

Magdalena SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ FIZYKI I INFORMATYKI STOSOWANEJ

Mikrospektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera w diagnostyce medycznej

Dr inż. Magdalena SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA

Praca naukowa autorki poświęcona jest badaniom składu biochemicznego ośrodkowego układu nerwowego człowieka w wybranych schorzeniach neurologicznych (choroby neurodegeneracyjne, nowotwory mózgu). Badania prowadzone są z wykorzystaniem współczesnych technik fizyki, głównie opartych na promieniowaniu synchrotronowym (rentgenowska mikroskopia fluorescencyjna, spektroskopia micro-XANES, mikrospektroskopia w podczerwieni). Celem prac jest wspomaganie badań nad patogenezą ww. schorzeń.

e-mail: boruchowska@novell.ftj.agh.edu.pl

Streszczenie

Mikrospektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) łączy w sobie dwie techniki badawcze, tj. spektroskopię w podczerwieni i mikroskopię. Umożliwia tym samym jednoznaczny analizę związków chemicznych w mikroobszarach badanego materiału. Szybki postęp techniki a przede wszystkim wykorzystanie synchrotronu jako źródła podczerwieni umożliwia prowadzenie badań z rozdzielczością przestrzenną rzędu pojedynczych mikrometrów. Oprócz oznaczeń składu chemicznego próbki istnieje również możliwość analizy topograficznej związków chemicznych zawartych w badanym materiale. Dzięki temu mikrospektroskopia w podczerwieni znalazła nowe zastosowanie jako narzędzie analityczne w badaniach tkanek i pojedynczych komórek. Niejednokrotnie jest wykorzystywana przez jednostki naukowe dla celów diagnostyki medycznej. Wśród zalet techniki jako narzędzia diagnostycznego należy wymienić możliwość rejestracji anomalii składu chemicznego z mikrometrową rozdzielczością przy minimalnej preparatyce próbek, nie wymagającej utrwalania materiału ani stosowania markerów biochemicznych. Niewielka ilość materiału wymagana do przeprowadzenia pomiaru może być pozyskana w sposób małoinwazyjny np. na drodze biopsji czy endoskopii. Szeroki nurt badań z wykorzystaniem mikrospektroskopii w podczerwieni do analizy tkanek i pojedynczych komórek stanowią aktualnie prace nad schorzeniami nowotworowymi, chorobami ośrodkowego układu nerwowego (choroby neurodegeneracyjne i prionowe), układu kostnego (osteoporoza, osteoartretyzm), chorobami serca i układu krwionośnego i in.

Słowa kluczowe: mikrospektroskopia w podczerwieni, promieniowanie synchrotronowe, analiza topograficzna, molekuly biologiczne, diagnostyka medyczna

Fourier Transform Infrared Microspectroscopy in Medical Diagnostic

Abstract

Fourier Transform Infrared (FTIR) microspectroscopy combines two techniques i.e. IR spectroscopy and microscopy. Therefore it enables determining the chemical composition in small sample areas. Rapid technical advance especially application of synchrotron radiation as an infrared source allows to obtain micrometer spatial resolution in infrared spectroscopy. Apart from determination of chemical composition of specimens the topographic analysis of samples is also possible. Therefore FTIR microspectroscopy is applied as an analytical tool to investigation of tissues and single cells. This technique is frequently used as a diagnostic tool in medicine. One of the advantage of this technique is possibility of determination of abnormalities in chemical composition of specimen with minimal sample preparation i.e. without sample staining and applying biochemical markers. The small sample amount can be taken during biopsy or endoscopy. Currently, infrared microspectroscopy is applied as a diagnostic tool in the following areas of medicine: cancer research, neurological disorders (neurodegenerations, prion diseases), bone diseases (osteoporosis, osteoarthritis), diseases of cardiovascular system and many others.

Keywords: infrared microspectroscopy, synchrotron radiation, topographic analysis, biological molecules, medical diagnostic

1. Wprowadzenie

Diagnostyka schorzeń stanowi podstawę medycyny klinicznej. Poprawnie postawiona diagnoza warunkuje właściwą drogę postępowania terapeutycznego a tym samym decyduje o poprawie stanu zdrowia pacjentów. Współczesny rozwój medycyny stawia nowe wymagania w zakresie diagnostyki schorzeń. Niezbędna jest właściwa klasyfikacja schorzenia (z uwzględnieniem podtypów jednostki chorobowej), ocena stopnia zaawansowania schorzenia, w przypadku choroby nowotworowej również rozpoznanie stopnia złośliwości nowotworu. Ponadto, istotnym jest monitorowanie postępów choroby i skuteczności stosowanej terapii. Konieczne jest stosowanie technik dających możliwość dotarcia do mikro- a nawet nanoobszarów tkanek czy też umożliwiających poznanie struktury i własności pojedynczych molekuł. Wiedza dostarczana przez „konwencjonalne” metody diagnostyki medycznej może niejednokrotnie okazać się niewystarczająca, co pociąga za sobą konieczność stosowania nowych metod badawczych. Współczesny rozwój technik zwłaszcza fizycznych otwiera nowe drogi poznawcze dla metod diagnostyki medycznej. Umożliwia dotarcie do nowych informacji np. o składzie chemicznym tkanek i pojedynczych komórek, budowie molekularnej układów biologicznych, czego nie można było osiągnąć stosowanymi dotychczas metodami diagnostycznymi. Dlatego też, można stwierdzić, że wprowadzanie nowych technologii jest lub wkrótce okaże się konieczne do wspomaganie działań patologów, aby wspólnie sprostać aktualnym wymaganiom diagnostyki medycznej. Na uwagę zasługuje technika spektroskopii w podczerwieni. Ta metoda analityczna dostarcza bardzo szybko jednoznacznej informacji o składzie biochemicznym tkanek i komórek. Niejednokrotnie wykazywano również, na jej użyteczność w rozróżnianiu tkanek zdrowych i patologicznych, jak również w klasyfikacji jednostek chorobowych oraz ocenie stopnia zaawansowania schorzeń. Połączenie spektroskopii w podczerwieni z mikroskopią stwarza możliwość prowadzenia badań w mikroobszarach a tym samym analizę biochemiczną na poziomie pojedynczych komórek.

2. Podstawy fizyczne mikrospektroskopii w podczerwieni

Mikrospektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) łączy w sobie dwie techniki badawcze, tj. spektroskopię w podczerwieni oraz mikroskopię świetlną. Mikroskopia świetlna spozwała na obserwacje struktur z mikrometrową rozdzielczością, spektroskopia w podczerwieni natomiast pozwala na poznanie składu chemicznego badanych obiektów. W spektroskopii w podczerwieni wykorzystuje się rezonansową absorpcję promieniowania elektromagnetycznego z zakresu podczerwieni (IR) przez drgające molekuly zawarte w badanym materiale [1]. Molekuly absorbują promieniowanie podczerwone tylko o ściśle określonych energiach fotonów, które związane są z modami wibracyjnymi tych molekuł. Energie te zależą od takich parametrów jak masa molekuly, symetria, położenie grup funkcyjnych itp. Uzyskiwane w pomiarach widmo absorpcyjne z

zakresu podczerwieni niesie jednoznaczną informację o związkach organicznych, występujących w badanej próbce czy też w przypadku materiałów biologicznych również o strukturze drugorzędowej białek. W technice tej nie ma ograniczenia rozmiarów analizowanych molekuł, dlatego też można za jej pomocą badać również wielkocząsteczkowe biopolimery takie jak DNA [2].

3. Synchrotronowa mikrospektroskopia w podczerwieni

Od wielu lat spektroskopia z zakresu średniej podczerwieni była stosowana w odniesieniu do materiałów biologicznych w celu identyfikacji struktur organicznych takich jak tłuszcze, białka, kwasy nukleinowe czy węglowodany, które absorbują rezonansowo energię właśnie z tego zakresu podczerwieni [3]. Od ok. 20 lat wprowadzono mikroskopy podczerwieni wyposażone w konwencjonalne, termalne źródła IR (tzw. globar). Spektrometry te w odniesieniu do badań biologicznych są idealne do badań struktur z rozdzielczością przestrzenną rzędu 20 μm a więc do badań na poziomie tkankowym. Nie są jednak w stanie sprostać współczesnym wymaganiom medycyny, a więc badaniom na poziomie komórkowym. Niezastąpionym w tym aspekcie jest synchrotronowe źródło podczerwieni. Jego jasność (definiowana jako liczba fotonów emitowanych przez jednostkową powierzchnię źródła w jednostkowy kąt bryłowy) jest ok. 100,1000 razy większa niż z konwencjonalnego źródła IR. Wynika to nie tyle z mocy samego źródła, ale z faktu, że w przypadku synchrotronu można do czynienia ze źródłem o niewielkich rozmiarach (10,20 μm), dodatkowo emitującym promieniowanie w wąski kąt bryłowy [4]. Dlatego też uzyskanie wiązki promieniowania IR ze źródła termicznego (rozmiar $\sim 100 \mu\text{m}$) o średnicy porównywalnej do rozmiarów wiązki z synchrotronu (kilka mikrometrów) wiąże się z 80,90% stratami intensywności wiązki. Podsumowując, zadawalający stosunek sygnału do szumu (uwzględniając również zjawisko dyfrakcji fali na układzie apertur) w przypadku źródła konwencjonalnego uzyskuje się dla wiązki o rozmiarach 20-30 μm , podczas gdy dla źródła synchrotronowego 3-10 μm . Istotnym dla analizy materiałów biologicznych jest możliwość prowadzenia badań z rozdzielczością rzędu pojedynczych mikrometrów. W przypadku konfokalnych mikroskopów podczerwieni pojawia się problem ograniczenia rozdzielczości przestrzennej przez towarzyszące efekty dyfrakcyjne. Ograniczenia te związane są z długością fali stosowanego promieniowania jak i ze stosowaniem apertury numerycznej w układach ogniskowania optycznego [5].

4. Preparatyka próbek i analiza danych

Nieocenioną zaletą spektroskopii w podczerwieni jest możliwość badania próbek w postaci gazowej, ciekłej jak i stałej [6]. Typowo próbki tkanek pobierane są w trakcie biopsji, endoskopii, punkcji lub też wykorzystuje się w tym celu materiał śródoperacyjny. Próbki płynów ustrojowych pobierane są analogicznie jak w przypadku rutynowych badań diagnostycznych. Istotnym jest fakt, że badania z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni można wykonywać dysponując niewielką ilością materiału badawczego, co jest szczególnie istotne w przypadku analizy materiałów klinicznych. Badania tkanek można prowadzić na cienkich skrawkach o grubości kilku mikrometrów a w przypadku próbek płynnych wystarczające jest kilka mikrolitrów płynu. Kolejną zaletą badań prowadzonych z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni jest możliwość oznaczeń molekuł biologicznych bez stosowania dodatkowych odczynników czy markerów biologicznych, co zdecydowanie skraca czas preparatyki próbek jak i obniża koszt analizy. Pobrany materiał badawczy bez utrwalania, barwienia i dodatkowej obróbki chemicznej może być prawie bezpośrednio poddany analizie.

Pomimo swej prostoty preparatyka próbek jest jednym z najważniejszych czynników decydujących o powodzeniu badań [5]. Ze względu na możliwość pracy z mikroskopem podczerwieni w dwóch trybach tj. transmisyjnym i odbiciowym istnieją też różne wymagania dotyczące preparatyki próbek. W przypadku pomiarów transmisyjnych wymagane jest aby próbki były dostatecznie cienkie, umożliwiające przejście wiązki promieniowania podczerwonego przez próbkę i dotarcie do detektora. W przypadku preparatyki tkanek materiał po uprzednim zamrożeniu lub przesychnieniu substancją utwardzającą jest cięty odpowiednio na kriomikrotomie lub mikrotomie na skrawki o grubości 5-20 μm . Przygotowany w ten sposób materiał jest nakładany na podkładkę wykonaną z substancji przepuszczającej promieniowanie podczerwone (np. CaF_2 , BaF_2 , ZnS , ZnSe i in.). W metodzie odbiciowej cienkie skrawki tkanki umieszczane są na podłożu odbijającym IR. Metoda ta wymaga jednak pracy z wiązką o dużym natężeniu co wiąże się z ok. 50% stratami intensywności promieniowania podczas kierowania wiązki odbitej do detektora. Należy zwrócić jednak uwagę na fakt, że w metodzie tej promieniowanie podczerwone dwukrotnie przechodzi przez badany materiał (w postaci wiązki padającej i odbitej od podłoża, na którym umieszczona jest próbka). Pociąga to za sobą „dwukrotną” absorpcję, a tym samym wpływa na wzmocnienie sygnału docierającego do detektora. Istotnym w tej metodzie jest więc przygotowanie odpowiednio cienkich próbek. Ponadto, istnieje możliwość pomiaru materiału idealnie wyszlifowanego, stanowiącego samoistnie powierzchnię odbijającą (np. w pomiarach próbek kości) [5].

Wykorzystanie spektroskopii (mikrospektroskopii) FTIR jako narzędzia diagnostycznego w medycynie pociąga za sobą również konieczność stosowania zaawansowanych metod komputerowych do akwizycji i analizy danych [7]. Postawienie odpowiedniej diagnozy wymaga dokonania właściwej klasyfikacji niejednokrotnie ogromnej ilości danych spektralnych. Narzędzia analizy obejmują zarówno proste metody statystyczne takie jak analiza klastrowa, jak i bardziej zaawansowane metody np. stosowanie sieci neuronowych. Analiza statystyczna umożliwia identyfikację parametru (bądź parametrów) w danych spektralnych, które mogą następnie posłużyć jako biomarker w danym schorzeniu.

5. Mikrospektroskopia w podczerwieni w badaniu układów biologicznych

Spektroskopia w podczerwieni jeszcze przed wprowadzeniem układów mikroskopowych wykorzystywana była do badań głównych molekuł biologicznych. Początkowo, prowadzono badania nad wyizolowanymi lub syntetyzowanymi związkami organicznymi budującymi żywe organizmy. Z biegiem czasu zaczęto wykorzystywać tę technikę do poznawania składu biochemicznego tkanek roślinnych i zwierzęcych a po wprowadzeniu mikroskopów podczerwieni również i budowy biochemicznej komórek [2]. Widmo absorpcyjne IR zarejestrowane w pomiarach tkanki niesie równocześnie informację o głównych molekułach biologicznych takich jak białka, lipidy, kwasy nukleinowe, węglowodory. Generalnie komórki, tkanki i płyny ustrojowe człowieka składają się z wody, tłuszczy, białek, węglowodorów oraz kwasów nukleinowych. Dlatego też, w widmach absorpcyjnych IR rejestrowanych w tego typu materiałach wyróżnić można trzy główne masywy tj. pasma lipidów (2800 – 3000 cm^{-1}), białek (1600 – 1700 cm^{-1} , 1500 – 1560 cm^{-1}), kwasów nukleinowych (1000 – 1250 cm^{-1}) (porównaj rysunek 1.) oraz dodatkowe pasma charakterystyczne dla danej grupy tkanek [2]. W aspekcie badań medycznych istotną jest możliwość oznaczania przy wykorzystaniu spektroskopii IR struktury drugorzędowej białek. Jak wiadomo zmiany takie mogą pojawiać się w niektórych jednostkach chorobowych jak np. w schorzeniach neurodegeneracyjnych [8]. Doświadczenie i wiedza zdobyta przez lata w oparciu o fundamentalne badania głównych

molekuł biologicznych, mikroorganizmów, komórek i tkanek znajduje obecnie praktyczne zastosowanie w wykorzystaniu spektroskopii w podczerwieni w diagnostyce medycznej.

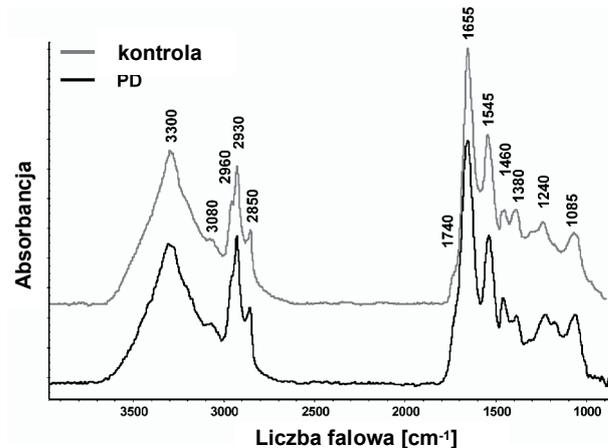
6. (Mikro)spektroskopia FTIR jako narzędzie diagnostyki medycznej

Współpraca naukowców wykorzystujących spektroskopię w podczerwieni ze środowiskiem medycznym owocuje coraz częściej stosowaniem tej techniki analitycznej do diagnozowania różnorodnych schorzeń. Technika ta w porównaniu z innymi stosowanymi aktualnie w medycynie ma wiele zalet. Jest to związane m. in. z tym, że promieniowanie podczerwone nie jest niszczące dla materiału biologicznego tak jak UV, promieniowanie X czy γ . W odróżnieniu od np. magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) czy pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) badania mogą być prowadzone na małej ilości materiału i ze zdecydowanie lepszą rozdzielczością przestrzenną. Ponadto, należy podkreślić, że technika ta jest nieinwazyjną, szybką metodą oznaczania równocześnie wielu biomolekuł. Jest stosunkowo tania w porównaniu ze stosowanymi metodami histochemicznymi. Umożliwia zarówno badania *ex vivo* jak i *in vitro* [7].

Jednym z bardziej aktywnych obszarów stosowania (mikro)spektroskopii w podczerwieni jest grupa chorób nowotworowych. Dotychczasowe prace wskazują, że w tej grupie schorzeń spektroskopia FTIR może być stosowana w następujących zagadnieniach: 1) rozróżnianie pomiędzy tkankami zdrowymi a zmienionymi nowotworowo (nowotwory piersi [9], okrężnicy [10], wątroby [11], szyjki macicy [12]) z uwzględnieniem wykrywania wczesnego stadium choroby, gdy standardowe metody nie dają jednoznacznej odpowiedzi [10]; 2) monitorowanie nieprawidłowego wzrostu i proliferacji komórek nowotworowych tak jak w przypadku krypt jelitowych [13], nabłonka szyjki macicy [14]; 3) rozróżnianie pomiędzy zdrowymi a nowotworowymi komórkami w biopsjach z małych organów jak prostata [15], tarczycy [16] oraz płynów ustrojowych [17]; 4) rozróżnianie pomiędzy stanami nowotworowymi a schorzeniami o podobnych objawach klinicznych (nowotwór okrężnicy i IBD – choroba zapalna jelit) [18]; 5) monitorowanie skutków terapii antynowotworowej (chemioterapii w przypadku białaczki) [19] oraz stopnia złośliwości nowotworu (chłoniaki [20]); 6) monitorowanie stężenia metabolitów [21,22]; 7) badania zmiany struktury drugorzędowej biomolekuł (białka, DNA) w chorobach nowotworowych [23].

Interesujące zastosowanie spektroskopii w podczerwieni to badania schorzeń neurologicznych. Złożoność funkcjonowania mózgu jak i stosunkowo uboga wiedza na temat patogenezы wielu schorzeń ośrodkowego układu nerwowego (OUN) człowieka skutkuje licznymi pracami badawczymi, obejmującymi zarówno poznanie patogenezы jak i swoistych markerów danego schorzenia umożliwiających wczesne diagnozowanie choroby. Znajdują się tu również badania z wykorzystaniem mikrospektroskopii FTIR. Badania z wykorzystaniem tej techniki prowadzone były w odniesieniu do udarów mózgu, neurotoksyczności, choroby pionowej, chorób genetycznych i zaburzeń metabolizmu [24]. Prace z wykorzystaniem mikrospektroskopii FTIR prowadzone są też w odniesieniu do choroby Alzheimera [24]. Pojawiające się w tym schorzeniu złoży β amyloidu dają jednoznaczny obraz w spektroskopii FTIR w postaci przesunięcia pasma amidu I w kierunku niższych częstotliwości. Miller i in. wskazuje na udział w formacji złoży tego białka również pierwiastków takich jak Zn i Cu [25]. Ponadto, badane jest czy podobne zmiany obserwowane są w innych organach co pozwoliłoby na wcześniejsze diagnozowanie choroby Alzheimera. Badania nad patogenezą choroby Parkinsona (PD) oraz stwardnienia bocznego zanikowego (ALS) jak również poszukiwanie markera biochemicznego dla tych schorzeń prowadzone są przez autorkę artykułu i

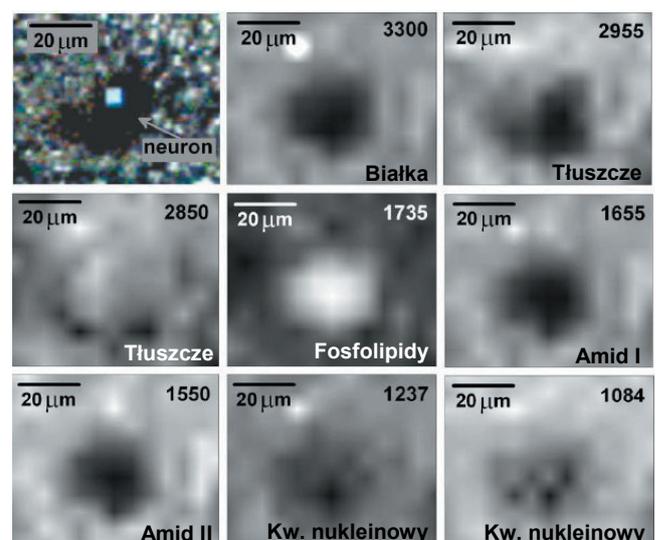
współpracowników [26,27]. Przykładowe widma absorpcyjne IR zebrane w obszarze neuronu istoty czarnej dla przypadku kontrolnego i choroby Parkinsona przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Widma absorpcyjne FTIR zebrane w obszarze neuronu istoty czarnej dla przypadku kontrolnego i choroby Parkinsona (PD).

Fig. 1. The comparison of FTIR absorption spectra acquired in the neurons of substantia nigra for the control and Parkinson's diseased (PD) cases.

Wykorzystanie w pracach synchrotronowej mikrospektroskopii w podczerwieni, dzięki bardzo dobrej rozdzielczości przestrzennej techniki, pozwala na poznanie nie tylko zmian dotyczących głównych molekuł biologicznych ale również poznanie składu molekularnego w strukturach tkanki (w tym również w degenerujących neuronach, charakterystycznych dla ww. schorzeń). Wykonanie analizy topograficznej dla biomolekuł z rozdzielczością rzędu pojedynczych mikrometrów umożliwia precyzyjne porównanie pomiędzy odpowiednimi obszarami tkanki (czy też komórki) pomiędzy tkanką zdrową a patologiczną. Problematyka ta została szczegółowo opisana w pracach [26,27]. Mapy powierzchniowe rozkładu wybranych grup funkcyjnych biomolekuł dla tkanki istoty czarnej mózgu zamieszczono na rysunku 2. Wykaz grup funkcyjnych, przypisanych zaznaczonym na rysunkach 1 i 2 liczbom falowym można znaleźć w pracy [2].



Rys. 1. Mapy FTIR uzyskane dla próbki istoty czarnej w porównaniu z obrazem mikroskopowym tkanki. Wartości podane na mapach oznaczają liczby falowe [cm⁻¹].

Fig. 1. Infrared maps of control substantia nigra sample in comparison with microscopic view of scanned area of the tissue. The values on the maps represent wavenumbers [cm⁻¹].

Wśród innych zastosowań diagnostycznych spektroskopii FTIR można wymienić choroby kości i stawów. Artretyzm, który może przybierać różne formy prowadzi do poważnych zmian w obrębie stawów i nadal jest trudny do diagnozowania [2]. Prace prowadzone przez Instytut Biodiagnostyki w Winnipeg z wykorzystaniem spektroskopii FTIR obejmowały systematyczne badania mazi stawowej pobieranej od osób z różnymi formami artretyzmu i grupy kontrolnej. Zmiany zaobserwowane w obrębie wiązania C-H lipidów, występujące dla różnych form artretyzmu pozwoliły na dokonanie odpowiedniej klasyfikacji w oparciu o technikę FTIR. Bardzo dobra zgodność pomiędzy tymi wynikami a diagnozą kliniczną potwierdza przydatność spektroskopii FTIR do badań artretyzmu [28]. Inną chorobą układu kostnego jest osteoporoza, polegająca na postępującym ubytku masy kostnej i dezorganizacji mikroarchitektury szkieletu kostnego. Badania kości w kierunku osteoporozy prowadzone są m. in. przez L. Miller i współpracowników. Synchrotronowa mikrospektroskopia FTIR wykorzystywana jest do oceny stopnia mineralizacji kości (stosunek fosforanów do białek) i zawartości węglanów (stosunek węglanów do białek), badania struktury kolagenu jak również wpływu stosowanych środków terapeutycznych na poprawę tych parametrów [29, 30].

Badania nad możliwościami stosowania spektroskopii FTIR do wybranych schorzeń układu krwionośnego (kardiomiopatie) badane są np. przez Gough i in. [31].

Jako przykład wykorzystania tej techniki w badaniach próbek gazowych można podać oznaczenie stosunku $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w CO_2 w testach oddechowych prowadzonych w kierunku identyfikacji bakterii *Helicobacter pylori* odpowiedzialnej za powstawanie choroby wrzodowej żołądka. Współczesna literatura zamieszcza jeszcze wiele innych, ciekawych przykładów świadczących o możliwościach diagnostycznego wykorzystania mikrospektroskopii w podcezerwieni dla potrzeb współczesnej medycyny.

7. Podziękowania

Niniejsza praca powstała przy wsparciu finansowym Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Warszawie.

8. Literatura

- [1] Stuart B. *Modern Infrared Spectroscopy*. John Wiley & Sons, LTD, Chichester 1996.
- [2] Naumann D. *FT-Infrared and FT-Raman Spectroscopy in Biomedical Research: Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*, Marcel Dekker, Inc. New York 2001.
- [3] Marinkovic N.S., Huang R., Bromberg P. i wsp. Center for Synchrotron Biosciences' U2B beamline: an international resource for biological infrared spectroscopy. *J. Synchrotron Rad.* 9, 2002, 189–197.
- [4] Duncan W. D., Williams G. P. Infrared synchrotron radiation from electron storage rings. *Appl. Opt.* 22, 1983, 2914–2923.
- [5] Miller L.M., Dumas P. Chemical imaging of biological tissue with synchrotron infrared light. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758, 2006, 846–857.
- [6] Michael Heise H. *Clinical Applications of Near-and Mid-Infrared Spectroscopy: Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*, Marcel Dekker, Inc. New York 2001.
- [7] Sahu R.K., Mordechai S. Fourier transform infrared spectroscopy in cancer detection. *Future Oncology* 1(5), 2005, 635–647.
- [8] Ross C.A., Poirier M.A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* 10, 2004, Suppl 10–17.
- [9] Gao T.J., Feng Y. Ci. Human breast carcinomal tissues display distinctive FTIR spectra: implication for the histological characterization of carcinomas. *Anal. Cell. Pathol.* 18, 1999, 87–93.
- [10] Argov S., Ramesh J., Salman A., Goldstein J., Sinelnikov I., Guterman H., Mordechai S. Diagnostic Potential of FTIR Microspectroscopy and Advanced Computational Methods in Colon Cancer Patients. *J. Biomed. Optics*, 7(2), 2002, 248–254.
- [11] Diem M., Chiriboga L., Yee H. Infrared spectroscopy of human cells and tissue. VIII. Data collection and analysis strategies for infrared mapping of tissue. *Biopolymers: Biospectroscopy*, 57, 2000, 282–290.
- [12] Wood B. R., Chiriboga L., Yee H., Quinn M. A., McNaughton D., Diem M. FTIR mapping of the cervical transformation zone, squamous and glandular epithelium, *Gynecol. Oncol.*, 93(4), 2004, 59–68.
- [13] Sahu R.K., Argov S., Bernshtain E., Salman A., Walfisch S., Goldstein J., Mordechai. S. Detection of abnormal proliferation in histologically “normal” colonic biopsies using FTIR-microspectroscopy, *Scan. J. of Gastroenterology*. 39 (6), 2004, 557–566.
- [14] Chang J.I., Huang Y.B., Wu P.C I wsp. Characterization of human cervical precancerous tissue through the Fourier transform infrared microscopy with mapping method. *Gynecol. Oncol.* 91(3), 2003, 577–583.
- [15] Gazi E, Dwyer J., Gardner P. i wsp. Applications of Fourier transform infrared microspectroscopy in studies of benign prostate and prostate cancer. A pilot studies. *J. Pathol.* 201(1), 2003, 99–108.
- [16] Schultz C.P. The potential role of Fourier transform infrared spectroscopy and imaging in cancer diagnosis incorporating complex mathematical methods. *Technol Cancer Res Treat.* 1(2), 2002, 95–104. [17] Wang H.P., Wang H.C., Huang Y.J. Microscopic FTIR studies of lung cancer cells in preural fluid. *Sci. Total Environ.* 204, 1997, 283–287.
- [18] Argov S, Sahu RK, Bernshtain E, Salman A, Shohat G, Zelig U, Mordechai S. Inflammatory bowel diseases as an intermediate stage between normal and cancer: a FTIR-microspectroscopy approach. *Biopolymers.* 75(5), 2004, 384–92.
- [19] Ramesh J., Huleihel M, Mordehai J, Moser A, Erukhimovich V., Levi C, Kapelushnik J., Mordechai S. Preliminary results of evaluation of progress in chemotherapy for childhood leukemia patients employing Fourier-transform infrared microspectroscopy and cluster analysis. *J Lab Clin Med.* 141(6), 2003, 385–94.
- [20] Andrus P.G, Strickland R.D. Cancer grading by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biospectroscopy.* 4(1), 1998, 37–46.
- [21] Liu KZ, Schultz CP, Johnston JB, Beck FW, Al-Katib AM, Mohammad RM, Mantsch HH. Infrared spectroscopic study of bryostatin 1-induced membrane alterations in a B-CLL cell line. *Leukemia.* 13(8), 1999, 1273–1280.
- [22] Takahashi S, Satomi A, Yano K, i wsp. Estimation of glycogen levels in human colorectal cancer tissue: relationship with cell cycle and tumor outgrowth. *J Gastroenterol.* 34(4), 1999, 474–80.
- [23] Malins DC, Gilman NK, Green VM, Wheeler TM, Barker EA, Vinson MA, Sayeeduddin M, Hellstrom KE, Anderson KM. Metastatic cancer DNA phenotype identified in normal tissues surrounding metastasizing prostate carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(31), 2004, 11428–11431.
- [24] Schaeberle M.D. Levin I.W. Lewis E.N. *Biological Vibrational Spectroscopic Imaging: Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*, Marcel Dekker, Inc. New York 2001.
- [25] Lisa M Miller, Qi Wang, Tejas P Telivala, Randy J Smith, Antonio Lanzirotti, Judit Miklossy. Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease. *J Struct Biol.* 155(1), 2006, 30–37.
- [26] Szczerbowska-Boruchowska M., Chwiej J., Lankosz M. i wsp. Intra-neuronal investigations of organic components and trace elements with the use of synchrotron radiation. *X-Ray Spectrom.* 2005; 34: 514–520.
- [27] Szczerbowska-Boruchowska M., Dumas P., Kastyak M.Z. i wsp. Biomolecular investigation of human substantia nigra in Parkinson's disease by synchrotron radiation Fourier transform infrared microspectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* 459(2), 2007, 241–248.
- [28] H.H.Eysel, M.Jackson, A.Nikhulin, R.L.Somorjai, G.T. D.Thomson, A novel diagnostic. test for arthritis: multivariate analysis of infrared spectra of synovial fluid. *Biospectroscopy* 3, 161–167 (1997).
- [29] Huang RY, Miller LM, Carlson CS, Chance MR. In situ chemistry of osteoporosis revealed by synchrotron infrared microspectroscopy. *Bone.* 33(4), 2003, 514–521.
- [30] Miller LM, Tibrewala J, Carlson CS. Examination of bone chemical composition in osteoporosis using fluorescence-assisted synchrotron infrared microspectroscopy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 46(6), 2000, 1035–1044.
- [31] Gough KM, Zelinski D, Wiens R, Rak M, Dixon IM. Fourier transform infrared evaluation of microscopic scarring in the cardiomyopathic heart: effect of chronic ATI suppression. *Anal Biochem.* 316(2), 2003, 232–242.