لیزر در پزشکی ۱۴۰۱/ دوره ۱۹ / شماره (۲) / صفحات ۷۱-۶۳.

مقاله مروری

رامان اسپکتروسکوپی و کاربردهای آن در پزشکی و شناسایی ویروس

فاطمه مطرودی[۱]*

استادیار
۱ گروه فیزیک، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

خلاصه

در رامان اسپکتروسکوپی ماده به‌وسیله لیزر تحریک می‌شود و نور پراکنده از آن که حاوی اطلاعاتی از ترازهای ارتعاشی ماده است و مشابه اثر انگشت برای ماده است، آشکارسازی می‌شود. ازآنجاکه نور در ماده جذب نمی‌شود، رامان یک روش با حداقل تاثیر در ماده است به‌همین دلیل در بافت و سلول‌های زنده کاربرد فراوانی دارد. هدف از این مطالعه، معرفی رامان اسپکتروسکوپی و مقایسه روش‌های مختلف رامان ازنظر کاربرد در پزشکی است. در پایان، چندین مطالعه جهت تشخیص ویروس‌های مختلف ازجمله ویروس‌های مشابه کووید۱۹ با استفاده از رامان اسپکتروسکوپی فهرست شده است.

برای یافتن مقالات مورد استفاده در این تحقیق از مجله Raman Spectroscopy و سایت‌های google scholar و ACS استفاده شد.

به‌دلیل حساسیت پایین رامان خودبه‌خودی، روش‌های تقویت‌شده مثل رامان القایی، CARS، SERS و رامان تشدیدی در پزشکی، بیشتر کاربرد دارند. SERS به‌دلیل نیاز به استفاده از نانوساختار جهت تقویت، در مطالعه سلول‌ها و در آزمایشگاه بیشتر مطالعه شده است. رامان القایی و CARS قادر به تصویربرداری زنده و در محل از موجودات زنده هستند. با ترکیب رامان با روش‌های چندمتغیره می‌توان حتی نمونه‌های مشابه را تفکیک کرد.

رامان اسپکتروسکوپی، قادر به تهیه تصویر و فیلم‌های با رزولوشن بالا از اندرکنش دارو با بافت زنده است. اخیرا، از طریق ترکیب با روش‌های آماری کاربرد گسترده‌ای در تشخیص ویروس‌های مختلف پیدا کرده است.

واژه‌های کلیدی: رامان اسپکتروسکوپی، تشخیص، بافت زنده، ویروس

نویسنده مسئول: فاطمه مطرودی

پست الکترونیک:
matroodi@gmail.com

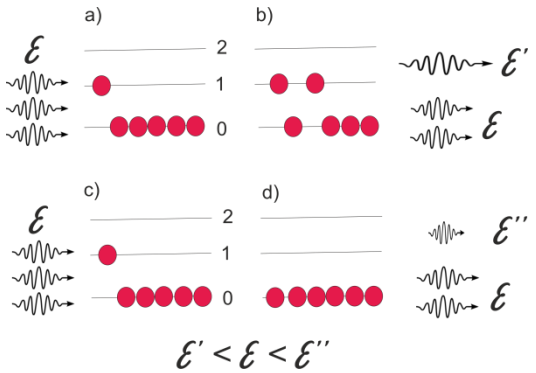
شماره تماس: .....

مقدمه

اولین آزمایشی که با آن اثر رامان ثبت شد در سال ۱۹۲۸ میلادی، جداگانه به‌وسیله دو گروه مختلف انجام شد ولی به‌دلیل ضعیف‌بودن اثر، جهت ثبت آن نیاز به چندین ساعت تا چندین روز زمان بود. بعد از اختراع لیزر و پیشرفت قطعات و دستگاه‌های اپتیکی به‌ویژه آشکارسازها و طیف‌سنج‌ها، مطالعات بیشتری در زمینه رامان انجام شد و کاربردهای مختلفی در زمینه‌های متنوع پیدا کرد. مقایسه تعداد مقالات رامان چاپ‌شده در موضوعات مختلف طبق آمار پایگاه رویترز در دو سال ۲۰۰۹ و ۲۰۱۸ نشان می‌دهد که تعداد کل مقالات رامان تقریباً دو برابر شده است درحالی‌که تعداد مقالات در زمینه خاص کاربردهای زیستی و بیو مدیکال از ۱۶۷ مقاله در سال ۲۰۰۹ به ۵۲۳ مقاله در سال ۲۰۱۸ رسیده است[۱]. دلیل این افزایش چشمگیر را می‌توان نیاز به شناخت بهتر از مکانیزم‌های زیستی و اندرکنش آنها با محیط و دارو و کاربردی‌بودن رامان اسپکتروسکوپی در این زمینه دانست. در این تحقیق، پس از معرفی رامان اسپکتروسکوپی و پارامترهای مهم در این تکنیک، به انواع رامان اسپکتروسکوپی و مزایا و معایب آنها پرداخته می‌شود. در پایان، کاربردهای رامان در تصویرسازی از بافت زنده و اندرکنش آن با دارو، تشخیص انواع ویروس‌ها و به‌ویژه ویروس‌های دستگاه تنفسی با ذکر نام ویروس، نوع رامان و طول‌موج لیزر به‌کاررفته به‌طور خلاصه آورده‌می‌شود.

معرفی رامان اسپکتروسکوپی

در اندرکنش نور و ماده ممکن هست که نور بازتابیده، جذب یا پراکنده شود. اثر رامان یک اثر پراکندگی نور به‌وسیله ماده است. اگر به نور به‌صورت یک مجموعه از فوتون‌ها توجه کنیم که به ماده رسیده‌اند (شکل ۱)، در پراکندگی بیشترین درصد فوتون‌ها با همان فرکانس فرودی پراکنده می‌شوند و به نام پراکندگی رایلی شناخته می‌شوند. یک تفاوت اصلی پراکندگی رایلی و رامان در این است که در رامان، فرکانس نور پراکنده اختلاف کمی با فرکانس نور رسیده پیدا می‌کند. این اختلاف فرکانسی کم دقیقاً منطبق با فرکانس‌های ارتعاشی ماده است. اگر فرکانس و در نتیجه انرژی فوتون پراکنده رامان کمتر از فوتون فرودی باشد، رامان استوکس و اگر بیشتر باشد آنتی‌استوکس گفته می‌شود.



شکل ۱: در(a) فوتون‌های فرو دی با نمونه اندرکنش می‌کنند درنتیجه باعث برانگیختگی یک الکترون از تراز زمینه به تراز ارتعاشی برانگیخته می‌شوند و یک فوتون با انرژی کمتر از انرژی فرودی پراکنده می‌شود (b). در (c) اندرکنش نور فرودی و نمونه باعث گذار الکترونی از تراز برانگیخته ارتعاشی به تراز زمینه می‌شود و درنتیجه یکی از فوتون‌ها با انرژی بیشتر از انرژی فرودی پراکنده می‌شود (d).

به‌دلیل توزیع جمعیتی بولتزمن ترازهای انرژی، در حالت عادی جمعیت فوتون‌های استوکس در نور پراکنده بیشتر از آنتی‌استوکس است. به‌همین‌دلیل در بیشتر موارد در یک طیف رامان شدت قله‌های ناحیه استوکس بیشتر از ناحیه آنتی‌استوکس است. شدت قله رایلی با وجود استفاده از فیلتر برای تضعیف آن معمولاً همچنان بیشتر از سایر قله‌ها خواهد بود. یک مشکل در انجام رامان اسپکتروسکوپی مواد، پدیده فلورسانس است که گاهی می‌تواند کاملاً طیف رامان را پوشش دهد و آشکارکردن آن را غیرممکن کند. این مساله در مواد فلورسانس‌کننده خیلی جدی می‌شود.

تابش نور به ماده و آشکارشدن فوتون‌های رامان را رامان خودبه‌خودی[1] می‌گوییم. اگر با استفاده از روش‌هایی باعث تحریک غیرخطی ماده برای افزایش شدت پراکندگی فوتون‌های رامان بشویم پدیده‌های غیرخطی مثل رامان القایی[2] یا رامان آنتی‌استوکس همدوس[3] CARS و یا اثرات دیگر را می‌توان استفاده کرد.

از مهمترین عوامل مؤثر در پیشرفت بیشتر رامان اسپکتروسکپی، می‌توان به ساخت فیلترهای هولوگرافیک برای حذف نور رایلی از طیف رامان اشاره کرد. یک مساله مهم دیگر ایجاد پایگاه‌های داده و استانداردکردن طیف‌های رامان مربوط به نمونه‌های مختلف می‌باشد.

[1] Spontaneous Raman
[2] Stimulated Raman
[3] Coherent anti-stokes Raman spectroscopy

هرچه این پایگاه داده‌های رامان جامع‌تر باشد، پژوهشگران آسان‌تر می‌توانند از رامان برای تفکیک و تمایز نمونه‌های مورد مطالعه خود استفاده کنند.

اطلاعات مختلفی در طیف رامان برای آنالیز مواد قابل استفاده هستند. مهمترین آنها، قله‌های مشخصه است که با ثبت آن‌ها و چک پایگاه داده‌های رامان می‌توان نمونه را شناسایی کرد. عواملی مثل تنش و فشار باعث شیفت کمی در محل قله‌های مشخصه ارتعاش ساختاری ماده می‌شوند و با اندازه‌گیری این شیفت می‌توان اندازه تنش را اندازه‌گیری کرد. همچنین برخی از فوتون‌های رامان قطبیده هستند و با اندازه‌گیری قطبش آن‌ها جهت‌گیری بلورها را برآورد می‌کنند. عوامل محیطی، نقص و نایکنواختی ساختار بلوری باعث پهن‌شدن قله‌های رامان می‌شوند. بنابرین با استفاده از پهنای قله امکان برآورد این اثرات وجود دارد. همچنین درحالت خطی، شدت قله‌های رامان رابطه مستقیمی با حجم یا غلظت نمونه مورد آزمایش دارد و از این راه می‌توان اندازه‌گیری کمی از نمونه انجام داد.

طول‌موج لیزر مورد استفاده برای اسپکتروسکوپی رامان باتوجه به کاربرد و نمونه موردنظر انتخاب می‌شود. هر چه طول موج لیزر کمتر باشد، بازده اثر رامان بیشتر می‌شود. اما وقتی طول موج لیزر در محدوده باند الکترونی نمونه قرار می‌گیرد (ناحیه UV) اثر فلورسانس نیز تقویت می‌شود. مگر این‌که طول موج را خیلی کوتاه‌تر کنیم و به ناحیه deep UV یعنی حدود ۱۰۰ تا ۲۵۰ نانومتر ببریم[۲].

وقتی برای تحریک نمونه از لیزری با طول موج کوتاه‌تر استفاده شود، برای تفکیک قله‌های رامان نیاز به طیف‌سنجی با قدرت تفکیک بیشتر خواهد بود. به‌عنوان مثال اگر قدرت تفکیک اسپکترومتر ۱ نانومتر باشد در طول‌موج تحریک ۲۵۰ نانومتر معادل با $160\ cm^{-1}$ در طیف رامان ثبت شده است. اما اگر از لیزر ۳۲۵ نانومتر استفاده کنیم یک نانومتر تفکیک معادل با $94\ cm^{-1}$ است. برای لیزر ۵۱۴، ۳۸ برای ۷۸۵ معادل با $16\ cm^{-1}$ است یعنی قدرت تفکیک برای لیزر ۷۸۵ nm بهتر و معادل ۰٫۱ تفکیکی هست که برای لیزر ۲۵۰ نانومتر به‌دست می‌آید. بنابراین لیزر ۷۸۵ nm خیلی بهتر از لیزر ۲۵۰ می‌تواند با اسپکترومتر یکسان قله‌های رامان مجزاتری تولید کند و طیف با کیفیت بهتر ثبت می‌شود.

شیفت رامان و وابستگی آن به طول موج لیزر به این صورت تعریف می‌شود:

$$\text{Raman shift } (\text{cm}^{-1}) = \left(\frac{1}{\lambda_0(nm)} - \frac{1}{\lambda_1(nm)}\right) \times \frac{(10^7 nm)}{(cm)}$$

در این رابطه، λ_0 و λ_1 به ترتیب طول‌موج لیزر و طول‌موج فوتون پراکنده هستند. با توجه به این رابطه در نمایش طیف رامان، شیفت صفر مربوط به طول موج لیزر هست و ناشی از پراکندگی رایلی است. باندهای استوکس فرکانس کمتر و طول موج بزرگتر از لیزر دارند پس سمت راست خط لیزر یا شیفت صفر قرار می‌گیرند و قله‌های آنتی‌استوکس، فرکانس بزرگتر و طول‌موج کوتاه‌تر از لیزر دارند و سمت چپ خط لیزر یا شیفت صفر قرار می‌گیرند (اگر محور عددموج در جهت چپ به راست باشد، یعنی از مقادیر کمتر در سمت چپ به مقادیر بزرگتر در سمت راست جهت داشته باشد). پس شیفت فرکانسی قله‌های استوکس مثبت و آنتی‌استوکس منفی می‌شود.

انواع رامان اسپکتروسکوپی

همان‌طورکه قبلاً هم اشاره شد کسر خیلی کمی از فوتون‌های پراکنده، تقریباً ۶-۱۰ رامان هستند. به‌همین‌دلیل دنبال روش‌هایی برای تقویت رامان خودبه‌خودی هستیم. از مهمترین روش‌هایی که برای تقویت اثر رامان استفاده می‌شود رامان تقویت سطحی[1] SERS است که در یک شیوه جدیدتر از تیپ میکروسکوپ شیئ برای تقویت اثر رامان استفاده می‌شود و به آن TERS[2] گفته می‌شود. رامان القایی و CARS از روش‌های دیگر هستند.

در SERS نانوذرات یا نانوساختارهایی طراحی می‌شوند. این نانوساختارها پراکندگی رامان را در مجاورت خودشان تقویت می‌کنند و ضریب تقویتی که ایجاد می‌کنند، می‌تواند تا ۱۰۱۴ برابر باشد. دو عامل، دلیل این تقویت سیگنال هستند. یک عامل، افزایش قطبش‌پذیری مولکول در اثر تشکیل باند بین سطح فلز (نانوساختار فلزی) و مولکول (نمونه مورد مطالعه) است. برای تشکیل این باند شیمیایی فاصله مولکول از سطح فلز باید ۱ تا ۵ آنگستروم باشد. عامل دوم، القای پلاسمون سطحی و تقویت شدت میدان

[1] Surface enhanced Raman spectroscopy
[2] Tip-enhanced Raman spectroscopy

الکترومغناطیسیی هست که مولکول می‌بیند و ایـن تقویـت بیشـتر از فاصله ۲ تا ۴ نانومتری از پلاسمون‌های سطحی دیگر فعال نیسـت. یک مساله در استفاده از تقویت سطحی، تفسیر طیف‌هـای بـه‌دسـت آمده است. مشخصات یک طیف، شامل محل قله‌ها و نسبت شـدت قله‌ها در مقایسه با هم است. دراین روش نسبت شدت‌ها کاملاً تغییر می‌کند و شکل کلی طیف با حالت خودبه‌خودی متفاوت است. حتی باندهای رامانی که در طیف خودبه‌خـودی یـا عـادی قابـل ملاحظـه نیستند در تقویت سطحی ممکن است بیشترین تقویت را پیدا کننـد و قلـه‌های اصـلی طیـف شـوند. ازطـرف‌دیگـر قلـه‌های اصـلی و پرشدت‌ترین‌های رامان خودبه‌خودی ممکن اسـت در طیـف SERS ناپدید شوند. مشکل دیگر این است کـه تقویـت ممکـن اسـت بـرای آلودگی‌های احتمالی در نمونه صورت گیرد و وجـود آلـودگی جزیـی هم طیف را به‌هم می‌ریزد. دیگر این که اثر SERS غیرخطی اسـت و وابستگی شدت طیف به نمونه و غلظت آن غیرخطی اسـت درنتیجـه رابطه مستقیمی بین مقدار نمونه و طیف نیست. درنتیجه برآورد کمی نمونه با استفاده از SERS پیچیده می‌شود و به همه عوامل شیمیایی و فیزیکی برای تفسیر دقیق طیف‌های SERS نیاز است که توجه شـود. این مساله کاربردهای عملی SERS را محدود می‌کند.

در TERS از خاصیت SERS برای تقویـت اسـتفاده مـی‌کنـیم و نانوسـاختاری کـه کـار تقویـت SERS را انجـام مـی‌دهـد تیـپ میکروسکوپ AFM می‌باشد که سر آن با طلا یا نقره لایه‌نشانی‌شده و کار تقویت فقط برای مولکولی کـه در مجـاورت تیـپ هسـت اتفـاق می‌افتد. با اسکن‌کـردن سـطح، تصـویری از توزیـع نمونـه بـه‌دسـت می‌آید. این روش، حساسیت رامان به ترکیبات شیمیایی را بـا تفکیـک فضایی میکروسکوپ AFM جمع‌کرده و از هر دو بهره می‌برد. مزایای این روش به‌دست‌آوردن رزولوشن نانومتری و رسیدن به زیر حد پراش اپتیکی است. چون SERS می‌توانـد زیـر حـد پـراش، آشکارسـازی انجام دهد.

از انواع رامان اسپکتروسـکوپی، رامـان القـایی[1] اسـت. در رامـان القایی با یک پدیده غیرخطی سروکار داریم و از شدت میـدان نـوری بالای ۱۰۹ V/cm برای تحریک ماده استفاده می‌شـود. بـا ایـن کـار، درحالی که در رامان خودبخودی از یک میلیون فوتون یکی مـی‌توانـد پراکندگی رامان پیدا کند در القایی تا ۵۰ درصد فوتون‌های نور رسیده به ماده می‌توانند دچار پراکندگی رامان شوند و ایـن اثـر ۴ تـا ۵ مرتبـه سیگنال رامـان را تقویـت مـی‌کنـد. در ایـن روش، دو باریکـه نـوری همزمان با نمونه اندرکنش می‌کنند. باریکـه اسـتوکس هـم جهـت بـا باریکه لیزر فرودی به نمونه مورد مطالعه، گسیل می‌شود و تنها مـدی که در طیف رامان خودبه‌خودی نمونه بیشترین شـدت را دارد بـه‌طـور عمده تقویت می‌شود و سایر مدهای رامان از طیف حذف می‌شـوند. از مزایای رامان القایی می‌توان به تقویت رامان خودبه‌خودی کـه ذاتـاً پدیده ضعیفی است، عدم‌نیاز به رنگدانه یا لیبـل، شناسـایی براسـاس ساختار شیمیایی، سرعت بالای تصویرسازی تـا ۳۰ فـریم در ثانیـه، امکان تصویربرداری سـه‌بعـدی نمونـه بـدون نیـاز بـه بـرش‌زدن آن، تصویربرداری عمقـی از بافـت البتـه بـا اسـتفاده از لیزرهـای NIR و کاهش زمینه فلورسانس را ذکر کرد.

به‌عنوان یک نوع دیگر رامان غیرخطی، می‌توان CARS را نام برد. در روش CARS از دو لیزر همدوس برای تولید سـیگنال در فرکـانس آنتی‌استوکس استفاده می‌شود. هر دو لیزر در شدت بالا باید باشـند و هم‌جهت با هم به‌کار می‌رونـد. یکـی از لیزرهـا در فرکـانس ثابـت و فرکانس لیزر دوم باید به صورتی کوک شود که اخـتلاف فرکانسـی دو لیزر دقیقاً منطبق بر مدهای ارتعاشی رامان نمونه مورد نظر بشـود. در این روش مدی که دو لیـزر بـرای آن تنظـیم شـدند، تنهـا مـد بسـیار پرشـدت در سـیگنال رامـان خواهـد بـود. در CARS بـه جـای مونوکروماتور می‌توان از فیلتر پهن باند و آشکارساز اسـتفاده کـرد. از کاربردهـای CARS در اسپکتروسـکوپی و میکروسـکوپی انتخـابی نمونه، تصویربرداری زنده در محل از عمق بافـت، مطالعـه طـولانی مدت سلول زنده، تحقیقات غیرمخرب در علوم مواد و علوم زیستی را اشاره کرد. مزیت عمده این روش این هست که یک ابزار توانمند برای اسپکتروسکوپی ارتعاشی و تصویربرداری هست. نیاز به لیبل نـدارد، حداقل آسیب را به نمونه مـی‌زنـد و باعـث فوتوبلیچینـگ نمی‌شـود. می‌تواند برای تصویربرداری سه بعدی استفاده شود و معمولاً به دلیـل اسـتفاده از لیزرهـای پالسـی کوتـاه در محـدوده پیکوثانیـه مـی‌توانـد همزمان بازدهی بالا و رزولوشن طیفی خوبی را بدهـد. امـا بـه‌دلیـل مکـانیزم فیزیکـی، طیـف‌هـای بـه‌دسـت آمـده نسـبت بـه رامـان خودبه‌خودی تغییر می‌کند، حساسیت به‌دلیل تابش زمینه غیرتشدیدی گاهی محدود می‌شود، وابستگی آن به مقدار و غلظت نمونه غیرخطی

[1] Stimulated Raman

است و به‌دلیل تابش زمینه غیرتشدیدی در تصاویر CARS خطا وجود دارد.

رامان القایی و CARS هر دو از تکنیک‌های موفق در بیوایمیجینگ هستند. اما القایی به دلیل مزیت‌هایی که نسبت به CARS دارد به‌خصوص در تصویربرداری بافت زنده بیشتر مورد توجه است. رامان القایی برای مجموعه بزرگتری از بافت‌ها کانتراست مولکولی بهتری می‌دهد و به‌دلیل وابستگی خطی به مقدار و غلظت نمونه برای برآورد کمی هم کاربرد دارد. همچنین وابستگی خطی آن به غلظت در برابر وابستگی غیرخطی در CARS کمک می‌کند که برای نمونه‌های با غلظت خیلی کم روش موثرتری باشد. نیز، شکل خطوط طیفی در رامان القایی مشابه به حالت خودبه‌خودی است به‌همین دلیل می‌توان از همان داده‌های طیفی مستقیماً برای القایی استفاده کرد. مشکل اثر تداخل زمینه غیرتشدیدی در تصاویر CARS یک امتیاز ویژه‌تر به رامان القایی در برابر آن می‌دهد. در رامان القایی اگر فرکانس استوکس در تشدید با مد ارتعاشی نمونه نباشد، سیگنال به‌دست آمده صفر می‌شود اما در CARS به‌دلیل وابستگی پیچیده میدان‌ها و پارامترهای ماده، حتی اگر دو باریکه لیزری فرستاده شده به ماده کاملاً با مد ارتعاشی منطبق نباشند باز سیگنال تولید می‌کنند و این باعث ایجاد یک زمینه غیرتشدیدی و ناخواسته در تصویر میکروسکوپی CARS می‌شود. پس به‌طور خلاصه اگر دو روش القایی و CARS رو با هم مقایسه کنیم از نظر وابستگی به غلظت نمونه، القایی خطی و CARS غیرخطی است. القایی وابستگی مستقیم به شدت باریکه‌های پمپ و استوکس دارد اما CARS وابستگی درجه دو به پمپ و درجه یک به استوکس دارد. القایی بدون زمینه هست ولی CARS در بیشتر حالات زمینه غیرتشدیدی در تصاویرش ظاهر می‌شود. شکل خط القایی یکسان با رامان خودبخودی است اما طیف CARS به‌دلیل تداخل ناشی از سیگنال زمینه تغییر می‌کند. مکان قله در القایی یکسان با رامان خودبه‌خودی است اما در CARS شیفت پیدا می‌کند. در القایی نیاز به مدولاسیون لیزر داریم درحالی که CARS نیازی به مدولاسیون ندارد. نویز لیزری در القایی خیلی مساله‌ساز هست درحالی‌که CARS حساسیت خاصی به نویز لیزری ندارد.

رامان تشدیدی[1] از انواع دیگر رامان اسپکتروسکوپی است. وقتی انرژی نور لیزر فرودی به اختلاف انرژی بین ترازهای الکترونی نمونه نزدیک می‌شود، برای پراکندگی رامان اثر تشدید اتفاق می‌افتد و بزرگی شدت رامان ۳ تا ۵ برابر قوی‌تر می‌شود. تقویت برای همه باندهای رامان صورت نمی‌گیرد. باندی که بیشترین جذب نور را دارد و معمولاً گروه کروموفور یا رنگی مولکول است بالاترین تقویت را پیدا می‌کند. ماکزیمم شدت سیگنال رامان تشدیدی وقتی به‌دست می‌آید که فرکانس لیزر برابر با فرکانس تحریک الکترون از حالت زمینه به اولین حالت برانگیخته باشد.

کاربردهای رامان اسپکتروسکوپی در تشخیص زیستی

از کاربردهای رامان می‌توان به استفاده از SERS برای تشخیص و مطالعه داروی ضدسرطان 6-Mercaptopurin (6MP) و فرآورده‌های متابولیکی آن اشاره کرد. در این مطالعه، نانوذرات هسته / پوسته طلا به قطر ۳۰ نانومتر با پوشش نقره به ضخامت ۷ نانومتر تهیه شدند. نانوذرات به راحتی از دیواره سلول عبور می‌کنند و وارد سلول می‌شوند. داروی مورد مطالعه از مشتقات پیورین است و در شیمی درمانی خیلی استفاده می‌شود. در سیستم بیولوژیکی به خودی خود ازنظر خاصیت آنتی کنسری غیرفعال است اما به کمک واکنش آنزیمی به حالت فعال 6-Mercaptopurin-ribose (6MPR) در می‌آید و ازطریق دخالت در توالی های DNA و RNA مانع از تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود. در این تحقیق 6MPR به عنوان نشانه فعال شدن خاصیت آنتی‌کنسری در سلول‌های زنده همزمان با 6MP از طریق تکنیک SERS مطالعه شد و غلظت بهینه نانوذرات و نیز زمان موردنیاز برای فعال شدن دارو به‌دست آمد[۳].

همچنین با استفاده از رامان خودبه‌خودی و رامان القایی متابولیسم لیپید و نیز دارو مطالعه شده است[٤].

با استفاده از باندهای رامان مشخصه هربخش از بافت زنده می‌توان تصویربرداری رامان از بخش‌های مختلف بافت زنده را انجام داد. در مطالعه‌ای، از رامان القایی در تصویربرداری زنده و در محل پوست موش، بازوی انسان و نفوذ دارو در پوست استفاده شد. در این کار نمونه همزمان با دو باریکه یکی در فرکانس پمپ و یکی در

[1] Resonance Raman

فرکانس استوکس تحریک می‌شود. اگر اختلاف این دو فرکانس منطبق بر ارتعاش مولکولی نمونه باشد، تحریک همدوس ارتعاشات مولکولی اتفاق می‌افتد و شدت باریکه استوکس افزایش پیدا می‌کند و باریکه پمپ دجار کاهش شدت می‌شود. در شرایط تحریکی تغییرات شدت در مقایسه با شدت باریکه پمپ خیلی کوچک است، به‌همین‌دلیل برای آشکارکردن سیگنال با حساسیت بالا از روش مدولاسیون فرکانس بالا استفاده می‌شود. بنابراین شدت باریکه استوکس مدوله می‌شود و مدولاسیون در اندرکنش با ماده به باریکه پمپ منتقل می‌شود. بعد از حذف باریکه استوکس به وسیله یک فیلتر اپتیکی، اندازه‌گیری سیگنال انجام می‌شود. افت و خیزهای مرتبط با اسکن در نمونه متحرک و همین‌طور نویز لیزری هر دو فرکانس پایین هستند. به‌همین‌دلیل جهت حذف این نویزها آشکارسازی در فرکانس بالاتر از ۱ مگاهرتز می‌تواند حساسیت بسیار بالایی را فراهم کند. برای انجام تصویربرداری در سرعت بالا شدت باریکه استوکس در فرکانس ۲۰ مگاهرتز مدوله شد و از آشکارساز با پاسخ زمانی ۱۰۰ نانوثانیه استفاده شد. معمولاً در میکروسکوپی رامان القایی اتلاف شدت باریکه پمپ در حالت عبوری از نمونه اندازه‌گیری می‌شود. این روش برای نمونه‌های ضخیم و غیرشفاف مثل بازوی انسان کاربردی نیست. به‌همین‌دلیل از سیگنال پراکندگی رو به عقب در بافت استفاده شد. در بافت‌های بیولوژیکی سیگنالی که رو به عقب جمع‌آوری می‌شود، برای تصویربرداری سریع خیلی ضعیف است و حتی با زمان جمع‌آوری بیشتر از ۶۰ ثانیه سیگنال به نویز به‌دست آمده از بافت خوب نیست. در نمونه ضخیم ۴۰ تا ۴۵ درصد نور، رو به عقب پراکنده می‌شود. و با درنظرگرفتن اپتیک جهت نور رسیده به روزنه آبجکتیو باید گفت که بیشتر از ۹۰ درصد نوری که رو به عقب پراکنده می‌شود حتی وارد آبجکتیو هم نمی‌شود. برای حل این مشکل آشکارساز دقیقاً در جلوی لنز آبجکتیو قرار داده‌شد و از درون حفره‌ای در مرکز آشکارساز تحریک نمونه انجام شد. با این کار در پوست موش ۲۸ درصد نور لیزر فرودی به نمونه جمع‌آوری شد. در این مطالعه برای آب، باند ارتعاشی کششی در $3250\ cm^{-1}$، پروتئین در $2845\ cm^{-1}$، داروی تزریقی استفاده‌شده رتینول باند ارتعاشی کششی پولوئن در $1596\ cm^{-1}$ برای d6-dimethyl sulfoxide که به‌وسیله دوتریم لیبل زده شد، باند کششی در $2125\ cm^{-1}$ استفاده شد. با این باندها برای رامان القایی، تصویربرداری در محل و زنده به‌دست آمد [۵].

رامان القایی امکان تصویرسازی بافت‌ها و سلول‌ها را فراهم می‌کند و برای کاربردهای تصویربرداری کلینیکی مثل تشخیص بیماری، تفکیک بافت‌های مختلف و حتی در حین جراحی خیلی اهمیت دارد. موانع اصلی این تکنیک پیچیدگی و قیمت بالای سیستم هست. همین‌طور عمق نفوذ نور در بافت یک مساله هست. میکروسکوپی رامان القایی در حالت زنده در موش، شبکیه چشم موش، مغز، نخاع و کبد انجام‌شده و در انسان هم در بافت‌های مختلف سالم و سرطانی از جمله در جراحی تومور مغزی می‌تواند مفید باشد. یک راه برای حل مشکل نفوذ نور استفاده از پروب رامان اندوسکوپی برای تحقیقات کلینیکی می‌تواند باشد[٦-١٠] .

در شناسایی ویروس‌های مختلف نیز از رامان اسپکتروسکوپی استفاده می‌شود. برخی از این کاربردها در جدول ۱ همراه با روش رامان اسپکتروسکوپی به‌کاررفته و نیز طول‌موج تحریک نمونه برای گسیل رامان، فهرست شده‌اند.

جدول۱. نمونه‌هایی از کاربرد رامان اسپکتروسکوپی در شناسایی ویروس‌های مختلف.

نام ویروس	نمونه مطالعه	نوع رامان	طول موج (nm)	سال	شماره مرجع
Tamiflu-resistant Influenza	Human saliva & nazal fluid	SERS	۶۳۳	۲۰۱۹	[۱۱]
Pf1	آب	رامان رزونانس	۲۲۹، ۲۳۸، ۲۴۴، ۲۵۷	۱۹۹۹	[۱۲]
RNA virions	Human saliva	خودبخودی	۵۳۲	۲۰۲۰	[۱۳]
HIV-1	آب و پلاسما	SERS	۷۸۵	۲۰۲۱	[۱٤]
Influenza	cell culture	SERS	۷۸۵	۲۰۱۵	[۱۵]
AIV (avian influenza virus)	آب	SERS	۷۸۵	۲۰۱۷	[۱٦]
APV	Dried virus	TERS	۵۳۲	۲۰۱۱	[۱۷]
AAV	Dried virus	TERS	۵۳۲	۲۰۱۱	[۱۷]
Dengue	سرم خون	SERS	۷۸۵	۲۰۲۰	[۱۸]
Dengue	سرم خون	خودبخودی	۴۴۲ ،۵۳۲	۲۰۱۲	[۱۹]
Cهپاتیت	سرم خون	خودبخودی	۸۳۰	۲۰۰۸	[۲۰]
Cهپاتیت	سرم خون	خودبخودی	۷۸۵	۲۰۱۸	[۲۱]
Bهپاتیت HBV	سرم خون	SERS	۷۸۵	۲۰۱۸	[۲۲]
RSV	cell culture	SERS	۷۸۵	۲۰۰۶	[۲۳]
zika	cell culture	SERS	۷۸۵	۲۰۰۶	[۲۳]
rhino	cell culture	SERS	۷۸۵	۲۰۰۶	[۲۳]
adeno	cell culture	SERS	۷۸۵	۲۰۰۶	[۲۳]
HIV	cell culture	SERS	۷۸۵	۲۰۰۶	[۲۳]
Tobacco mosaic virus	Dried virus	TERS	۵۶۸,۵	۲۰۰۸	[۲٤]

۱۱. نتیجه‌گیری

رامان اسپکتروسکوپی به عنوان یک روش اپتیکی و غیرمخرب، کاربردهای متنوعی در پزشکی و مطالعات زیستی از بررسی فعالیت سلول‌ها و اندر کنش آنها با داروهای مختلف، تفکیک بافت سالم و سرطانی، تشخیص و تفکیک ویروس‌های مختلف به‌ویژه اخیراً به دلیل شیوع کووید۱۹ ویروس‌های دستگاه تنفسی و از خانواده آنفلونزا پیدا کرده است. توانایی روش‌های رامان تشدیدی و نیز رامان غیرخطی مثل رامان القایی و CARS در تصویربرداری سریع و در محل از بافت زنده دریچه جدیدی برای یافتن چگونگی مکانیزم‌های مختلف در موجودات زنده فراهم کرده است. این زمینه تحقیقاتی مشابه بسیاری دیگر از تحقیقات درحال رشد است و روش‌هایی برای افزایش کارایی، کیفیت و دقت آن از طریق استفاده از هندسه‌ها و دستگاه‌های اپتیکی و الکترونیکی جدید، ترکیب با روش‌های دیگر و نیز بهره‌بردن از روش‌های چندمتغیره و آماری جهت آنالیز داده‌های به‌دست آمده مورد توجه قرار گرفته است.

References:

1. Nafie, L.A., Recent advances in linear and nonlinear Raman spectroscopy. Part XIII. Journal of Raman Spectroscopy, 2019. 50(12): p. 1783-1806.
2. Hug, W., et al. Deep UV Raman and fluorescence spectroscopy for real-time in situ process monitoring. in Next-Generation Spectroscopic Technologies XIII. 2020. International Society for Optics and Photonics.
3. Han, G., et al., Label-free surface-enhanced Raman scattering imaging to monitor the metabolism of antitumor drug 6-mercaptopurine in living cells. Analytical chemistry, 2014. 86(23): p. 11503-11507.
4. Shen, Y., F. Hu, and W. Min, Raman imaging of small biomolecules. Annual review of biophysics, 2019. 48: p. 347-369.
5. Saar, B.G., et al., Video-rate molecular imaging in vivo with stimulated Raman scattering. science, 2010. 330(6009): p. 1368-1370.
6. Lee, M., et al., Recent advances in the use of stimulated Raman scattering in histopathology. Analyst, 2021. 146(3): p. 789-802.
7. Sepp, K., et al., Utilizing stimulated Raman scattering microscopy to study intracellular distribution of label-free ponatinib in live cells. Journal of medicinal chemistry, 2019. 63(5): p. 2028-2034.
8. Lee, H.J. and J.-X. Cheng, Imaging chemistry inside living cells by stimulated Raman scattering microscopy. Methods, 2017.128 :p. 119-128.
9. Hill, A.H. and D. Fu, Cellular imaging using stimulated Raman scattering microscopy. Analytical chemistry, 2019. 91(15): p. 9333-9342.
10. Anna, I., et al., Novel strategies of Raman imaging for brain tumor research. Oncotarget, 2017. 8(49) :p. 85290.
11. Eom, G., et al., Diagnosis of tamiflu-resistant influenza virus in human nasal fluid and saliva using surface-enhanced raman scattering. ACS sensors, 2019. 4(9): p. 2282-2287.
12. Wen, Z.Q., A. Armstrong, and G.J. Thomas, Demonstration by ultraviolet resonance Raman spectroscopy of differences in DNA organization and interactions in filamentous viruses Pf1 and fd. Biochemistry, 1999. 38(10): p. 3148-3156.
13. Desai, S., et al., Raman spectroscopy-based detection of RNA viruses in saliva: A preliminary report. Journal of Biophotonics, 2020. 13(10): p. e202000189.
14. Yadav, S., et al., Portable and sensitive Ag nanorods based SERS platform for rapid HIV-1 detection and tropism determination. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 202 ۱. :۱۹۸p. 111477.
15. Lim, J.-y., et al., Identification of newly emerging influenza viruses by surface-enhanced Raman spectroscopy. Analytical chemistry, 2015. 87(23): p. 11652-11659.
16. Sun, Y., et al., A promising magnetic SERS immunosensor for sensitive detection of avian influenza virus. Biosensors and Bioelectronics, 2017. 89: p. 906-912.
17. Hermann, P., et al., Evaluation of tip-enhanced Raman spectroscopy for characterizing different virus strains. Analyst, 2011. 136(6): p. 1148-1152.
18. Gahlaut, S., et al., SERS platform for dengue diagnosis from clinical samples employing a hand held Raman spectrometer. Analytical chemistry, 2020. 92(3): p. 2527-2534.
19. Rehman, A., et al., Dengue blood analysis by Raman spectroscopy. Laser Physics, 2012. 2 :(٦)٢p. 1085-1089.
20. Saade, J., et al., Identification of hepatitis C in human blood serum by near-infrared Raman spectroscopy. Spectroscopy, 2008. 22(5): p. 387-395.
21. Sohail, A., et al., Analysis of hepatitis C infection using Raman spectroscopy and proximity based classification in the transformed domain. Biomedical optics express, 2018. 9(5): p. 2041-2055.

22. Lu, Y., et al., Label free hepatitis B detection based on serum derivative surface enhanced Raman spectroscopy combined with multivariate analysis. Biomedical optics express, 2018. 9(10): p. 4755-4766.

23. Shanmukh, S., et al., Rapid and sensitive detection of respiratory virus molecular signatures using a silver nanorod array SERS substrate. Nano letters, 2006. 6(11): p. 2630-2636.

24. Cialla, D., et al., Raman to the limit: tip-enhanced Raman spectroscopic investigations of a single tobacco mosaic virus. Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering, 2009. 40(3): p. 240-243.