. *Journal of Molecular Structure*, 1218 doi:10.1016/j.molstruc.2020.128524 (⇐)
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022286020308498>
- [58] Brozek-Pluska, B., Miazek, K., Musiał, J., & Kordek, R. (2019). Label-free diagnostics and cancer surgery raman spectra guidance for the human colon at different excitation wavelengths. *RSC Advances*, 9(69), 40445-40454. doi:10.1039/c9ra06831g (⇐)
https://www.researchgate.net/publication/337804425_Label-free_diagnostics_and_cancer_surgery_Raman_spectra_guidance_for_the_human_colon_at_different_excitation_wavelengths
- [59] Brozek-Pluska, B., Musiał, J., Kordek, R., & Abramczyk, H. (2019). Analysis of human colon by raman spectroscopy and imaging-elucidation of biochemical changes in carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14) doi:10.3390/ijms20143398 (⇐)
<https://www.mdpi.com/1422-0067/20/14/3398>
- [60] Vlasov, A. V., Maliar, N. L., Bazhenov, S. V., Nikelshparg, E. I., Brazhe, N. A., Vlasova, A. D., Gordeliy, V. I. (2020). Raman scattering: From structural biology to medical applications. *Crystals*, 10(1) doi:10.3390/cryst10010038 (⇐)
<https://www.mdpi.com/2073-4352/10/1/38>
- [61] Lu, L., Shi, L., Secor, J., & Alfano, R. (2018). Resonance raman scattering of β -carotene solution excited by visible laser beams into second singlet state. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 179, 18-22. doi:10.1016/j.jphotobiol.2017.12.022 (⇐)
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134417309818>

- [62] Peltier M., «Nouvelles experiences sur la calorite des courans electriques» Paris (1834)
https://books.google.gr/books?id=1Jc5AAAacAAJ&pg=PA371&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- [63] TEC
https://totech.com/peltier-thermoelectric-cooler-modules/?gclid=Cj0KCQjw29CRBhCUARIsAOboZbLbc3Ua8jb4Szxw2qxaMl7sgtC1zx8aOKh2-tPY_P67BlyWLI90b4EaAqsXEALw_wcB
- [64] Kong, K., Kendall, C., Stone, N., & Notingher, I. (2015). Raman spectroscopy for medical diagnostics - from in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 89, 121-134. doi:10.1016/j.addr.2015.03.009
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X15000447?via%3Dihub>
- [65] Gaifulina, R., Maher, A. T., Kendall, C., Nelson, J., Rodriguez-Justo, M., Lau, K., & Thomas, G. M. (2016). Label-free raman spectroscopic imaging to extract morphological and chemical information from a formalin-fixed, paraffin-embedded rat colon tissue section. *International Journal of Experimental Pathology*, 97(4), 337-350. doi:10.1111/iep.12194
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/iep.12194>
- [66] Pence, I. J., Patil, C. A., Lieber, C. A., & Mahadevan-Jansen, A. (2015). Discrimination of liver malignancies with 1064 nm dispersive raman spectroscopy. *Biomedical Optics Express*, 6(8), 2724-2737. doi:10.1364/BOE.6.002724
<https://opg.optica.org/boe/fulltext.cfm?uri=boe-6-8-2724&id=321640>
- [67] Anastassopoulou, J., Kyriakidou, M., Malesiou, E., Rallis, M., & Theophanides, T. (2019). Infrared and raman spectroscopic studies of molecular disorders in skin cancer. *In Vivo*, 33(2), 567-572. doi:10.21873/invivo.11512
<https://iv.iijournals.org/content/33/2/567>
- [68] Pence, I. J., Beaulieu, D. B., Horst, S. N., Bi, X., Herline, A. J., Schwartz, D. A., & Mahadevan-Jansen, A. (2017). Clinical characterization of in vivo inflammatory bowel disease with raman spectroscopy. *Biomedical Optics Express*, 8(2), 524-535. doi:10.1364/BOE.8.000524
<https://opg.optica.org/boe/fulltext.cfm?uri=boe-8-2-524&id=357047>
- [69] Jenkins, C. A., Jenkins, R. A., Pryse, M. M., Welsby, K. A., Jitsumura, M., Thornton, C. A., . . . Harris, D. A. (2018). A high-throughput serum raman spectroscopy platform and methodology for colorectal cancer diagnostics. *Analyst*, 143(24), 6014-6024. doi:10.1039/c8an01323c
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/AN/C8AN01323C>

- [70] Bergholt, M. S., Zheng, W., Lin, K., Wang, J., Xu, H., Ren, J. -, . . . Huang, Z. (2015). Characterizing variability of in vivo raman spectroscopic properties of different anatomical sites of normal colorectal tissue towards cancer diagnosis at colonoscopy. *Analytical Chemistry*, 87(2), 960-966. doi:10.1021/ac503287u <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac503287u>
- [71] Bergholt, M. S., Lin, K., Wang, J., Zheng, W., Xu, H., Huang, Q., . . . Huang, Z. (2016). Simultaneous fingerprint and high-wavenumber fiber-optic raman spectroscopy enhances real-time in vivo diagnosis of adenomatous polyps during colonoscopy. *Journal of Biophotonics*, 9(4), 333-342. doi:10.1002/jbio.201400141 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbio.201400141>
- [72] Patil, C. A., Pence, I. J., Lieber, C. A., & Mahadevan-Jansen, A. (2014). 1064 nm dispersive raman spectroscopy of tissues with strong near-infrared autofluorescence. *Optics Letters*, 39(2), 303-306. doi:10.1364/OL.39.000303 <https://opg.optica.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-39-2-303>
- [73] Depaoli, D., Lemoine, É., Ember, K., Parent, M., Prud'Homme, M., Cantin, L., . . . Côté, D. C. (2020). Rise of raman spectroscopy in neurosurgery: A review. *Journal of Biomedical Optics*, 25(5) doi:10.1117/1.JBO.25.5.050901 <https://www.spiedigitallibrary.org/journals/journal-of-biomedical-optics/volume-25/issue-05/050901/Rise-of-Raman-spectroscopy-in-neurosurgery-a-review/10.1117/1.JBO.25.5.050901.full?SSO=1>
- [74] Sensarn, S., Zavaleta, C. L., Segal, E., Rogalla, S., Lee, W., Gambhir, S. S., . . . Contag, C. H. (2016). A clinical wide-field fluorescence endoscopic device for molecular imaging demonstrating cathepsin protease activity in colon cancer. *Molecular Imaging and Biology*, 18(6), 820-829. doi:10.1007/s11307-016-0956-7 <https://link.springer.com/article/10.1007/s11307-016-0956-7>
- [75] Imamura, T., Saitou, T., & Kawakami, R. (2018). In vivo optical imaging of cancer cell function and tumor microenvironment. *Cancer Science*, 109(4), 912-918. doi:10.1111/cas.13544 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cas.13544>
- [76] Jenkins, C. A., Lewis, P. D., Dunstan, P. R., & Harris, D. A. (2016). Role of raman spectroscopy and surface enhanced raman spectroscopy in colorectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 8(5), 427-438. doi:10.4251/wjgo.v8.i5.427 <https://www.wjgnet.com/1948-5204/full/v8/i5/427.htm>
- [77] Blanco-Formoso, M., & Alvarez-Puebla, R. A. (2020). Cancer diagnosis through sers and other related techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6) doi:10.3390/ijms21062253 <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/6/2253>

- [78] Hidetoshi Sato, Mika Ishigaki, Akinori Taketani and Bibin B. Andriana «Raman spectroscopy and its use for live cell and tissue analysis» Department of Biomedical Chemistry, School of Science and Technology, Kwansai Gakuin University, DOI 10.3233/BSI-180184
https://www.researchgate.net/publication/330147486_Raman_spectroscopy_and_its_use_for_live_cell_and_tissue_analysis
- [79] Eliana Cordero, Ines Latka, Christian Matthäus, Iwan W. Schie, Jürgen Popp, “In-vivo Raman spectroscopy: from basics to applications,” *J. Biomed. Opt.* 23(7), 071210 (2018), doi: 10.1117/1.JBO.23.7.071210
https://www.researchgate.net/publication/327862060_In-vivo_Raman_spectroscopy_From_basics_to_applications
- [80] Aaran T. Lewis, Riana Gaifulina, Martin Isabelle, Jennifer Dorney, Mae L. Woods, Gavin R. Lloyd, Katherine Lau, Manuel Rodriguez-Justo, Catherine Kendall, Nicholas Stone and Geraint M. Thomas «Mirrored stainless steel substrate provides improved signal for Raman spectroscopy of tissue and cells» (wileyonlinelibrary.com) (2016) DOI 10.1002/jrs.4980
https://www.researchgate.net/publication/305916634_Mirrored_stainless_steel_substrate_provides_improved_signal_for_Raman_spectroscopy_of_tissue_and_cells
- [81] Agnieszka Rajwa, Robert J. Bialik, Mikołaj Karpin´ski and Bartłomiej Luks “Dissolved Oxygen in Rivers: Concepts and Measuring Techniques” ResearchGate (2014) DOI: 10.1007/978-3-319-07599-0_19
https://www.researchgate.net/publication/296480356_Dissolved_Oxygen_in_Rivers_Concepts_and_Measuring_Techniques
- [82] Xiaotian Sun, Yiliang Bi, Tenghui Dong, Min Min, Wei Shen, Yang Xu & Yan Liu “Linked colour imaging benefits the endoscopic diagnosis of distal gastric diseases” *Scientific Reports* |(2017) 7: 5638 | DOI:10.1038/s41598-017-05847-3
https://www.researchgate.net/publication/318469549_Linked_colour_imaging_benefits_the_endoscopic_diagnosis_of_distal_gastric_diseases
- [83] Stefan Harmsen, Stephan Rogalla, Ruimin Huang, Massimiliano Spaliviero, Volker Neuschmelting, Yoku Hayakawa, Yoomi Lee, Yagnesh Tailor, Ricardo Toledo-Crow, Jeon Woong Kang, Jason M Samii, Hazem Karabeber, Ryan M. Davis, Julie R White, Matt van de Rijn, Sanjiv S. Gambhir, Christopher H. Contag, Timothy Wang, and Moritz F. Kircher “Detection of Pre-Malignant Gastrointestinal Lesions Using Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering-Nanoparticle Endoscopy” *ACS Nano*, Just Accepted Manuscript • DOI: 10.1021/acs.nano.8b06808 • Publication Date (Web): 09 Jan 2019
https://www.researchgate.net/publication/330265240_Detection_of_Pre-Malignant_Gastrointestinal_Lesions_Using_Surface-Enhanced_Resonance_Raman_Scattering-Nanoparticle_Endoscopy

- [84] Sumito Sato, Ryuichi Sekine, Hirotada Kagoshima, Keisuke Kazama, Aya Kato, Manabu Shiozawa and Jun-ichi Tanaka “All-in-one Raman spectroscopy approach to diagnosis of colorectal cancer: analysis of spectra in the fingerprint regions” *J Anus Rectum Colon* 2019; 3(2): 84-90 dx.doi.org/10.23922/jarc.2018-039
https://www.researchgate.net/publication/332655222_All-in-one_Raman_spectroscopy_approach_to_diagnosis_of_colorectal_cancer_analysis_of_spectra_in_the_fingerprint_regions
- [85] Samantha J. Harder, Martin Isabelle, Lindsay DeVorkin, Julian Smazynski, Wayne Beckham, Alexandre G. Brolo, Julian J. Lum2 & Andrew Jirasek Raman spectroscopy identifies radiation response in human non-small cell lung cancer xenografts Article in *Scientific Reports* · March 2016 DOI: 10.1038/srep21006
<https://www.nature.com/articles/srep21006>
- [86] Zavaleta, C. L., Garai, E., Liu, J. T. C., Sensarn, S., Mandella, M. J., Van De Sompel, D., . . . Gambhira, S. S. (2013). A raman-based endoscopic strategy for multiplexed molecular imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(25), E2288-E2297. doi:10.1073/pnas.1211309110
<https://www.pnas.org/content/110/25/E2288#sec-1>