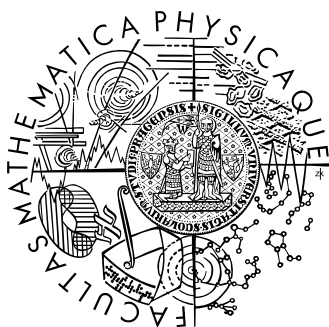


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Nad'a Rosová

Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků (DCDR) tělních tekutin

Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Vladimír Kopecký Jr., Ph.D.

Studijní program: Fyzika, Obecná fyzika

2008

Děkuji RNDr. Vladimíru Kopeckému, Ph.D. za obětavost a ochotu při vedení mé bakalářské práce. Děkuji MUDr. Aleši Bartošovi, Ph.D. (Psychiatrické centrum Praha) za laskavé poskytnutí vzorků mozkomíšního moku a krevního séra. Děkuji také rodičům za podporu a trpělivost při mém studiu.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci napsala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce.

V Praze dne 7. srpna 2008

Nad'a Rosová

Obsah

| | |
|---|----|
| Abstrakt | 2 |
| 1. Ramanova spektroskopie | 3 |
| 2. Ramanova spektroskopie v medicíně | 7 |
| 2.1. Výzkum tkání pomocí Ramanovy spektroskopie | 7 |
| 2.2. Výzkum tělních tekutin Ramanovou spektroskopií | 11 |
| 2.3. Výzkum mozkomíšního moku vibrační spektroskopií | 13 |
| 3. Drop coating deposition Raman (DCDR) | 15 |
| 4. Užití DCDR | 19 |
| 5. Konfokální mikroskop | 25 |
| 5.1. Integrovaný Ramanův systém HR800 | 26 |
| 5.1.1. Základní komponenty integrovaného Ramanova systému | 26 |
| 5.1.2. Zjednodušený popis optické dráhy laserového svazku | 27 |
| 6. Podložky SpectRIM™ | 28 |
| 7. Měření DCDR spekter mozkomíšního moku | 29 |
| 8. Diskuze výsledků a závěr | 42 |
| 9. Literatura | 43 |

Název práce: *Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků (DCDR) tělních tekutin*

Autor: *Nad'a Rosová*

Katedra (ústav): *Fyzikální ústav UK*

Vedoucí bakalářské práce: *RNDr. Vladimír Kopecký Jr., Ph.D.*

e-mail vedoucího: *kopecky@karlov.mff.cuni.cz*

Abstrakt: *V této práci jsme se zabývali aplikacemi vibrační spektroskopie v biomedicíně, přesněji měřením Ramanových spekter kapkově nanášených povlaků (DCDR) tělních tekutin, v našem případě mozkomíšního moku a krevního séra. Metoda DCDR spočívá v tom, že se na nesmáčivou podložku nanese malá kapka vzorku a po zaschnutí se měří spektrum z vytvořeného kroužku. Zaměřili jsme se na zjišťování reprodukovatelnosti měření spekter z hlediska konfigurace Ramanova mikrospektrometru a z hlediska stability vzorků v čase. Proměřili jsme hloubkový profil kroužku a odhadli tloušťku povlaku mozkomíšního moku na 1 μm . Ukázali jsme, že vzorky mozkomíšního moku nepodléhají fotodegradaci, ale uchovávané při pokojové teplotě degradují již po několika dnech, což lze zpomalit, nikoli však zastavit, uchováváním za nízkých teplot. Obecně platí, že mozkomíšní mok zdravého a nemocného člověka se liší složením proteinů a jejich celkovou koncentrací. Metoda DCDR by tak mohla sloužit k rychlé identifikaci normálních a patologických vzorků cerebrospinální tekutiny.*

Klíčová slova: *DCDR, Ramanova spektroskopie, mozkomíšní mok*

Title: *Drop coating deposition Raman spectroscopy (DCDR) of body fluids*

Author: *Nad'a Rosová*

Department: *Institute of Physics, Charles University*

Supervisor: *RNDr. Vladimír Kopecký Jr., Ph.D.*

Supervisor's e-mail address: *kopecky@karlov.mff.cuni.cz*

Abstract: *In this work we studied biomedical applications of vibrational spectroscopy, especially the drop coating deposition Raman (DCDR) spectra of body fluids, in our case of the cerebrospinal fluid and blood serum. The DCDR method is based on depositing of a drop on a hydrophobic substrate and measuring a spectrum of a created ring. We focused on the reproducibility of spectral measurements with respect to the configuration of Raman microspectrometer and to the sample stability in time. We measured the depth profile of the ring and estimated its thickness to 1 μm . We showed, that the samples of cerebrospinal fluid do not photodegrade, however, kept at room temperatures they degrade after few days, which can be slowed down by keeping them at low temperatures. Generally, the normal and diseased cerebrospinal fluids differ in the composition and concentration of proteins, thus, DCDR technique could be useful in rapid identification of normal and pathological samples of the cerebrospinal fluid.*

Keywords: *DCDR, Raman spectroscopy, cerebrospinal fluid*

1. Ramanova spektroskopie

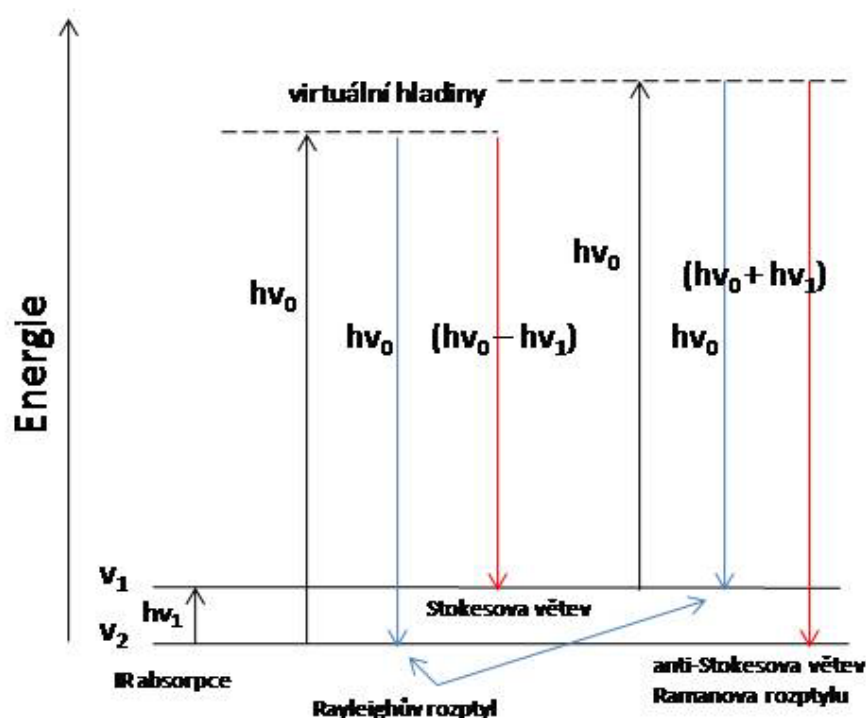
Ramanova spektroskopie je druh vibrační spektroskopie založený na Ramanově rozptylu. Ramanův rozptyl je neelastický rozptyl světla, kdy dopadající foton s energií vyšší než je vibrační energie, ztratí/získá část své energie na vibrační vybuzení molekuly a zbývající energie je rozptýlena jako foton s nižší/vyšší vlnovou délkou [Diem, 1993].

Rozptyl je dvoufotonový proces, kde dopadající foton o energii $h\nu_0$ během srážky spolu s molekulou, která byla v základním stavu (předpokládáme tedy $E = 0$), vytvoří stav o celkové energii $h\nu_0$, takzvaný virtuální stav, který není stabilní [Mayo et al., 2003]. Tento stav můžeme považovat za krátkodobou deformaci elektronového obalu způsobenou elektrickým oscilujícím polem fotonu. Pro excitovanou molekulu má tento virtuální stav energii $(h\nu_0 + h\nu_1)$, kde $h\nu_1$ je energie excitovaného vibračního stavu molekuly. Z virtuálního stavu je rozptýlen foton o vlnové délce buď stejné, jako byla vlnová délka dopadajícího fotonu (tedy $h\nu_0$), nižší ($h\nu_0 - h\nu_1$) nebo vyšší ($h\nu_0 + h\nu_1$). První případ nastane pro elastický *Rayleighův rozptyl*, při kterém obecně zůstává molekula ve stejném stavu, jako byla před srážkou. Druhý stav nastane pro takzvanou *Stokesovu větev* Ramanova rozptylu, kdy je část energie dopadajícího fotonu využita na excitaci vibračního stavu molekuly, a třetí pro *anti-Stokesovu větev*, kdy naopak molekula přešla z excitovaného stavu do stavu základního. Klasický popis Ramanova rozptylu [Zýka et al., 1988] je založen na dipólovém momentu indukovaném elektromagnetickým polem dopadajícího záření E :

$$\mu = \alpha E, \quad (1)$$

kde α je tenzor polarizovatelnosti. Můžeme jej popsat jako makroskopickou odpověď materiálu na elektromagnetické pole – nejslaběji vázaný elektron molekuly nebo atomu bude nejvíce „odpovídat“ na sílu vynaloženou elektrickým polem a to tak, že bude „následovat“ oscilace světla – a tím bude produkovat indukovaný (dynamický) dipólový moment o frekvenci závislé na oscilaci světla:

$$E = E_0 \cos \omega t \quad (2)$$



Obr. 1.1: Rayleighův a Ramanův rozptyl

Indukovaný dipólový moment bude tedy také oscilovat s úhlovou rychlostí ω :

$$\mu = \alpha E_0 \cos \omega t \quad (3)$$

Polarizovatelnost tedy popisuje snadnost, s jakou se mohou elektrony vychýlovat v elektromagnetickém poli v závislosti na struktuře molekuly. Je to nerezonanční odpověď materiálu na působení elektromagnetického pole a je závislá na dielektrické konstantě ϵ a na refrakčním indexu.

Nelineární N -atomová molekula má $3N - 6$ vibračních stupňů volnosti, a tedy také $3N - 6$ vnitřních souřadnic Q , podle kterých vibruje. Závislost Q na čase je pro harmonický pohyb dána rovnicí:

$$Q = Q_0^m \cos \omega_m t, \quad (4)$$

kde ω_m je m . fundamentální frekvence. Polarizovatelnost může být rozšířena podle Taylorova rozvoje podle Q_m kolem rovnovážné polohy:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_m} \right) Q_m + \dots \quad (5)$$

Spojením rovnic (4) a (5) získáme:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_m} \right) Q_0^m \cos \omega_m t \quad (6)$$

a indukovaný dipólový moment může být tedy psán jako

$$\mu = \alpha_0 E_0 \cos \omega t + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right) Q_0^m E_0 \cos \omega_m t \cos \omega t \quad (7)$$

Po využití identity $\cos(\alpha) \cdot \cos(\beta) = 1/2[\cos(\alpha + \beta) + \cos(\alpha - \beta)]$ dostaneme rovnici

$$\mu = \alpha_0 E_0 \cos \omega t + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right) Q_0^m E_0 [\cos(\omega - \omega_m)t + \cos(\omega + \omega_m)t] \quad (8)$$

podle které indukovaný dipólový moment μ osciluje na frekvencích ω , $(\omega - \omega_m)$ a $(\omega + \omega_m)$ a na stejných frekvencích také vyzařuje. Rozptyl na stejné frekvenci, jako byla budící frekvence ω nazýváme elastický – Rayleighův rozptyl. Rozptyl na nižší nebo vyšší frekvenci je rozptyl neelastický – Ramanův. Při frekvenci $(\omega - \omega_m)$ se jedná o Stokesovu větev Ramanova rozptylu a při frekvencích $(\omega + \omega_m)$ o anti-Stokesovu větev. Stokesova a anti-Stokesova větev jsou symetrické vzhledem k budící frekvenci ω . Z rovnice (8) vyplývá, že pro vznik Ramanova efektu je nutná změna polarizovatelnosti, tedy nenulový člen $(\partial\alpha/\partial Q)$ [Zýka et al., 1988].

Intenzita Ramanova rozptylu je dána vztahem

$$I \propto \nu^4 I_0 N f(\alpha^2) \quad (9)$$

kde I_0 je intenzita budícího záření, N počet molekul v daném stavu, schopných excitovat, ν je frekvence budícího svazku v cm^{-1} a α je polarizovatelnost vzorku. Pro Stokesovu větev značí N počet molekul v základním vibračním stavu, tedy ve stavu s nižší energií, pro anti-Stokesovu větev je N počet molekul, který je původně v excitovaném stavu, tedy ve stavu s vyšší energií.

Poměr molekul v základním a excitovaném stavu závisí na absolutní teplotě vzorku a na rozdílu energií mezi stavy, tedy podle Boltzmannova zákona:

$$\frac{N_k}{N_0} = e^{-\left(\frac{E_k - E_0}{k_B T} \right)} \quad (10)$$

Tento poměr je vždy menší než jedna, tedy Stokesova větev je intenzivnější (dle vztahu (9)) než anti-Stokesova. Ramanův rozptyl je však obecně velmi slabý jev – přibližně jen jeden foton z 10^{10} dopadajících fotonů je neelasticky rozptýlen [Mayo et al., 2003].

2. Ramanova spektroskopie v medicíně

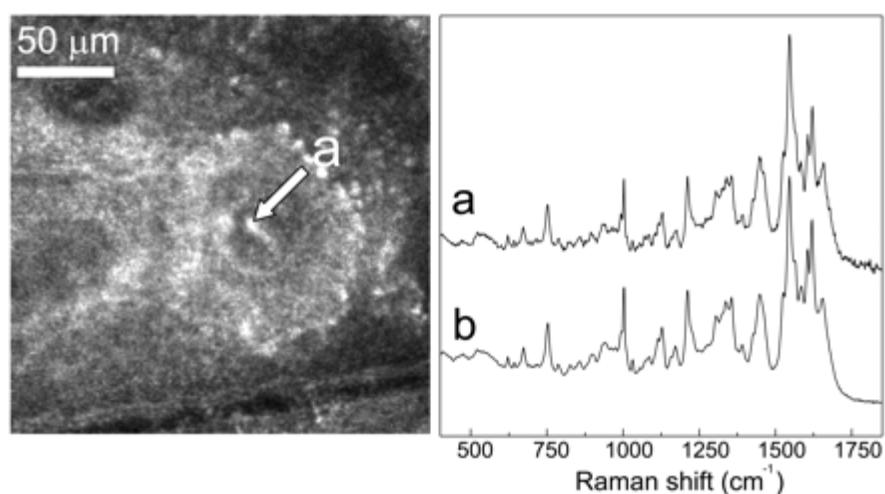
Ramanova spektra jsou založena na vibračních stavech molekul. I při malých změnách ve složení a koncentracích molekul, které jsou způsobeny nemocí, či obecně patologickým stavem, dostáváme rozlišitelná vibrační spektra. Navíc patří Ramanova spektroskopie, stejně jako nukleární magnetická rezonance a infračervená spektroskopie, mezi nedestruktivní metody, proto by mohla být dobře využitelná v medicíně jako diagnostická metoda [Schrader et al., 1999].

Nevýhodou Ramanovy spektroskopie v medicínském výzkumu je častá parazitní fluorescence vzorku pro excitační zdroj záření ve viditelném oboru spektra, která je mnohem intenzivnější než Ramanův signál a je třeba ji ze spektra obtížně odečítat. Jedním z řešení tohoto problému je používání excitačního záření o vlnové délce ležící v blízké infračervené oblasti (NIR Raman). Při těchto vlnových délkách je fluorescence potlačena, protože pro vybuzení do nejnižšího excitačního stavu molekuly je třeba energie, která odpovídá viditelnému světlu, a pro nižší energie (a tedy vyšší vlnovou délku) nedojde k excitaci [Hanlon et al., 2000]. Jinou možností je používání ultrafialového světla o vlnové kratší než 270 nm, při kterém dochází k rezonančnímu zesílení signálu. Například užitím záření o vlnové délce 229 nm vytváří rezonanční efekt s aminokyselinami s aromatickým postranním řetězcem a vlnová délka 257 nm zesiluje Ramanovy pásy spojené s nukleovými kyselinami [Heise, 2008].

2.1. Výzkum tkání pomocí Ramanovy spektroskopie

Pro zkoumání vzorků tkání se používají především vlnové délky z blízké infračervené oblasti. Výhodou pro výzkum je, že tyto vlnové délky pronikají v tkáni do hloubky řádu milimetrů. Toho využili například Caspers et al. (2001), kteří zkoumali hloubkový profil kůže pomocí Ramanova mikrospektrometru a věnovali se závislosti obsahu vody v rohovité vrstvě na hloubce. Zaměřili se na přirozené zvlhčovací faktory pokožky, jako je obsah serinu, glycinu a dalších složek a ukázali, že naměřená koncentrace vody je v dobré shodě s rentgenovými *in vitro* experimenty. Ve své další práci Caspers et al. (2003) měřili souběžně pomocí konfokálního Ramanova mikrospektrometru Ramanova spektra a pomocí

skenovacího konfokálního mikroskopu *in vivo* obraz kůže do hloubky asi 250 μm . Na obrazu získaném konfokálním mikroskopem identifikovali potní kanálek, tukové žlázy a kožní kapiláry a následně proměřili jejich spektrum. Spektrum získané ze středu kapiláry porovnali se spektrem krve *in vitro*. I když je spektrum krve v kapiláře ovlivněno také signálem z jejího nejbližšího okolí, pochází většina Ramanova signálu z krve (obr. 2.1) a metoda by se tedy mohla využít pro získání spektra krve bez nutnosti jejího odběru. Výhodou je také rychlost měření – uvedené spektrum bylo naměřeno za 30 sekund.

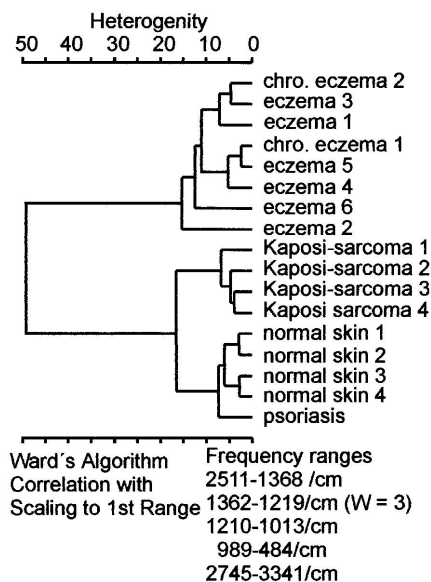


Obr. 2.1: Vlevo obraz kožní kapiláry v hloubce 60 μm , vpravo Ramanovo spektrum z bodu *a* porovnané se spektrem krve (b) [Caspers et al., 2003]

Výzkum kůže Ramanovou spektroskopií se kromě zjišťování složení a hydratace kůže zaměřuje na kožní nemoci, například na psoriázu nebo i mozoly, čímž se zabýval Edwards et al. (1995). Ve spektru zrohovatělé vrstvy kůže je, podle autorů, pro nemocnou kůži patrný úbytek signálu patřícího vibracím lipidů a struktura vrstvy je tedy jiná než u zdravé kůže.

Velkou část využití Ramanovy spektroskopie ve výzkumu kůže i jiných tkání tvoří zkoumání rakoviny, zaměřené zejména na rozlišení zdravé tkáně od nemocné. Gniadecka et al. (1997) uvádí, že lze odlišit Ramanova spektra zdravé kůže a kůže postižené bazocelulárním karcinomem; Fendel a Schrader (1998) zjistili, že NIR FT Ramanova spektra různých lézí na kůži se liší v oblastech amidu III (jedna z peptidových vibrací, 1220–1300 cm^{-1}) a změnou relativní intenzity některých pásů, což je způsobeno změnou obsahu lipidů, vody a změnou složení bází DNA. Pomocí

shlukové analýzy lze tato spektra rozlišit a určit, zdali jsou léze zhoubné nebo nezahubné (obr. 2.2).

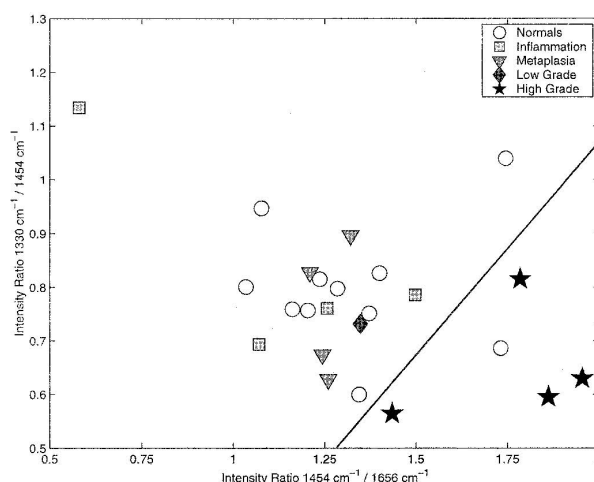


Obř. 2.2: Vývojový strom shlukové analýzy z [Fendel, Schrader, 1998]

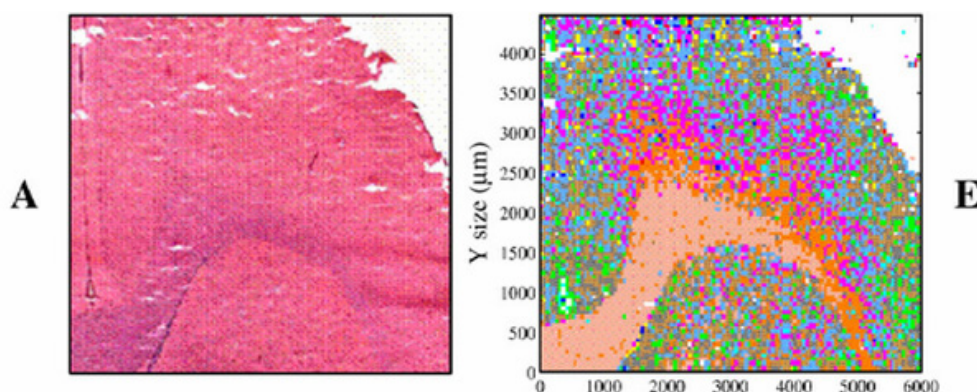
Pro *in vivo* měření Ramanových spekter rakovinných tkání a jejich rozlišení od tkání zdravých je používána také sonda s optickými vlákny. Takovou sondou byla naměřena spektra plic [Short et al., 2008], jícnu a žaludku krysy [Hatori et al., 2007], a ústní dutiny krysy [Schut et al., 2000]. Utzinger et al., (2001) sondou změřili *in vivo* spektra normální tkáně děložního čípku, tkáně s metaplazií a různými stupni dysplazie, tedy předrakovinnými stavy rakoviny děložního krčku, což je jedna z nejvíce zkoumaných typů rakovin [Krafft, Sergio, 2006]. K rozlišení spekter použili jednoduchý algoritmus, kdy porovnávali poměry intenzit pásů $1330/1454\text{ cm}^{-1}$ ku $1454/1656\text{ cm}^{-1}$, tedy intenzit, které se přiřazují vibracím kolagenu, fosfolipidům a DNA, a které se nejvíce měnily. U stavů těžké formy dysplazie je intenzita pásu 1454 cm^{-1} $1,5\text{--}2\times$ větší než intenzita pásu 1656 cm^{-1} a $1,3\text{--}2\times$ větší než 1330 cm^{-1} , zatímco u ostatních vzorků je poměr těchto intenzit nižší. Proto jsou těžké stavy dysplazie v jednoduchém diagramu od ostatních stavů odděleny (obr. 2.3). Tento algoritmus však také špatně identifikoval jeden normální vzorek.

Ramanova spektroskopie se využívá i na zobrazování tkání. Spektra jsou postupně naměřena z celé zkoumané tkáně, normalizována, zpracována analýzou hlavních komponent [např. Jolliffe I.T., 2002] a shlukovou analýzou [např. Jain et al.,

1999], které rozdělí spektra do několika skupin s charakteristickými znaky. Přiřazením barvy těmto skupinám pak vznikne Ramanův obraz tkáně v nepravých barvách (obr. 2.4) [Amharref et al., 2007, Zhang et al., 2008]. Amharref et al. (2007) takto zkoumali normální a nádorovou mozkovou tkáň krys a získaná data pak porovnali s histopatologickými výsledky. Jednotlivým skupinám přiřadili jejich původ (mozková kůra, krev, corpus callosum, nádor a okolí nádoru). Nádorová spektra měla sníženou intenzitu fosfolipidových a cholesterolových pásů a naopak zvýšenou intenzitu pásů DNA a RNA.



Obr. 2.3: Diagram k rozlišení těžké dysplazie [Utzinger et al., 2001], který porovnává poměry intenzit pásů, u kterých docházelo k největším změnám



Obr. 2.4: Histopatologický (vlevo) a Ramanův obraz zdravé mozkové tkáně. Výrazný útvar je corpus callosum, modrá a zelená barva byla přiřazena krvi a zbylé barvy šedé tkáni mozkové [Amharref et al., 2007]

Na měření Ramanových spekter jednotlivých buněk se používá optická pinzeta. Banerjee a Zhang (2007) s její pomocí měřili spektrum mozkové buňky astrocytu a astrocytomu, což je rakovinná buňka odvozená z astrocytu, která z velké části tvoří mozkové nádory. Ramanova spektra těchto dvou buněk jsou podobná, ale spektrum astrocytomu má výrazně vyšší intenzitu. Jess et al. (2006) měřili přístrojem využívajícím princip optické pinzety Ramanova spektra z různých částí buňky keratinocyty – z jádra, cytoplazmy a membrány. Tato spektra jsou od sebe dobře rozlišitelná třeba podle vibrací thyminu (751 cm^{-1}), který se nachází v DNA a tedy v jádře, zatímco v cytoplazmě a membráně se DNA nevyskytuje a proto charakteristický pás thyminu chybí.

Ramanova spektroskopie se využívá i ve výzkumu mineralizovaných tkání, to znamená kostí a zubů. Zkoumají se změny v lokálním složení kostí, vývoji lebky v prenatálním a postnatálním věku [Tarnowski et al., 2002], nemoci kostí, jako je kraniosynostóza [Tarnowski et al., 2004] nebo možnosti měření spekter neinvazivně přes kůži sondou s optickými vlákny za účelem odhalení osteoporózy [Matousek et al., 2006].

2.2. Výzkum tělních tekutin Ramanovou spektroskopií

Mezi tělní tekutiny řadíme krev, cytosol, mozkomíšní mok, sklivec, lymfu, ale také slzy, moč, pot nebo sliny. Důvodem, proč se tyto tekutiny zkoumají vibrační spektroskopií, je snaha o rychlé a reprodukovatelné zjišťování změn ve složení tělních tekutin, které by mohlo pomáhat při diagnózách nemocí, například cukrovky měřením obsahu glukózy v krvi nebo změnou složení krve nemocných rakovinou.

Krev je nejvíce zkoumanou tělní tekutinou, ale Ramanova spektroskopie plné krve je obtížná, protože krev obsahuje fluorofory, hemoglobin absorbuje světlo a tím se zahřívá a zahřívá i své okolí, což vyvolává změny v lokálním složení krve a také dochází k Mieovu rozptylu na buňkách v krvi [Rohleder, Petrich, 2008]. Proto se ke zkoumání používají častěji deriváty krve, především krevní plazma.

Berger et al. (1997) použili NIR Ramanovu spektroskopii na plnou krev a určovali s přesností řádově stejnou, jaká je přesnost metod používaných v medicíně, koncentraci glukózy a hydrogenuhličitanu. Ve své další práci Berger et al. (1999) změřili s dobrou přesností koncentrace dalších složek krevní plazmy a plné krve a optickým vláknem (*liquid core optical fiber*) chemické koncentrace v krevní

plazmě a moči [Qi, Berger, 2007]. Yonzon et al. (2006) měřili glukózu v povrchově zesílených Ramanových spektrech hovězí krevní plazmy a předpokládají, že by se tato metoda dala využít pro měření glukózy v krvi *in vivo* a navíc v reálném čase. Lambert et al. (2005) ve své práci zkoumali možnost nepřímého měření glukózy spektroskopickou analýzou komorové vody v oku. Zjistili, že Ramanův signál je dostatečný na zjištění koncentrace glukózy a že potřebný výkon laserového svazku nepoškozuje sítnici a nepřekračuje bezpečnostní limit.

Pichardo-Molina et al. (2007) srovnávali spektra krevní plazmy pacientů s rakovinou prsu se spektry zdravých dobrovolníků a byli schopni je rozlišit. Analýzou hlavních komponent získali sedm oblastí (pásů), které se měnily. Tyto pásy náleží vibračním proteinů, polysacharidů a fosfolipidů.

Moč jako odpadní kapalina obsahuje chemikálie, kterých se tělo zbavuje. Proto lze zkoumáním moči získat různé informace, například o zatížení a výkonu člověka podle koncentrace kyseliny mléčné, která vzniká ve svalech při jejich práci, a kreatinu, který charakterizuje svalovou hmotu. Jeho koncentrace je tedy různá pro ženy a muže [Farquharson et al., 2000]. Rozbor moči je podstatou dopingových měření a používá se při identifikaci požitých drog a léků.

Ramanův signál moči je při excitaci viditelnými vlnovými délkami překryt fluorescencí. Dou et al. (1996) proto použili infračervené vlnové délky. Ve své práci zjišťovali, zda by se infračervená Ramanova spektroskopie dala použít místo nynějších metod na zjišťování koncentrace glukózy a jiných látek v moči. Tuto koncentraci určovali podle intenzity pásů glukózy, acetonu, močoviny a kreatinu uměle přidaných do moči. V práci [Dou et al., 1997b] postupovali analogicky, ale měřili anti-Stokesovu větev Ramanova rozptylu, kterou nepřekrývá fluorescence. Detekční limit zkoumaných látek se v obou případech pohyboval při vyšších fyziologických koncentracích, což by se dle autorů dalo zlepšit zvýšením doby měření. Uměle přidanou glukózu a aceton v moči také určovali přístrojem bez spektrometru, který měří pouze intenzitu záření v úzké oblasti vybrané filtrem [Dou et al., 1997a], a opět byli schopni detekovat vyšší fyziologické koncentrace.

Park et al. (2007) se rozhodli vytvořit metodu, která by umožňovala denní měření koncentrace glukózy a jiných látek v moči bez zásahu do běžného života, tedy měření v toaletě. Pro vytvoření podobných podmínek moč 10krát zředili. Poté měřili koncentraci uměle přidané glukózy.

Farquharson et al. (2000) vytvořili speciální sol-gel s obsahem stříbra pro povrchově zesílenou Ramanovu spektroskopii (SERS), který použili na měření spektra moči. Ve spektru identifikovali pásy kyseliny močové a kreatinu.

Trachta et al. (2004) spojili dohromady kapalinovou chromatografii a SERS, kterou měřili separované látky z moči a krve obsahující psychofarmaka. Jednotlivé separované složky identifikovali a porovnali s referenčními spektry. Tato metoda by splňovala právní požadavek druhého nezávislého testu na identifikaci použitých nelegálních látek.

Ramanova spektroskopie moči by mohla být alternativou i k časově náročným dopingovým kontrolám, protože ve spektru moči lze zjistit přítomnost efedrinu v nižší než povolené koncentraci [Guimaraes et al., 2006]. Jiným sportovním využitím by mohlo být měření koncentrace kyseliny mléčné v krvi sportovců během tréninku [Pilotto et al., 2001], které by mělo napomáhat k efektivnějšímu rozvržení tréninku. Kyselinu mléčnou v krvi identifikovali podle zvýšené intenzity pásu na 830 cm^{-1} přes kůži krysy pomocí optického vlákna.

Ve slinách se, podobně jako v krevní plazmě, dají detekovat podané léky a drogy nebo změny způsobené nemocí. Na rozdíl od plazmy je získání vzorku rychlé, neinvazivní a s nižším rizikem infekce [Choo, Huestis, 2004]. Farquharson et al. (2005) měřili povrchově zesílená Ramanova spektra slin s uměle přidaným 5-fluorouracilem, který se používá k léčbě rakoviny. Ve spektru byl 5-fluorouracil dobře rozpoznatelný a autoři předpokládají, že by tato metoda mohla být využita při úpravě dávkování léků. Kah et al. (2007) uvádějí, že lze rozlišit povrchově zesílená Ramanova spektra slin zdravých lidí a lidí nemocných rakovinou úst, která by se takto dala rychle diagnostikovat.

2.3. Výzkum mozkomíšního moku vibrační spektroskopii

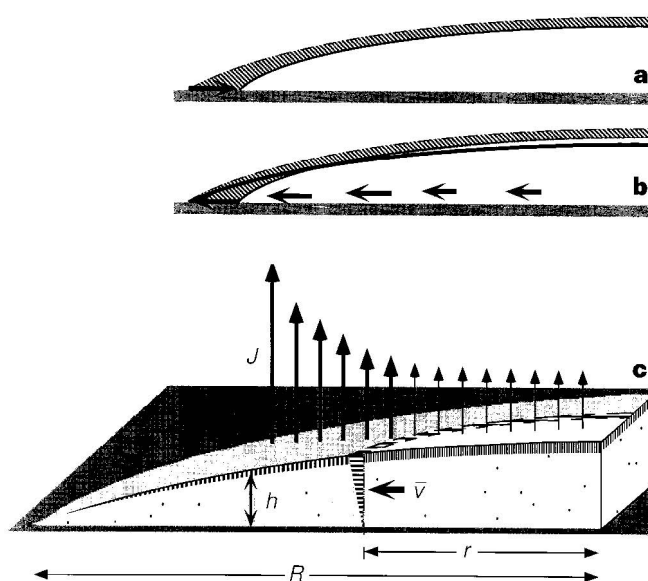
Mozkomíšní mok je čirá tekutina, která obklopuje mozek a míchu a zastává funkce ochrany, odvádění metabolických zplodin mozku, transportu látek a kontroly chemického prostředí centrálního nervového systému [Hühmer et al., 2006]. Zkoumáním jeho složení můžeme nepřímo získat informace o stavu mozku a různých neurologických, ale i nádorových nemocech. Změny v mozku způsobené nemocí se obecně projevují zvýšenou koncentrací proteinů v mozkomíšním moku.

Griebe et al. (2007) měřili infračervená spektra mozkomíšního moku lidí s Alzheimerovou chorobou a srovnávali je se spektry zdravých lidí. Pro diagnostikování vzorků vytvořili umělou neuronovou síť. Srovnávali koncentrace a poměr dvou možných ukazatelů této choroby, což jsou β -amyloid₁₋₄₂ a tau protein. Koncentrace β -amyloidu₁₋₄₂ je pro pacienty s Alzheimerovou chorobou nižší než pro zdravé lidi a koncentrace tau proteinu se naopak zvyšuje. Umělou neuronovou sítí byli schopni rozlišit tato spektra s 86% přesností.

3. Drop coating deposition Raman (DCDR)

Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků (drop coating deposition Raman spectroscopy – DCDR) je spektroskopickou technikou, při které se na vhodnou podložku nanese kapka zkoumaného vzorku, nechá se vyschnout a získaný povlak se zkoumá pomocí Ramanovy mikrospektroskopie. Výhodou tohoto postupu je získání koncentrovaného vzorku z malého objemu velmi zředěného roztoku [Zhang et al., 2003].

Odpařování kapky umístěné na podložce se odehrává ve dvou fázích – v prvním stadiu se nemění styčná plocha kapky s podložkou a mění se kontaktní úhel. Po dosažení kritického úhlu se začne zmenšovat plocha zabíraná kapkou [Hu, Larson, 2002].

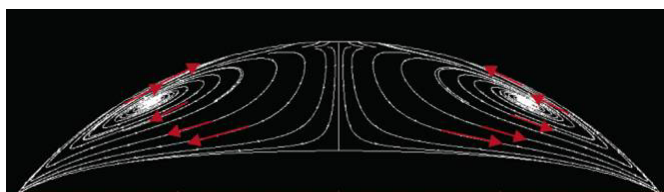


Obr. 3.1: Pokud by k okrajům neproudila kapalina zevnitř, styčná plocha by se zmenšovala (a). Proud, který kompenzuje ztrátu odpařené kapaliny, způsobí, že v prvním stadiu se styčná plocha nemění (b). V (c) jsou znázorněny veličiny, potřebné k vysvětlení jevu [Deegan et al., 1997]

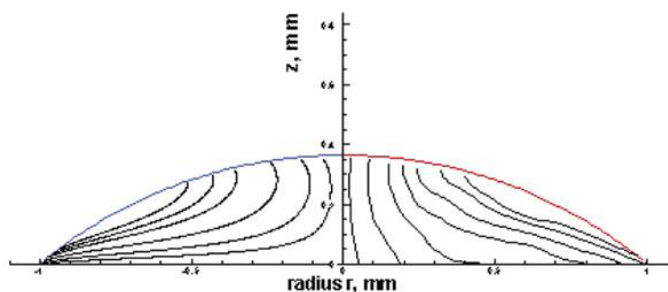
Pro kapky rozpouštědel, která se nedají snadno kontaminovat povrchově aktivními látkami, je při odpařování pozorován silný cirkulační proud. Tento proud je způsoben takzvaným *Marangoniho efektem*, což je pohyb kapaliny podél fázového rozhraní z míst o nižším mezifázovém napětí do míst o vyšším mezifázovém napětí.

Při vypařování se snižuje teplota kapaliny, ale protože kapalina na vrcholku kapky se vypařuje rychleji než kapalina na okraji kapky, je zde také teplota nižší. Pro nižší teplotu je povrchové napětí kapky vyšší, vytváří se tedy gradient povrchového napětí a vzniká proudění povrchových vrstev kapaliny z míst o nižším povrchovém napětí do míst o vyšším povrchovém napětí. Protože je ale styčná plocha kapky s povrchem stále stejná, musí docházet také k proudění kapaliny „zevnitř ven“ – dochází k cirkulačnímu proudění. Rozptýlené částice se při tomto proudění usazují do středu kapky [Hu, Larson, 2006].

Pro vodné roztoky je však Marangoniho efekt potlačen. Jak uvádí Hu a Larson (2006), je to způsobeno snadnou kontaminací vody povrchově aktivními látkami, což způsobí oslabení Marangoniho toku. Aby se styčná plocha kapky při odpařování nezmenšovala, musí do jejích okrajových částí proudit kapalina z vnitřní části. Toto proudění odnáší téměř všechny rozptýlené částičky na okraj kapky, kde se následně usadí [Deegan et al., 1997]. Tomuto efektu se říká *efekt kávového kroužku (coffee-ring effect)* a je podstatou DCDR měření.



Obr. 3.2: Marangoniho efekt pro kapku rozpouštědla. Převzato z [Hu, Larson, 2006]



Obr. 3.3: Potlačení Marangoniho efektu pro vodný roztok. Vlevo předpověď, vpravo skutečný průběh [Hu, Larson, 2006]

Proudění ve vysychající kapce lze podle Deegana et al. (2007) popsat nasyceností okolí kapky vodní párou. Můžeme předpokládat, že v blízkém okolí povrchu kapky bude nasycenost popsána rovnovážným stavem $\varphi(\mathbf{r})$, který splňuje rovnici:

$$\nabla^2 \varphi = 0. \quad (11)$$

V nekonečnu můžeme předpokládat koncentraci φ_∞ a na povrchu kapky koncentraci φ_s . Tok vypařování tekutiny v kapce je úměrný gradientu koncentrace, tedy

$$J(r) = -D\nabla\varphi, \quad (12)$$

kde D je difuzivita vodní páry ve vzduchu. Úlohu můžeme řešit jako elektrostatický problém, kapka bude znázorňovat vodič a φ elektrostatický potenciál. Protože je úhel θ_c mezi okrajem kapky a podložkou malý, řešení pro tok J je divergentní:

$$J(r) \approx (R-r)^{\frac{\pi-2\theta_c}{2\pi-2\theta_c}}, \quad (13)$$

kde R je poloměr kapky a r vzdálenost od středu kapky. Pro snižující se kontaktní úhel se výraz v exponentu blíží k $\frac{1}{2}$ a tok vypařování tekutiny v kapce je tedy úměrný

$$J(r) \approx \frac{1}{\sqrt{R-r}}. \quad (14)$$

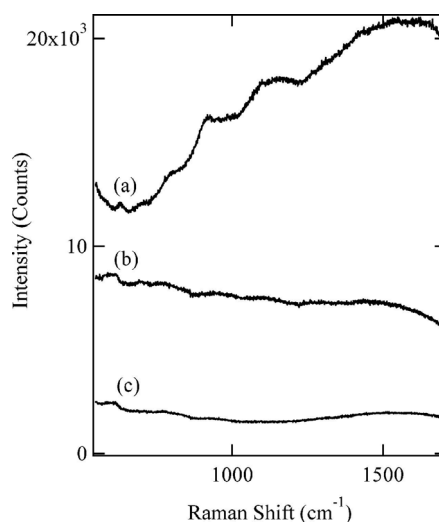
Vypařená kapalina je nahrazována z vnitřku kapky rychlostí $v \approx J$, dochází k přemísťování hmoty kapky ze středu k obvodu a vytváření kroužku látek v kapalině rozpuštěných.

Protože částice, jejichž Ramanův signál chceme měřit, se téměř všechny ukládají na okraj, kde vytváří tenký prsteneček, získáváme i pro velmi zředěné roztoky velmi koncentrované povlaky. To umožňuje získat Ramanova spektra z roztoků o koncentraci až 1 μM .

Spektra získaná metodou DCDR jsou v podstatě totožná se spektry získanými z koncentrovaného roztoku nebo z krystalického vzorku [Zhang et al., 2003], pouze molekuly usazené na vnější části kroužku mohou být vysušením poškozeny [Kopecký, Baumruk, 2006]. Jejich spektra se pak liší od spekter získaných z vnitřních částí povlakové vrstvy, která poškozena nebyla a vhodným výběrem místa lze tedy získat spektra v dobré kvalitě. Zhang et al. (2003) také uvádí, že

spektrum inzulinu získané metodou DCDR se shoduje se spektrem inzulinu v přirozeném stavu a je odlišné od spektra denaturovaného inzulinu.

Pro zachování vzorků je důležité, aby podložka, na kterou se kapka nanáší, byla chemicky a teplotně odolná [Zhang et al. 2003]. Vhodná podložka pro DCDR by měla mít také nízkou optickou absorbanci, vysokou optickou odrazivost, malý nebo žádný rušivý signál v Ramanově spektru a hlavně musí být nesmáčivá. První tři podmínky jsou důležité pro samotnou detekci pomocí Ramanovy mikroskopie, mají zajistit co nejmenší Ramanův signál pozadí. Čtvrtá podmínka zaručuje co nejmenší styčnou plochu kapky s povrchem a tím co nejvyšší zkoncentrování zkoumané látky pomocí efektu kávového kroužku. Zhang et al. (2003) použili ve svých pokusech sklo potažené zlatem, plochou zlatou destičku a nerezovou destičku pokrytou tenkou vrstvou teflonu, se kterou nakonec dosáhli nejlepších výsledků (obr. 3.4).



Obr. 3.4: Ramanova spektra pozadí pro různé substráty – sklo (a), sklo s 20nm vrstvou zlata (b) a nerezová ocel pokrytá vrstvou teflonu (c). [Zhang et al. 2003]

Filik a Stone (2007) vyzkoušeli jako podložku destičku z křemene a z fluoritu (fluorid vápenatý). Křemenná destička nebyla pro měření s použitou vlnovou délkou laseru 830 nm vhodná, protože vytvářela velké luminiscenční pozadí. Destička z fluoritu má vlastní ramanovský signál na 320 cm⁻¹ a měření na ní musí probíhat delší dobu, protože je na rozdíl od ocelové destičky transparentní, tato destička je však levnější než SpectRIM™ a dá se znovu použít.

4. Užití DCDR

Poprvé metodu kapkově nanášených povlaků publikoval Zhang et al. (2003). Autoři se zaměřili na základní vlastnosti a možnosti metody – tedy na nalezení optimálního povrchu, odhadnutí možného koncentračního limitu ($\approx 1 \mu\text{M}$) a srovnání spekter glukózy, fruktózy, lysozymu a inzulinu získaných metodou DCDR se spektry získanými jinou metodou. Tímto srovnáním zjistili, že DCDR spektra glukózy jsou podobná spektrům vodného roztoku a odlišná od spektra krystalické formy, zatímco spektrum fruktózy se podobá krystalické formě, spektrum lysozymu je analogické vodnému roztoku lysozymu a spektrum inzulinu svému vodnému roztoku.

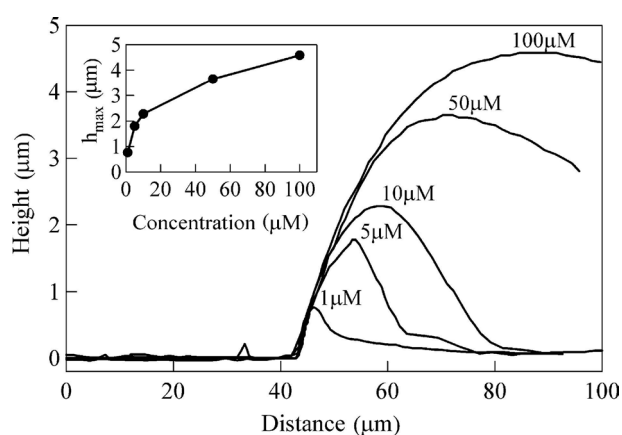
Ortiz et al., 2006 provedli další srovnání spekter pro vodný roztok a vysušenou kapku inzulinu. Byly nalezeny drobné rozdíly, které by mohly být dle autorů způsobeny rozdílnou hydratací vzorků, různým poměrem nečistot nebo tím, že usazování a vysoušení kapky lehce mění sekundární strukturu látky. Spektra jsou ovšem stále velmi odlišná od spektra denaturovaného inzulinu.

Podle článku [Kopecký, Baumruk, 2006] se v DCDR spektrech peptidů mění spektrální pásy postranních řetězců aminokyselin, které jsou citlivé na změny lokálního prostředí, a nejstabilnější spektra lze tedy naměřit ve střední a vnitřní části kroužku. Spektra lysozymu umístěného na různých podložkách (SpectRIM a křemenná destička) s různou hydrofobicitou jsou téměř totožná [Ortiz et al., 2006]. Pokud dochází k interakci zkoumané látky s podložkou, mělo by být působení různě smáčivých povrchů různé, a tedy by se měla lišit i spektra. Proč tomu tak není, vysvětlují autoři tím, že pokud dochází k interakci, jsou poškozeny pouze nejspodnější usazené vrstvy, které výsledný Ramanův signál příliš neovlivní. Ortiz et al. (2006) dále uvádí, že v DCDR spektrech peptidů je pás amidu I posunut mírně k vyšší relativní frekvenci, což by mohl být signál zvýšeného počtu β -skládaných listů.

V práci [Ortiz et al., 2006] zjišťovali autoři také stálost vzorku lysozymu při dlouhodobém osvětlení laserovým svazkem. Rozdíl mezi spektrem pořízeným na začátku a spektrem pořízeným po hodině ozařování ukazuje, že vzorek nepodstoupil žádné výrazné změny.

Spektra stejného proteinu v roztoku o různých koncentracích jsou prakticky shodná až do koncentrace asi 10 μM , při nižších koncentracích je poměr signál/šum nižší, přesto je rozdíl od spekter koncentrovanějších roztoků malý. Kvalita spektra také závisí na čistotě rozpouštědla. Pokud roztok s velmi malou koncentrací ($\approx 1 \mu\text{M}$) obsahuje nečistoty, je výsledné spektrum složením spektra zkoumané látky a obsažených nečistot [Ortiz et al., 2006].

Výškový profil kroužku pro různé koncentrace změřili Ortiz et al. (2006) pomocí mikroskopu atomárních sil a zjistili, že maximální výška kroužku se nezvyšuje s koncentrací původního roztoku lineárně, ale že pro zvyšující se koncentraci se přírůstek maximální výšky snižuje (obr. 4.1).

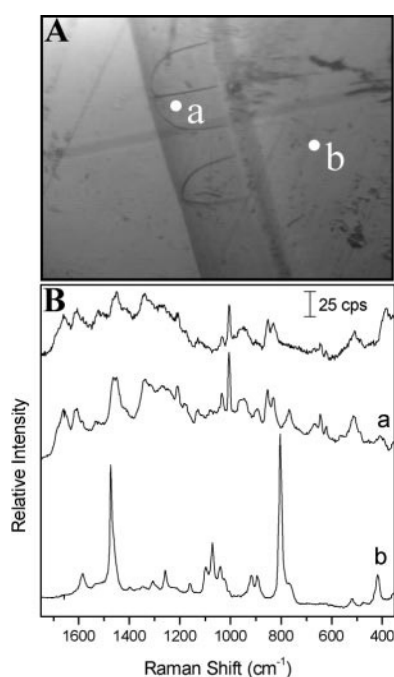


Obr. 4.1: Profil kroužku pro různé koncentrace roztoku lysozymu. Měření probíhalo od vnějšího okraje k vnitřnímu. Ve výseku je zobrazena závislost maximální výšky kroužku na koncentraci [Ortiz et al., 2006]

Nepřímo změřili výškový profil kroužku také Kopecký a Baumruk (2006), kteří podle intenzity spektrálních pásů albuminu, které neměnila svoji relativní intenzitu, sestavili graf váženého průměru Ramanovy intenzity v závislosti na měřené pozici. Výšku kroužku vytvořeného z kapky o objemu 2 μl a koncentraci 0,1 mg/ml odhadli podle interference okrajů na asi 600 nm.

V experimentu popsáném v [Zhang et al., 2004] byly zkoumány vzorky aminokyseliny a proteinu pomocí klasické Ramanovy spektroskopie v pevném stavu a jejich roztoky pomocí DCDR. U výsledných spekter byl srovnán signál pozadí a bylo zjištěno, že vzorek měřený metodou kapkově nanášených povlaků vytváří asi desetkrát menší signál pozadí – fluorescence než stejný vzorek bez jakýchkoliv úprav a asi třikrát menší než vzorek upravený metodou iluminace. Autoři dále rozpustili inzulin a lysozym ve vodném roztoku s pufrům. Poměr koncentrací protein:pufr byl

1:100 respektive 1:1000. Po vysušení kapky bylo zjištěno, že Ramanova spektra měřená na okraji se podobají spektru inzulínu/lysozymu a liší se od spektra získaného z usazeniny uvnitř, které odpovídá spektru použitého pufru (obr. 4.2). Tedy i přes stokrát (resp. tisíckrát) větší koncentraci pufru se podařilo získat dvě různá Ramanova spektra. Rozdíly ve spektrech vysvětlují autoři tím, že nečistoty, které zaviňují fluorescenci, mají nízkou počáteční koncentraci a usazují se později než špatně rozpustné proteiny. Jejich usazování je pak rovnoměrné po celé styčné ploše kapky. Stejně pufr, který je dobře rozpustný, se usazoval později a rovnoměrně.

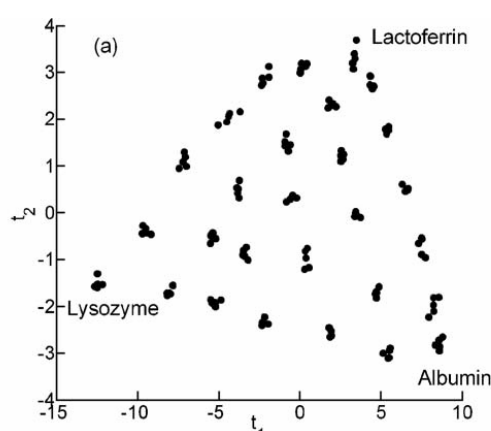


Obr. 4.2: (A) Obrázek kroužku vzniklého vysušením kapky roztoku inzulínu a pufru. (B) Spektra z oblastí *a* a *b* na obrázku, nahoře spektrum inzulínu

Různě rozpustné látky by se tedy obecně měly usazovat v různých částech povlaku. Toto tvrzení ale není dle [Zhang et al., 2004] univerzálně použitelné, například látky, které při vypařování kapky nekystalizují, se neseparují od ostatních látek, třeba od svých nečistot. Stejně tak látky s vysokou vzájemnou afinitou se při usazování neseparují.

Filik a Stone (2007) zkoumali, zda lze analyzovat pomocí DCDR a analýzy hlavních komponent změny v relativních koncentracích proteinů ve vodném roztoku. Použity byly lysozym, laktoferin a albumin ve stejné celkové koncentraci, jako se nachází v lidských slzách ($\sim 3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Spektra, která byla pořízena ze středu

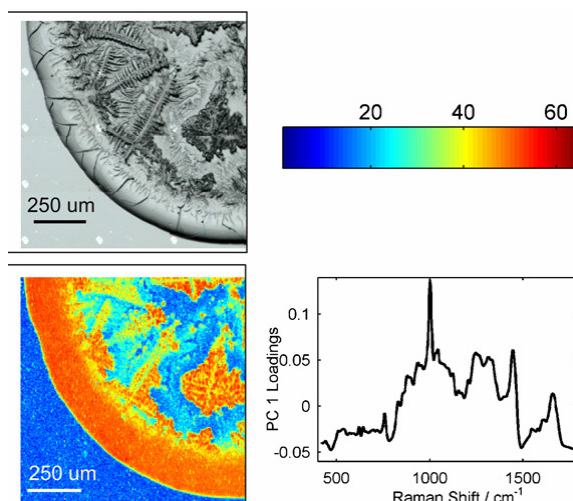
vytvořeného kroužku, byla nejvíce ovlivněna spektrem lysozymu. To bylo způsobeno tím, že rozložení proteinů v kroužku není rovnoměrné, lysozym se ukládá na vnitřní straně kroužku, zatímco laktoferin a albumin směrem k vnějšímu okraji. Tato separace může být způsobena odlišnou hmotností – lysozym je menší molekula. Pro analýzu hlavních komponent použili průměr ze spekter naměřených v různých místech kroužku. Touto analýzou pak bylo možné detekovat malé změny v relativních koncentracích proteinů (obr. 4.3). Autoři předpokládají, že by bylo možné využít tuto metodu pro rychlou a jednoduchou diagnózu očních infekcí, které se projevují právě změnou koncentrace proteinů.



Obr. 4.3: Rozdělení spekter vzorků s různými kombinacemi koncentrací lysozymu, laktoferinu a albuminu [Filik, Stone, 2007]

DCCR spektra vysušené kapky slzy analyzovali Filik a Stone (2008) metodou Ramanova zobrazování (obr. 4.4). Analýzou hlavních komponent rozdělili naměřená spektra na čtyři hlavní složky – proteiny, hydrogenuhličitan sodný s močovinou, lipidy a močovina s lipidy. Autoři také popsali proces vysušování slzy na hydrofobním povrchu. Nejprve se zformuje kroužek, který obsahuje velké množství proteinů a poté se začnou od vnějšího okraje tvořit krystalky obsahující chlorid sodný, močovinu a proteiny, jejichž okraje vysychají jako poslední. Lipidy jsou zcela nerozpustné a nevytvářejí žádnou strukturu.

Djaoued et al. (2007) měřili spektrum kyseliny domoové (domoic acid), neurotoxinu, který způsobuje ztrátu krátkodobé paměti. Zjistili, že se spektrum mění v závislosti na koncentraci vodného roztoku a jsou odlišné od spektra krystalické formy. Například zmizely téměř všechny pásy vibrací karboxylové skupiny. Dále jsou všechny pásy rozšířené, což je způsobeno změnou délky vazeb při interakci s molekulami vody.



Obr. 4.4: Obrázek vysušené slzy a výsledek analýzy hlavních komponent, zobrazená složka je protein. Červená barva znamená velký, modrá barva malý obsah této složky [Filik a Stone, 2008]

Ve článku [Ortiz et al., 2004] autoři srovnávali tři různé inzulinů, které se od sebe velmi málo liší, jejich Ramanova spektra jsou ale identifikovatelná.

V [Cipriani, Ben-Amotz, 2005] změřili autoři Ramanova spektra tří molekul skupiny taxanů metodou kapkově nanášených povlaků o různých počátečních koncentracích roztoků (1 mM–0,001 mM) a měřením Ramanova spektra pevné látky. Tato spektra vzájemně srovnali, určili původ jednotlivých pásů a porovnali s kvantově-mechanickým výpočtem energetických hladin těchto molekul pomocí Hartree-Fockovy metody. Vypočtené spektrum bylo v dobré shodě s pozorovaným, odlišnosti vysvětlují autoři tím, že u velkých molekul se jednotlivé atomy ovlivňují složitějším způsobem, než předpokládá teorie.

Das et al. (2008) použili jako podložku pro metodu kapkově nanášených povlaků SERS substrát se zlatými nanočástičkami. Uvádí, že spektrum myoglobinu lze takto získat již z attomolových koncentrací.

Ve článku Xie et al. (2008) je popsána nová metoda, která využívá DCDR – ultrafiltrační Ramanova diference (UFRD), složení ultrafiltrace, DCDR a diferenční spektroskopie, pomocí které autoři zkoumali vázání ligandů na protein. Takto lze ovšem zkoumat pouze ligandy se silným Ramanovým signálem.

Ortiz et al. (2007) zkoumal formování amyloidových vláken z inzulinu pomocí DCDR diferenční spektroskopie. Formování vláken způsobilo změny v oblastech spektra amid I, amid III a peptidické kostry proteinu, což odpovídá zvýšenému množství β -skládaných listů.

Xie et al. (2004) zjišťovali, zda se pomocí DCDR dá zjistit stupeň fosforylace tyrosinu v peptidech. Rozdíl fosforylace byl patrný z kolapsu dubletu na 820–850 cm^{-1} a oslabení pásu nacházejícího se u 1205 cm^{-1} . Spektra vzorků s různým stupněm fosforylace byla zpracována metodou částečných nejmenších čtverců.

Moger et al. (2007) ve své práci porovnávali povrchově zesílená Ramanova spektra a DCDR spektra fosforylovaných a nefosforylovaných peptidů, které obsahovaly tyrosin a serin a měly počáteční koncentraci 100 μM . U obou metod byly pozorovány prakticky stejné změny ve spektrech způsobené fosforylací, i když jsou pásy SERS spektra zesíleny selektivně a spektrum obsahuje i pásy, které se v nezesíleném spektru nevyskytují.

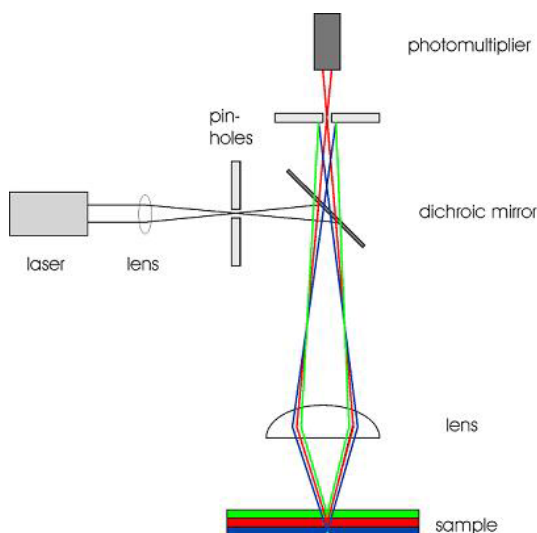
Xie et al. (2005) měřili změny ve spektrech fosforylovaných a nefosforylovaných aminokyselin (serin a threonin), v závislosti na pH a ve spektrech získaných metodou DCDR rozdílly spekter fosforylovaných a nefosforylovaných peptidů v kyselém (pH 3) a zásaditém (pH 8) prostředí. U fosforylovaných peptidů dochází ke změnám spektra okolo 980 cm^{-1} , zatímco u nefosforylovaných k těmto změnám nedochází. Změny ve spektru některých nefosforylovaných peptidů jsou podle autorů způsobeny změnami sekundární struktury proteinu závislými na pH.

Zhang et al. (2005) zkoumali místo fosforylace na peptidu, jehož sekvence je odvozena ze sekvence proteinu tyrosin kináza. Pro srovnání použili spektra fosforylovaného a nefosforylovaného serinu, treoninu a tyrosinu.

5. Konfokální mikroskop

Principem konfokálního mikroskopu je vyloučení velké části světla odraženého od vzorku, z míst, která se nenacházejí v ohniskové rovině mikroskopu. Pro klasický mikroskop totiž platí, že zobrazuje světlo odražené od různě hloubkově vzdálených částí vzorku. Pokud má pozorovaný vzorek tloušťku větší než je hloubka ostrosti objektivu, některé části neleží v ohniskové rovině a vytvářejí v objektivu neostří obraz. Vyloučením světla odrážejícího se od těchto částí dostaneme obraz s lepším kontrastem a pouze z tenké vrstvy vzorku.

Jako zdroj světla se pro konfokální mikroskop používá laserový paprsek zaostřený na štěrbinu, která určuje aperturu svazku. Tato štěrbinu je zobrazena objektivem na vzorek jako ploška o jistém průměru. Stejný objektiv pak zobrazuje odražené a rozptýlené světlo (a případně fluorescenci) na detektor. Mezi detektorem a objektivem se nachází druhá štěrbinu, která na detektor propustí pouze světlo získané z části, na kterou je mikroskop zaostřen. Tato štěrbinu je tedy zaostřena na stejné místo jako první štěrbinu a objektiv, a proto se tento typ mikroskopu nazývá konfokální (obr 5.1).



Obr. 5.1: Schéma konfokálního mikroskopu (převzato z webové stránky Johannes Gutenberg Univerzität Mainz)

To, že se zdroj zobrazuje na vzorek jako ploška a ne jako ideální bod, je dáno difrakcí světla. Každý bod vzorku se tudíž zobrazí na takzvaný Airyho disk

(kroužek), jehož poloměr závisí na vlnové délce světla a na numerické apertuře čočky objektivu. Tento poloměr omezuje rozlišení mikroskopu – nejmenší vzdálenost dvou bodů, které lze ještě rozlišit je přibližně rovna právě poloměru Airyho disku [Semwogerere, Weeks, 2005].

Výhodou konfokálního zobrazení je kromě lepšího kontrastu také možnost zjišťovat třidimenzionální strukturu postupným zaostřováním na různě hluboké vrstvy vzorku. Nevýhodou je naopak velmi malé zorné pole a tedy nutnost postupovat při získávání obrazu celé roviny bod po bodu.

5.1. Integrovaný Ramanův systém HR800

HR800 je integrovaný Ramanův systém, skládající se z mikroskopu, který je konfokálně spojen se spektrografem o ohniskové vzdálenosti 800 mm. Systém používá uspořádání pro měření v geometrii zpětného rozptylu.

5.1.1. Základní komponenty integrovaného Ramanova systému

Jako vnitřní laser je použit helium-neonový laser o výkonu zhruba 20 mW s vlnovou délkou 632,8 nm. V zadní části přístroje se nachází vstup pro externí laser, je možné připojit prakticky jakýkoli laser s vlnovou délkou 440–800 nm. V našem měření jsme použili standardní laser.

Pro oddělení budícího a rozptýleného záření se používá Notch filtr. Je to holografická mřížka, která je specifická pro určitou vlnovou délku, to znamená, že tuto vlnovou délku totálně odráží, zatímco záření o jiné vlnové délce propouští.

Konfokální štěrbina mikroskopu je nastavitelná v rozmezí 0–1000 μm a nastavuje se v poměru 1,4 \times zvětšení objektivu. Tento poměr vychází z toho, že délka tubusu objektivu je jiná než ohnisková vzdálenost čočky, která vytváří obraz Ramanova svazku na konfokální štěrbinu a tento poměr je právě 1,4.

Systém je v základní sestavě vybaven mikroskopem BX 40 od firmy Olympus se třemi objektivy – 10 \times NA 0,25, 50 \times NA 0,7 a 100 \times NA 0,9 (NA = $n \cdot \sin \alpha$ je numerická apertura, n je index lomu čočky (objektivu) a α sběrný prostorový úhel). Zaostřuje se po 1 μm krocích.

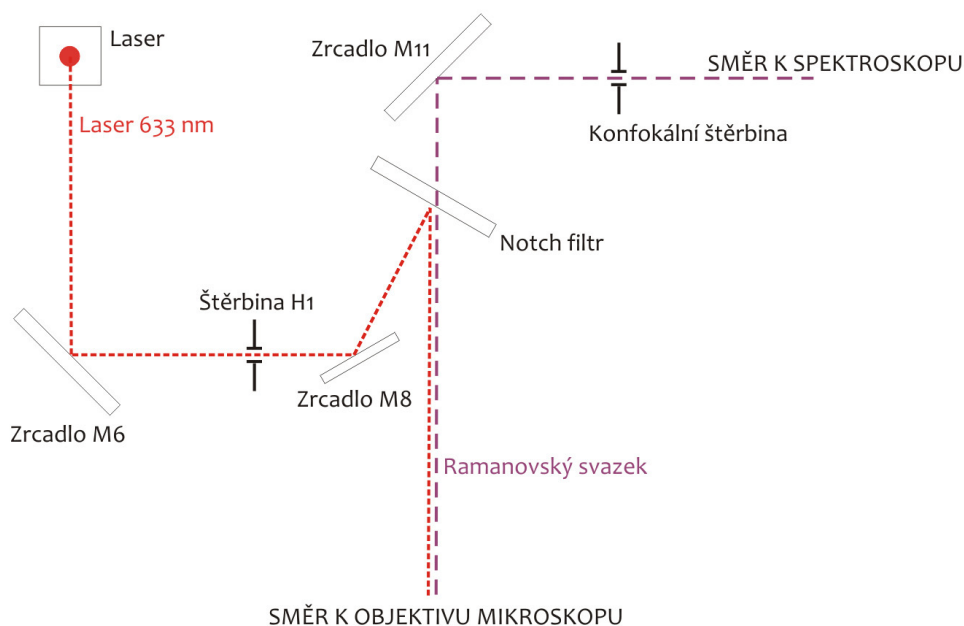
Měření hloubkového profilu vzorku jsme provedli pomocí piezoelektrického členu s rozlišením 0,1 μm a rozsahem 0–100 μm .

Pro měření roztoků v kvetách jsme použili makro adaptér s objektivem o ohniskové vzdálenosti 40 mm, který lze k mikroskopu připevnit místo okuláru.

Jako spektrograf je použit spektrograf s asymetrickou montáží Czerny–Turner, který na výstupu dává rovnoměrné rozložení intenzity [Šípová, 2006]. Vyměnitelné mřížky mají 1800 vrypů/mm (standardní) a 600 vrypů/mm, kterou jsme použili při měření.

5.1.2. Zjednodušený popis optické dráhy laserového svazku

Laserový paprsek je zaostřen na štěrbinu H1 a odražen Notch filtrem směrem k mikroskopu a ke zkoumanému vzorku. Naměřený signál se skládá z elasticky i neelasticky odražených fotonů. Záření rozptýlené elasticky Rayleighovým rozptylem je Notch filtrem odraženo zpět ve směru Zrcadla M8, zatímco neelasticky rozptýlený Ramanův signál Notch filtrem projde a je zobrazen na konfokální štěrbinu, která je následně zobrazena na vstupní štěrbinu spektrografu.



Obr. 5.2: Zjednodušené schéma integrovaného Ramanova systému HR800 [Šípová, 2006]

6. Podložky SpectRIM™

Podložky SpectRIM™, použité pro měření DCDR, vyrobila firma Tienta Sciences. Tyto podložky jsou tvořeny plastovou destičkou o velikosti $2,54 \times 7,62$ cm ($1,0 \times 3,0$ palce), na které je nalepena plochá nerezová destička o rozměrech $2,27 \times 2,27$ cm ($0,9 \times 0,9$ palce), pokrytá hydrofobní vrstvou teflonu o tloušťce menší než 50 nm.

Podložka SpectRIM™ splňuje všechny podmínky, které vyjmenoval Zhang a kol. (2003), je tedy chemicky odolná, má vysokou optickou odrazivost a slabý Ramanův a infračervený signál. Výhodou je její použitelnost pro Ramanovu mikrospektrometrii, hmotnostní spektrometrii a infračervenou mikroskopii, tedy možnost měřit stejný vzorek třemi různými metodami [Tienta Sciences, 2003].



Obr. 6.1: Podložka SpectRim™

7. Měření DCDR spekter mozkomíšního moku

Za hlavní měřenou tělní tekutinu jsme vybrali mozkomíšní mok, jehož vzorky, stejně jako vzorky krevního séra, nám poskytl MUDr. Aleš Bartoš, Ph.D. (Psychiatrické centrum Praha).

Mozkomíšní mok je bezbarvý vodný roztok, který je normálně tvořen 99 % vodou, dále obsahuje proteiny (150–500 mg/l u zdravého jedince, největší podíl má albumin (120–300 mg/l), koncentrace dalších proteinů v moku i v séru ukazuje tab. 7.1), glukózu (kolem 3,3 mmol/l), laktát (1,6 mmol/l), ureu (4,1 mmol/l), ionty Na^+ (asi 150 mmol/l), Cl^- (120 mmol/l), K^+ , Ca^{2+} , HCO_3^- a další látky, například cholesterol, kreatinin a amoniak [Masopust, 2008].

| Proteiny | Jednotky | Mok | Sérum |
|------------------|----------|---------|------------|
| celkový protein | mg/l | 150–500 | 70 000 |
| prealbumin | mg/l | 12–27 | 100–400 |
| albumin | mg/l | 120–300 | 39000 |
| transferrin | mg/l | 7–22 | 1900–3800 |
| IgG | mg/l | 12–40 | 7000–15000 |
| IgA | mg/l | 0,2–2,1 | 800–4000 |
| IgM | mg/l | 0,2–1,2 | 400–2600 |
| orosomukoid | mg/l | 1,5–4,5 | 300–1300 |
| fibrinogen | mg/l | 1,0–4,5 | 3000–6000 |
| antitrypsin | mg/l | 6–15 | 1100–2300 |
| antithrombin III | mg/l | 1–7 | 200–400 |

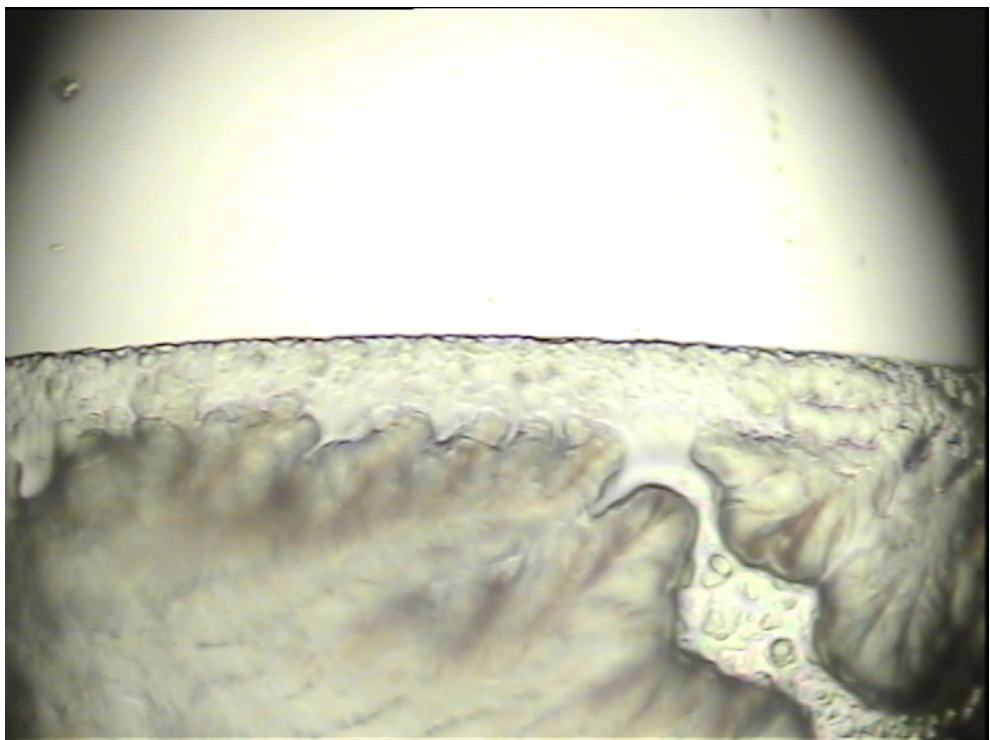
Tab. 7.1: Koncentrace některých proteinů v mozkomíšním moku a v séru

Krevní sérum je nebuněčná složka krve. Je to nažloutlá tekutina tvořená z 90 % vodou, asi ze 7 % proteiny, dále obsahuje glukózu, soli, některé kyseliny a žlučová barviva [Kodíček M., 2007].

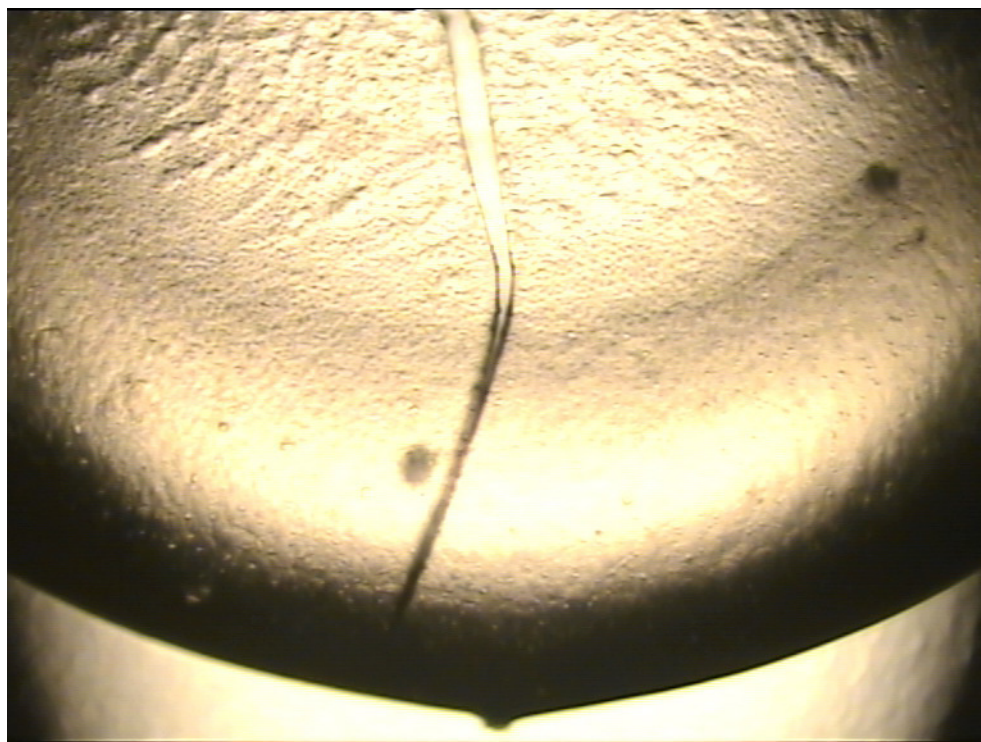
Vzorky mozkomíšního moku a krevního séra byly připraveny nanesením 2 μl vzorku na teflonovou destičku SpectRIM™ a jeho vysušením na vzduchu v běžných podmínkách. Vytvořený povlak jsme pak zobrazili Ramanovým mikrospektrometrem (obr. 7.1 a 7.2), vybrali vhodné místo na okraji kroužku, zaměřili jej objektivem 50 \times a změřili jeho spektrum.



Obr. 7.1: Okraj vysušené kapky mozkomíšního moku. Objektiv 10× Na okraji vysušené kapky je patrný tenký prstenec proteinů, zatímco vnitřek původní kapky je tvořen zrnitými krystalky.



Obr. 7.2: Okraj vysušené kapky mozkomíšního moku. Na okraji je patrná prstencová struktura, v níž se převážně soustředily proteiny ze vzorku. Objektiv 50×.



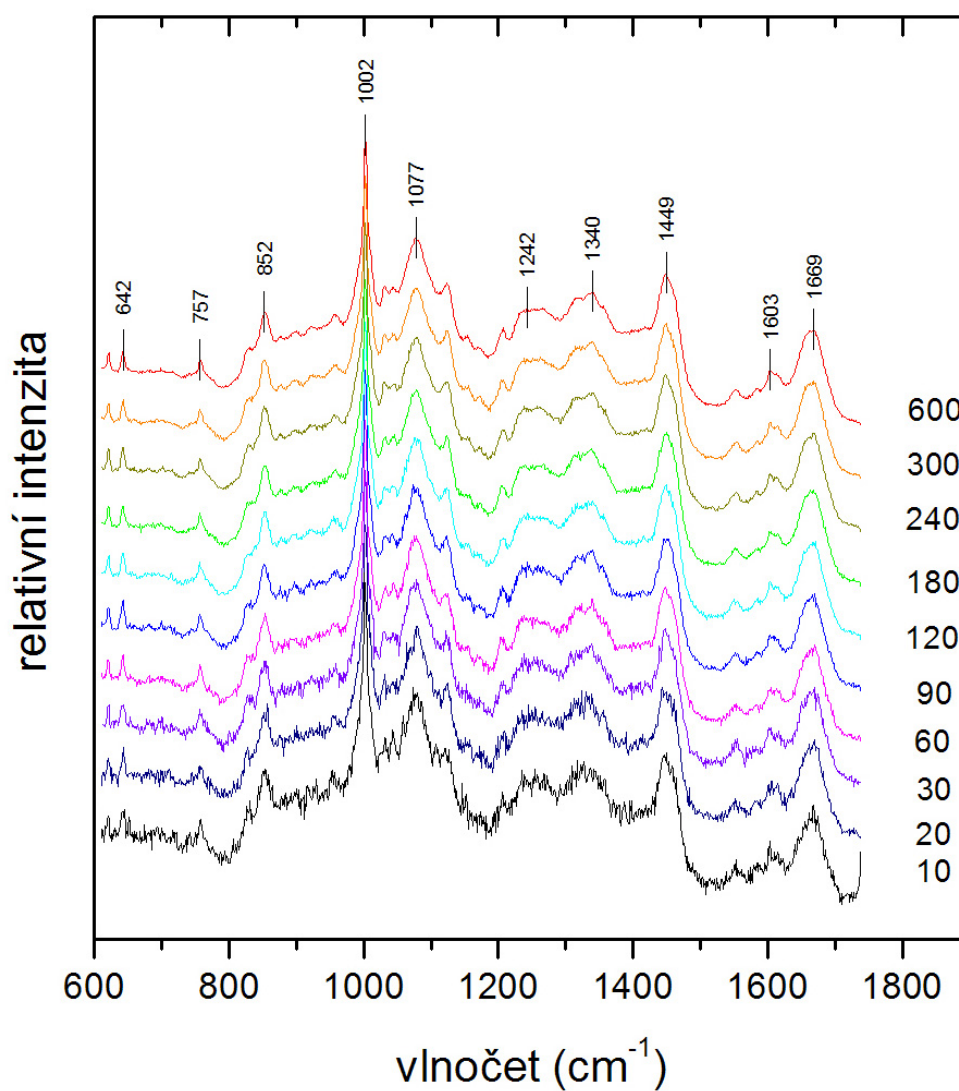
Obr. 7.3: Okraj vysušené kapky krevního séra. Krevní sérum, na rozdíl od mozkomíšního moku nevykazovalo jasně oddělenou strukturu prstence proteinů na okraji původní kapky.

Ramanovo spektrum krevního séra se vzhledem k nerozseparování vzorku na destičce jevílo stejné z libovolného místa a jeho měření tudíž nečinilo potíží. Pro potenciální medicínskou diagnostiku však bylo podstatnější nalezení podmínek vhodných pro měření mozkomíšního moku. Pro zjištění vhodného nastavení mikrospektrometru jsme měřili spektra mozkomíšního moku s různou dobou expozice (obr. 7.4) a s různou šířkou konfokální štěrbinu (obr. 7.5). Spektra byla normalizována na pás fenylalaninu (zhruba 1003 cm^{-1}). Spektrum dobré kvality dostáváme při expoziční době 120 s a pro konfokální štěrbinu $100\text{ }\mu\text{m}$. Pro další měření jsme až na výjimky volili šířku konfokální štěrbinu $200\text{ }\mu\text{m}$ a expoziční dobu 180 a více sekund, čímž byla zaručena vysoká kvalita změřených spekter.

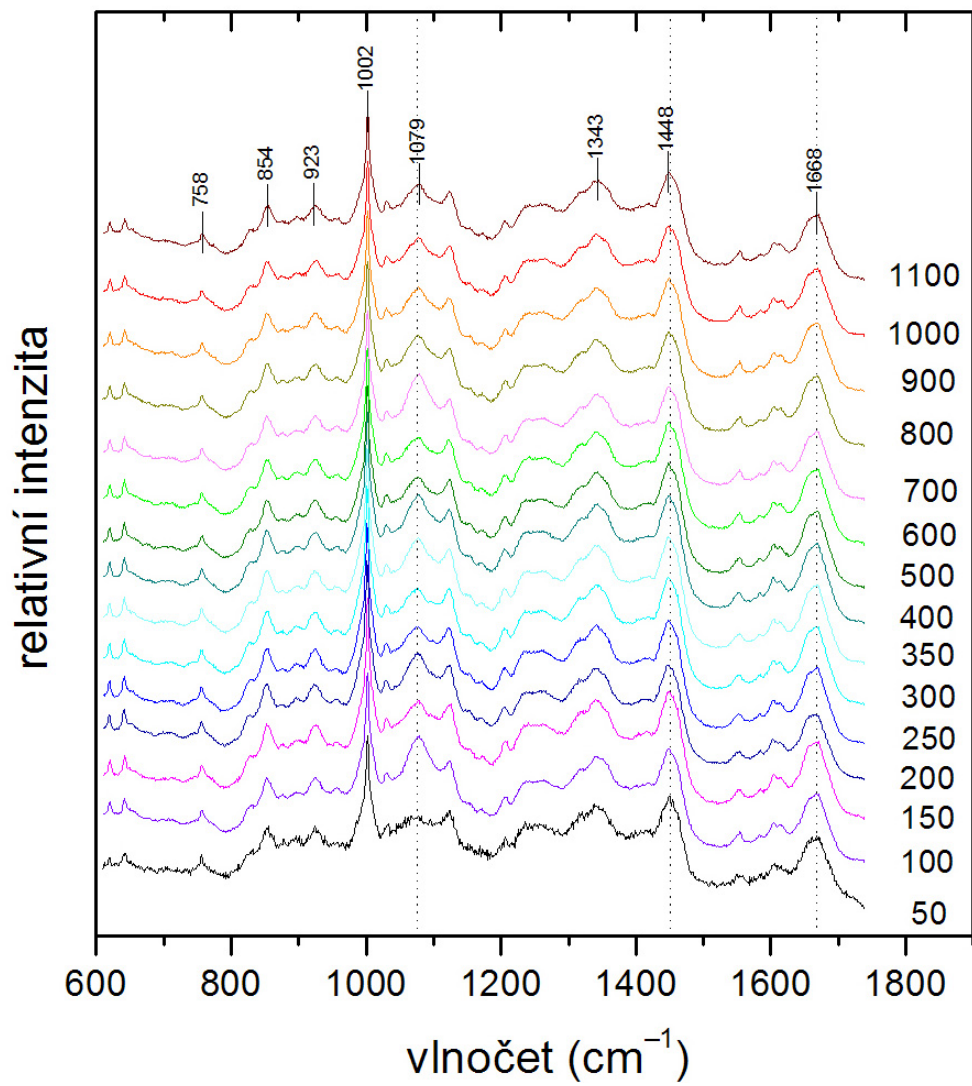
Spektrum s dobou expozice 20 s se prakticky (pomineme-li fluktuace pozadí spektra) až na poměr signál–šum neliší od spektra s expozicí 10 minut, jak lze vidět na obrázku 7.6. Ani při delší expozici vzorku tedy nedochází k jeho fotodegradaci.

Při zvětšující se konfokální štěrbině získáváme stále více signálu i z oblastí, které nejsou v ohniskové rovině mikroskopu. Tyto oblasti mohou mít mírně jiné složení, a proto se také mění celkové spektrum. Pásky, ve kterých se mění intenzita, jsou přibližně v okolí 1079 cm^{-1} , což odpovídá valenční vCC vibraci), 1448 cm^{-1}

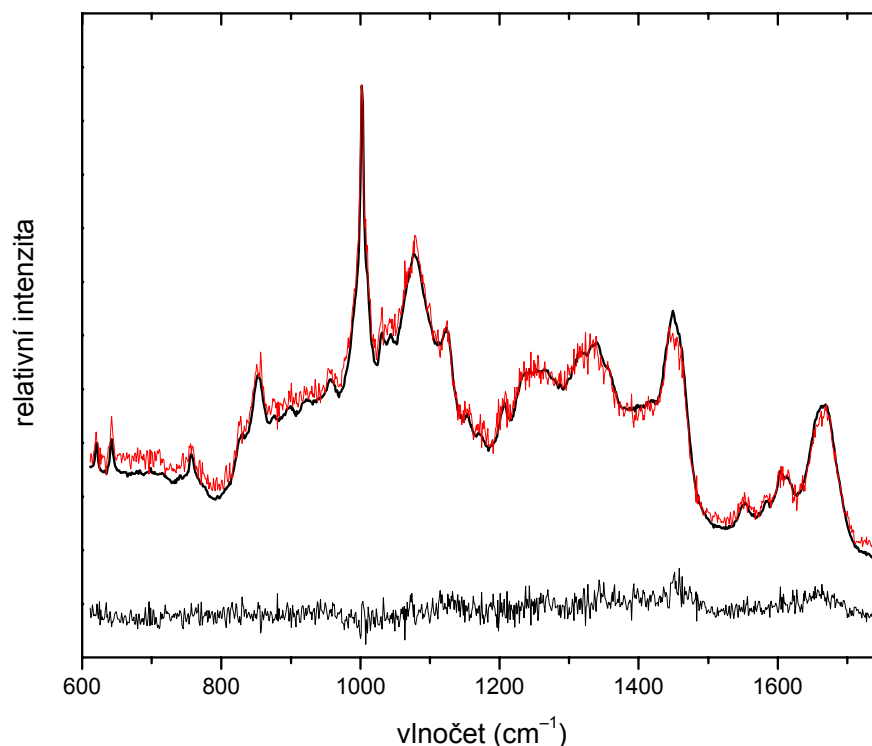
(deformační δCH_2) a 1668 cm^{-1} (amid I), jak lze vidět na obr. 7.7, který vznikl postupným odečítáním po sobě jdoucích spekter z obr. 7.5. Otevírání štěrbiny nad $800\text{ }\mu\text{m}$ již nepřináší žádné změny ve spektru.



Obr. 7.4: Spektra mozkomíšního moku měřená s různou expoziční dobou, kterou, v sekundách, udávají čísla po pravé straně jednotlivých spekter



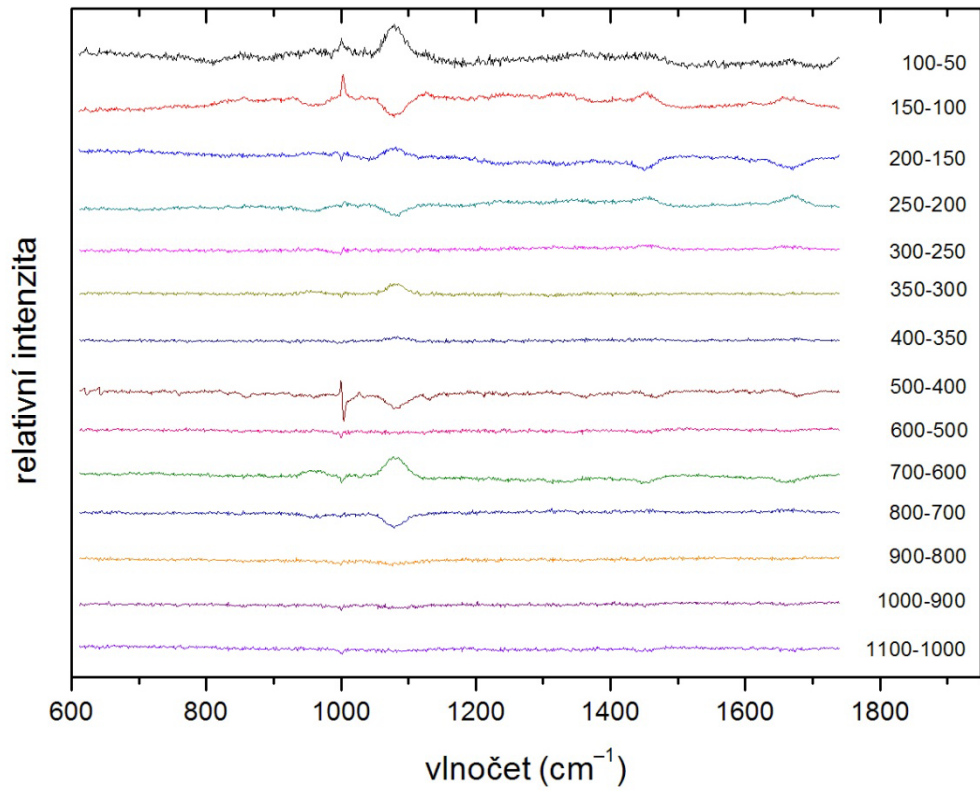
Obr. 7.5: Spektra mozkomíšního moku pro různou šířku konfokální štěrbin. Šířka je udána v mikrometrech po pravé straně jednotlivých spekter



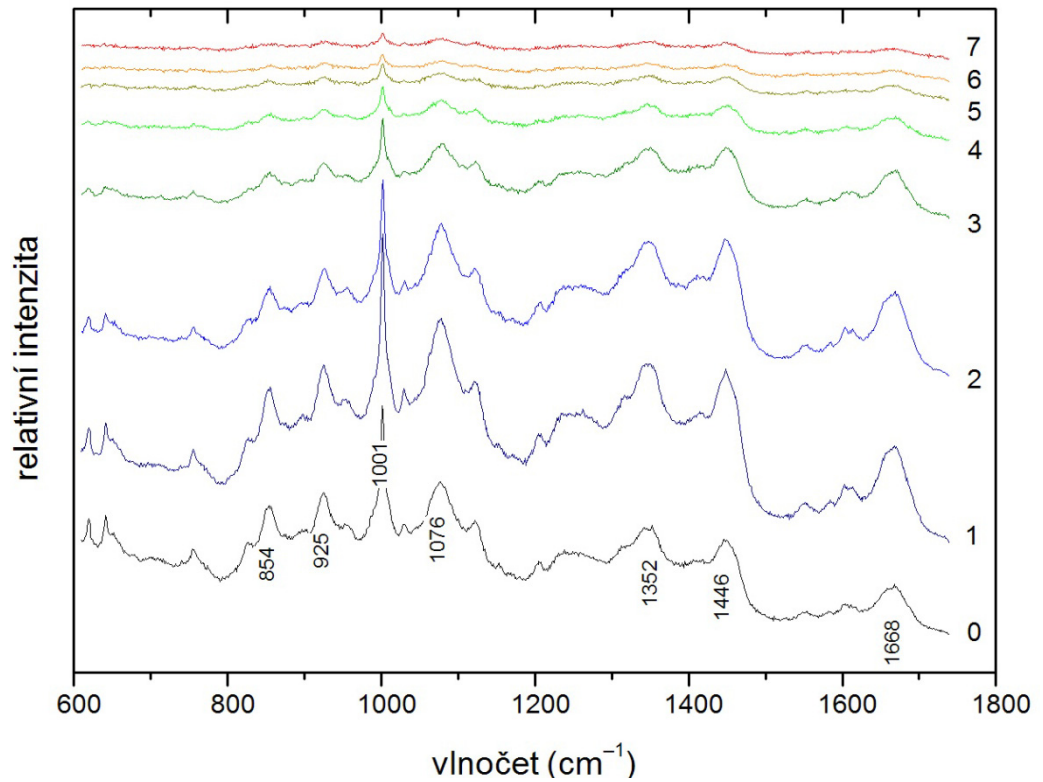
Obr. 7.6: Rozdílové spektrum (dole) spektra měřeného 10 minut (černé) a 20 sekund (červené)

Abychom zjistili přibližnou šířku usazené vrstvy a změnu signálu v různých hloubkách vzorku, využili jsme možnosti měření hloubkového profilu pomocí piezoelektrického členu mikroskopu (obr. 7.8). Spektra 0 až 7 jsou měřena postupně s krokem jednoho mikrometru od povrchu destičky směrem nahoru. Aby se oblasti, ze kterých se měřila jednotlivá spektra, překrývaly co nejméně, nastavili jsme při tomto měření konfokální štěrbinu na 100 μm . Rozdílové spektrum 0 μm – 3 μm vidíme na obrázku 7.9. Rozdíl spekter není velký, liší se pouze intenzita CH_2 deformací (1448 cm^{-1}) a oblast amid I (1665 cm^{-1}).

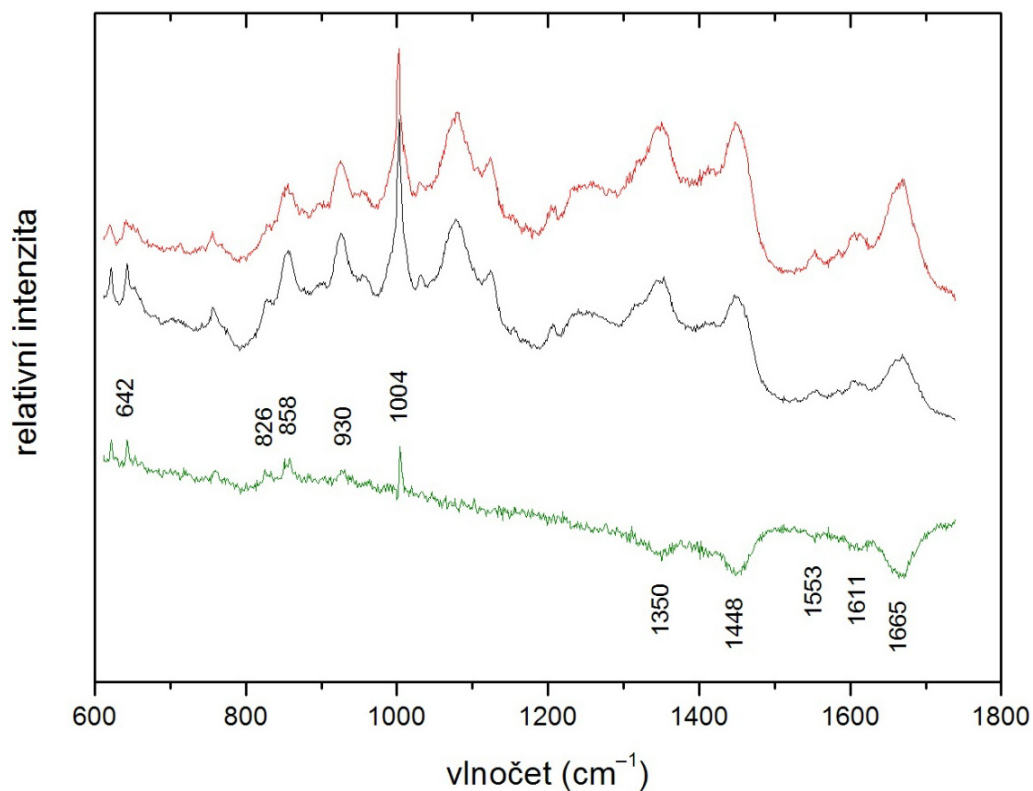
Na rozdíl od DCDR vzorků čistého proteinu, pro něž Zhang et al. (2003) uvádí, že spektra se nezměnila v řádu týdnů, podléhají vzorky mozkomíšního moku na podložce degradaci. Spektra naměřená v březnu se velmi liší od spekter stejného vzorku naměřených v prosinci předchozího roku (obr. 7.10). Došlo k výraznému poklesu signálu v oblasti vibrací fenylalaninu (1003 cm^{-1}), naopak ke zvýšení signálu kolem 1357 cm^{-1} a 2930 cm^{-1} . Nový pás kolem 2241 cm^{-1} by mohl patřit vibracím S–H.



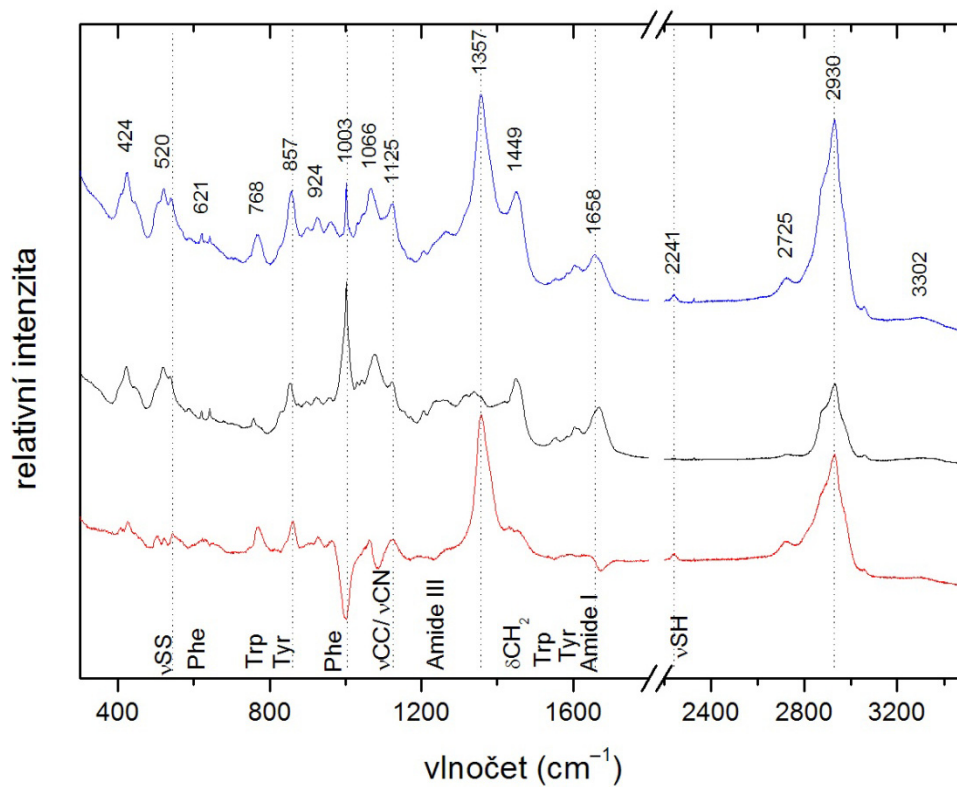
Obr. 7.7: Rozdíly mezi jednotlivými spektry naměřenými s různou konfokální štěrbinou



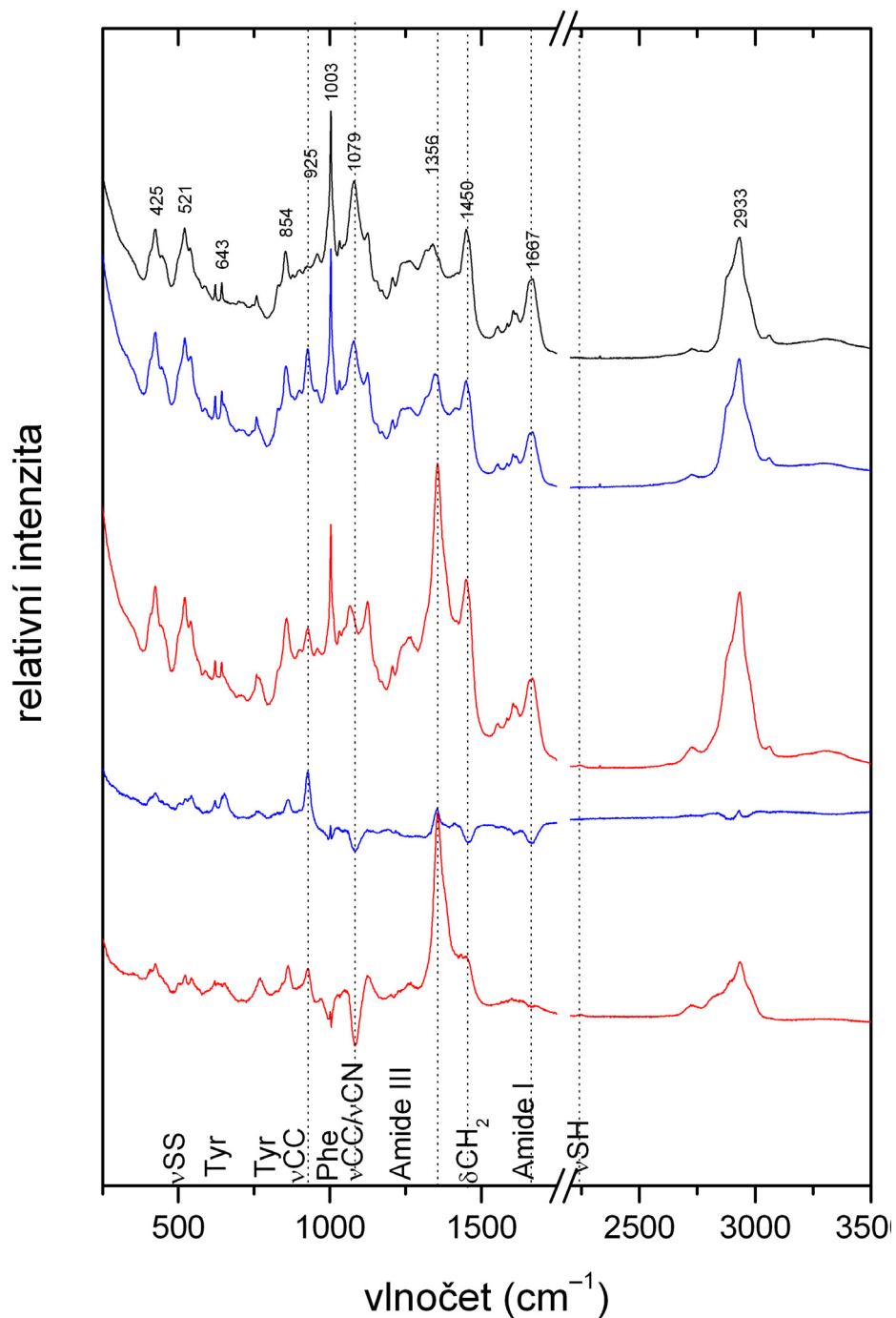
Obr. 7.8: Spektra hloubkového profilu prstence mozkomíšního moku, čísla udávají vzdálenost od povrchu destičky v mikrometrech



Obr. 7.9: Rozdílové spektrum (zelená křivka) spektra na vzdálenosti 0 μm (černá) a 3 μm (červená) uvedených na obr. 7.7



Obr. 7.10: Spektrum mozkomíšního moku v prosinci (černá křivka) a v březnu následujícího roku (modrá) a jejich rozdíl (červená)



Obr. 7.11: Spektra měřená 5. 3. (černé), 13. 3. (horní modré) a 3. 5. (horní červené) a jejich rozdíly 13.3.–5.3. (dolní modré) a 3.5.–5.3. (dolní červené)

Je tedy možné, že dochází ke štěpení S–S můstků, v jejichž charakteristické oblasti (kolem 520 cm^{-1}) také došlo ke změnám.

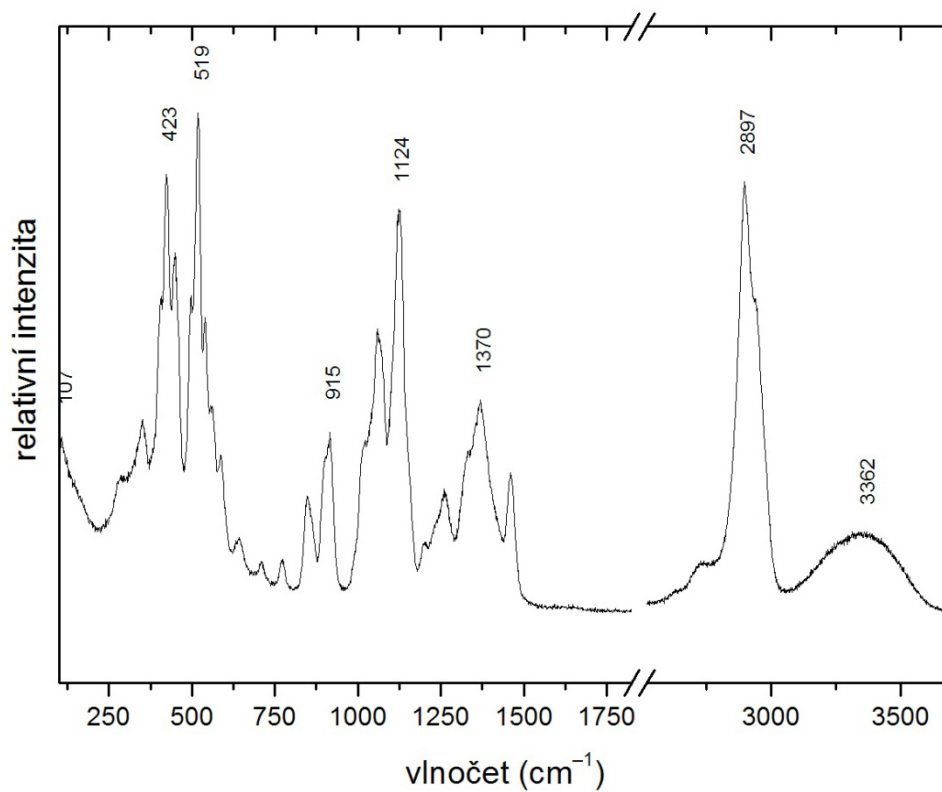
Abychom zjistili, jak rychle dochází k degradaci, měřili jsme jiný vzorek mozkomíšního moku 5. března, 13. března a 3. května. Na obrázku 7.11 vidíme, že po týdnů jsou nejvýraznější změny v pásech na 925 (vzrůst) a 1079 (pokles) cm^{-1}

(valenční vibrace C–C). Tato změna je ale pozorovatelná již po třech dnech od nanesení vzorku, jak lze zjistit srovnáním spekter na obr. 7.4 a 7.5, které byly měřeny 5. a 8. března. Další změny probíhají v oblasti vibrací amidu I, v oblasti deformačních vibrací CH₂ a v oblasti kolem 1356 cm⁻¹. Pro vzorek starý dva měsíce lze říci, že jeho degradace je již téměř úplná.

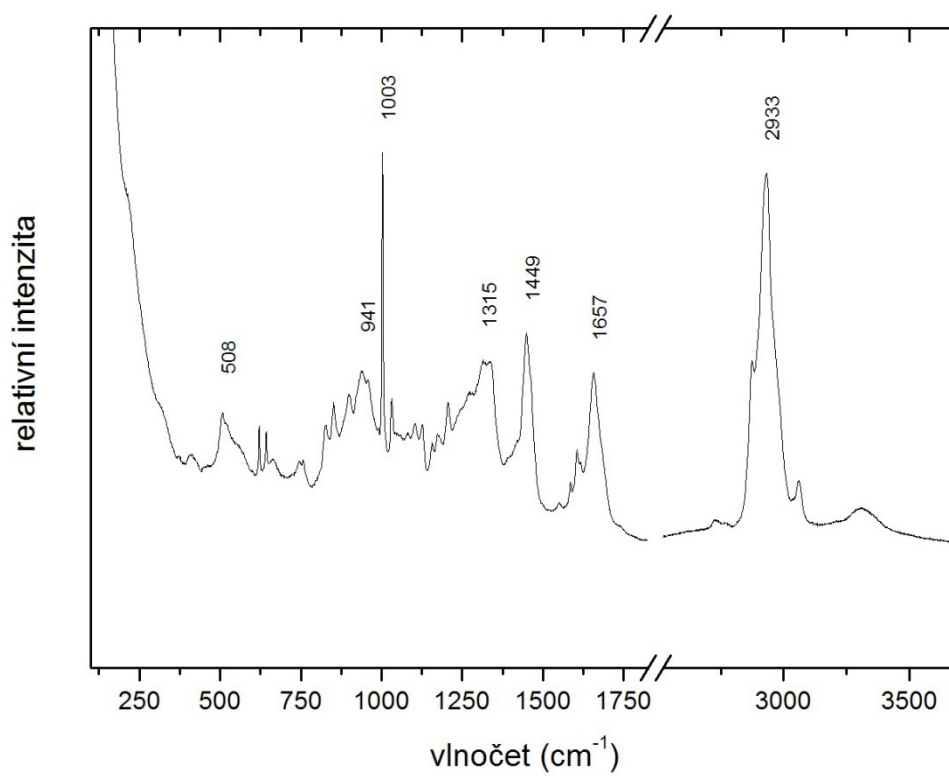
Stejný vzorek mozkomíšního moku jsme ve stejnou dobu nanесли na druhou destičku, kterou jsme po vyschnutí okamžitě zamrazili na –80 °C. Spektrum jsme změřili po dvou měsících, tedy v době, kdy byl již vzorek uchovávaný při pokojové teplotě zcela degradovaný, a porovnali jej s původním spektrem změřeným 5. března. Na zamražené destičce došlo k mírné degradaci, která je pozorovatelná ve stejných oblastech jako degradace vzorku uchovaného při pokojové teplotě za tři dny, tedy v oblasti pásů 925 a 1079 cm⁻¹. Nízká teplota tedy degradaci zcela nezabránila, pouze ji výrazně zpomalila.

Abychom mohli lépe posoudit složení mozkomíšního moku, změřili jsme pro srovnání DCDR spektra hlavních složek moku, tedy glukózy, močoviny a albuminu. Na obr. 7.12 je spektrum získané z vyschlé 2μl kapky vodného roztoku glukózy (Merck) o koncentraci 6,6 mg/ml, na obr. 7.13 spektrum z 2μl kapky vodného roztoku lidského sérového albuminu o koncentraci 0,2 mg/ml (Imuna) a na obr. 7.14 spektrum z 2μl kapky vodného roztoku močoviny (Serva) o koncentraci 6 mg/ml. Tato spektra jsme zkusili odečíst od spektra mozkomíšního moku. Výsledkem jsou DCDR spektra uvedená na obr. 7.15 pro mok a albumin a 7.16 pro mok, albumin a glukózu.

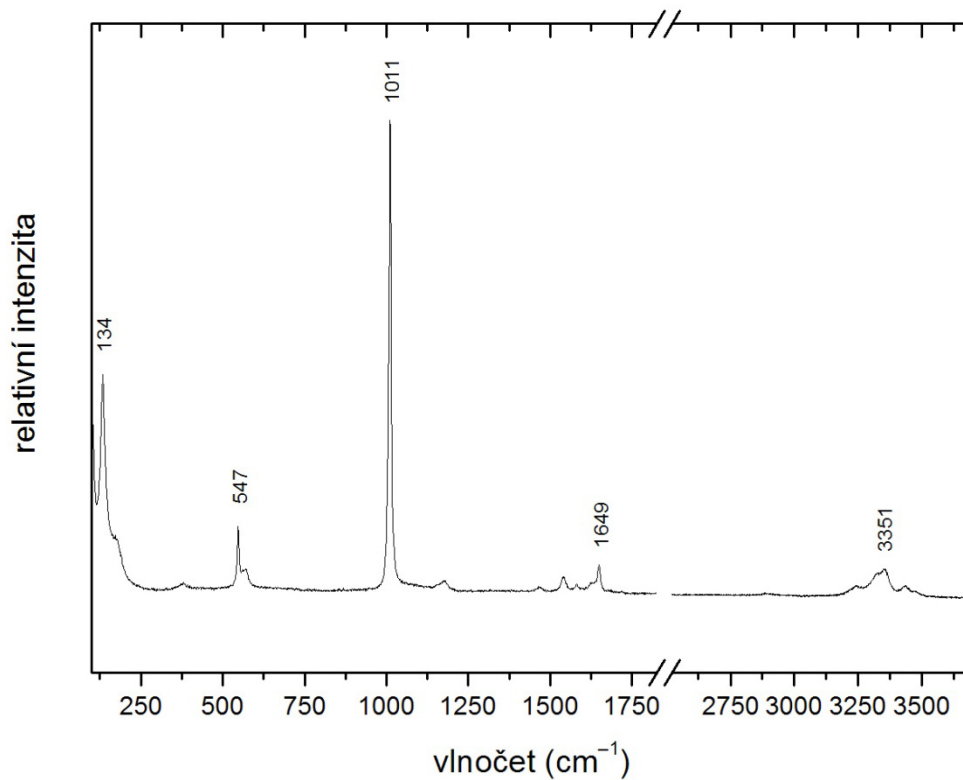
Po odečtení spektra albuminu, což je protein s největší koncentrací, je patrné (obr. 7.15), že signál proteinů poklesl a začalo dominovat spektrum glukózy, jak lze vidět i na obr. 7.16. Můžeme tedy říci, že albumin je jednou z hlavních komponent měřeného kroužku. Po odečtení spektra glukózy od tohoto rozdílového spektra jsme dostali spektrum na obr. 7.16. Tomuto zbytkovému spektru dominují pásy 1007 a 1080 cm⁻¹ a spektrum neodečtených proteinů (oblast amidu I a amidu III). Odečtením spektra močoviny již nezískáme výrazně jiný výsledek, protože močovina má jen jeden výrazný pík na 1011 cm⁻¹. Zbytkové spektrum jsme srovnali se spektrem laktátu (Schradler B., 1989), tedy další látky, která se nachází v mozkomíšním moku. Signál laktátu však ve spektru není dobře patrný a tak původ dominantních pásů není zcela jasný.



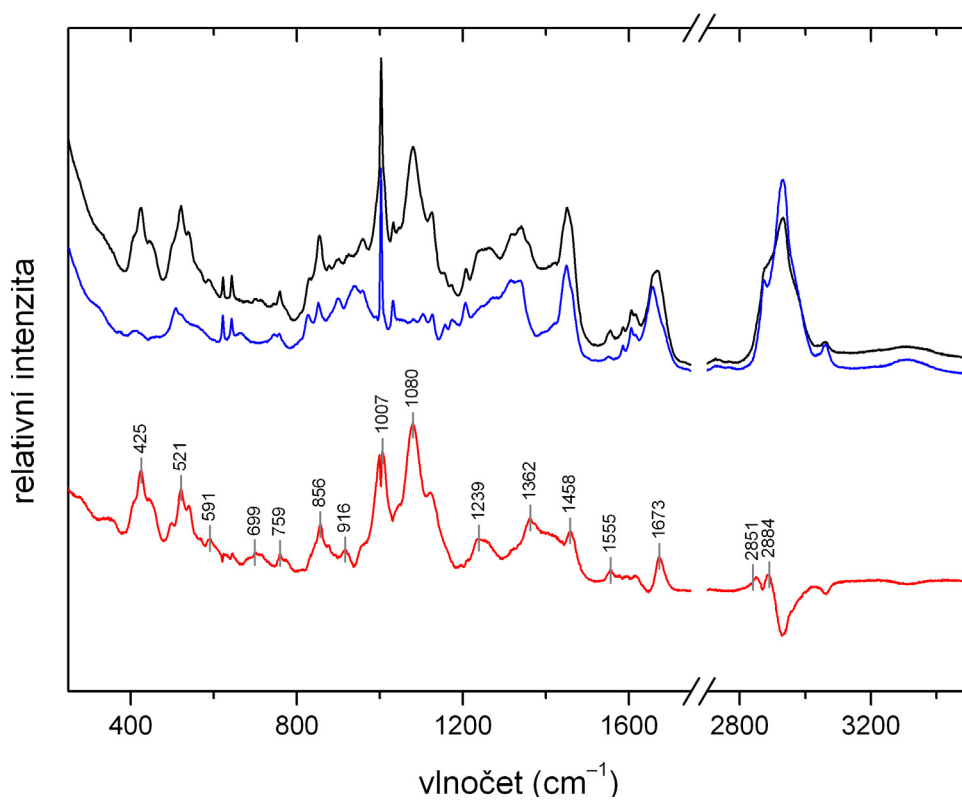
Obr. 7.12: DCDR spektrum glukózy (koncentrace 6,6 mg/ml)



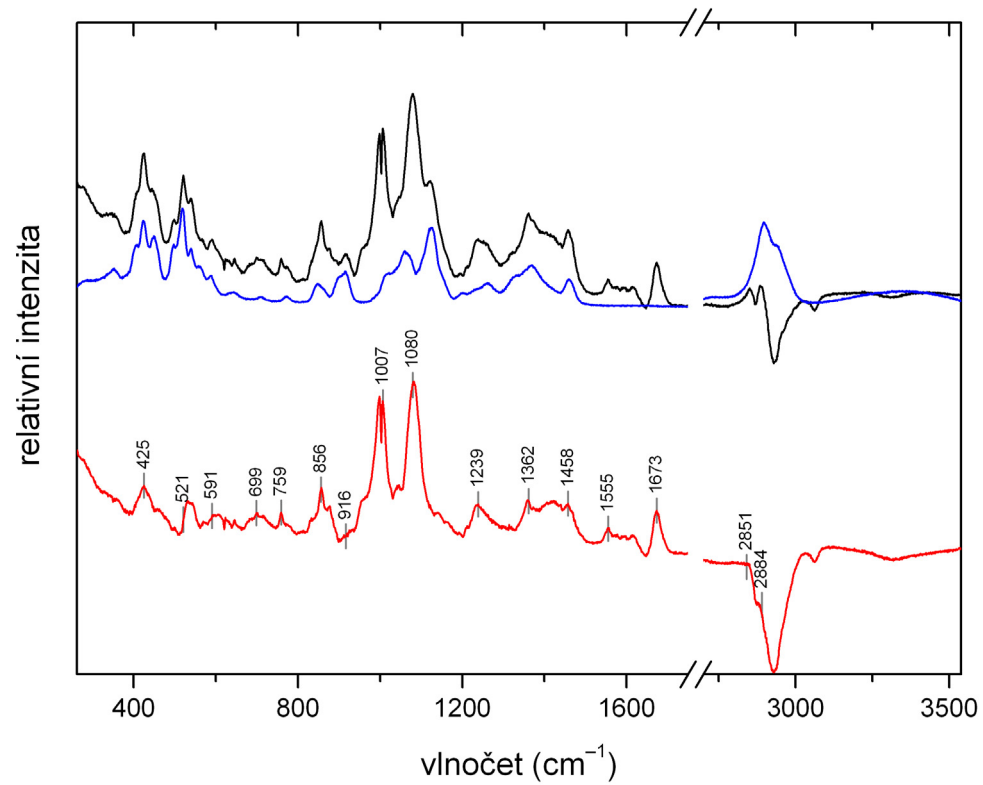
Obr. 7.13: DCDR spektrum lidského sérového albuminu (koncentrace 0,2 mg/ml)



Obr. 7.14: DCDR spektrum močoviny (koncentrace 6 mg/ml)



Obr. 7.15: Rozdílové spektrum (červeně) spektra mozkomíšního moku (černé) a lidského sérového albuminu (modré)



Obr. 7.16: Rozdílové spektrum (červené) rozdílového spektra z obr. 7.14 (černé) a glukózy (modré)

8. Diskuze výsledků a závěr

Konfokalita mikroskopu zaručuje relativně malou oblast sběru signálu. Při zvětšování této oblasti se může měnit její celkové složení. Mozkomíšni mok při vysoušení vytváří složitou strukturu krystalků, jejichž složení se liší od složení kroužku, a spodní vrstvy kroužku mohou být poškozeny [Kopecký, Baumruk, 2006], je proto vhodné – buď nastavit konfokální šterbinu na nízkou hodnotu a měřit z dobře definované vrstvy dané fokusací mikroskopu na plochu destičky, nebo naopak rezignovat na konfokalitu a při měření tak sbírat signál z celé vrstvy přes všechny nehomogenity ve vzorku.

Možnost odhadu tloušťky kroužku nám dává měření hloubkového profilu. Měřitelný signál se nachází pouze v oblasti o výšce přibližně 3 μm , spektra ve větší výšce jsou jen signálem odraženým destičkou (obr. 7.7). Pokud budeme předpokládat hloubkové rozlišení při konfokální šterbině 100 μm 3–4 μm vychází, že vrstva kroužku není tlustší než 1 μm . To dobře koresponduje s dříve publikovanými výsledky [Ortiz et al., 2006], které pro koncentraci proteinu 1 μM udávají výšku prstence 1 μm (obr. 4.1).

Stejně jako Ortiz et al. (2006) jsme nepozorovali žádné změny vzorku způsobené fotodegradací. Ovšem na rozdíl od vzorku čistého proteinu, který se neměnil v řádu týdnů (Zhang et al., 2003), dochází k degradaci mozkomíšního moku na destičce uchované v běžných podmínkách velice rychle. Změny se objevují již v průběhu tří dnů. To znamená, že pro zajištění reprodukovatelných spekter mozkomíšního moku je třeba vzorky změřit co nejdříve po nanesení nebo je nutné nalézt vhodný způsob uchovávání destiček a tekutých vzorků za nízkých teplot pro pozdější měření. Ovšem ani tak není skladovatelnost vzorků neomezená.

Závěrem lze říci, že Ramanova spektroskopie je potenciálně velice vhodným nástrojem v medicínské diagnostice mozkomíšního moku, i když se ukazuje, že měření mají svá úskalí, jak co do nalezení vhodných podmínek, tak především v otázce manipulace se vzorky samotnými. Předkládaná práce je však vůbec první studií v dané oblasti užití DCDR spektroskopie a jako první krok ji od aplikovatelnosti v medicínské diagnostice dělí velké množství experimentální práce kterou bude třeba vykonat.

9. Literatura

- Amharref N., Beljebbar A., Dukic S., Venteo L., Schneider L., Pluot M., Manfait M. (2007): Discriminating healthy from tumor and necrosis tissue in rat brain tissue samples by Raman spectral imaging. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 2605–2615.
- Banerjee H. N., Zhang L. (2007): Deciphering the finger Prints of Brain Cancer Astrocytoma in comparison to Astrocytes by using near infrared Raman Spectroscopy. *Mol. Cell. Biochem.* **295**, 237–240.
- Berger A. J., Itzkan I., Feld M. S. (1997): Feasibility of measuring blood glucose concentration by near-infrared Raman spectroscopy. *Spectrochim. Acta A* **53**, 287–292.
- Berger A. J., Koo T. W., Itzkan I., Horowitz G., Feld M. S. (1999): Multicomponent blood analysis by near-infrared Raman spectroscopy. *Appl. Optics* **38**, 2916–2926.
- Caspers P. J., Lucassen G. W., Carter E., Bruining H., Puppels G. J. (2001): In Vivo Confocal Raman Microspectroscopy of the Skin: Noninvasive Determination of Molecular Concentration Profiles. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 434–442.
- Caspers P. J., Lucassen G. W., Puppels G. J. (2003): Combined In Vivo Confocal Raman Spectroscopy and Confocal Microscopy of Human Skin. *Biophys. J.* **85**, 572–580.
- Cipriani P., Ben-Amotz D. (2005): Characterization of select members of the taxane family using Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **36**, 1052–1058.
- Das G., Mearini F., De Angelis F., Prasciolu M., Liberale C., Patrini M., Di Fabrizio E. (2008): Attomole (amol) myoglobin Raman detection from plasmonic nanostructures. *Microelectronic Eng.* (v tisku).
- Deegan R. D., Bajakin O., Dupont T. F., Huber G., Nagel S. R., Witten T.A. (1997): Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature* **389**, 827–829.
- Diem M. (1993): Introduction to modern vibrational spectroscopy. John Wiley & Sons, New York – Chichester – Brisbane – Toronto – Singapore.
- Djaoued Y., Balaji S., Priya S. (2007): Non-resonance micro-Raman spectroscopic studies on crystalline domoic acid and its aqueous solutions. *Spectrochim Acta A* **67** (5), 1362–1369.
- Dou X., Yamaguchi Y., Yamamoto H., Doi S., Ozaki Y. (1996): Quantitative analysis of metabolites in urine using a highly precise, compact near-infrared Raman spectrometer. *Vib. Spec.* **13**, 83–89.

- Dou X., Yamaguchi Y., Yamamoto H., Doi S., Ozaki Y. (1997a): A highly sensitive, compact Raman system without a spectrometer for quantitative analysis of biological samples. *Vib. Spec.* **14**, 199–205.
- Dou X., Yamaguchi Y., Yamamoto H., Doi S., Ozaki Y. (1997b): Quantitative analysis of metabolites in urine by anti-Stokes Raman spectroscopy. *Biospectros.* **3**, 113–120.
- Edwards H. G. M., Williams A. C., Barry B. W. (1995): Potential applications of FT Raman spectroscopy for dermatological diagnostics. *J. Mol. Struct.* **347**, 379–388.
- Farquharson S., Lee Y. H., Kwon H., Shahriari M., Rainey P. (2000): Urinalysis by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *AIP Conf. Proc.* **504**, 306–311.
- Farquharson S., Shende C., Inscore F. E., Maksymiuk P., Gift A. (2005): Analysis of 5-fluorouracil in saliva using surface-enhanced Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **36**, 208–212.
- Fendel S., Schrader B. (1998): Investigation of skin and skin lesions by NIR-FT-Raman spectroscopy. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **360**, 609–613.
- Filik J., Stone N. (2007): Drop coating deposition Raman spectroscopy of protein mixtures. *Analyst* **132**(6), 544–550.
- Filik J., Stone N. (2008): Analysis of human tear fluid by Raman spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **616**, 177–184.
- Gniadecka M., Wulf H. C., Mortensen N. N., Nielsen O. F., Christensen D. H. (1997): Diagnosis of basal cell carcinoma by Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **28**, 125–129.
- Griebe M., Daffertshofer M., Stroick M., Syren M., Ahmad-Nejad P., Neumaier M., Backhaus J., Hennerici M. G., Fatar M. (2007): Infrared spectroscopy: A new diagnostic tool in Alzheimer disease. *Neurosci. Lett.* **420**, 29–33.
- Guimaraes A. E., Pacheco M. T. T., Silveira L., Barsottini D., Duarte J., Villaverde A. B., Zangaro R. A. (2006): Near infrared Raman spectroscopy (NIRS): A technique for doping kontrol. *Spectr.-Int. J.* **20**, 185–194.
- Hanlon E. B., Manoharan R., Koo T. W., Shafer K. E., Motz J. T., Fitzmaurice M., Kramer J. R., Itzkan I., Dasari R. R., Feld M. S. (2000): Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Phys. Med. Biol.* **45**, R1–R59.
- Hattori Y., Komachi Y., Asakura T., Shimosegawa T., Kanai G., Tashiro H., Sato H. (2007): In vivo Raman study of the living rat esophagus and stomach using a micro-Raman probe under an endoscope. *Appl. Spectrosc.* **61**, 579–584.
- Heise H. M. (2008): Biomedical vibrational spectroscopy – technical advances. In Lasch, P., Kneipp, J.: *Biomedical vibrational spectroscopy*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 9–38.

- Horiba Jobin Yvon: HR800 User manual.
- Hu H., Larson R.G. (2002): Evaporation of a sessile droplet on a substrate. *J. Phys. Chem. B* **106**, 1334–1344.
- Hu H., Larson R.G. (2006): Marangoni effect reverses coffee-ring depositions. *J. Phys. Chem. B* **110**, 7090–7094.
- Hühmer A. F., Biringer R. G., Amato H., Fonteh A. N., Harrington M. G. (2006): Protein analysis in human cerebrospinal fluid: Physiological aspects, current progress and future challenges. *Dis. Markers* **22**, 3–26.
- Choo R. E., Huestis M. A. (2004): Oral fluid as a diagnostic tool. *Clin. Chem. Lab. Med.* **42**, 1273–1287.
- Jain A. K., Murty M. N., Flynn P. J. (1999): Data clustering: A review. *ACM Comput. Surv.* **31**, 264–323.
- Jess P. R. T., Garcés-Chávez V., Smith D., Mazilu M., Paterson L., Riches A., Herrington C. S., Sibbett W., Dholakia K. (2006): Dual beam fibre trap for Raman microspectroscopy of single cells. *Optics Express* **14**, 5779–5791.
- Jolliffe I. T. (2002): Principal komponent analysis. Springer, New York.
- Kah J. C. Y., Kho K. W., Lee C. G. L., Sheppard C. J. R., Shen Z. X., Soo K. C., Olivo M. C. (2007): Early diagnosis of oral cancer based on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* **2**, 785–798.
- Kodíček, M: plasma krevní. Biochemické pojmy: výkladový slovník [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2008-08-07]. Dostupný z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=plasma_krevni>
- Kopecký V., Baumruk V. (2006): Structure of the ring in drop coating deposited proteins and its implication for Raman spectroscopy of biomolecules. *Vibr. Spectrosc.* **42**, 184–187.
- Krafft C., Sergo V. (2006): Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues. *Spectroscopy* **20**, 195–218.
- Lambert J. L., Pelletier C. C., Borchert M. (2005): Glucose determination in human aqueous humor with Raman spectroscopy. *J. Biomed. Optics* **10**, 031110.
- Masopust, Jaroslav: Klinická biochemie [online]. Zentiva, (2008), [cit. 2008-08-02]. Dostupný z WWW: <<http://www.zdravcentra.cz>>.
- Matousek P., Draper E. R. C., Goodship A. E., Clark I. P., Ronayne K. L., Parker A. W. (2006): Non-invasive Raman spectroscopy of human tissue in vivo. *Appl. Spectrosc.* **60**, 758–763.
- Mayo D. W., Miller F. A., Hannah R. W. (2003): Course notes on the interpretation of infrared and Raman spectra. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

- Moger J., Gribbon P., Sewing A., Winlove C.P. (2007): Feasibility study using surface-enhanced Raman spectroscopy for the quantitative detection of tyrosine and serine phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1770**, 912–918.
- Ortiz C., Zhang D., Xie Y., Davisson V.J., Ben-Amotz D. (2004): Identification of insulin variants using Raman spectroscopy. *Anal. Biochem.* **332**, 245–252.
- Ortiz C., Zhang D., Xie Y., Ribbe A. E., Ben-Amotz D. (2006): Validation of the drop coating deposition Raman method for protein analysis. *Anal. Biochem.* **353**, 157–166.
- Ortiz C., Zhang D., Ribbe A.E., Xie Y., Ben-Amotz D. (2007): Analysis of insulin amyloid fibrils by Raman spectroscopy. *Biophys Chem.* **128** (2-3), 150–155.
- Pichardo-Molina J. C., Frausto-Reyes C., Barbosa-García O., Huerta-Franco R., González-Trujillo J. L., Ramírez-Alvarado C. A., Gutiérrez-Juárez G., Medina-Gutiérrez C. (2007): Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients. *Lasers. Med. Sci.* **22**, 229–236.
- Pilotto S., Pacheco M. T. T., Silveira Jr L., Balbin Villaverde A., Zângaro R.A. (2001): Analysis of near-infrared Raman spectroscopy as a new technique for a transcutaneous non-invasive diagnosis of blood components. *Lasers. Med. Sci.* **16**, 2–9.
- Qi D. H., Berger A. J. (2007): Chemical concentration measurement in blood serum and urine samples using liquid-core optical fiber Raman spectroscopy. *Appl. Optics* **46**, 1726–1734.
- Rohleder D., Petrich W. (2008): Raman spectroscopy of biofluids. In Lasch, P., Kneipp, J.: *Biomedical vibrational spectroscopy*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 105–120.
- Semwogerere, D., Weeks, E. R. (2005): Confocal microscopy. In Wnek G. and Bowlin G.: *Encyclopedia of biomaterials and Biomedical engineering*. Taylor & Francis.
- Short M. A., Lam S., McWilliams A., Zhao J. H., Lui H., Zeng H. S. (2008): Development and preliminary results of an endoscopic Raman probe for potential in vivo diagnosis of lung cancers. *Opt. Lett.* **33**, 711–713.
- Schrader B. (1989): Raman/infrared atlas of organic compounds. VCH Publishers, Weinheim – New York.
- Schrader B., Dippel B., Erb I., Keller S., Löchte T., Schulz H., Tatsch E., Wessel S. (1999): NIR Raman spectroscopy in medicine and biology: results and aspects. *J. Mol. Struct.* **480–481**, 21–32.
- Schut T. C. B., Witjes M. J. H., Sterenborg H. J. C. M., Speelman O. C., Roodenburg J. L. N., Marple E. T., Bruining H. A., Puppels G. J. (2000): In vivo detection of dysplastic tissue by Raman spectroscopy. *Anal. Chem.*, **72**, 6010–6018.

- Šípová H. (2006): Studium biomolekul pomocí SERS spektroskopie na pevných kovových nanosubstrátech. Bakalářská práce. Fyzikální ústav Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze.
- Tarnowski C. P., Ignelzi Jr. M. A., Morris M. D. (2002): Mineralization of developing mouse calvaria as revealed by Raman microspectroscopy. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 1118–1126.
- Tarnowski C. P., Ignelzi Jr. M. A., Wang W., Taboas J. M., Goldstein S. A., Morris M. D. (2004): Earliest mineral and matrix changes in force-induced musculoskeletal disease as revealed by Raman microspectroscopic imaging. *J. Bone Miner. Res.* **19**, 64–71.
- Tienta Sciences: Biomolecular sensing [online]. (2003) [cit. 2007-11-29]. Dostupný z WWW: <<http://005bcf5.netsolhost.com/prod01.htm>>.
- Trachta G., Schwarze B., Sägmüller B., Brehm G., Schneider S. (2004): Combination of high-performance liquid chromatography and SERS detection applied to the analysis of drugs in human blood and urine. *J. Mol. Struct.* **693**, 175–185.
- Uttinger U., Heintzelman D. L., Mahadevan-Jansen A., Malpica A., Follen M., Richards-Kortum R. (2001): Near-infrared Raman spectroscopy for *in vivo* detection of cervical precancers. *Appl. Spectrosc.* **55**, 955–959.
- Xie Y., Zhang D., Jarori G. K., Davisson V. J., Ben-Amotz D. (2004): The Raman detection of peptide tyrosine phosphorylation. *Anal. Biochem.* **332**, 116–121.
- Xie Y., Jiang Y., Ben-Amotz D. (2005): Detection of amino acid and peptide phosphate protonation using Raman spectroscopy. *Anal. Biochem.* **343**, 223–230.
- Xie Y., Zhang D., Ben-Amotz D. (2008): Protein–ligand binding detected using ultrafiltration Raman difference spectroscopy. *Anal. Biochem.* **373**, 154–160.
- Yonzon C. R., Lyandres O., Shah N. C., Dieringer J. A., Van Duyne R. P. (2006): Glucose Sensing with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. Surface enhanced Raman scattering – Physics and applications, *Topics Appl. Phys.* **103**, 367–379.
- Zhang D., Xie Y., Mrozek M. F., Ortiz C., Davisson J., Ben-Amotz D. (2003): Raman detection of proteomic analytes. *Anal. Chem.* **75**, 5703–5709.
- Zhang D., Mrozek M. F., Xie Y., Ben-Amotz D. (2004): Chemical segregation and reduction of Raman background interference using drop coating deposition. *Appl. Spectrosc.* **58**, 929–933.
- Zhang D., Ortiz C., Xie Y., Davisson V. J., Ben-Amotz D. (2005): Detection of the site of phosphorylation in a peptide using Raman spectroscopy and partial least squares discriminant analysis. *Spectrochim Acta A* **61** 471–475.

Zhang, G., Chan K. L. A., Flach C. R., Mendelsohn R. (2008): Interplay of univariate and multivariate analysis in vibrational microscopic imaging of mineralized tissue and skin. In Lasch, P., Kneipp, J.: *Biomedical vibrational spectroscopy*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 357-378.

Zýka J., et al. (1988): Analytická příručka. SNTL/ALFA, Praha.