

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **238109**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **411405**

(22) Data zgłoszenia: **26.02.2015**

(51) Int.Cl.

G01N 21/65 (2006.01)

G01J 3/28 (2006.01)

G01J 3/44 (2006.01)

(54) **Sposób badania poddawanych rozciąganiu próbek biologicznych w spektroskopie Ramana**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
29.08.2016 BUP 18/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
05.07.2021 WUP 14/21

(73) Uprawniony z patentu:

**WOJEWÓDZKI SZPITAL SPECJALISTYCZNY
WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MAGDALENA KOBIELARZ, Wrocław, PL
CELINA PEZOWICZ, Wrocław, PL
SŁAWOMIR WUDARCZYK, Oborniki Śląskie, PL**

PL 238109 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób badania zmian struktury próbek biologicznych w spektroskopie Ramana, poddawanych badaniu zmian zachodzących w rozciągającym materiale, zwłaszcza o wysokiej odkształcalności i niejednorodności.

Znane sposoby testowania próbek biologicznych, dotyczą przede wszystkim badania cech mechanicznych całej próbki, takich jak: wytrzymałość na rozciąganie, sztywność lub podatność, na podstawie uzyskanych uśrednionych wartości oceniane są właściwości mechaniczne badanego materiału. Zmiany miejscowe zachodzące w morfologii rozciąganych próbek, poddanych jednoosiowemu lub dwuosiowemu rozciąganiu bada się najczęściej metodami optycznymi, obserwując zmiany zachodzące w strukturze materiału, w świetle przechodzącym lub odbitym.

Do testowania próbek biologicznych stosowane są również metody oparte na spektroskopii Ramana, wykorzystujące zjawisko rozproszenia promieniowania elektromagnetycznego, związane ze zmianą energii rozpraszanych fotonów, do identyfikacji zmian struktury na podstawie oscylacyjnych poziomów energetycznych badanej substancji. Źródłem promieniowania w spektroskopii Ramana są lasery pracujące przy długości fali z zakresu od ultrafioletu, poprzez zakres widzialny, aż do podczerwieni. Znany jest ze zgłoszenia w trybie PCT nr WO2012109301, sposób obejmujący kształtowanie wiązki laserowej realizowany w spektroskopie Ramana z zastosowaniem aparatury zawierającej obiektyw mikroskopu skupiony na polu widzenia; laser generujący wiązkę astygmatyczną i optykę do sprzęgania wiązki astygmatycznej z obiektywem mikroskopu w celu wytworzenia oświetlenia o dużym współczynniku kształtu w polu widzenia mikroskopu. Sposób nie pozwala na analizę spektralną tego samego obszaru próbki, w związku ze zmianą jej długości podczas rozciągania.

W spektroskopii Ramana otrzymuje się widma zawierające pasma oscylacyjne, odpowiadające drganiom normalnym cząsteczek. Spektroskopia Ramana umożliwia uzyskanie informacji o wielkości i rodzaju drgań atomów tworzących wiązania w poszczególnych cząsteczkach na podstawie widma uzyskanego z naświetlanej promieniem lasera próbki. Drgania te mogą być dwojakiego typu: w przypadku gdy wiązania w cząsteczce są rozciągane uzyskuje się drgania rozciągające, zaś w przypadku gdy wiązania w cząsteczce są deformowane uzyskuje się drgania deformacyjne. Na podstawie analizy widma, położeniom pasm Ramana, przypisuje się drgania odpowiadające określonym typom wiązań.

Z patentu FR 280680 znane jest stanowisko pomiarowe do badania zachowania reologicznego materiałów miękkich, w szczególności biomateriałów lub tkanek fizjologicznych charakteryzujące się tym, że stosuje rozciąganie i ściskanie próbki miękkiego materiału. Urządzenie pomiarowe wyposażone jest w sterowany komputerowo siłownik zamontowany na stałym wsporniku oraz zaopatrzone w tłok uruchamiający urządzenie, przymocowany do bliższego końca wózka. Przeciwnie końce próbki są w nim mocowane do dalszego końca wózka, a czujnik siły zamontowany jest na wsporniku. Procesor sygnałowy charakteryzuje materiał pod względem siły wykrywanej przez czujnik w odniesieniu do liniowego przemieszczenia tłoka.

Istotę wynalazku stanowi sposób badania zmian struktury próbek biologicznych w spektroskopie Ramana podczas jednoosiowego rozciągania, polegający na tym, że wybrany do badań obszar próbki ogranicza się z obu stron poprzez wprowadzenie dwóch różnych indykatorów, w postaci substancji, emitujących charakterystyczne dla każdej z nich widmo. Ograniczony z obu stron, wybrany obszar badanej próbki, poddaje się jednoosiowemu rozciąganiu w umocowanym do stolika spektroskopu urządzeniu do rozciągania próbek. Podczas rozciągania wybrany obszar naświetla się wiązką laserową, w kolejnych fazach całego procesu rozciągania i rejestruje się widma, pochodzące z tego samego obszaru próbki w położeniach uzależnionych od częstości drgań składników próbki odpowiadające tym fazom. Zarejestrowane kolejne widma, obrazujące pasma, poszerzające się wraz ze wzrostem odkształceń w strukturze rozciąganej próbki, analizuje się i porównuje z wzorcem.

Sposób według wynalazku obejmuje przygotowanie próbki przed procesem rozciągania, które polega na tym, że z jednej strony badanego obszaru wprowadza się, ograniczający ten obszar indykator **L**, emitujący charakterystyczne dla niego widmo, które jest jednoznacznie lokalizowane w analizie spektralnej metodą Ramana, z drugiej strony badanego obszaru wprowadza się, ograniczający ten obszar indykator **P**, dający również charakterystyczne dla niego widmo. W zależności od badanych właściwości i rodzaju próbki, indykatorami **L** i **P** pokrywa się powierzchnię próbki lub wprowadza się dobrany indykator w strukturę materiału, każdy tylko po jednej stronie badanego obszaru, eliminując ryzyko wprowadzenia indykatora **L** lub **P** w badany obszar próbki.

Zgodnie z wynalazkiem podczas rozciągania próbki biologicznej, krokowo, po każdym rozciągnięciu o zadaną wartość wykonuje się badanie spektroskopowe Ramana, a uzyskane widma obrazujące wpływ rozciągania na deformację wiązań chemicznych i przebieg deformacji w strukturze próbki poddawanej jednoosiowemu rozciąganiu, porównuje się z wzorcem.

Zaletą sposobu według wynalazku jest nie tylko czułość nawet na małe zmiany strukturalne, ale całkowita gwarancja, że wiązka lasera oświetla ten sam ograniczony indykatorami obszar, podczas rozciągania próbki ulegającej niejednorodnej deformacji. W znanych i stosowanych sposobach, nie było możliwe spowodowanie, aby promień lasera padał na to samo miejsce próbki poddawanej sekwencyjnemu rozciąganiu i każdorazowemu badaniu widma. Sposób, będący przedmiotem wynalazku jest niezastąpiony w przypadku próbek o budowie warstwowej, rozciąganych poprzecznie do układu warstw. Inną korzystną właściwością sposobu jest jego przydatność do testowania materiałów biologicznych, które mogą mieć różny stopień uwodnienia poszczególnych obszarów próbki, a więc będą dawały charakterystyczne widma rotacyjne i oscylacyjne cząsteczek.

Urządzenie zastosowane w sposobie według wynalazku, umożliwia precyzyjną analizę zmian struktury w wybranym obszarze rozciąganej jednoosiowo próbki biologicznej, w tym materiałów o wysokiej odkształcalności i niejednorodności, a także tkanek miękkich.

Przedmiot wynalazku w przykładzie realizacji jest uwidoczniony na rysunku, na którym Fig. 1 przedstawia rozciąganą próbkę umocowaną w szczękach, znaczoną indykatorami **L** i **P** z zaznaczonym obszarem badanym **BO**, a Fig. 2 przedstawia zmiany położenia badanego obszaru zachodzące w testowanej próbce podczas rozciągania, będące wynikiem niejednorodności właściwości próbki, z zaznaczonym miejscem padania wiązki laserowej **WL**.

P r z y k ł a d

Sposób według wynalazku polega na tym, że w celu zbadania próbki jej końce mocuje się w szczękach **1a** i **1b**, następnie po jednej stronie badanego obszaru wprowadza się indykator **L**, a po drugiej indykator **P**. Tak przygotowaną próbkę umieszcza się na stoliku spektroskopu Ramana i ustawia urządzenie w taki sposób, aby wiązka lasera padała na poddawany badaniu obszar. Następnie uruchamia się silniki, powodujące rozsuwanie się szczęk **1a** i **1b** i następuje rozciąganie próbki z zadaną siłą **F_r**, co skutkuje zmianą długości próbki o określoną wartość i bada się widmo Ramana. Jeśli uzyskane widmo nie ma składowych charakterystycznych dla indykatorów **L** i **P** to taki pomiar uznaje się za poprawny. Prędkość **V_L** **V_P** każdej szczęki **1a** i **1b** zadaje się w układzie sterowania. Wartość wydłużenia próbki, bazującą na pomiarze położenia szczęk **1a** i **1b** oblicza się w układzie sterowania na podstawie sygnałów położenia wałów silników odczyty wartych z czujników położenia silników – enkoderów, natomiast wartość siły rozciągającej w danej chwili **F_r** odczytuje się na podstawie sygnału pochodzącego z czujnika siły **2**, który przekazuje odpowiednie sygnały do układu sterowania.

Jeśli pojawia się widmo **P**, to na panelu sterowania **PS** wciska się przycisk. Układ sterowania wysyła wówczas sygnały do silników. Cała próbka z niezmienną długością przemieszcza się o zadaną wartość Δx w stronę, po której znajduje się indykator **P**, po czym wykonuje się kolejny pomiar. Jeśli wciąż widmo wskazuje na obecność indykatora **P**, to procedurę powtarza się, aż do uzyskania braku widma charakterystycznego dla indykatora **P**. Analogiczny jest tryb postępowania, gdy w analizie spektralnej pojawia się widmo od indykatora **L**, z tą różnicą, że wówczas całą próbkę przemieszcza się w stronę indykatora **L**, aż do uzyskania braku widma identyfikującego indykator **L**.

Wykaz oznaczeń na rysunku:

1a i b – szczęki chwytne

2 – czujnik siły

L – indykator wprowadzony z lewej strony

P – indykator wprowadzony z prawej strony

V_L – prędkość szczęki 1a

V_P – prędkość szczęki 1b,

F_r – siła rozciągania

BO – badany obszar próbki

WL – wiązka lasera

Δx – wartość jednoczesnego przemieszczenia obu szczęk chwytnych

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób badania poddawanych rozciąganiu próbek biologicznych w spektroskopie Ramana, oparty na badaniu zmian zachodzących w strukturze próbek rozciąganych jednoosiowo w urządzeniu, współpracującym z spektroskopem, **znamienny tym**, że jednoosiowemu rozciąganiu w urządzeniu do rozciągania próbek, umocowanym do stolika spektroskopu, poddaje się ten sam obszar próbki, ograniczony z obu stron dwoma różnymi indykatorami, wprowadzonymi w postaci substancji emitujących charakterystyczne dla każdej z nich widmo, a podczas rozciągania wybrany obszar naświetla się wiązką laserową, w kolejnych fazach całego procesu rozciągania i rejestruje się widma, pochodzące z tego samego obszaru próbki w położeniach uzależnionych od częstości drgań składników próbki odpowiadające tym fazom, następnie zarejestrowane kolejne widma, obrazujące pasma, poszerzające się wraz ze wzrostem odkształceń w strukturze rozciąganej próbki, analizuje się i porównuje z wzorcem.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że przed procesem rozciągania, po jednej stronie badanego obszaru próbki wprowadza się ograniczający ten obszar indykator (L), emitujący charakterystyczne dla niego widmo, które jest jednoznacznie lokalizowane w analizie spektralnej metodą Ramana, a z drugiej strony badanego obszaru wprowadza się, ograniczający ten obszar indykator (P), dający również charakterystyczne dla niego widmo.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w zależności od badanych własności i rodzaju próbki, indykatorami (L i P) pokrywa się powierzchnię próbki lub wprowadza się dobrany indykator w strukturę materiału, każdy z tych indykatorów tylko po jednej stronie badanego obszaru, eliminując ryzyko wprowadzenia indykatora (L lub P) w badany obszar próbki.

Rysunki

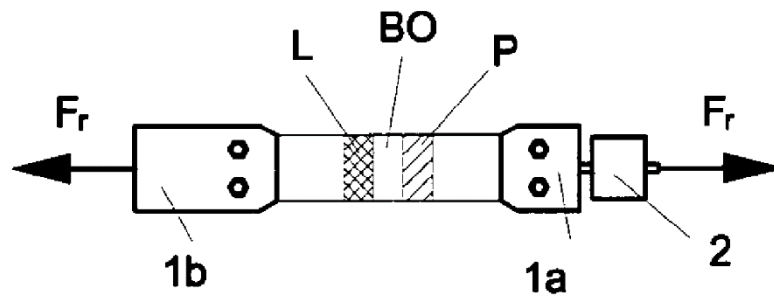


Fig. 1

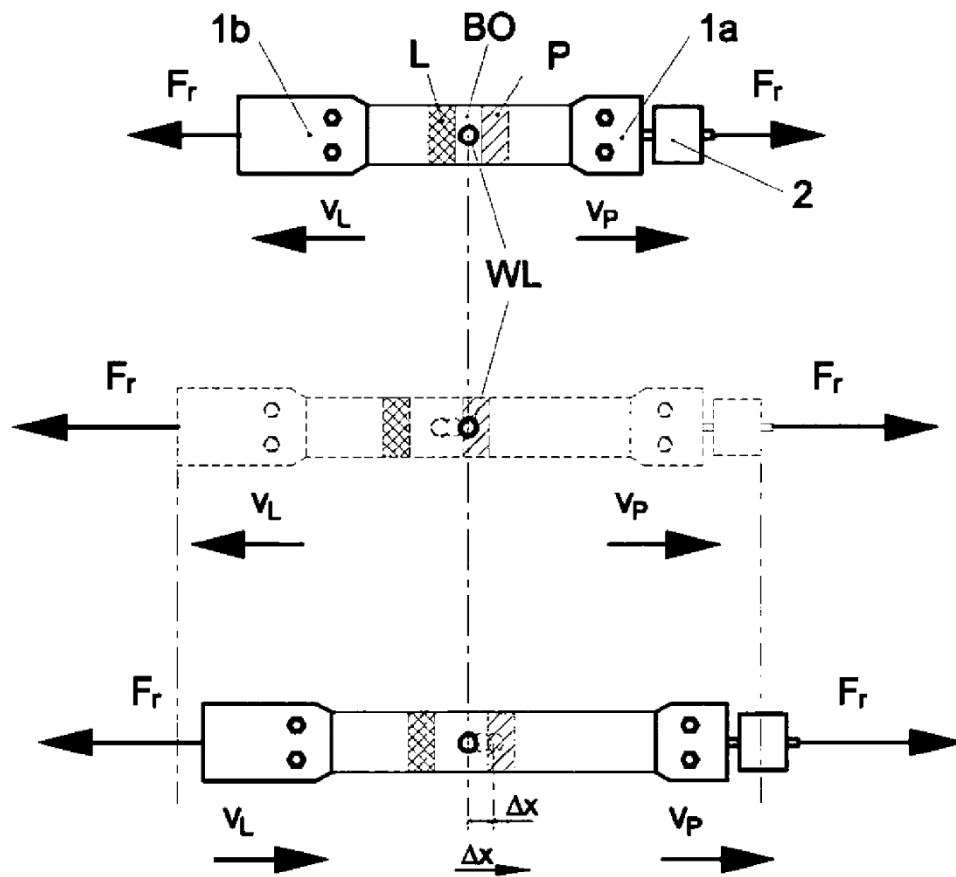


Fig. 2