

رامان اسپکتروسکوپی و کاربردهای آن در پزشکی و شناسایی ویروس

خلاصه

فاطمه مطرودی*

استادیار
گروه فیزیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران
اهواز، اهواز، ایران

در رامان اسپکتروسکوپی ماده به وسیله لیزر تحریک می شود و نور پراکنده از آن که حاوی اطلاعاتی از ترازهای ارتعاشی ماده است و مشابه اثر انگشت برای ماده است، آشکارسازی می شود. از آنجاکه نور در ماده جذب نمی شود، رامان یک روش با حداقل تأثیر در ماده است به همین دلیل در بافت و سلول های زنده کاربرد فراوانی دارد. هدف از این مطالعه، معرفی رامان اسپکتروسکوپی و مقایسه روش های مختلف رامان از نظر کاربرد در پزشکی است. در پایان، چندین مطالعه جهت تشخیص ویروس های مختلف از جمله ویروس های مشابه کووید ۱۹ با استفاده از رامان اسپکتروسکوپی فهرست شده است.

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

به دلیل حسایت پایین رامان خود به خودی، روش های تقویت شده مثل رامان القایی، CARS، SERS و رامان تشدید در پزشکی، بیشتر کاربرد دارند. SERS به دلیل نیاز به استفاده از نانو ساختار جهت تقویت، در مطالعه سلول ها 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 روش های چند متغیره می توان حتی نمونه های مشابه را تفکیک کرد. رامان اسپکتروسکوپی، قادر به تهیه تصویر و فیلم های با رزولوشن بالا از اندرکنش دارو با بافت زنده است. اخیراً، از طریق ترکیب با روش های آماری کاربرد گسترده ای در تشخیص ویروس های مختلف پیدا کرده است.

واژه های کلیدی: رامان اسپکتروسکوپی، تشخیص، بافت زنده، ویروس

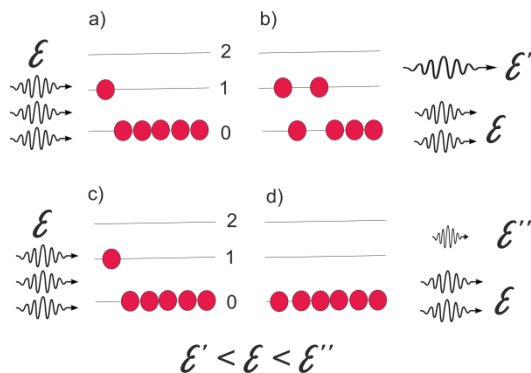
نویسنده مسئول: فاطمه مطرودی

پست الکترونیک:

matroodi@gmail.com

شماره تماس:

.....



شکل ۱: (در) فوتون‌های فرو دی با نمونه اندرکنش می‌کنند در نتیجه 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 در نتیجه یکی از فوتون‌ها با انرژی بیشتر از انرژی فرودی پراکنده می‌شود (d).

به دلیل توزیع جمعیتی بولتزمن ترازهای انرژی، در حالت عادی جمعیت فوتون‌های استوکس در نور پراکنده بیشتر از آنتی استوکس است. به همین دلیل در بیشتر موارد در یک طیف رامان شدت قله‌های ناحیه استوکس بیشتر از ناحیه آنتی استوکس است. شدت قله راییلی 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 آشکار کردن آن را غیرممکن کند. این مساله در مواد فلورسانس کننده خیلی جدی می‌شود.

تابش نور به ماده و آشکار شدن فوتون‌های رامان را رامان خودبه‌خودی^۱ می‌گوییم. اگر با استفاده از روش‌هایی باعث تحریک غیرخطی ماده برای افزایش شدت پراکندگی فوتون‌های رامان بشویم پدیده‌های غیرخطی مثل رامان القایی^۲ یا رامان آنتی استوکس همدوس^۳ CARS و یا اثرات دیگر را می‌توان استفاده کرد.

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

مقدمه

اولین آزمایشی که با آن اثر رامان ثبت شد در سال ۱۹۲۸ میلادی، جداگانه به وسیله دو گروه مختلف انجام شد ولی به دلیل ضعیف بودن 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 روتیز در دو سال ۲۰۰۹ و ۲۰۱۸ نشان می‌دهد که تعداد کل مقالات رامان تقریباً دو برابر شده است در حالی که 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 کاربردی بودن 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 طول موج لیزر به‌کاررفته به‌طور خلاصه آورده می‌شود.

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 راییلی شناخته می‌شوند. یک تفاوت اصلی پراکندگی راییلی 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 آنتی استوکس گفته می‌شود.

¹ Spontaneous Raman

² Stimulated Raman

³ Coherent anti-stokes Raman spectroscopy

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

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

در این رابطه، λ_0 و λ_1 به ترتیب طول موج لیزر و طول موج 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 آنتی استوکس، فرکانس بزرگتر و طول موج کوتاه‌تر از لیزر دارند و سمت چپ خط لیزر یا شیفت صفر قرار می‌گیرند (اگر محور عدد موج 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 آنتی استوکس منفی می‌شود.

انواع رامان اسپکتروسکوپی

همان‌طور که قبلاً هم اشاره شد کسر خیلی کمی از فوتون‌های پراکنده، تقریباً ۶-۱۰٪ رامان هستند. به همین دلیل دنبال روش‌هایی برای تقویت رامان خودبه‌خودی هستیم. از مهمترین روش‌هایی که برای تقویت اثر رامان استفاده می‌شود رامان تقویت سطحی^۱ SERS است که در یک شیوه جدیدتر از تیپ میکروسکوپ شیئی برای تقویت اثر رامان استفاده می‌شود و به آن TERS^۲ گفته می‌شود. رامان القایی و CARS از روش‌های دیگر هستند.

در SERS نانو ذرات یا نانوساختارهایی طراحی می‌شوند. این نانوساختارها پراکندگی رامان را در مجاورت خودشان تقویت می‌کنند و ضریب تقویتی که ایجاد می‌کنند، می‌تواند تا ۱۰^{۱۴} برابر باشد. دو عامل، دلیل این تقویت سیگنال هستند. یک عامل، افزایش قطبش پذیری 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

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 ناپیکنواختی ساختار بلوری باعث پهن شدن قله‌های رامان می‌شوند. بنابراین با استفاده از پهنای قله امکان برآورد این اثرات وجود دارد. همچنین در حالت 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.

طول موج لیزر مورد استفاده برای اسپکتروسکوپی رامان با توجه به کاربرد و نمونه مورد نظر 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 این که 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. به عنوان مثال اگر قدرت تفکیک اسپکترومتر ۱ نانومتر باشد در طول موج تحریک ۲۵۰ نانومتر معادل با ۱۶۰ cm⁻¹ در طیف رامان ثبت شده است. اما اگر از لیزر ۳۲۵ نانومتر استفاده کنیم یک نانومتر تفکیک معادل با ۹۴ cm⁻¹ است. برای لیزر ۵۱۴، ۳۸ برای ۷۸۵ معادل با ۱۶ cm⁻¹ است یعنی قدرت تفکیک برای لیزر ۷۸۵ nm بهتر و معادل ۰/۱ تفکیکی هست که برای لیزر ۲۵۰ نانومتر به دست 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.

¹ Surface enhanced Raman spectroscopy

² Tip-enhanced Raman spectroscopy

الکترومغناطیسی هست که مولکول می بیند و این تقویت بیشتر از فاصله ۲ تا ۴ نانومتری از پلاسمون های سطحی دیگر فعال نیست. یک مساله در استفاده از تقویت سطحی، تفسیر طیف های به دست آمده است. مشخصات یک طیف، شامل محل قله ها و نسبت شدت قله ها در مقایسه با هم است. در این روش نسبت شدت ها کاملاً تغییر می کند و شکل کلی طیف با حالت خودبه خودی متفاوت است. حتی باندهای رامانی که در طیف خودبه خودی یا عادی قابل ملاحظه نیستند در تقویت سطحی ممکن است بیشترین تقویت را پیدا کنند و قله های اصلی طیف شوند. از طرف دیگر قله های اصلی و پرشدت ترین های رامان خودبه خودی ممکن است در طیف SERS ناپدید شوند. مشکل دیگر این است که تقویت ممکن است برای آلودگی های احتمالی در نمونه صورت گیرد و وجود آلودگی جزئی هم طیف را به هم می ریزد. دیگر این که اثر SERS غیرخطی است و وابستگی شدت طیف به نمونه و غلظت آن غیرخطی است در نتیجه رابطه مستقیمی بین مقدار نمونه و طیف نیست. در نتیجه برآورد کمی نمونه با استفاده از SERS پیچیده می شود و به همه عوامل شیمیایی و فیزیکی برای تفسیر دقیق طیف های SERS نیاز است که توجه شود. این مساله کاربردهای عملی SERS را محدود می کند.

در TERS از خاصیت SERS برای تقویت استفاده می کنیم و نانو ساختاری که کار تقویت SERS را انجام می دهد تیپ میکروسکوپ AFM می باشد که سر آن با طلا یا نقره لایه نشانی شده و کار تقویت فقط برای مولکولی که در مجاورت تیپ هست اتفاق می افتد. با اسکن کردن سطح، تصویری از توزیع نمونه به دست می آید. این روش، حساسیت رامان به ترکیبات شیمیایی را با تفکیک فضایی میکروسکوپ AFM جمع کرده و از هر دو بهره می برد. مزایای این روش به دست آوردن رزولوشن نانومتری و رسیدن به زیر حد پراش اپتیکی است. چون SERS می تواند زیر حد پراش، آشکارسازی انجام دهد.

از انواع رامان اسپکتروسکوپی، رامان القایی^۱ است. در رامان القایی با یک پدیده غیرخطی سروکار داریم و از شدت میدان نوری بالای ۱۰۹ V/cm برای تحریک ماده استفاده می شود. با این کار، درحالی که در رامان خودبخودی از یک میلیون فوتون یکی می تواند

پراکندگی رامان پیدا کند در القایی تا ۵۰ درصد فوتون های نور رسیده به ماده می توانند دچار پراکندگی رامان شوند و این اثر ۴ تا ۵ مرتبه سیگنال رامان را تقویت می کند. در این روش، دو باریکه نوری همزمان با نمونه اندرکنش می کنند. باریکه استوکس هم جهت با باریکه لیزر فرودی به نمونه مورد مطالعه، گسیل می شود و تنها مدی که در طیف رامان خودبه خودی نمونه بیشترین شدت را دارد به طور عمده تقویت می شود و سایر مدهای رامان از طیف حذف می شوند. از مزایای رامان القایی می توان به تقویت رامان خودبه خودی که ذاتاً پدیده ضعیفی است، عدم نیاز به رنگدانه یا لیبل، شناسایی براساس ساختار شیمیایی، سرعت بالای تصویرسازی تا ۳۰ فریم در ثانیه، امکان تصویربرداری سه بعدی نمونه بدون نیاز به برش زدن آن، تصویربرداری عمقی از بافت البته با استفاده از لیزرهای NIR و کاهش زمینه فلورسانس را ذکر کرد.

به عنوان یک نوع دیگر رامان غیرخطی، می توان CARS را نام برد. در روش CARS از دو لیزر همدوس برای تولید سیگنال در فرکانس آنتی استوکس استفاده می شود. هر دو لیزر در شدت بالا باید باشند و هم جهت با هم به کار می روند. یکی از لیزرها در فرکانس ثابت و فرکانس لیزر دوم باید به صورتی کوک شود که اختلاف فرکانسی دو لیزر دقیقاً منطبق بر مدهای ارتعاشی رامان نمونه مورد نظر بشود. در این روش مدی که دو لیزر برای آن تنظیم شدند، تنها مد بسیار پرشدت در سیگنال رامان خواهد بود. در CARS به جای مونوکروماتور می توان از فیلتر پهن باند و آشکارساز استفاده کرد. از کاربردهای CARS در اسپکتروسکوپی و میکروسکوپی انتخابی نمونه، تصویربرداری زنده در محل از عمق بافت، مطالعه طولانی 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 ندارد، حداقل آسیب را به نمونه می زند و باعث فوتوبلیچینگ نمی شود. می تواند برای تصویربرداری سه بعدی استفاده شود و معمولاً به دلیل استفاده از لیزرهای پالسی کوتاه در محدوده پیکوثانیه می تواند همزمان بازدهی بالا و رزولوشن طیفی خوبی را بدهد. اما به دلیل مکانیزم فیزیکی، طیف های به دست آمده نسبت به رامان خودبه خودی تغییر می کند، حساسیت به دلیل تابش زمینه غیرتشدید گاهی محدود می شود، وابستگی آن به مقدار و غلظت نمونه غیرخطی

¹ Stimulated Raman

رامان تشدید^۱ 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 تشدید وقتی به دست 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 از نظر خاصیت آنتی کنسری غیرفعال است اما به کمک واکنش آنزیمی به حالت فعال 6MPR (6-Mercaptopurin-ribose) می‌آید و از طریق دخالت در توالی های DNA و RNA مانع از تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود. در این تحقیق 6MPR به عنوان نشانه فعال شدن خاصیت آنتی کنسری در سلول‌های زنده همزمان با 6MP از طریق تکنیک SERS مطالعه شد و غلظت بهینه نانوذرات و نیز زمان موردنیاز برای فعال شدن دارو به دست آمد [۳].

همچنین با استفاده از رامان خودبه خودی و رامان القایی متابولیسم لیپید و نیز دارو مطالعه شده است [۴].

با استفاده از باندهای رامان مشخصه هر بخش 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

است و به دلیل تابش زمینه غیرتشدید 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 به خصوص در تصویربرداری بافت زنده بیشتر مورد توجه است. رامان القایی برای مجموعه بزرگتری از بافت‌ها کانتراست مولکولی بهتری می‌دهد و به دلیل 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 خودبه خودی است به همین دلیل می‌توان از همان داده‌های طیفی مستقیماً برای القایی استفاده کرد. مشکل اثر تداخل زمینه غیرتشدید 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 به دست آمده صفر می‌شود اما در CARS به دلیل 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 غیرتشدید و ناخواسته در تصویر میکروسکوپی CARS می‌شود. پس به طور 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 غیرتشدید در تصاویرش ظاهر می‌شود. شکل خط القایی یکسان با رامان خودبخودی است اما طیف CARS به دلیل تداخل ناشی از سیگنال زمینه تغییر می‌کند. مکان قله در القایی یکسان با رامان خودبه خودی است اما در CARS شیف‌ت پیدا می‌کند. در القایی نیاز به مدولاسیون لیزر داریم در حالی که CARS نیازی به مدولاسیون ندارد. نویز لیزری در القایی خیلی مساله‌ساز هست در حالی که CARS حساسیت خاصی به نویز لیزری ندارد.

¹ Resonance Raman

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، شبکه 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 [۶-۱۰].

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 طول موج تحریک نمونه برای گسیل رامان، فهرست شده‌اند.

جدول ۱. 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 & nasal fluid	SERS	۶۳۳	۲۰۱۹	[۱۱]
Pf1	آب	رامان روزوانس	۲۳۸، ۲۲۹، ۲۵۷، ۲۴۴	۱۹۹۹	[۱۲]
RNA virions	Human saliva	خودبخودی	۵۳۲	۲۰۲۰	[۱۳]
HIV-1	آب و پلاسما	SERS	۷۸۵	۲۰۲۱	[۱۴]
Influenza	cell culture	SERS	۷۸۵	۲۰۱۵	[۱۵]
AIV (avian influenza virus)	آب	SERS	۷۸۵	۲۰۱۷	[۱۶]
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]
C هیاتیت	سرم خون	خودبخودی	۸۳۰	۲۰۰۸	[۲۰]
C هیاتیت	سرم خون	خودبخودی	۷۸۵	۲۰۱۸	[۲۱]
B هیاتیت 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	[۲۴]

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 دچار کاهش شدت می‌شود. در شرایط تحریکی تغییرات شدت در مقایسه با شدت باریکه پمپ خیلی کوچک است، به‌همین دلیل 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. به‌همین دلیل 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 ضعیف و غیرشفاف مثل بازوی انسان کاربردی نیست. به‌همین دلیل 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 در نظر گرفتن 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 پولون در 1596 cm^{-1} برای d6-dimethyl sulfoxide که به‌وسیله دوتریم لیل زده شد، باند کششی در 2125 cm^{-1} استفاده شد. با این باندها برای رامان القایی، تصویربرداری در محل و زنده به‌دست آمد [۵].

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 کووید ۱۹ ویروس‌های دستگاه تنفسی و از خانواده آنفلونزا پیدا کرده است. توانایی روش‌های رامان تشدید 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 در حال 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*, 2021. 201 :p. 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. 22(6) :p. 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. *Nanoletters*, 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.