

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

Јасмина Ј. Лазаревић

**Раманова спектроскопија
фармаколошки активних супстанци и
биокатализатора**

докторска дисертација

Београд, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Jasmina J. Lazarević

**Raman spectroscopy of pharmacologically
active compounds and biocatalysts**

doctoral dissertation

Belgrade, 2019

Ментор: _____

др Бранко Бугарски
редовни професор
Технолошко-металуршки факултет
Универзитет у Београду

Члан комисије: _____

др Зорица Кнежевић - Југовић
редовни професор
Технолошко-металуршки факултет
Универзитет у Београду

Члан комисије: _____

др Диана Бугарски
научни саветник
Институт за медицинска истраживања
Универзитет у Београду

Члан комисије: _____

Академик Зоран В. Поповић
научни саветник
Институт за физику Београд
Универзитет у Београду

Mojoj porodici

Захвалност

Свом ментору, професору Бранку Бугарском, дугујем велику захвалност на указаном поверењу, сарадњи, саветима, разумевању и топлим људском приступу током свих протеклих година.

Академику Зорану В. Поповићу неизмерно сам захвална на пруженој прилици да се бавим истраживачким радом у Центру за физику чврстог стања и нове материјале Института за физику у Београду и изванредним условима за рад. Хвала на могућности да учим и радим са изузетним људима и уз њих, јер су ме сви они обликовали као истраживача, те и њима захваљујем.

Веома сам захвална др Диани Бугарски, научном саветнику Института за медицинска истраживања, на сарадњи и пруженој могућности да отворим врата магичног света биологије.

Др Тамари Кукољ желим да изразим искрену захвалност на досадашњој успешној сарадњи, професионалном приступу, одговорној припреми узорака матичних ћелија, колегијалности и саветима у вези са израдом и обликовањем тезе.

Сарадницима са Института за физику, др Милошу Радоњићу и др Дарку Танасковићу из Лабораторије за примену рачунара у науци дугујем велику захвалност за DFT прорачуне молекула ибупрофена, без којих рад на тој теми не би био комплетан.

Срдачно захваљујем на сарадњи, преданом раду и несебичној помоћи др Урошу Ралевићу из Центра за физику чврстог стања и нове материјале Института за физику.

Прекретницу у мом професионалном животу направила је др Снежана Ускоковић-Марковић, ванредни професор на Катедри за аналитичку хемију Фармацеутског факултета Универзитета у Београду. Хвала јој од срца јер ме је охрабрила и показала да могу више. Година проведена у раду са студентима била је незаборавна и надањујућа.

На подршци, позитивној критици, саветима, веселој атмосфери у радном окружењу и пријатељству хвала онима који су и много више од колега: Ани Милосављевић, Сањи Ђурђић Мијин, Бојани Вишић и Новици Пауновићу.

Љубав, нежност, пажња и топли дом мојих родитеља, Руџице и Јована, и брата Милана, увек су били моја сигурна лука и на томе сам им неизмерно захвална.

Ненаду Лазаревићу, мом најбољем пријатељу, животном сапутнику, сараднику, с којим делим живот, посао и канцеларију, захваљујем јер је све што зна несебично поделио са мном. Хвала на љубави, подршци и помоћи.

Мерења Рамановог расејања за потребе ове дисертације извршена су у Центру за физику чврстог стања и нове материјале Института за физику у Београду. Нумерички прорачуни извршени су у Лабораторији за примену рачунара у науци Института за физику у Београду. Узорци матичних ћелија добијени су из Лабораторије за експерименталну хематологију и матичне ћелије Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду. Истраживање је финансирано од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, у оквиру пројеката ИИИ46010, ИИИ45018 и ОН175062.

Раманова спектроскопија фармаколошки активних супстанци и биокатализатора

Резиме

У овој дисертацији, Раманова спектроскопија коришћена је за свеобухватну анализу примарних мезенхимских матичних ћелија пореклом из периодонцијума, меког везивног ткива које спаја корен зуба за алвеоларну кост и има улогу у одржавању минерализације и ублажавању сила која се јављају жвакањем. Раманова спектроскопија примењена је са циљем да се стекне увид у унутрашњи биохемијски профил на нивоу појединачних мезенхимских матичних ћелија, јер је познато да свака ћелија има јединствен рамански спектар. Ове ћелије стимулисане су да диференцирају у ћелије адипогене, хондрогене и остеогене лозе те су и диференциране ћелије испитиване овим методом. Стаклена покривна стакла коришћена су као подлоге јер је стакло материјал који се у лабораторијама најчешће користи, јефтино је, што је од значаја за потенцијалну клиничку примену ове методе. С друге стране, стакло има врло снажан рамански одговор, али је показано да је анализа могућа посматрањем одређеног спектралног региона у ком је утицај стакла елиминисан. У свим групама узорака, забележено је истоветно понашање, манифестовано променама у раманским спектрима у виду повећања релативног интензитета Раман мода протеина/липида и смањења релативног интензитета мода нуклеинских киселина. Поред тога, извршена је опсежна статистичка анализа применом анализе принципалних компонената, која је открила значајна груписања ћелија које поседују исте спектралне карактеристике. Упркос хетерогености примарних матичних ћелија и лоза насталих њиховом диференцијацијом, показано је да микро-Раманова спектроскопија на адекватан начин омогућава разликовање ћелијског статуса, што је значајно са аспекта медицинске и клиничке примене.

Спектроскопска анализа живих ћелија се још увек веома ретко обавља у клиничким условима и истраживачким студијама, иако у испитивању (пато)физиолошких процеса представљају изузетан извор информација. Између осталог, разлог је дуго време снимања спектра током ког долази до активације аутолитичких процеса, потреба за специфичном опремом, као и немогућност анализирања у тренутку узорковања. Стога, неопходно је

пронаћи оптималан метод очувања ћелија у постојећем стању, имајући у виду да је избор фиксатива условљен самом природом ћелије, тј. ћелијском лозом. Иако фиксација значајно мења састав и изглед биолошког узорка, могуће је обезбедити конзистентне хемијске и физичке особине избором одговарајућих услова припреме. У овој дисертацији, два најчешће коришћена хемијска фиксатива, формалдехид и метанол, употребљена су за очување примарних матичних ћелија пореклом из перидонцијума, које су између осталог, важан ћелијски извор у реконструктивној стоматологији. Помоћу Раманове спектроскопије, узорци ћелија су испитивани, те је утицај ових фиксатива на рамански одговор ћелија анализиран и упоређен. Како су у питању различити механизми деловања ових хемијских супстанци, одређене Раман моде су померене и/или промењеног интензитета у раманским спектрима. Да би се добила комплетнија слика, резултати су статистички обрађени применом анализе главних компонената.

Полиморфизам је важна особина фармаколошки активних супстанци и ексципијенаса који постоје у кристалном облику. Ова појава представља велики проблем током развоја лека, тј. његовог дозирањег облика, јер утиче на физичка и хемијска својства супстанци од којих зависи исход одређеног технолошког поступка. Овде је приказана раманска студија рацемског ибупрофена на ниским температурама. Извршена је детаљна анализа његове кристалне симетрије. Калкулације од првих принципа динамичких особина појединачног молекула ибупрофена упоређене су са експерименталним подацима. Уочено је 19 од 26 карактеристичних Раманових мода очекиваних у спектралном опсегу испод 200 cm^{-1} , карактеристичном за међумолекулске вибрације.

Кључне речи: Раманова спектроскопија, мезенхимске матичне ћелије, анализа појединачних ћелија, полиморфизам, међумолекулске вибрације.

Научна област: Технолошко инжењерство

Област истраживања: Биохемијско инжењерство и биотехнологија

УДК број:

Raman spectroscopy of pharmacologically active compounds and biocatalysts

Abstract

In this dissertation, the utilization of Raman spectroscopy for comprehensive analysis of primary mesenchymal stem cells from periodontal ligament, a soft connective tissue which anchors tooth root for the alveolar bone, was demonstrated. Since every cell has the unique Raman spectrum, Raman spectroscopy was used with the purpose to gain the insight in intrinsic biochemical profile on a single cell level. Mesenchymal stem cells from periodontal ligament were stimulated to differentiate towards osteogenic, chondrogenic, and adipogenic lineages. These differentiated cells were investigated by means of Raman spectroscopy as well. Microscopic glass cover-slips were used as substrates due to its cost-effectiveness and common use in laboratories, which is important for its clinical application. On the other hand, glass has strong Raman response, but it was demonstrated that the analysis was possible by taking into account certain spectral region in which its influence was eliminated. In all sample groups, the same type of behavior was noticed, manifested as the increase of relative intensity Raman band of proteins/lipids, and the decrease of relative intensity of nucleic acids Raman bands. Further, the extensive statistical analysis in the form of principal component analysis was performed, revealing significant groupings of cells with the same spectral features, which confirmed previously obtained results. Despite the heterogeneity of primary mesenchymal stem cells and their differentiated lineages, it was proved that micro-Raman spectroscopy could adequately distinguish cell status, which is important for its clinical and medical use.

In investigation of (patho)physiological processes, cells represent an exceptional source of information. However, spectroscopic analysis of live cells is still very seldom in clinics, as well as in research studies. Among others, the reasons are long acquisition time during which autolysis process is activated, necessity of specified technical equipment, and inability to perform analysis in a moment of sample preparation. Hence, an optimal method of preserving cells in the existing state is of extreme importance, having in mind that selection of fixative is cell lineage dependent. In this study, two commonly used chemical fixatives, formaldehyde and methanol, were used for preserving primary mesenchymal stem cells extracted from

periodontal ligament, which are valuable cell source for reconstructive dentistry. By means of Raman spectroscopy, cell samples were probed and the impact of these fixatives on their Raman response was analysed and compared. Different chemical mechanisms are the core processes of formaldehyde and methanol fixation and certain Raman bands were shifted and/or of changed intensity when Raman spectra of cells fixed in that manner were compared. In order to get clearer picture, comprehensive statistical analysis was performed.

Polymorphism is an important property of pharmacologically active compounds and excipients which exist in crystal form. This phenomenon is a big drawback during drug development and development of its dosage form, due to its influence on physical and chemical properties of a substance, having huge impact on the outcome of a technological process. Here, the Raman study of racemic ibuprofen at low temperatures, was demonstrated. Detailed analysis of the racemic ibuprofen crystal symmetry, related to the vibrational properties of the system, has been presented. The first principle calculations of a single ibuprofen molecule dynamical properties were compared with the experimental data. Nineteen, out of 26 modes expected for the spectral region below 200 cm^{-1} , have been observed.

Keywords: Raman spectroscopy, Mesenchymal stem cells, Single cell analysis, Polymorphism, Intermolecular vibrations

Scientific field: Technological engineering

Research area: Biochemical engineering and biotechnology

UDC number: number

Садржај

1	Увод	1
1.1	Раманова спектроскопија и мезенхимске матичне ћелије	1
1.2	Раманова спектроскопија и полиморфизам	12
1.3	Кратак преглед	14
2	Метод и експеримент	15
2.1	Историјски развој Раманове спектроскопије	15
2.1.1	Класична теорија Рамановог расејања	16
2.1.2	Квантна теорија Рамановог расејања	19
2.2	Експериментална поставка	20
2.2.1	TriVista 557	22
2.2.2	NTegra	23
2.3	Припрема узорака, експериментални услови и обрада података . .	24
2.3.1	Мезенхимске матичне ћелије периодонцијума	25
2.3.1.1	Изолација и култивација мезенхимских матичних ћелија периодонцијума	25
2.3.1.2	Припрема узорака мезенхимских матичних ћелија периодонцијума за експеримент Рамановог расејања	26
2.3.1.3	Експериментални услови	28
2.3.1.4	Обрада експерименталних података	30
2.3.2	Ибупрофен	33
2.3.2.1	Експериментални услови	33
3	Мезенхимске матичне ћелије: диференцијација и хемијска фиксација	35
3.1	Испитивање диференцијационог статуса ПД – ММЋ Рамановом спектроскопијом: резултати и дискусија	35
3.2	Праћење утицаја хемијске фиксације на примарне ММЋ методом Раманове спектроскопије: резултати и дискусија	44

4	Полиморфизам фармаколошки активних једињења:	
	Ибупрофен	54
4.1	Кристална структура (RS) – ибупрофена	54
4.2	Унутрашње вибрације (RS) – ибупрофена	56
4.3	Међумолекулске вибрације (RS) – ибупрофена	59
5	Закључак	65
	Библиографија	67

1. Увод

1.1 Раманова спектроскопија и мезенхимске матичне ћелије

Биокатализа, у ширем смислу, обухвата све облике катализе у којима се као активатори хемијских реакција користе биолошки ентитети или њихова комбинација (ензими, органеле, ћелије или вишећелијски организми) [1, 2]. Употребом биокатализатора постижу се већа продуктивност, уштеда и добијање квалитетнијих производа, омогућава њихова лакша сепарација. Споредне реакције се готово у потпуности сузбијају, јер биокатализаторе карактерише висока селективност, укључујући регио-, хемо-, диастерео- и енантиселективност. Такође, преласком на биокатализу, поштују се нове стратегије друштвене и еколошке одговорности које се базирају на поштовању концепта одрживог развоја и омогућује прелаз ка зеленим технологијама [3, 4]. За све (потенцијалне) биокатализаторе важно је да се развије метод брзе, економичне и недеструктивне карактеризације током животног циклуса [5]. Због својих јединствених особина, матичне ћелије (МЋ) представљају занимљиво подручје за тестирање оваквих техника.

Ограничена способност регенерације и репарације одраслог хуманог организма захтева нове терапијске приступе у лечењу многих болести и стања. Подаци говоре да је Србија на дну европске лествице према броју донора органа. Тек прошле године је донет Закон о пресађивању људских органа ("Сл. гласник РС", 57/2018) који ближе уређује ову област, а који је у јавности дочекан са скепсом. Трансплантациона медицина још увек није постала рутинска, пре свега због ограничене доступности органа за трансплантацију. Тиме су регенеративна медицина и инжењеринг ткива добиле свој замајац. Ткивни инжењеринг интегрише открића из области биологије, биохемије, хемије, науке о материјалима, физике, медицине и биотехнологије, с циљем да се направи витални графт ван тела. Главна идеја ткивног инжењеринга је да се направи одговарајући биокомпатибилни 3D носач (скафолд) [6] [Слика

1.2]. Више од две деценије се на томе интензивно ради, али је примена органа створених у лабораторији који би помогли пацијентима који чекају на трансплантацију и даље далеко од рутинске. Без обзира на још увек недовољну развијеност ове области, досадашњи напори унапредили су сазнања о развоју органа, култури ћелија, дизајну биореактора и биоматеријала, неинвазивног мониторинга ћелија и ткива, стратегијама о развоју носача лекова и хируршким интервенцијама. Матичне ћелије (МЋ) имају кључну улогу у регенеративној медицини и ткивном инжењерингу, чиме су шансе за излечење многих до сада неизлечивих и животно угрожавајућих болести значајно увећане. Велика очекивања од овог приступа потичу од јединствених особина матичних ћелија, као што су самообнављање и потенцијал за диференцијацију *in vitro*. С аспекта диференцијационог капацитета, ембрионалне МЋ (ЕМЋ) и индуковане плурипотентне МЋ (иПМЋ) пружају највише могућности. Ипак, познато је да ове ћелије формирају тератоме, чиме је њихова терапијска примена онемогућена. Као значајан недостатак ових ћелија, јављају се и етичка питања која се доводе у везу са самом изолацијом. С друге стране, имајући у виду релативно једноставне процедуре изолације, често и током рутинских интервенција или као њихов нуспродукт, и изостанак етичких питања када је иста у питању, мезенхимске матичне ћелије (ММЋ) имају значајну предност у односу на ЕМЋ и иПМЋ. Стога, ММЋ представљају обећавајуће средство у ћелијској терапији, регенеративној медицини и ткивном инжењерингу [7, 8]. Клиничка употреба ММЋ углавном је заснована на њиховој ниској имуногености *in vitro*, у преклиничким студијама, као и у студијама на људима, што иде у прилог примени алогених ММЋ у трансплантационој медицини. Миграторна способност ММЋ омогућава им да испоље свој регенеративни потенцијал било где у организму.

Присуство нехематопоетских МЋ у костној сржи претпостављено је још у XIX веку захваљујући раду немачког патолога Конхајма [9]. Наиме, посматрајући физиолошки процес зарастања рана, дошао је до закључка да костна срж може бити извор фибробласта који стварају колаген. Доказ да костна срж садржи ћелије које могу диференцирати у друге мезенхимске ћелије и фибробласте, стигао је од Фриденштајна и сарадника [10]. Данас, после скоро пола века од овог открића, познато је да ове ћелије насељавају ткива и органе у читавом адултном организму, али и организму фетуса, као и у перинаталном ткиву, где имају примарну улогу у одржавању ткивне хомеостазе, регенерацији и репарацији [11, 12]. Комитет за мезенхимске и ткивне матичне ћелије Међународног удружења за ћелијску терапију (ISCT, од енгл. In-

ternational Society for Cell Therapy), установио је минимални критеријум за карактеризацију ММЋ: адхезија за пластичну површину, експресија CD73, CD90, CD105 површинских маркера, недостатак хематопоетских маркера CD34-, CD45-, CD14-, CD79 α -, HLA-DR-, као и диференцијациони потенцијал ка више лоза (остеогеној, адипогеној и хондрогеној) [13, 14]. Осим потенцијала за диференцијацију у ткива мезодермалног порекла, показано је да ММЋ могу да трансдиференцирају и у различите типове ћелија ендодермалног и ектодермалног порекла (ендотелске ћелије, неуронске ћелије, хепатоците, кардиомиоците итд.) у зависности од услова култивације, што је последица њиховог ембрионалног порекла (из мезодерма и кранијалног неуралног гребена) [15], као што је приказано на Слици 1.3. Међутим, стварање графтова и диференцијација у биолошки и функционално ткивно-специфичне ћелије су још увек недовољно разјашњени [16]. Иако ММЋ поседују заједничке ћелијске карактеристике, опште је прихваћено да због свог ткивног порекла, старости донора, услова култивације, ове ћелије имају променљив регенеративни капацитет [17, 18]. Важна особина у разматрању ММЋ као потенцијалних терапијских агенаса је и њихова способност модулације имунског одговора, што директно, ћелијским контактом, што индиректно, секрецијом солубилних фактора [19]. Њихов имунски фенотип (широко описан као МНС I+, МНС II-, CD40-, CD80-, CD86-) сматра се неимуногеним, те би се алогена трансплантација могла одиграти без имуносупресије. Најпре је забележено да ММЋ утичу на имунски одговор тако што га супримирају, али је њихова улога у имунитету још увек предмет опсежних истраживања [20]. Поред тога што представљају потенцијални ћелијски извор за потребе регенеративне медицине, значајна је и њихова примена у развоју нових лекова и фармацеутским истраживањима, јер прецизније одсликавају физиолошка стања у односу на имортализоване ћелијске линије које се иначе користе у претклиничким истраживањима. Временом, испитивања на животињама би такође могла бити сведена на најмању меру [21].

Хумане ММЋ које су испитиване у овој тези потичу из ткива периодоцијума (ПД – ММЋ), фиброзног васкуларизованог везивног ткива. Оно повезује зуб за алвеоларну кост, одржава ниво минерализације и ублажава механичке силе настале услед процеса жвакања [22, 23, 24]. У претходним истраживањима, показано је да ПД – ММЋ испитиване у експерименту изведеном у оквиру израде ове тезе, испуњавају критеријуме за идентификацију ММЋ, постављене од стране ISCT [25, 26]. Ипак, природа ММЋ, укључујући ПД – ММЋ је још увек недовољно истражена. Стога је испитивање ПД – ММЋ, као

ћелијског извора за потребе регенеративне медицине и стоматологије и ткивног инжењеринга, од великог значаја за развој нових терапијских приступа [27].

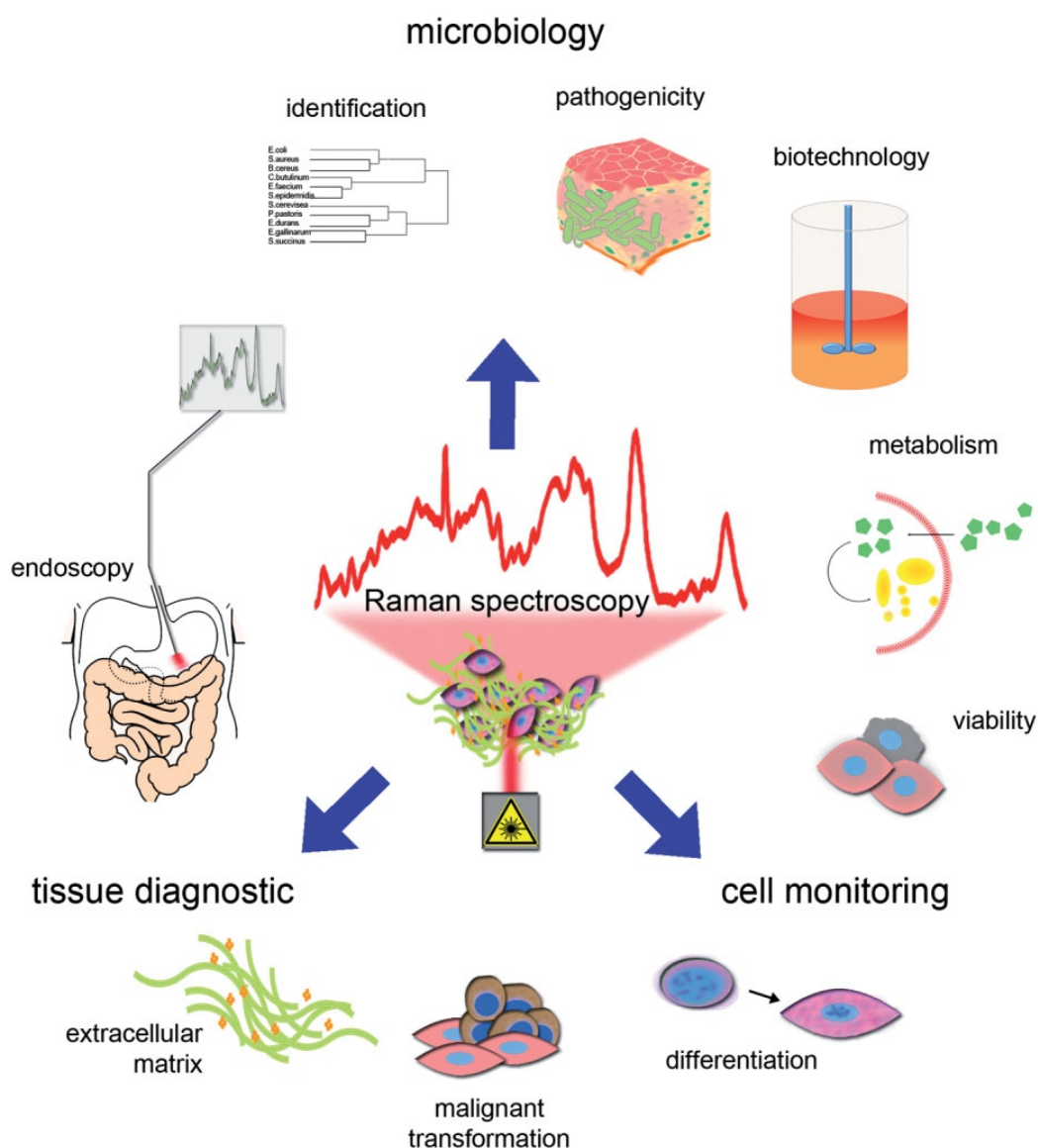
Иако су периодонтална ткива ектодермалног порекла, ПД – ММЋ изоловане из периодонцијума одраслих јединки поседују особине матичности сличније ММЋ него ћелијама неуралног гребена, те експримирају површинске маркере карактеристичне за ММЋ: CD105, CD90 и CD73. Не експримирају CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 и HLA класе II [28, 29, 30]. Осим тога, ПД – ММЋ локализоване у периваскуларном зиду периодонцијума имају морфолошких сличности са перицитима, а такође сличне су и у диференцијационом потенцијалу, ћелијском фенотипу и могућности да *in vitro* формирају структуре налик на капиларе. Недавно је утврђено да и ММЋ из других ткивних извора (мозак, плућа, јетра, бубрези, мишићи, кожа, костна срж) поседују особине перицита [31, 32]. На матичност ПД – ММЋ утичу различити фактори, као што су ткивно порекло, узраст донора, услови култивације, присуство запаљенских процеса и фактори раста [33]. Пролиферативна и миграторна способност, као и потенцијал за диференцијацију опадају са годинама донора, што је посебно значајно за аутологу трансплантацију код пацијената оболелих од хроничног периодонтитиса, који се најчешће јавља у старијој животној доби [34].

ПД – ММЋ изолују се из средње трећине коренског дела зуба након екстракције, мада је показано и да се извесна количина ових ћелија налази у алвеоларном простору. С аспекта изолације, млечни зуби су посебно занимљиви, јер је показано да ПД – ММЋ таквог порекла имају већу пролиферативну способност, као и израженији остеогени и адипогени потенцијал, у поређењу са ћелијама које потичу из ткива сталних зуба [35, 36].

Узимајући у обзир хетерогеност примарних ММЋ, која је последица различитог ткивног порекла, старости донора и услова култивације, од суштинског је значаја да ове ћелије буду адекватно описане и окарактерисане током читавог виталног периода, пре даље манипулације. Иако су данас многе технике доступне у овој области, укључујући масену спектроскопију, проточну цитометрију, имуноцитохемију, као и технике које су усмерене ка анализи карактеристика појединачних ћелија у оквиру популације ММЋ на нивоу генома, транскриптома, протеома, епигенома и метаболома, већина њих нарушава интегритет и онемогућава даљу примену ових ћелија. Такође, неке од њих трају веома дуго, приметне су и захтевају специфичне обележиваче, који осим што нарушавају природну структуру ћелија, повећавају трошкове анализе [37, 38]. Тако се у овој области наметнула Раманова спектроскопија-оптичка вибрациона техника која се заснива на нееластичном расејању светлости на

материјалу, тј. на Рамановом ефекту [39, 40, 41, 42]. Ова метода превазилази наведене недостатке захваљујући јединственим особинама: неинвазивна је, недеструктивна, не захтева сложену припрему узорака, потребне су врло мале запремине истог, брза је и анализит може бити у било ком агрегатном стању. Такође, вода није ограничавајући фактор, што није случај са другим оптичким техникама каква је нпр. Фурије-трансформ инфрацрвена спектроскопија, која представља комплементарну методу Рамановој спектроскопији [43]. Резултат је јединствени рамански спектар, "отисак прста" анализата, који пружа комплетну слику о (био)хемијском саставу и структури узорка, на субмолекуларном нивоу. Овај метод користи се за изучавање промена у хемијској структури/саставу, као и у молекуларној симетрији и/или симетрији кристала. Оно што је заједничко за све раманске спектре биолошких узорака, иако су ћелијски-(ткивно-)специфични јесте да одсликавају укупну молекуларску грађу, укључујући сигнале који потичу од протеина, нуклеинских киселина, липида, угљених хидрата и неорганских кристала. Због свог богатог макромолекуларног састава, биолошки узорци представљају изузетно сложене системе када се ради о вибрационој спектроскопији, која је у стању да испита издвојену вибрацију у молекулу или кристалу. У таквим случајевима, говоримо о вибрационим тракама које представљају бројне истоветне вибрације, а не о појединачним вибрацијама.

Свака промена биохемијског састава биолошког система може резултовати променом интензитета одређене Раманове линије [38, 44, 45, 46]. За ову област је од изузетне важности што се анализа може извршити на нивоу појединачне ћелије (тзв. *single cell* анализа). Иако је сам концепт Раманове спектроскопије познат већ скоро читав век и дуго се користи за детекцију и идентификацију хемијских супстанци у различитим областима, пре свега физике и хемије, тек се у последњих неколико деценија учесталије примењује у анализи биолошких система и у биомедицини, са тежњом да у што краћем временском периоду постане референтна аналитичка/дијагностичка метода и нађе своју рутинску примену у клиници и науци о живим системима. У анализи ћелија, рамански спектри су карактеристични за сваки тип и пружају додатне информације о ћелијској вијабилности, диференцијационом стању, туморогеничности итд. Када је у питању анализа ткива, Раманова спектроскопија може да детектује значајне промене екстрацелуларног матрикса, као и да на неинвазиван начин изврши карактеризацију здравих ткива и оних са патолошким променама. Такође, примењује се и за процесни мониторинг *in vitro* инжењеризованих матрикса у ткивном инжењерингу. Ове, као и друге области примене Раманове



Слика 1.1: Примена Раманове спектроскопије у биомедицини. Преузето из [47].

спектроскопије у биомедицини представљене су на Слици 1.1.

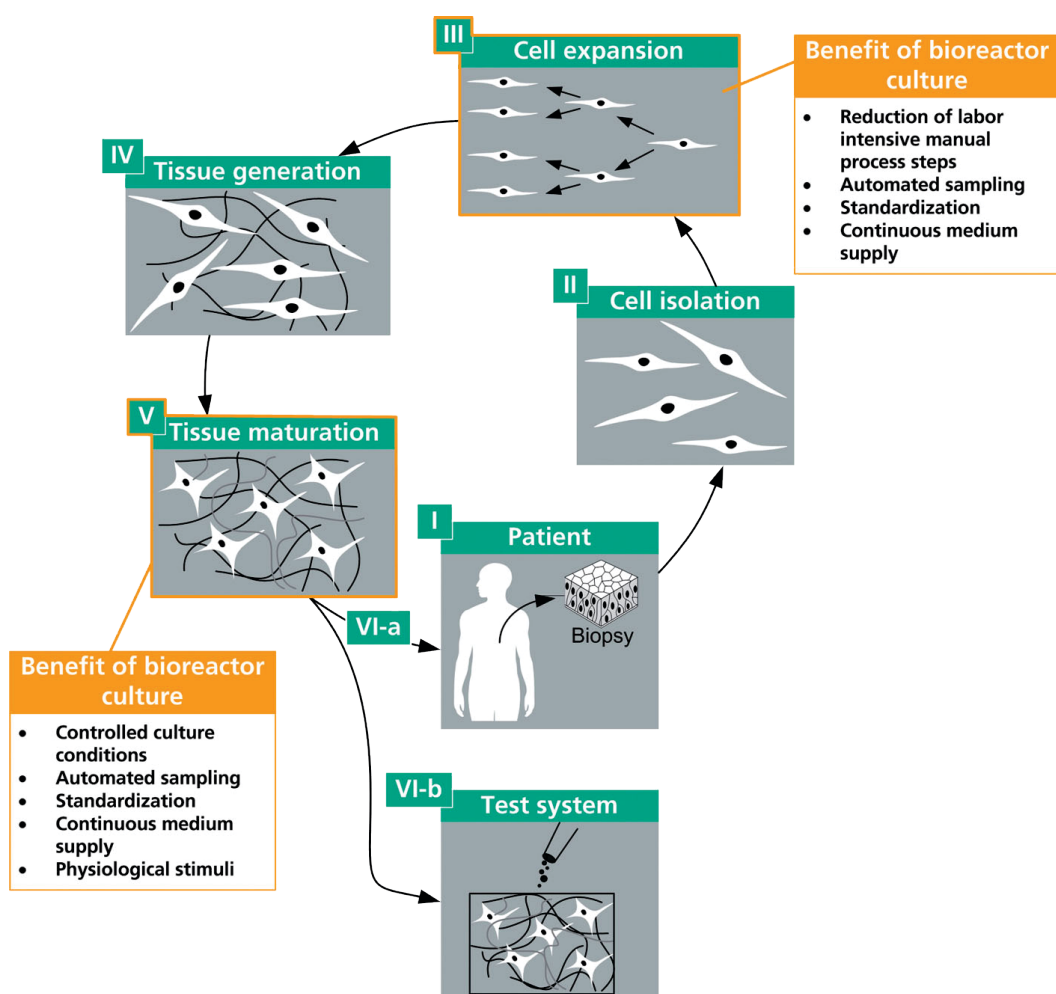
Последњих година долази до експанзије метода Раманове спектроскопије у карактеризацији микроорганизама са применом у биотехнологији, јер је овим методом могуће разликовати споре од активних облика, као и споре и друге партикуле присутне у раствору. Такође, могуће је на основу раманских спектра разликовати споре различитих бактеријских врста на основу промена у концентрацији дикалцијум-дишиколината и протеина. Овај метод је робустан и веома репродуцибилан чак и при различитим условима температуре, времена и медијума. За нозокомијалне инфекције и њихову

епидемиологију од значаја је примена Раманове спектроскопије у анализи микробних колонија, где се уочавају спектралне разлике услед различитих метаболичких стања у центру колоније и на њеним ивицама. Као директан и недвосмислен метод, Раманова спектроскопија се примењује као додатна аналитичка техника уз серотипизацију, гел-електрофорезу и генотипизацију у микробиологији [48, 49, 50, 51, 52].

Адекватна карактеризација и идентификација ММТ, али и других биолошких система, кључна је када је у питању њихова даља примена. На пољу биотехнологије, мониторинг интрацелуларног материјала и метаболичких особина су кључни кораци, јер се природни или артефицијални метаболити ћелија пречишћавају у индустријски биотехнолошки производ (хемијске супстанце, горива или биолошки активне супстанце). Раманска студија на *Saccharomyces cerevisiae* показала је да се промене у одређеним фазама раста могу детектовати овим методом на основу спектралних промена које су у вези са стадијумом ћелијског циклуса и пупљењем [52]. Када су у питању еукариотске ћелије, и оне имају свој специфични рамански спектар ком доприносе ћелијске функције и метаболичке карактеристике, што их чини јединственим. У више студија показано је да се Раманова спектроскопија може користити за дискриминацију примарних ћелија и ћелијских линија. На примеру *HaCaT* кератиноцита и примарних кератиноцита, показано је да линије имају јачи, тј. већи интензитет вибрационе моде протеина и ДНК услед веће пролиферативне активности. Такође, показано је да А549 линија хуманих ћелија карцинома плућа није адекватна замена за примарне алвеоларне ћелије, већ су алвеоларне ћелије трансфековане ретровирусом боља опција јер су сличније примарним алвеоларним ћелијама [53, 54]. По питању матичних ћелија и њихове даље примене у ћелијској терапији или у ткивном инжењерингу, анализа метаболичког стања ових ћелија је суштински важна [55, 56]. Раманова спектроскопија показала се као сензитивна метода за праћење биохемијских промена које се дешавају приликом оштећења ћелија или наступајуће ћелијске смрти [57]. Највећи број испитивања МТ методом Раманове спектроскопије до сада вршен је помоћу експериментално напреднијих поставки (CARS од енгл. Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy, Раман пинцета (Raman tweezers), TERS, од енгл. Tip enhanced Raman spectroscopy, SERS, од енгл. Surface enhanced Raman spectroscopy) због веће осетљивости коју показују [58]. Живе мишће и хумане ЕМТ побуђују највећу пажњу [44, 46, 47, 56, 59]. Поред тога, вршено је и спектрално мапирање живих и апоптотичних ЕМТ [60]. Међутим, забележено је све веће интересовање за

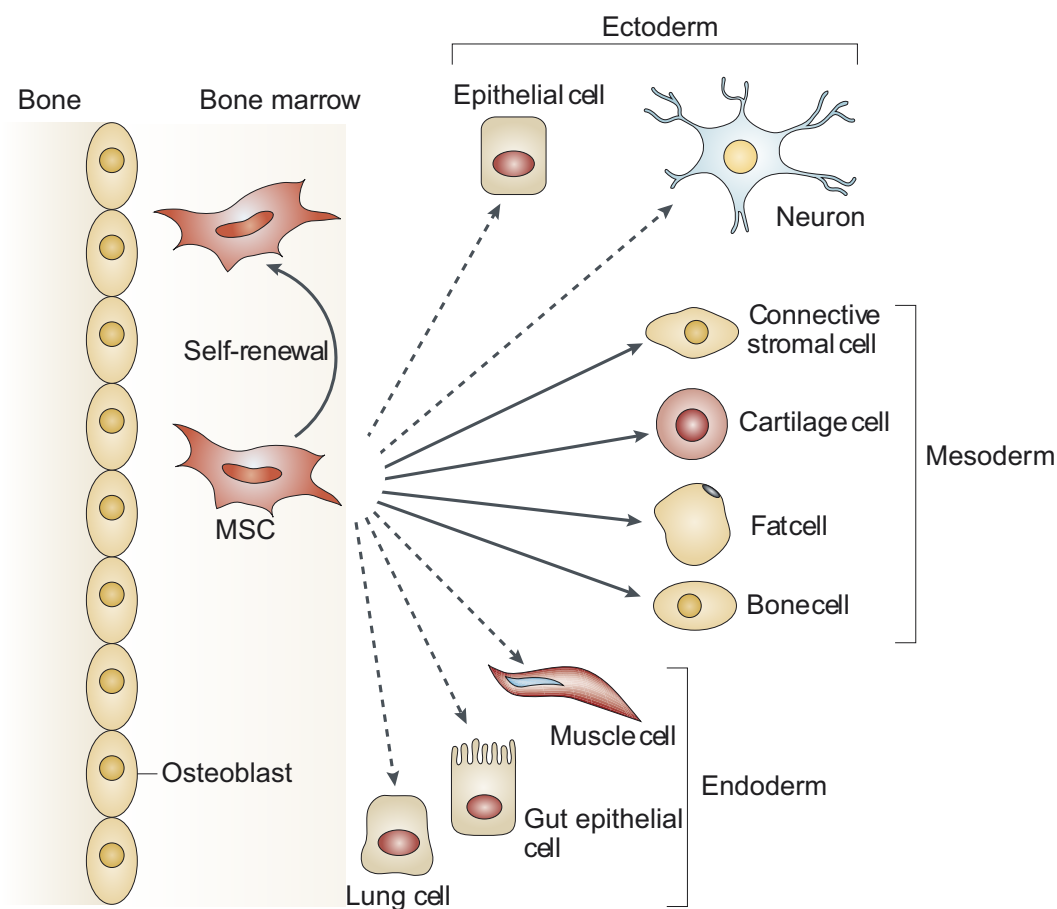
ММТ у овој области, управо због широких могућности њихове даље примене [38, 61, 62]. Једно испитивање ММТ методом вибрационе спектроскопије бавило се карактеризацијом ММТ пореклом из костне сржи и испитивало је ефекте различитих фактора који утичу на способност диференцијације ка остеогеној лози [63]. Даље, Раманова спектроскопија је примењена као аналитички метод за карактеризацију и идентификацију ММТ резус мајмуна различитих узрастних група, од феталне до јувенилне [64]. Такође, овај спектроскопски метод је примењен за мапирање дистрибуције различитих биомолекула у оквиру две групе МТ: адултних хуманих ММТ пореклом из костне сржи и хуманих ЕМТ, као и за идентификацију спектралних карактеристика у оквиру раманских спектра који би правили разлику између генетички абнормалних и трансформисаних ћелија са једне, и нормалних, са друге стране [65]. Једна студија посвећена је и детекцији промена у вијабилности ММТ пореклом из пупчане врпце методом микро-Раман спектроскопије, где аутори износе хипотезу да се способност ових ћелија за живот и размножавање може описати помоћу три вибрационе моде одређене енергије [61].

Спектроскопска анализа живих ћелија и даље се обавља веома ретко, и у клиничким и у истраживачким условима, пре свега због дужине трајања процеса када је аутолиза неизбежан механизам. Ипак, није увек могуће испитивати аналит у тренутку када је узоркован. Одлучујући и основни корак ћелијске биологије за добијање сензитивних и репродуцибилних резултата је процес који се назива фиксација. Њиме се одржава локализација биомолекула. Примењује се за одржавање физиолошког стања ћелије, превенирањем скупљања или отицања ћелије изазваним осмотским притиском иницираним сушењем на ваздуху, као и аутолизе активацијом лизозомалних ензима. Аутолиза укључује процесе денатурације протеина, дефосфорилације моноклеотида, фосфолипида и протеина, накупљање хроматина, фрагментацију једра и кондензацију и фрагментацију цитоплазме [67]. Познато је да избор средства за фиксирање зависи од природе саме ћелије и може значајно да промени експерименталне податке када је у питању Раманова спектроскопија [68]. У последњој деценији, рађена су бројна испитивања утицаја различитих фиксатива на раманске спектре различитих ћелијских лоза како би се пронашли оптимални услови фиксирања за сваку од њих. Једна од студија бави се проучавањем ефекта формалдехида и етанола на CARS сигнал протеина и липида у различитим ћелијским просторима глијалних и неуронских ћелија. Закључено је да је фиксација формалдехидом преферабилан метод презервације ових ћелија [68]. Испитиван је ефекат



Слика 1.2: Дефиниција ткивног инжењерства: Током биопсије (I), ћелије се изолују (II) и умножавају помоћу стандардних метода ћелијске културе (III). Након тога, ћелије се засејавају у скафолд (IV) и 3D структура је формирана. Типично, ћелије морају да се адаптирају на услове 3D културе и успоставе ткивно-специфичне функције. Стога, обезбеђује се процес матурације (V). На крају, изграђено ткиво може бити употребљено као имплант (VI a) или као тест систем (VI b). За умножавање ћелија и фазу сазревања ткива, приказане су предности биореакторског система. Преузето из [6].

хемијских процеса фиксације на раманске спектре здравих ћелија и ћелија леукемије [69]. У поређењу са спектрима нефиксираних ћелија, спектри фиксираних су показали промене интензитета специфичних Раман маркера, а каснија статистичка анализа показала је да метанол изазива значајније промене у спектру у поређењу са формалдехидом. Даље, метод Раманове спектроскопије примењен је за испитивање механизма дејства хемијских фиксатива на три ћелијске линије: нормалне ћелије коже, ћелије нормалног бронхијалног



Слика 1.3: Диференцијација ММЋ ка више ћелијских лоза. ММЋ из костне сржи могу да се самообнављају (закривљена стрелица), као и да диференцирају (праве стрелице означене пуном линијом) у ћелије мезодерма. Способност да трансдиференцирају у ћелије екто- и ендодермалног порекла приказана је испрекиданом стрелицом, с обзиром на то да је трансдиференцијација спорна *in vivo*. Преузето из [66].

епитела и плућног аденокарцинома [70]. Деградација нуклеинских киселина, денатурација протеина и цурење липида забележено је са свим фиксативима (формалином, Карнојевим фиксативом, метанолом са сирћетном киселином) и на свим ћелијским лозама, али у различитом степену. Аутори су запазили да формалин на најбољи начин чува целовитост ћелије и даје спектрални садржај који је најсличнији ономе који потиче од живих ћелија. Такође, једна студија бавила се испитивањем утицаја фиксације формалдехидом, десикацијом и сушењем на ваздуху [71]. Резултати су показали да избор методологије фиксације значајно утиче на квалитет и репродуцибилност резултујућих спектралних података. Формалдехид је показао противречне промене када је у питању очување ћелије, као и губитак интензитета сигнала, док је сушење

довело до контрадикторних резултата када је у питању репродуцибилност. Десикација је показала добру спектралну репродуцибилност и добар однос сигнала и шума [71].

Један од ограничавајућих фактора у примени Раманове спектроскопије за испитивање карактеристика појединачних ћелија је могући допринос супстрата (подлоге) раманском спектру. Начин да се ово превазиђе је коришћење специјалних кристалних подлога велике чистоће и кристаличности. Такви супстрати су обично скупи, што у знатној мери умањује потенцијал ове технике.

Други ограничавајући фактор је сама комплексност поставке, процедура и могуће пертурбације анализата приликом анализе појединачних живих ћелија. Стога се прибегава анализи фиксираних препарата. Међутим, сам процес хемијске фиксације може имати значајан утицај на биохемијску структуру анализата што доводи до варијације сензитивности метода у зависности од предмета изучавања. У овој дисертацији, испитиван је утицај два најчешће коришћена фиксатива, метанола и формалдехида, на раманске спектре ММЋ на нивоу појединачне ћелије.

У овој тези, Раманова спектроскопија примењена је на ПД – ММЋ ради њихове спектроскопске карактеризације, као и на ПД – ММЋ које су стимулисане да диференцирају у ћелије масног ткива, хрскавице и кости са циљем утврђивања спектралних разлика. Анализа је извршена на стаклу које у великој мери утиче на раманске спектре монослоја ћелија, како би се утврдило да ли је анализа уопште могућа на основу одређеног спектралног опсега у ком је допринос стакла могуће елиминисати. Разматрана је могућност примене широко доступних микроскопских стаклених плочица у спектроскопској карактеризацији и праћењу диференцијације ММЋ, при чему су дефинисане одговарајуће процедуре. Извршена је асигнација најзначајнијих раманских мода, као и спектралних разлика, а затим су подаци и статистички обрађени. Поред тога, микро-Раман спектроскопија примењена је у испитивању фиксираних ПД – ММЋ, ради утврђивања ефеката два најчешће коришћена хемијска фиксатива који имају различити механизам деловања (метанол и формалдехид) на спектралне карактеристике, а затим су ти ефекти поређени. Формалдехид у великој мери реагује са аминок групама, формира метиленске мостове и доводи до унакрсног повезивања молекула (енгл. cross-linking), што их мења, али и стабилизује [72]. Његов утицај на терцијерну структуру протеина није велик. Насупрот томе, метанол замењује воду у ћелији и доводи до разарања хидрофилних и хидрофобних веза, што последично доводи до промена терцијерне структуре протеина [73, 74].

1.2 Раманова спектроскопија и полиморфизам

Најзаступљеније технике у фармацеутској индустрији и истраживању дуго су биле нуклеарна магнетна резонанца и масена спектрометрија [75]. Међутим, нагли технолошки развој довео је до све веће примене Раманове спектроскопије у овим истраживањима. Данас постоје комерцијални уређаји захваљујући којима је читав аналитички поступак знатно олакшан, у смислу да је руковање инструментима сведено на рутинско управљање. Метода је високоспецифична, Раманов спектар је јединствен за сваки аналит, под условом да постоји општи услов за раманску активност. Због раније већ наведених особина, Раманова спектроскопија се редовно примењује у идентификацији, карактеризацији и одређивању фармаколошки активних супстанци (ФАС) у чистом стању и у формулацијама. Све је чешћа употреба Раманове спектроскопије у мониторингу процеса у реалном времену у фармацеутској индустрији, примарно у квалитативној анализи. Данас постоје готове базе података (спектара) које омогућавају једноставно проналажење и поређење спектара анализираних супстанци, а самим тим и брзу идентификацију. Широј примени у овој области доприноси и једноставност експеримента, као и чињеница да су подаци комплементарни онима добијеним Фурије-трансформ инфрацрвеном спектроскопијом и дифракцијом X-зрака. Неколико врста информација може се добити овом методом: разликовање ексципијенаса и ФАС, разликовање полиморфних облика ФАС, праћење хемијских промена интермедијера, идентификација састава смеше итд. Постојање комерцијалних уређаја довело је до примене Раманове спектроскопије у QA/QC¹, како у току процеса (in - line), тако и након завршетка истог (on-line). Иницијална примена у процесној аналитичкој технологији односила се углавном на мониторинг примарних процеса, пре свега за разумевање кинетике и термодинамике процеса [76], што је довело до бољег разумевања, оптимизације и праћења процеса.

У већини случајева, ФАС су органски молекули изоловани у облику кристалних соли. Манипулација приликом израде фармацеутског облика може довести до промена форме чврсте супстанце, а све промене се врло лако могу уочити у раманском спектру. Већина фармацеутских производа су чврстог стања, те је и знање о карактеристикама ФАС и ексципијенаса у том облику од виталног значаја за развој у ефикасан дозирани облик. Увид у физичке и хемијске особине, као што су растворљивост и стабилност, нарочито у току иницијалних фаза развоја лека, спречава

¹енгл. Quality Assurance/Quality Control, обезбеђење квалитета и контрола квалитета

компликације током даљег процеса производње и побољшава њихов квалитет. Стога, неопходно је разумевање полиморфизма и понашања кристалне структуре било које фармацеутски релевантне супстанце. Полиморфизам се дефинише као особина супстанце да егзистира у две или више кристалних структура. Различити полиморфни облици имају различиту кристалну решетку и стога различите физичке и хемијске особине, као што су густина, тврдоћа, хемијска стабилност, растворљивост, брзина растварања у различитим солвентима, тачка топљења, хигроскопност. Оне директно утичу на биолошку расположивост и биолошку еквиваленцију формулација, које представљају најважније особине за здравствене ауторитете [77, 78, 79]. Другим речима, полиморфизам утиче на фармакокинетику, али и фармакодинамику лека. Појава облика који се међусобно тешко разликују, детектују или појава изоструктурних форми истих или различитих молекула представља низ изазова у производњи лекова. Полиморфни облик изабран током развоја лека треба да буде термодинамички стабилан, са добром растворљивошћу и брзином растварања, нехигроскопан, са високом тачком топљења, компактне морфологије и да не формира хидрате. Ове особине даље утичу на пластичност, компресибилност, способност таблетирања и сл. Ефикасност и брзина развоја једног лека, робустност произвођачког процеса, као и квалитет и стабилност ФАС и ексципијенаса, директно зависе од способности да се успешно произведе одређена стабилна форма лековите или помоћне супстанце. Најважније је одабрати термодинамички најстабилнију форму, а сам процес њене производње мора бити репродуцибилан и конзистентан. Синтеза одређеног облика могућа је пажљивим контролисањем услова средине, као што су температура, суперсатурација, брзина кристализације, одабир солвента и сл. Поуздана производња одређеног стабилног полиморфа је систематичан процес који укључује фазу проналаска полиморфа, његову детекцију и аналитику. Неколико савремених метода успешно се примењује у аналитици полиморфа, као што су дифракција X-зрака, термални методи (термогравиметријска анализа, калориметрија, диференцијална скенирајућа калориметрија), нуклеарна магнетна резонанца, микроскопски методи, али и вибрациона спектроскопија. Како су полиморфни облици ФАС веома осетљиви на физичке третмане, као што су млевање, загревање и слично, многе технике нису нашле примену у њиховој анализи. У раној фази развоја лека и преформулационој фази најчешће су доступне веома мале и ограничене количине супстанци, те је и са тог аспекта Раманова спектроскопија нашла водеће место у овој области. Она даје директан увид у природу фазних прелаза

молекуларних једињења *in situ* која су изложена различитим стресогеним факторима средине, јер за овај тип мерења није потребна посебна припрема узорака, а важно је истаћи да се узорком даље може манипулисати јер остаје неопштећен. Стога, Раманова спектроскопија има важно место у фармацеутским наукама. Ова појава постаје све већи проблем, јер неке студије указују на то да од 10 најчешће преписиваних лекова у Сједињеним Америчким Државама, 8 показују полиморфизам или постоје у форми хидрата [80]. Различити полиморфни облици имају различите физичке и хемијске особине које даље утичу на брзину и профил ресорпције лека и његову биорасположивост. Дакле, и на саму активност лека.

Широко распрострањен приступ у испитивању полиморфних облика ФАС методом Раманове спектроскопије базира се на анализи високоенергијског дела спектра који доминантно потиче од унутармолекулских вибрација. Иако, стриктно говорећи, промена кристалне структуре резултује ренормализацијом и/или променом њихове симетрије, ове промене су, због природа интеракција у молекулским кристалима ФАС, по правилу мале, те их уређаји ограничене резулције и ефикасности често не могу детектовати. Поред тога, у случају када је величина кристалита упоредива са величином ласерског спота (до на ред величине), проста реоријентација кристалита може довести до варијације интензитета унутармолекулских модова. Ова ограничења могу се превазићи изучавањем међумолекулске вибрације које су у "1-1" вези са кристалном структуром анализата. Део дисертације посвећен је испитивању ибупрофена, са посебном пажњом усмереном на међумолекулске вибрације у нискоенергијском делу спектра.

1.3 Кратак преглед

Докторска дисертација подељена је у пет поглавља. После уводног дела, у Глави 2 описани су историјски развој и теоријске основе раманске спектроскопије, експерименталне поставке којима је мерено раманско расејање, као и процес припреме узорака и обраде података. У Глави 3 приказани су оригинални научни резултати објављени у научним чланцима. Методом Раманове спектроскопије анализирани су ПД – ММТ и ћелије настале њиховим диференцирањем (на стакленој подлози), као и утицај хемијске фиксације на раманске спектре ових ћелија. Четврто поглавље приказује оригиналне научне резултате засноване на анализи нискоенергијских међумолекулских и унутармолекулских вибрација ибупрофена. У петој глави сумирани су закључци истраживања. Дисертација се завршава прегледом литературе.

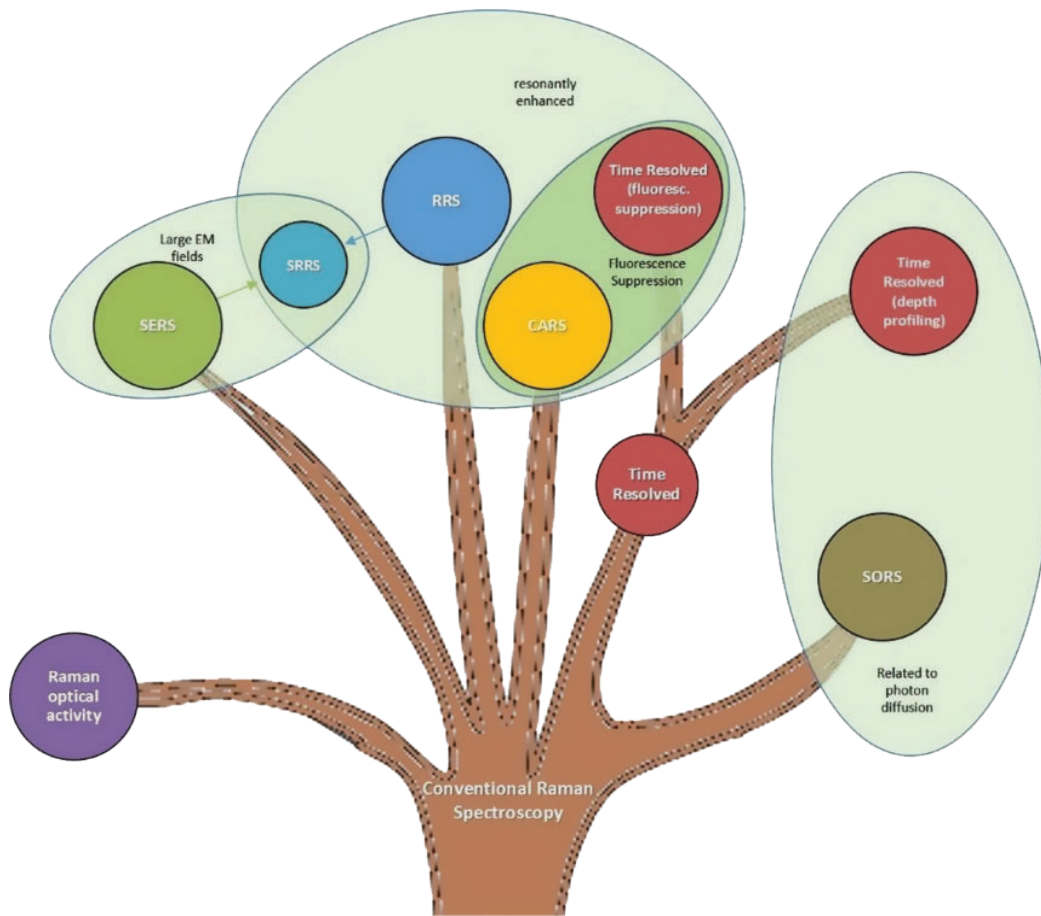
2. Метод и експеримент

2.1 Историјски развој Раманове спектроскопије

Раманова спектроскопија спада у групу оптичких спектроскопских техника. Заснива се на Рамановом ефекту- нееластичном расејању светлости (најчешће видљиве) на материјалу. Ефекат је најпре теоријски предвидео Смекал 1923. године [81], 1925. године су га квантномеханички описали Крејмерс и Хајзенберг [82], а експериментално је потврђен од стране Манделштама и Ландсберга на кристалима 1928. године [42]. Готово истовремено, 1928. године, ефекат на молекулима експериментално потврђују Раман и Кришнан [39], а две године касније, 1930. награђени су за свој допринос Нобеловом наградом из области физике.

Анализом нееластичне компоненте расејане светлости, стиче се увид у вибрациону структуру материјала. Интерпретацијом вибрационих спектра, осим идентификације и информација о структури, може се добити низ података о фундаменталним особинама испитиваног материјала. Експериментално, расејана светлост се анализира као функција таласне дужине и њен интензитет се представља у функцији Рамановог помераја: $\Omega = \omega_l - \omega_s$, па се енергија посматране ексцитације може прочитати директно са спектра.

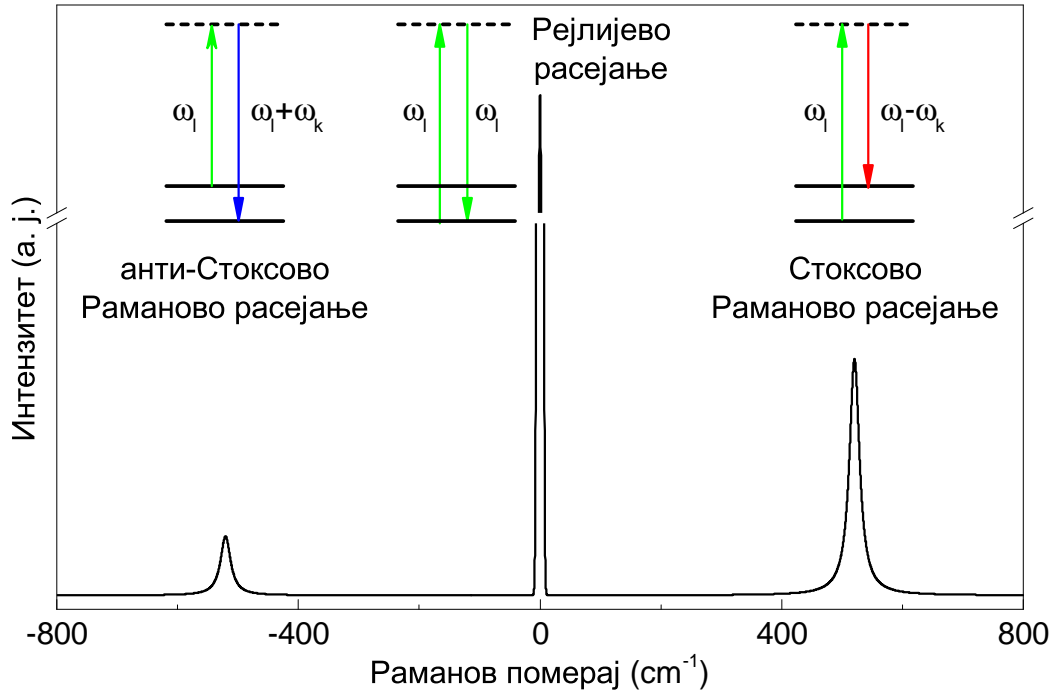
Раманова спектроскопија, као аналитички метод, добија на значају тек 60-их година прошлог века открићем ласера као извора монохроматске светлости. Од тада долази до њеног наглог развоја који је пратио даље усавршавање детектора, извора светлости, као и оптичких дисперзионих елемената. Данас постоје уређаји високе спектралне резолуције и са латералном резолуцијом ограниченом само дифракционим лимитом. Временом долази до развоја различитих варијација у самој методологији [види Сliku 2.1]. Рекло би се да данас нема области у којој се не примењује, како у идентификацији, тако и у одређивању супстанци различите природе и порекла.



Слика 2.1: "Породично стабло" Раманових техника. Релативно једноставна конвенционална Раманова спектроскопија је корен комплекснијих техника, као што су SERS (енгл. Surface enhanced Raman spectroscopy), CARS (енгл. Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy), RRS (енгл. Resonant Raman spectroscopy), SORS (енгл. Spatially offset Raman spectroscopy). Преузето из [83].

2.1.1 Класична теорија Рамановог расејања

Раманов ефекат је резултат интеракције различитих елементарних екситација са електромагнетним (ЕМ) таласима посредством електрона [84]. У пракси, најчешће се посматра интеракција са вибрационим и/или ротационим кретањима. Ако је аналит кристал или велики молекул, ротационо кретање се не разматра. Када ЕМ талас интерагује са узорком, електронске орбитале конститутивних молекула или јона пертурбују се фреквенцијом упадног електричног поља (ω_l) [85, 86]. Пертурбација електронског облака изазвана упадним ЕМ таласом резултује периодичним раздвајањем наелектрисања, тј. индуковањем диполног момента, а осцилујући индуковани диполни момент представља нови извор ЕМ зрачења. Највероватнији процес је да ће се



Слика 2.2: Раманов спектар силицијума мерен на собној температури са илустрацијама одговарајућих прелаза код Рејлијевог, Стоксовог и анти-Стоксовог расејања.

светлост емитовати на истој фреквенци (ω_l) као и упадна светлост, што представља еластично расејање светлости. Ипак, иако много мање вероватно, део светлости се расејава на различитим фреквенцама у односу на упадно зрачење и то је процес нееластичног расејања. Сматра се да се 1 од 10^7 упадних фотона нееластично расеје. Раманово расејање је пример нееластичног расејања светлости [87]. Индуковани диполни момент доводи до поларизације молекула (\vec{P}), што је дато изразом:

$$\vec{P} = \hat{\alpha}\vec{E}, \quad (2.1)$$

где је $\hat{\alpha}$ тензор поларизабилности, а \vec{E} је електрично поље упадног ЕМ таласа. Како су компоненте вектора \vec{P} и \vec{E} у општем случају различите за различите правце, а поларизабилност анизотропна, релацију (2.1) можемо представити у следећем облику:

$$\begin{bmatrix} P_x \\ P_y \\ P_z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{bmatrix} \quad (2.2)$$

Тензор поларизабилности је, у општем случају, функција (тренутног)

положаја језгра и тиме и учесталости молекулских вибрација ($\omega = 2\pi\nu$). На тај начин, добија се зависност вектора поларизације \vec{P} у изразу (2.1) од фреквенције упадног електричног поља \vec{E} (ω_l) и фреквенце вибрације (ω_k). Варијације поларизабилности са вибрацијама молекула могу се изразити развојем сваке компоненте $\alpha_{\rho\sigma}$ тензора поларизабилности $\hat{\alpha}$ у Тејлоров ред у односу на нормалне координате вибрације:

$$\alpha_{\rho\sigma} = (\alpha_{\rho\sigma})_0 + \sum_k \left(\frac{\partial \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k} \right)_0 Q_k + \frac{1}{2} \sum_{kp} \left(\frac{\partial^2 \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k \partial Q_p} \right)_0 Q_k Q_p \dots \quad (2.3)$$

где $(\alpha_{\rho\sigma})_0$ представља вредност компоненте тензора $\alpha_{\rho\sigma}$ у равнотежном стању, $Q_k, Q_p \dots$ представљају нормалне координате вибрација енергија $\omega_k, \omega_p \dots$, а сумацију вршимо по свим нормалним координатама. Индекс "0" односи се на равнотежни положај. У првој апроксимацији посматрамо само чланове линеарне по нормалним координатама. То је тзв. хармонијска апроксимација. Тада израз (2.3) можемо написати у облику:

$$(\alpha_{\rho\sigma})_k = (\alpha_{\rho\sigma})_0 + (\alpha'_{\rho\sigma})_k Q_k, \quad (2.4)$$

где је:

$$(\alpha'_{\rho\sigma})_k = \left(\frac{\partial \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k} \right)_0 \quad (2.5)$$

Како релација (2.4) важи за сваку компоненту тензора, можемо је записати као:

$$\hat{\alpha}_k = \hat{\alpha}_0 + \hat{\alpha}'_k Q_k. \quad (2.6)$$

Уколико претпоставимо да су варијације добро описане простим хармонијским кретањем, временска зависност Q_k је дата са:

$$Q_k = Q_{k_0} \cos(\omega_k t), \quad (2.7)$$

где је Q_{k_0} амплитуда нормалне координате. Комбиновањем израза (2.5) и (2.7) добијамо временску зависност тензора поларизабилности као резултат молекулских вибрација:

$$\hat{\alpha}_k = \hat{\alpha}_0 + \hat{\alpha}'_k Q_{k_0} \cos(\omega_k t). \quad (2.8)$$

Сада у израз (2.1) уводимо временску зависност електричног поља \vec{E} , дату са:

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(\omega_l t), \quad (2.9)$$

и $\hat{\alpha}_k$ дату са (2.8). Даље добијамо:

$$\vec{P} = \hat{\alpha}_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_l t) + \hat{\alpha}'_k \vec{E}_0 Q_{k_0} \cos(\omega_k t) \cos(\omega_l t). \quad (2.10)$$

Користећи тригонометријски идентитет:

$$\cos A \cos B = \frac{1}{2}(\cos(A + B) + \cos(A - B)), \quad (2.11)$$

израз (2.10) се може написати као:

$$\vec{P} = \hat{\alpha}_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_l t) + \frac{1}{2} \hat{\alpha}'_k \vec{E}_0 Q_{k_0} \cos((\omega_k - \omega_l)t) + \frac{1}{2} \hat{\alpha}'_k \vec{E}_0 Q_{k_0} \cos((\omega_k + \omega_l)t). \quad (2.12)$$

Из претходне једначине може се закључити да се индуковани диполни моменти формирају на три различите фреквенце: ω_l , $\omega_l - \omega_k$ и $\omega_l + \omega_k$, што резултује расејањем светлости на исте три учесталости. Прва фреквенца расејања одговара фреквенци упадног ЕМ таласа и представља еластично расејање светлости (*Рејлијево расејање*). Наредне две фреквенце померене су ка нижим и вишим фреквенцама и представљају нееластичне процесе означене као *Стоксово* и *анти-Стоксово расејање*. Неопходан услов за раманско расејање је да израз (2.5) мора бити различит од нуле. Иако класична теорија пружа делимично објашњење Рамановог ефекта (нпр. услов за раманску активност појединих вибрација), није у стању да објасни профил Раманове линије и температурску зависност интензитета Раман активних мода. За њихово разумевање, неопходно је квантномеханичко разматрање одговарајућих процеса [86].

2.1.2 Квантна теорија Рамановог расејања

Према честичној теорији, под појмом Рамановог расејања обично се подразумева расејање на фононима¹ - квазичестицама које представљају кванте механичких вибрација у материјалу, те се ова појава описује као нееластични судар између фотона и материјала при коме фотон добија (анти - Стоксов процес) или губи (Стоксов процес) један или више кваната вибрације. Ако је учесник овог судара само један квант вибрације, у питању је процес првог реда, који је уједно и највероватнији у односу на више(квази)честичне. На Слици 2.2 приказани су прелази за Рејлијево расејање, као и за први ред Стоксовог и анти-Стоксовог расејања. Нека је ω_l упадни фотон, ω_s расејани фотон, а ω_k

¹У општем случају, до расејања може доћи и на другим елементарним (квази)честицама које нису предмет изучавања ове дисертације.

квант вибрације. Тада ће важити закон одржања енергије и импулса за почетно и крајње стање система:

$$\omega_s = \omega_l \pm \omega_k, \quad (2.13)$$

$$k_s = k_l \pm q_k. \quad (2.14)$$

Будући да је код кристала $k_s(k_l) \ll 2\pi/a$, где је a параметар решетке, у експерименту Рамановог расејања могу се уочити само ексцитације са $q_k \simeq 0$.

У процесу расејања светлости упадни фотон енергије ω_l , у видљивом или ултраљубичастом делу спектра, који пада на материјал, представља пертурбацију за електронска стања¹, при чему систем прелази у побуђено виртуално стање [Слика 2.2]. Наведени процес праћен је истовременом деексцитацијом система из виртуалног у неко стационарно стање при чему се емитује фотон енергије ω_s . У зависности од тога да ли је у дошло до промене вибрационог стања система на више, ниже или његовим враћањем на почетно вибрационо стање, можемо говорити о Стоксовом, анти-Стоксовом односно Рејлијевом процесу.

Применом сложених квантномеханичких формализама на процес Рамановог расејања, при чему урачунавамо и анхармонијске доприносе, добијамо израз за профил Стоксове и анти-Стоксове линије:

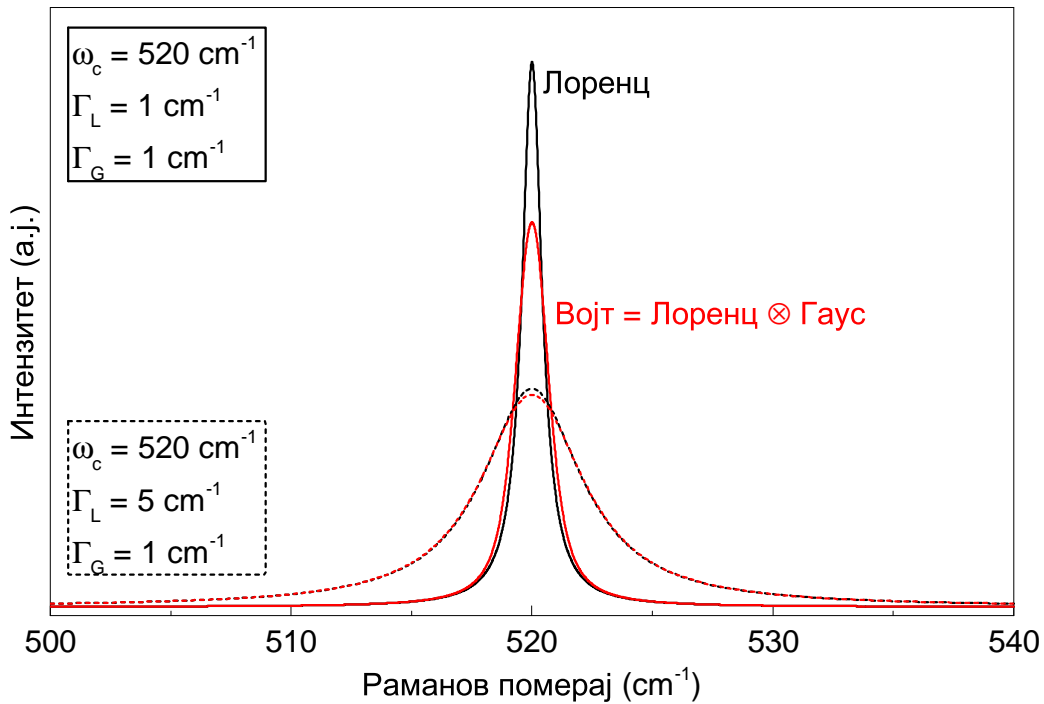
$$\bar{I}_{\substack{\text{Stoks} \\ \text{anti-Stoks}}} = \frac{\text{const.}}{c^4} (\omega_l - \omega_k)^4 \frac{\hbar}{2\omega_k} ((\alpha'_{\rho\sigma})_k)^2 \begin{pmatrix} \bar{n}_k + 1 \\ \bar{n}_k \end{pmatrix} \times \left(\frac{\Gamma}{(\omega - \omega_k)^2 + \Gamma^2} \right) \quad (2.15)$$

У овом изразу, Γ представља полуширину Раманове линије. На основу претходне једначине може се закључити да је основни профил Раманове линије, која одговара једној нормалној вибрацији, описан Лоренцовим профилем (види Сliku 2.3).

2.2 Експериментална поставка

У основи сваког спектроскопског уређаја базираног на Рамановом ефекту су извор светлости, оптички систем за вођење и обликовање снопа, монохроматор и детектор [Слике 2.4 и 2.6] [87]. Као извор светлости, користе се ласери који обезбеђују непрекидну емисију монохроматског зрачења, чиме је започета интензивнија примена ове методе. Недостатак ласера као светлосног извора је постојање плазма-линија које је неопходно уклонити пре него што снап светлости доспе до микроскопа, чему служи систем за вођење и обликовање

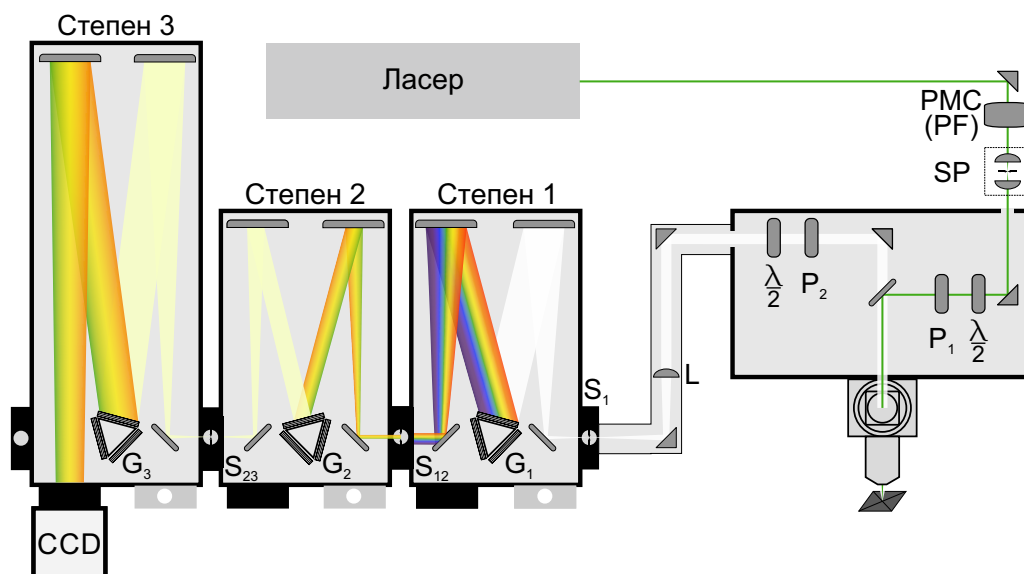
¹Електрони су довољно лаки да могу да прате брзо променљиво ЕМ поље.



Слика 2.3: Илустрација основног профила Раманове линије на примеру силицијума. Црним линијама представљен је основни профил Раманове линије описан изразом 2.15, Лоренцов профил. Услед инструменталног ширења, у експерименту се увек уочава конволуција Лоренцовог и Гаусовог профила, тј. Војтов профил, приказан црвеним линијама. Значајне разлике у анализи Раманових спектра третманом Лоренцовим, односно Војтовим профилем могу се уочити само при малој полуширини посматране ексцитације и великом инструменталном ширењу, односно када је $\Gamma_L \sim \Gamma_G$.

снопа. Елиминисање ласерских плазма-линија врши се филтрима или монохроматором са призмом. Иако су филтри једноставни за употребу, мана им је чињеница да за сваку ласерску линију треба обезбедити посебан филтар који пропушта светлост само те таласне дужине. Насупрот томе, монохроматор са призмом захтева пажљиво подешавање. Светлосни сноп се огледалима доводи до микроскопа који га усмерава на узорак и истовремено прикупља расејану светлост (тзв. расејање уназад). На једном од уређаја (Jobin Yvon T64000) коришћен је конфокални микроскоп којим се омогућава рад са узорцима изузетно малих димензија и постиже добра дубинска и латерална резолуција. Светлост прикупљена у микроскопу даље се усмерава на спектрометар, који просторно разлаже нееластично расејану светлост, након чега се она усмерава на CCD детектор (*Charge Coupled Device*).

За извођење експеримента у овој дисертацији, коришћена су три уређаја за мерење Рамановог расејања (TriVista 557, Jobin Yvon T64000 и NTegra). Као



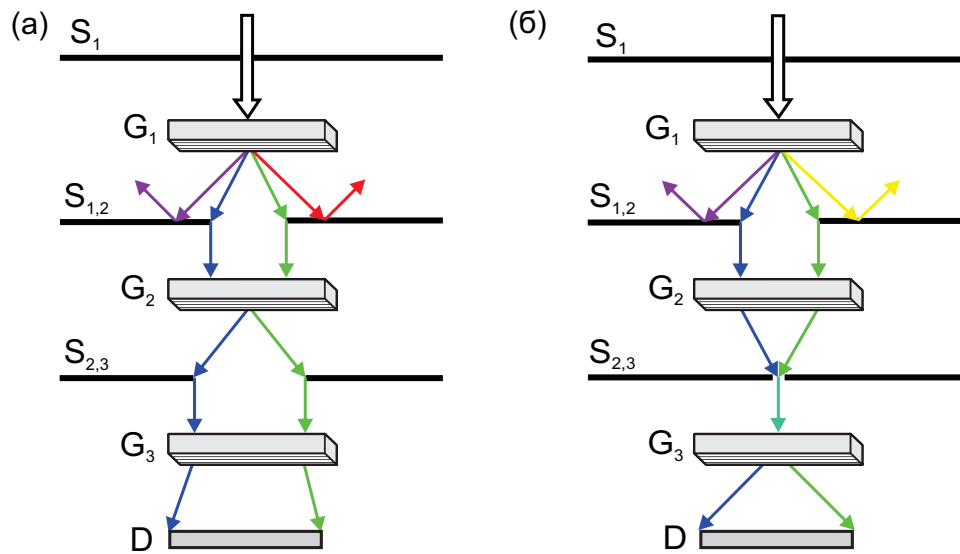
Слика 2.4: Шематски приказ TriVista 557 раманског система, где су PMC - монохроматор са призмом, PF - плазма филтер, SP - просторни филтер, $\lambda/2$ плочица, P - поларизатор, L - сочиво, S - прорез, G - дифракциона решетка, CCD камера. Приказани систем је конфигурисан у троструки одузимајући мод. Сваки од степена опремљен је са по три моторизоване дифракционе решетке (Степени 1 и 2 - 300 зареза/mm, 900 зареза/mm, 1800 зареза/mm, Степен 3 - 600 зареза/mm, 1800 зареза/mm и 2400 зареза/mm.)

извори светлости, примењени су Ar^+/Kr^+ јонски гасни ласер и чврстотелни Nd:YAG ласер и VerdiG ласер. Будући да су TriVista 557 и Jobin Yvon T64000 троструки системи сличног принципа рада, у даљем тексту приказана је и описана само TriVista 557.

2.2.1 TriVista 557

Код троструких система, какви су TriVista 557 и Jobin Yvon T64000, елиминација еластичног расејања постиже се двоструким предмонохроматором. Њихови дисперзионни елементи су дифракционе решетке којима се светлост просторно разлаже по таласним дужинама. Оба поменута спектрометра могу радити у два режима (мода): сабирајућем (адитивном) и одузимајућем (види Сliku 2.5. Сабирајући мод слабије потискује еластично и инструментално¹ расејање. Одузимајући мод скоро потпуно елиминише нежељене компоненте светлости и омогућава детекцију таласних дужина блиских таласној дужини побудне светлости. Прелаз из једног у други мод остварује се или променом

¹Ово расејање је последица вишестриких рефлексија расејања еластично расејање светлост унутар самог уређаја.



Слика 2.5: Шематски приказ принципа рада спектрометра у (а) сабирајућем и (б) одузимајућем режиму, где су G - дифракциона решетка и D - детектор и S - прорез.

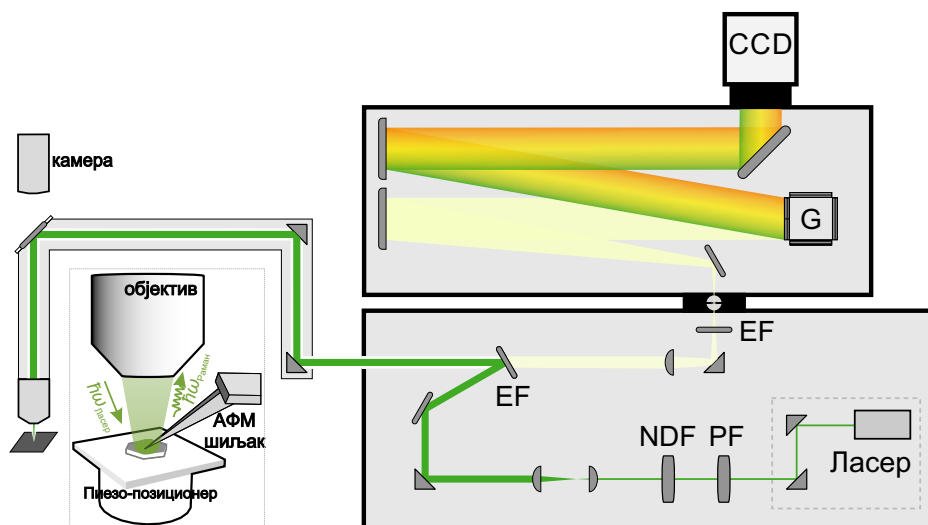
оријентације друге решетке предмонохроматора (TriVista 557), или променом оријентације снопа између прве и друге решетке предмонохроматора (Jobin Yvon T64000).

Основна разлика између сабирајућег и одузимајућег мода потиче од различитог узајамног односа решетки G_1 и G_2 . У првом случају долази до сабирања, док у другом долази до одузимања њихових дисперзија. Варијацијом прореза S_{12} врши се одабир спектралног опсега и истовремено потискује еластично, као и инструментално расејана светлост. У трећем степену, резултујућа светлост се коначно разлаже и усмерава на CCD који се хлади течним азотом.

TriVista 557 и Jobin Yvon T64000 Раманови системи спрегнути су са LINKAM THMS 600 микроскопском пећи, која омогућава рад у температурском опсегу од $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ у различитим атмосферама, као и Konti Cryovac хелијумским микроскопским криостатом, који омогућава рад у температурском опсегу од 4 К до 330 К при притисцима мањим од 10^{-6} mbar.

2.2.2 NTegra

Ntegra Spectra систем пружа могућност симултаних Раман и AFM (од енгл. Atomic Force Microscopy - микроскопија на бази атомских сила) мерења на истој површини узорка. На тај начин, добијају се комплементарне информације



Слика 2.6: Шематски приказ Ntegra раманског система, где су PF - плазма филтер, NDF - филтер снаге, EF - "edge" филтер, L - сочиво, S - прорез, G - дифракциона решетка, CCD камера. Приказани рамански систем, спрегнут је са микроскопом на бази атомских сила.

о физичким својствима (AFM) и хемијском саставу (Раман) узорка, и то са високом резолуцијом. Захваљујући спрези са AFM модулом, узорак увек остаје у фокусу побудног ласера што омогућава добијање Раманових спектра високог квалитета, чак и на узорцима који имају изузетно неравне површине. Таласна дужина побудног ласера овог система је 532 nm, а нумеричка апертура објектива $NA=0,7$. Сузбијање еластично расејане светлости постиже се системом тзв. edge филтера (EF) (види Слику 2.6). Уређај поседује четири моторизоване дифракционе решетке: 150 зареза/mm, 600 зареза/mm, 1800 зареза/mm и 2400 зареза/mm. Могуће је снимити спектрални опсег од ултраљубичастог, преко видљивог до инфрацрвеног. Просторна резолуција ограничена је дифракционим лимитом од 270 nm у XY равни, а омогућен је 3D конфокални имиџинг.

2.3 Припрема узорака, експериментални услови и обрада података

Када су у питању биолошки системи, још увек није постигнут консензус у вези са оптималном таласном дужином побудне светлости, мада се највише примењују извори таласних дужина блиске инфрацрвене области да би се

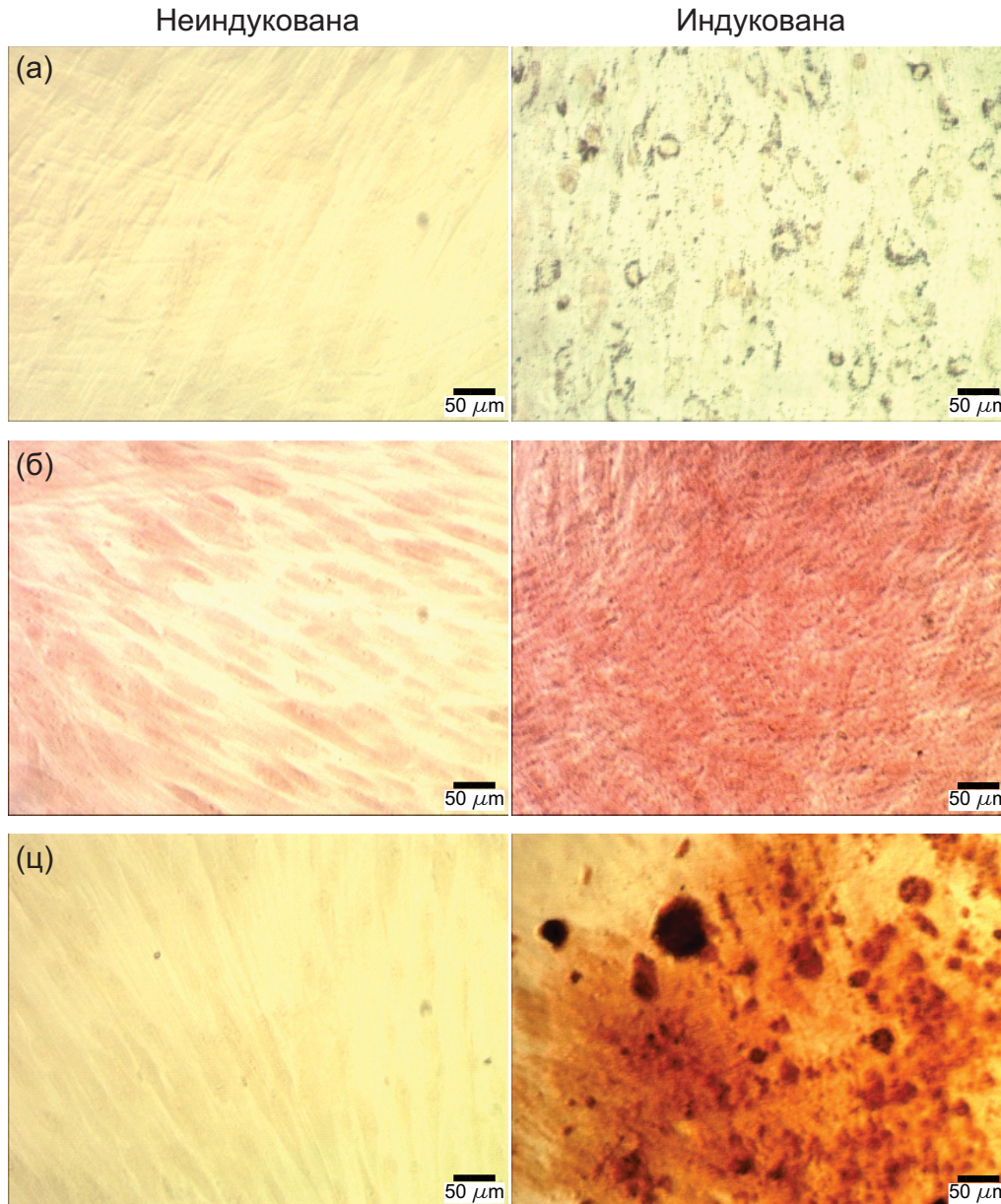
избегла или знатно ослабила фотолуминесценција [47, 88, 89]. Избор, пре свега, зависи од природе узорака и њихових особина, као и циља експеримента. Ипак, како су у питању биолошки узорци, посебан опрез је неопходан како им се не би нашкодило избором експерименталних услова. Иако је једна од особина и велика предност Раманове спектроскопије чињеница да специјална припрема узорака није потребна, с обзиром на природу анализата, ипак је било неопходно утврдити под којим околностима би требало снимати спектре како би се добио оптималан сет информација.

2.3.1 Мезенхимске матичне ћелије периодонцијума

2.3.1.1 Изолација и култивација мезенхимских матичних ћелија периодонцијума

За потребе експеримената вршених током израде ове дисертације, изоловане су и коришћене примарне ММЋ пореклом из ткива периодонцијума здравих одраслих особа након екстракције умњака. Ткива су сакупљана на Департману за оралну хирургију Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, што је претходно одобрио Етички одбор ове установе, уз писани пристанак пацијента. Ткиво периодонцијума је уситњено у асептичним условима, након чега су комадићи ткива постављани у флак површине 25 cm² и култивисани у стандардним условима за култивацију ћелија што подразумева 37 °C у влажној атмосфери (100%) са 5% CO₂), при чему је као медијум за раст ћелијских култура коришћен DMEM (од енгл. Dulbecco's modified Eagle's medium, PAA Laboratories, Pasching, Austria) уз додатак 10%-ног феталног говеђег серума, (FBS, од енгл. Fetal Bovine Serum, PAA Laboratories), 100 U/ml пеницилина и 100 µg/ml стрептомицина (PAA Laboratories). Медијум је мењан сваког трећег дана како би се обезбедиле хранљиве материје и уклониле нечистоће. Када је постигнута конфлуентност од 80-90%, ћелије су редовно пасажирани у DMEM са 10%-ним FBS, одлепљивањем 0.05%-ним трипсином са 1 mM ЕДТА (етиленаминамнтетрасирћетна киселина, PAA Laboratories). Изоловане ПД – ММЋ окарактерисане су према критеријумима Међународног удружења за ћелијску терапију [13], на основу показане адхезије за подлогу, присуства специфичног имунофенотипа и способности диференцијације ка три лозе ћелија мезодермалног ткива [25]. У свим експериментима анализирани су ћелије пасажа П(3-6), подељене у две серије, серију 1 и серију 2. За детаље погледати [90].

2.3.1.2 Припрема узорака мезенхимских матичних ћелија периодонцијума за експеримент Рамановог расејања



Слика 2.7: Потенцијал ММЋ за диференцијацију ка више лоза. (а) Бојење Oil Red O бојом указује на присуство интрацитоплазматских липидних капи чиме се потврђује адипогена диференцијација. (б) Хондрогена диференцијација потврђена је позитивним бојењем протеогликана бојом Сафранин О. (в) Позитивно бојење екстрацелуларног матрикса Ализарин црвеном током процеса минерализације потврђује остеогену диференцијацију.

За потребе снимања Рамановог расејања, у делу дисертације који се бави испитивањем диференцијационог статуса овом методом, ПД – ММЋ

засејане су на округлим покровним стаклима у плочи за култивацију ћелија са 24 бунара (2×10^4 по бунару) и узгајане у стандардним условима култивације. Истовремено, ћелије су засејане под истим условима како би се испратила диференцијација стандардним *in vitro* бојењем. Када је достигнута конфлуенција, индукована је диференцијација ћелија ка адипогеној, хондрогеној и остеогеној лози инкубирањем у специфичном диференцијационом медијуму (за детаље погледати [90]). Уз редовну измену медијума, остеогенеза и хондрогенеза су анализирани након три недеље, а адипогенеза је трајала 4 недеље. Контролни узорци су култивисани у стандардном медијуму са 5% FBS током једнаког временског периода. Након тога, ПД – ММЋ су испране физиолошким раствором, фиксирани метанолом током 10 минута на собној температури и испране дестилованом водом непосредно пре експеримента раманског расејања. Стандардно *in vitro* испитивање процеса диференцијације, које је коришћено као компаративни метод, извршено је након што су ћелије фиксирани и обојени специфичним бојама. Адипогена диференцијација потврђена је уочавањем унутарћелијске липидних капи карактеристичних за адипоците након бојења Oil Red O бојом (Merck, Darmstadt, Немачка) и посматрања под светлосним микроскопом. Хондрогена диференцијација потврђена је хистохемијским бојењем Сафранин О бојом (Merck, Darmstadt, Немачка), чиме се детектују протеоглици екстрацелуларног матрикса хрскавице. Остеогена диференцијација испитивана је бојењем фиксираних ћелија Ализарин црвеном бојом (Riedel de Haen, Хановер, Немачка), у трајању од 30 минута на собној температури чиме се уочава калцијум присутан у екстрацелуларном матриксу и одређује степен минерализације посматрањем под светлосним микроскопом. Имајући у виду ткивно порекло ПД – ММЋ и да је његова улога одржавање нивоа минерализације [24, 91], очекивано је да ПД – ММЋ показују већи степен диференцираности ка остеогеној него адипогеној лози, за разлику од ММЋ пореклом из других ткива [92, 93].

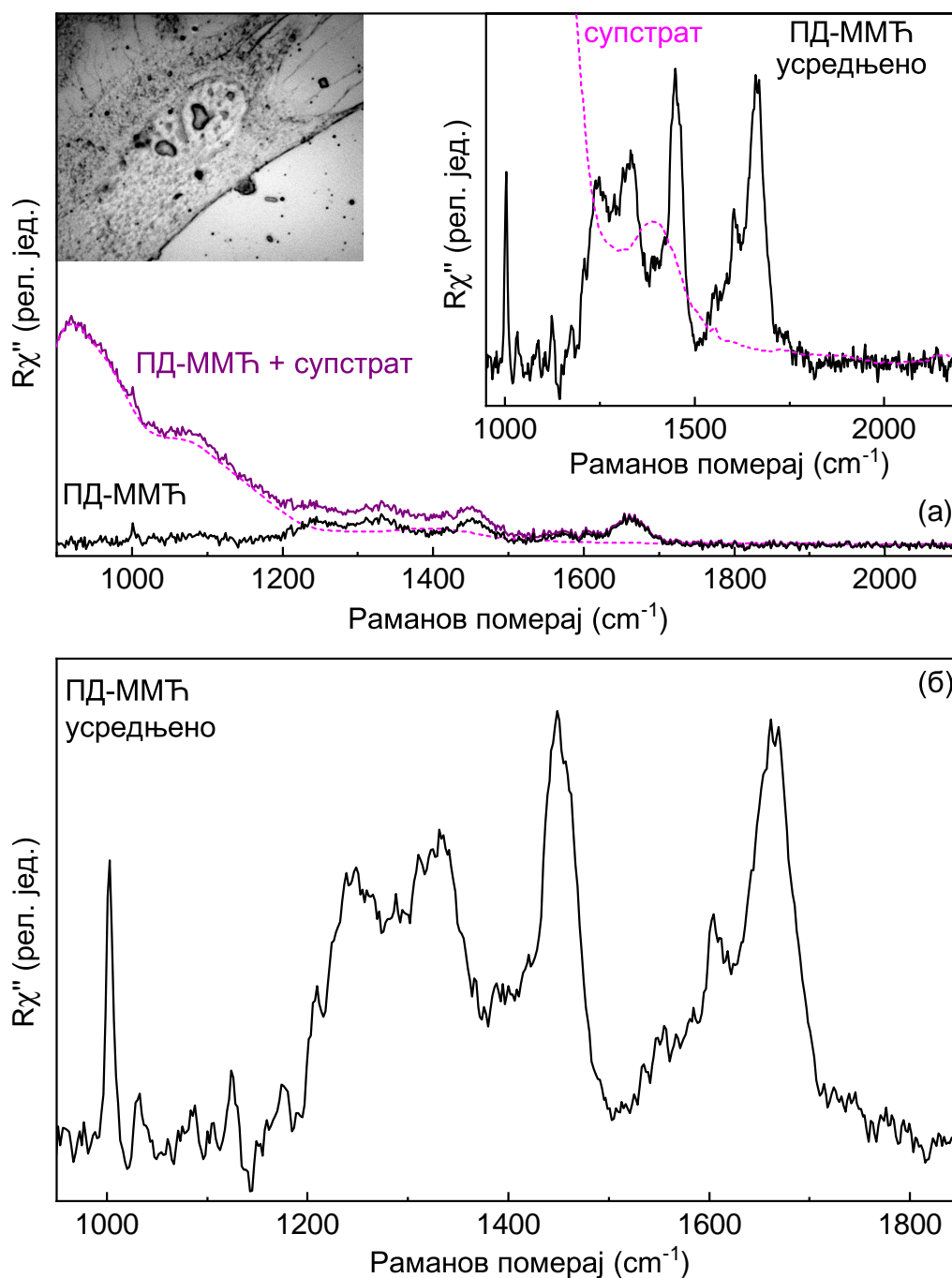
За потребе експеримента Рамановог расејања који се односи на испитивање утицаја различитих фиксатива на раманске спектре ПД – ММЋ, ћелије су засађене на округлим плочицама CaF_2 (Thorlabs) у плочи за култивацију ћелија са 24 бунара (5×10^3 ћелија по плочици) и култивисане у медијуму за раст ћелијских култура при стандардним условима током 24 часа. Након адхезије, ПД – ММЋ испране су физиолошким раствором и фиксирани 3.7% формалдехидом или метанолом током 10 минута на собној температури. Непосредно пре снимања спектра, ћелије су испране пречишћеном водом. Имајући у виду биолошко порекло узорака, познато је да културе примарних

ММТ представљају хетерогену ћелијску популацију, те то треба узети у разматрање. Такође, њихове особине су веома подложне модификацијама за време стандардног процеса култивације [94, 95]. Из тог разлога, да би се добили репродуцибилни резултати, анализирани су ћелије које припадају различитим пасажама (пасажа 3-серија 1 и пасажа 6-серија 2).

2.3.1.3 Експериментални услови

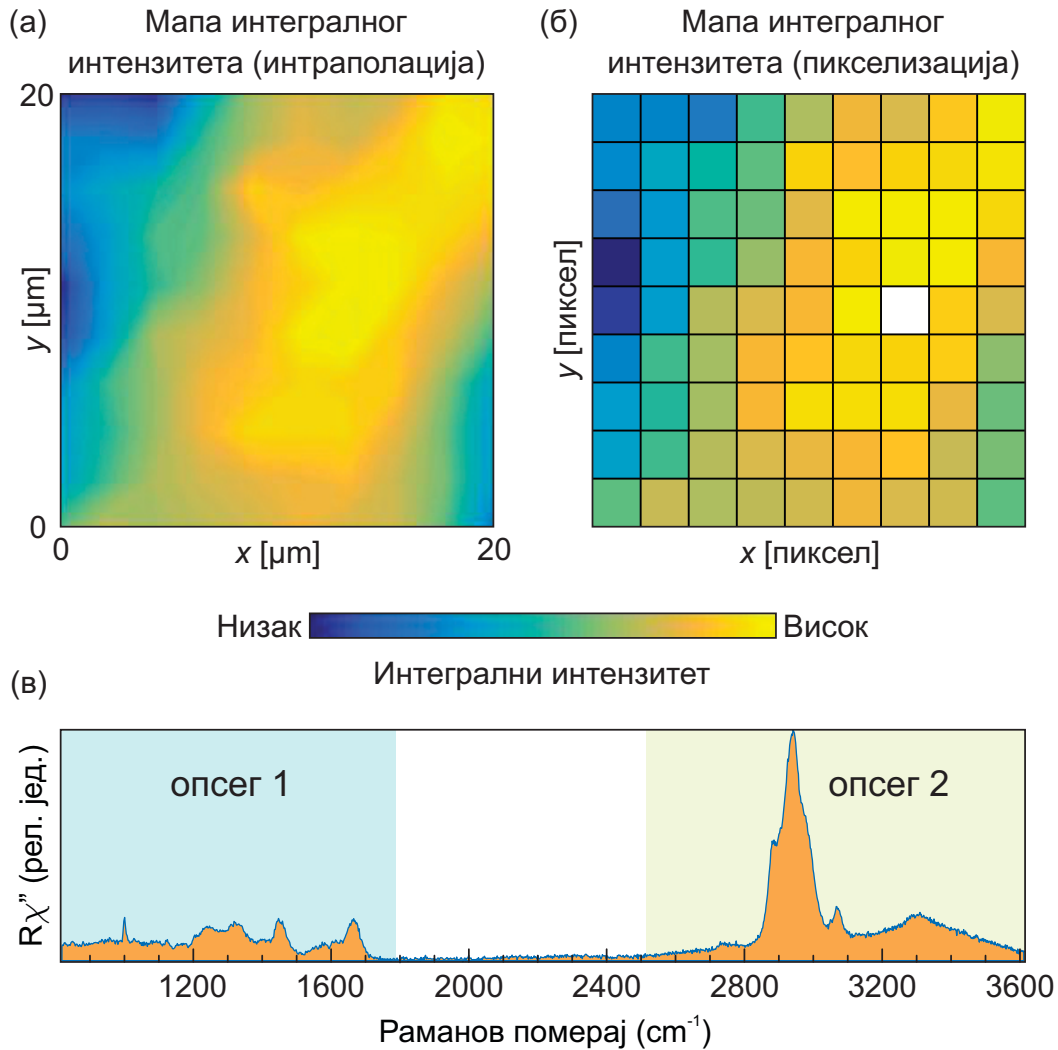
Мерење Рамановог расејања ради провере диференцијационог статуса ММТ извршено је на TriVista 557 микро-раманском систему у конфигурацији расејања уназад. Као светлосни извор, коришћен је Coherent VerdiG зелени ласер, таласне дужине 532 nm. Ласерска линија очишћена је Semrock LL01-532-12.5 Narrowband Clean-up филтером. Фокусирање светлости на узорак постигнут је употребом микроскопског објектива Olympus LMPlanFI са увећањем 100, нумеричке апертуре $NA = 0.80$. Пречник ласерског спота у овом експерименту подешен је на $4 \mu\text{m}$. Са циљем да се избегну сва могућа оштећења узорака и/или ефекти загревања, снага ласера на узорку је одржавана на веома ниском нивоу, око 1 mW. Нису коришћени додатни просторни филтри нити поларизациона оптика ни у упадном, ни у расејаном оптичком путу. Време аквизиције је било 900 секунди. За потребе експеримента, спектрометар је конфигуриран у троструком одузимајућем режиму. У прва два степена коришћена су решетке од 300 зареза/mm, док је у крајњем степену коришћена решетка од 500 зареза/mm. Улазни и други интермедијерни отвор подешени су на $100 \mu\text{m}$. Да би снага пао на пуну ширину детектора, први интермедијерни отвор подешен је на 12 mm. Анализом 360 ћелија добијено је и анализирано 1080 спектра у главном делу експеримента (30 ћелија по ћелијској лози, 180 ћелија по серији).

Експеримент Рамановог расејања изведен ради провере утицаја хемијских фиксатива на спектре ММТ, извршен је на NTegra Spectra Раманово систему. Као извор светлости, коришћен је ласер таласне дужине 532 nm. Снага ласера подешена је на 2 mW и фокусирана на површину од око $1 \mu\text{m}$ како би се добио задовољавајући интензитет сигнала током 60 секунди аквизиције. Под овим условима, показало се да су Раман линије које потичу од узорка, добијене једна за другом на истом месту, стабилне по питању интензитета линија и позиције у спектру. Другим речима, нису уочене ласером изазване промене ћелија током понављања аквизиције на изабраним местима ни за једну тачку. Због постојања унутарћелијских варијација, адекватна методологија мора бити примењена како би се добио потребан ниво репрезентативности узорка, тј. метод мора бити



Слика 2.8: (а) Раманов спектар ПД – ММЋ на стаклу, стаклена подлога и њихова разлика. Леви уметак: Фотографија ПД – ММЋ током експеримента Рамановог расејања. Десни уметак: Поређење спектра супстрата и спектра добијеног усредњавањем 540 Раманових спектара ПД – ММЋ. (б) Усредњени спектар 540 Раманових спектара ПД – ММЋ.

робустан. Испитиване су две серије ПД – ММЋ третираних формалдехидом и метанолом, просторним мапирањем Раман сигнала на 20 ћелија по серији. Спектри су снимани на 10 × 10 или 11 × 11 матрицама просторних тачака,



Слика 2.9: ПД – ММТ Раманова мапа (а) интерполираног интегралног интензитета, и (б) пикселизованог интегралног интензитета. (в) Раманов спектар хумане ПД – ММТ мерен на пикселу означеном белом бојом.

одвојених растојањем већим од процењеног пречника фокуса од око $1 \mu\text{m}$. У зависности од величине ћелије, просторна резолуција је варирала између $2 \mu\text{m}$ и $3 \mu\text{m}$.

2.3.1.4 Обрада експерименталних података

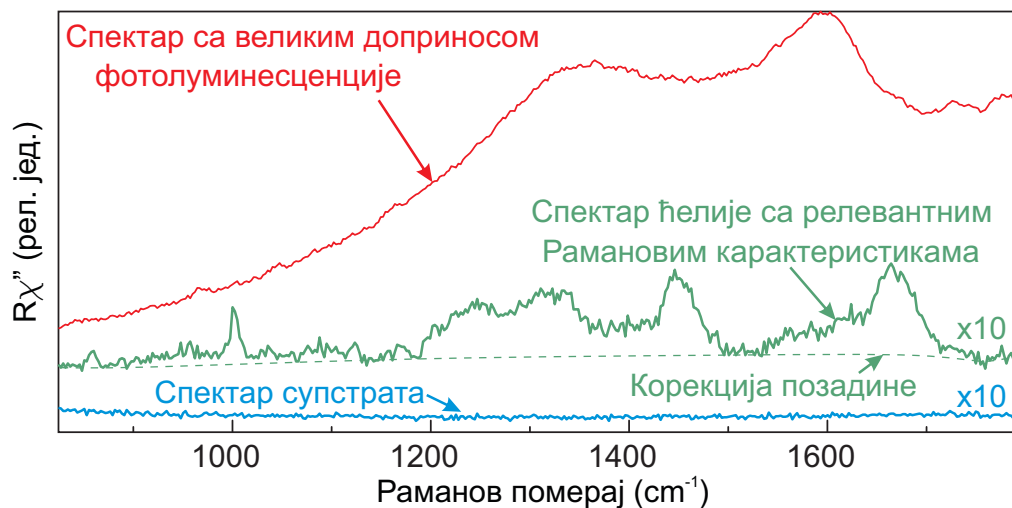
У делу експеримента који се односи на проверу диференцијационог статуса ММТ, анализи спектра претходила је обрада истих, одузимањем доприноса супстрата (види Сliku 2.8 (а)) и биолошке флуоресценције. Никакво равнање (smoothing) спектра није извршено. Спектар супстрата (стакла) добијен је посебно током дужег времена аквизиције. Пре поступка одузимања, спектар супстрата третиран је Савицки-Голеј филтером. На десном уметку на

Слици 2.8 (а) приказано је поређење спектра супстрата са спектром матичних ћелија добијеним усредњавањем 540 спектара. Значајно мањи шум спектра стакла указује да он значајније не доприноси статистици спектара матичних ћелија. Због великог доприноса спектра супстрата на нижим енергијама, анализа је ограничена на спектралну регију изнад 1000 cm^{-1} .

Апсолутна вредност интензитета Раманове линије није поуздана величина. Чак и мала варијација експерименталних услова може проузроковати ”вештачку” варијацију њеног интензитета. Да бисмо искључили ову појаву као потенцијалну несигурност, сви спектри су нормализовани на раманску моду на око 1660 cm^{-1} , која је у свим спектрима присутна са врло високим интензитетом.

Приликом испитивања утицаја фиксације на раманске спектре ПД – ММЋ, добијене су спектралне мапе. Пример интерполиране спектралне мапе појединачне ћелије фиксиране метанолом приказан је на Слици 2.9 (а). На Слици 2.9 (б) приказана је иста мапа, али пикселизована, док је интерполација изостављена ради јасноће. Са x и y означене су просторне координате у којима је спектар снимљен. Интензитет пиксела, означен белом на Слици 2.9 (б), добијен је интегралњем Рамановог спектра у том пикселу. Вредност интеграла једнака је површини испод добијеног спектра, што је и приказано осенченом површином (наранџасто) испод типичног спектра ПД – ММЋ на Слици 2.9(в). Карактеристичне Раман моде уочене су у два спектрална региона означеним на Слици 2.9 (в), 800 cm^{-1} до 1770 cm^{-1} и 2500 cm^{-1} до 3600 cm^{-1} . Уочено је свега неколико спектара који су се значајно разликовали од типичног спектра ПД – ММЋ [Слика 2.9 (в)], а који су приказивали веома доминантне доприносе луминесценције. Пример таквог спектра, у издвојеном спектралном региону од 800 cm^{-1} до 1770 cm^{-1} , приказан је на Слици 2.10. Упадљиво је да велики допринос луминесценције маскира релевантне Раман моде, што може довести до погрешне интерпретације. Из тог разлога, овакви спектри су изостављени из анализе. Релевантни спектри су претретирани пре следствене анализе. Као први корак у томе, одузет је позадински спектар, моделован као полиномска функција четвртог степена (види Слику 2.10). Након тога, спектри су нормализовани на вредност интегралног интензитета који је рачунат у оквирима спектралних региона од интереса.

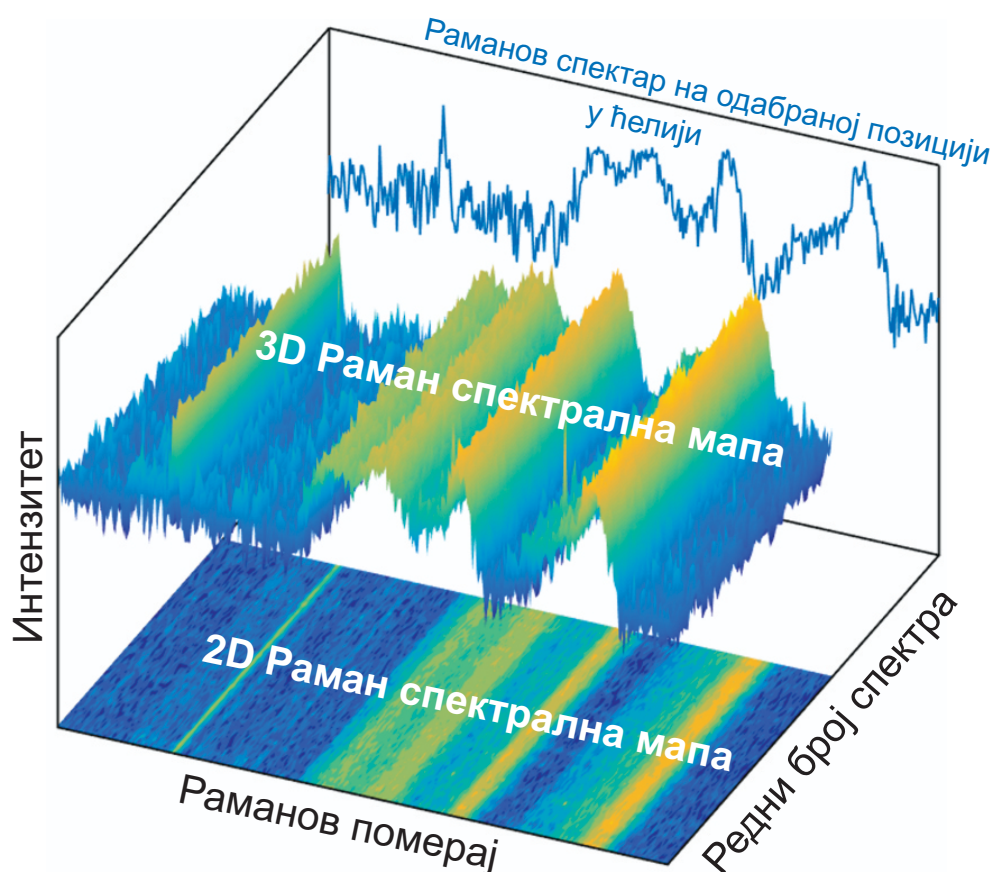
Ради поједностављења, у овој дисертацији коришћене су 2D мапе уместо 3D мапа, јер су чак и најмањи помераји или промене интензитета уочљивији на њима. На Слици 2.11 приказане су 3D Раман мапе добијене ређањем спектара добијених на различитим позицијама у оквиру појединачне ћелије. Резултујућа 3D мапа има Раманов померај у cm^{-1} као x -осу. Редни број спектра,



Слика 2.10: Типични Раманов спектар ПД – ММТ, супстрата и тачке високе фотолуминесценције у опсегу 800 cm^{-1} до 1800 cm^{-1} . Илустровани су и различити кораци обраде спектара.

који представља спектар добијен на одређеном пикселу, представљен је y -осом, док је нормализовани интензитет раманске моде предствљен z -осом. Испод 3D мапе, приказана је њена 2D пројекција, где су задржане x - и y -оса, а z -оса је представљена бојом (жута боја означава високи, а плава ниски интензите).

Поред директног поређења спектара добијених на матичним и диференцираним ћелијама, као и приликом поређења утицаја два фиксатива различитог механизма дејства, примењен је мултиваријантни статистички метод - анализа главних компонената (Principal component analysis - PCA) [37, 44, 47, 96, 97]. Овај вид статистичке анализе редукује ефективну димензионалност експерименталних података одређивањем ортонормалног базиса вектора оптерећења (loading vectors) на начин да се највећа варијанса пројектује на прву координату, друга највећа варијанса се пројектује на другу координату итд. трансформисањем у нови сет варијабли - главне компоненте (principal components - PCs). Оне су некорелисане и организоване тако да неколико првих задржава варијансе присутне у свим почетним варијаблама [98]. Оваква анализа даје изражено груписање тачака, засновано на њиховим заједничким спектралним карактеристикама [44, 96]. Пре статистичке анализе, сваком спектру је одузет средњи спектар, а затим је подељен својом стандардном девијацијом.



Слика 2.11: Илустративни приказ добијања 2D мапе.

2.3.2 Ибупрофен

2.3.2.1 Експериментални услови

Једна од већ наведених предности Раманове спектроскопије је да, у одређеним случајевима, специјална припрема узорка није потребна. Веома мала количина чистог ибупрофена (Галеника а.д. Београд), молекулског кристала, постављена је на микроскопску плочицу и анализирана. Молекулске кристале карактерише изражен контраст између јаких ковалентних унутармолекулских веза и слабих ван дер Валсових међумолекулских интеракција или водоничних веза које учествују у њиховом груписању. Док су међумолекулске интеракције одговорне за специфичне физичке особине молекуларних једињења, јаке ковалентне везе чувају унутрашњу структуру упркос међумолекулским интеракцијама. Вибрације молекулских кристала могу бити тзв. унутрашње (унутар молекула) и спољашње (између молекула у молекулском кристалу) о чему ће касније бити више речи. Једна од основних карактеристика међумолекулских вибрација је да се налазе на ниским енергијама, тј. у близини

ласерске линије. Сходно томе, у испитивању је коришћен Jobin Yvon T64000 Раман са дифракционим решеткама 1800/1800/1800 зареза/mm, у одузимајућем режиму који омогућава максимално сузбијање еластично расејане светлости. Спољашњи и прорез између другог и трећег степена подешени су на 100 μ , док су латерални отвори подешени тако да је постигнут минималан шум. Као извор ексцитације, коришћен је аргон-криптонски (Ar^+/Kr^+) јонски гасни ласер таласне дужине 514.5 nm. Снага ласера је подешена да не буде већа од 0.3 kW/cm². Ради јаснијег раздвајања уочених карактеристичних модова, температурски зависна мерења извршена су помоћу LINKAM THMS 600 микроскопске пећи. Сви спектри кориговани су одговарајућим Бозе фактором $\bar{n}(T)$.

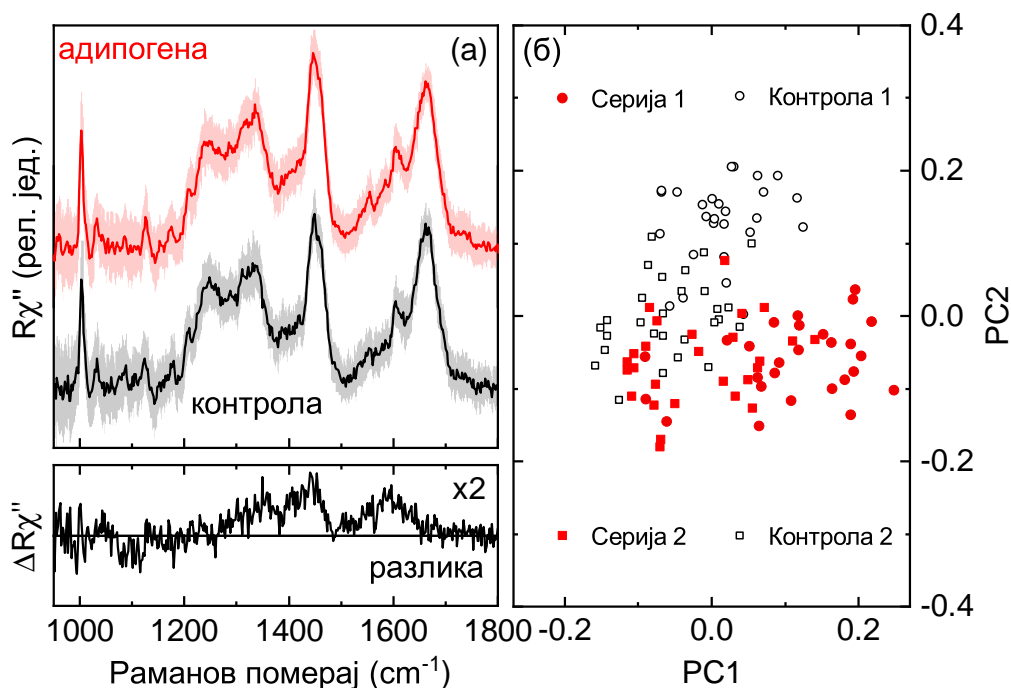
3. Мезенхимске матичне ћелије: диференцијација и хемијска фиксација

3.1 Праћење диференцијационог статуса ММЋ: резултати и дискусија

Приликом анализе појединачних ћелија, због њихове сложене унутрашње структуре, могуће је постојање малих варијација у раманским спектрима који су снимљени на различитим положајима у ћелији. Да би добијени спектри појединачних ћелија били репрезентативни за сваку ћелију, спектри су усредњени. Извршен је прелиминарни експеримент, у ком је испитано 54 ћелије прве серије. За сваку ћелијску лозу, 9 ММЋ и 9 диференцираних ћелија је анализирано снимањем спектра на 10 насумично одабраних места у ћелији. Резултати анализе добијени на свеобухватним подацима, као и на делу података који се добијају са три насумичне позиције у ћелији, нису показали квалитативне разлике. Овај приступ је показао да је за одабране експерименталне услове и дате узорке, довољно анализирати три насумичне позиције у ћелији и извући адекватне квалитативне закључке.

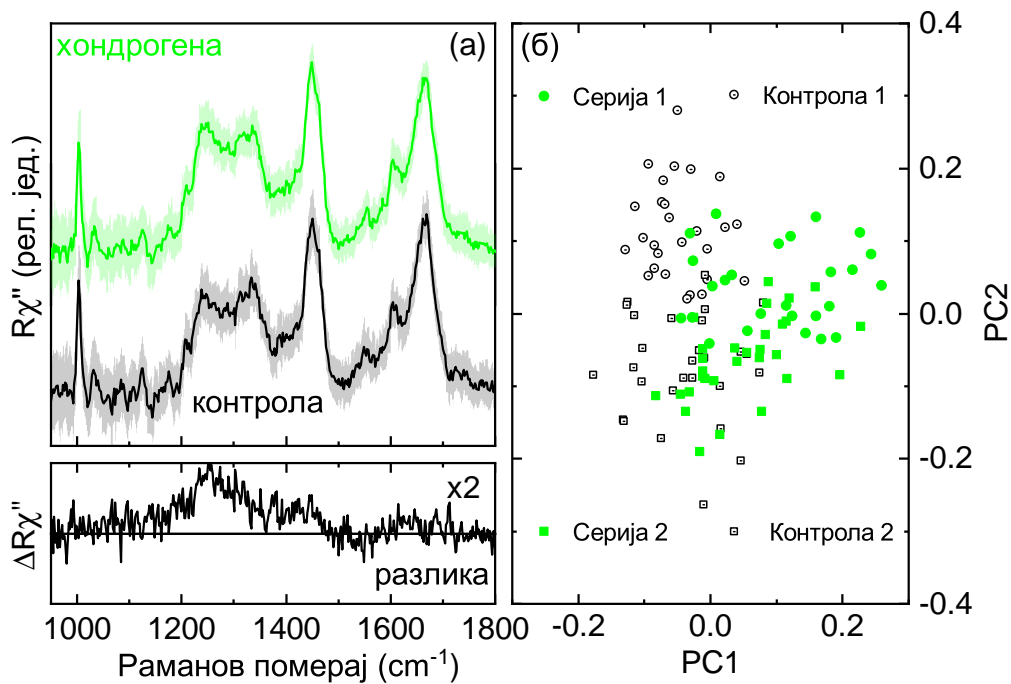
Да би се стекао увид у начин на који се промена диференцијационог статуса ПД – ММЋ рефлектује на раманске спектре, извршена су три сета мерења Рамановог расејања. За сваку лозу, добијени су спектри за 30 ПД – ММЋ и 30 диференцираних ћелија (ПД – ММЋ култивисане одређено време у медијуму који стимулише диференцијацију ка адипогеној, хондрогеној и остеогеној лози). Свака ћелија анализирана је на начин да су спектри снимани на три насумично одабране позиције, уз троструко понављање, како би могуће варијације у оквиру ћелије биле узете у разматрање. На тај начин, тестирана је довољност овог приступа за праћење разлика између ћелија, као и између ћелијских лоза.

Слика 2.8 (б) приказује рамански спектар ПД – ММЋ добијен усредњавањем



Слика 3.1: (а) Усредњени Раманови спектри (црне линије) ПД – ММЋ (контролни узорци), диференцираних ћелија (адипогена лоза) и њихове спектралне разлике. Стандардна девијација за сваку лозу и контролну групу приказана је обојеним површинама. (б) Графички представљене факторске оцене рачунате независно помоћу ПСА за Раманове спектре контролних ПД – ММЋ и њихових диференцираних аналога.

540 спектра свих контролних узорака (ПД – ММЋ). Највећи допринос спектру у делу који се разматра долази од нуклеинских киселина, протеина и липида [46, 59, 61, 102, 103, 104, 105]. Као што се може видети на Слици 2.8 (б), бројне вибрационе моде су присутне у ПД – ММЋ раманском спектру, а најистакнутије моде асигниране су у сагласности са литературом [46, 59, 61, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105] и приказане у Табели 3.1. Спектралне карактеристике нуклеинских киселина потичу од појединачних пуринских и пиримидинских база (аденин, гуанин, тимин, цитозин и урацил), као и од кичмене структуре молекула ДНК и РНК коју чини пентоза-фосфат. Спектрални одзив протеина укључује доприносе ароматичних аминокиселина (фенилаланин, триптофан и тирозин), амидних група секундарних структура протеина (α -хеликс, β -набрана структура и насумично клупко), као и од разних вибрација угљеникових атома везаних за атом азота или други атом угљеника [103]. Различите вибрације унутар водонично-угљеничног ланца (нпр. C-C истезање, CH₂ и CH₃ вибрације при којима се мења угао везе - тзв. scissoring и увртање) представљају специфичне одлике липида у раманском спектру

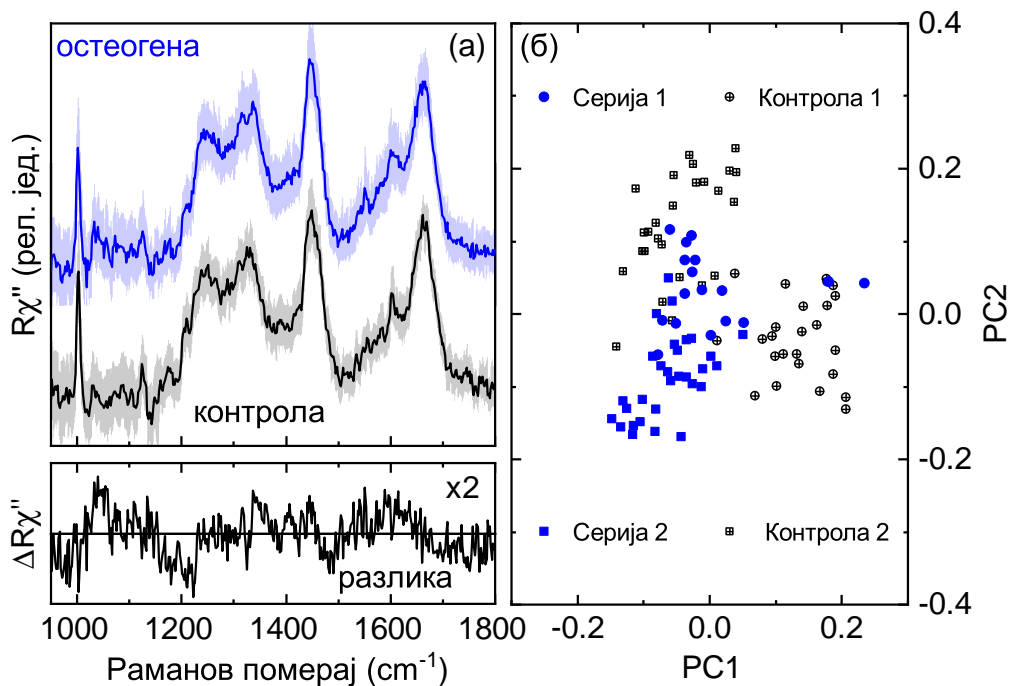


Слика 3.2: (а) Усредњени Раманови спектри (црне линије) ПД – ММЋ (контролни узорци), диференцираних ћелија (хондрогена лоза) и њихове спектралне разлике. Стандардна девијација за сваку лозу и контролну групу приказана је обојеним површинама. (б) Графички представљене факторске оцене рачунате независно помоћу РСА за Раманове спектре контролних ПД – ММЋ и њихових диференцираних аналога.

[100]. У основи, различити доприноси могу се преклапати, чинећи препознавање потенцијалних разлика у Рамановом спектру ПД – ММЋ и диференцираних ћелија захтевним процесом.

На Слици 3.1 (а) приказани су усредњени спектри ПД – ММЋ (контролних узорака), диференцираних ћелија (адипоцита), као и њихове спектралне разлике обе серије узорака који су одговарајућим условима у култури усмерени да диференцирају ка адипогеној лози. На Слици 3.2 (а) и Слици 3.3 (а) приказани су усредњени рамански спектри контролних ПД – ММЋ, диференцираних ћелија и њихове разлике за хондрогену и остеогену лозу, респективно. Иако опште спектралне карактеристике у спектрима који се пореде изгледају готово идентично, након одузимања, уочавају се значајне разлике.

Када је у питању адипогена диференцијација [Слика 3.1 (а)], приметно је благо смањење релативног интензитета мода на 1100 cm^{-1} и повећање релативног интензитета пикова на око 1353 cm^{-1} , 1447 cm^{-1} и 1590 cm^{-1} . Према подацима из Табеле 3.1, ова појава може се објаснити као благо смањење садржаја нуклеинских киселина и повећање садржаја протеина и липида. С



Слика 3.3: (а) Усредњени Раманови спектри (црне линије) ПД – ММЋ (контролни узорци), диференцираних ћелија (остеогена лоза) и њихове спектралне разлике. Стандардна девијација за сваку лозу и контролну групу приказана је обојеним површинама. (б) Графички представљене факторске оцене рачунате независно помоћу РСА за Раманове спектре контролних ПД – ММЋ и њихових диференцираних аналога.

друге стране, потенцијално повећање интензитета Раманове линије на 1735 cm⁻¹, које представља спектрални маркер липида (тј. њихових естара), није уочен. Наиме, ткивно порекло ових ћелија је такво да оне не потичу из адипозног ткива, па је и диференцијација у масне ћелије слабије изражена него код МЋ пореклом из адипозног ткива [24, 91, 92, 93].

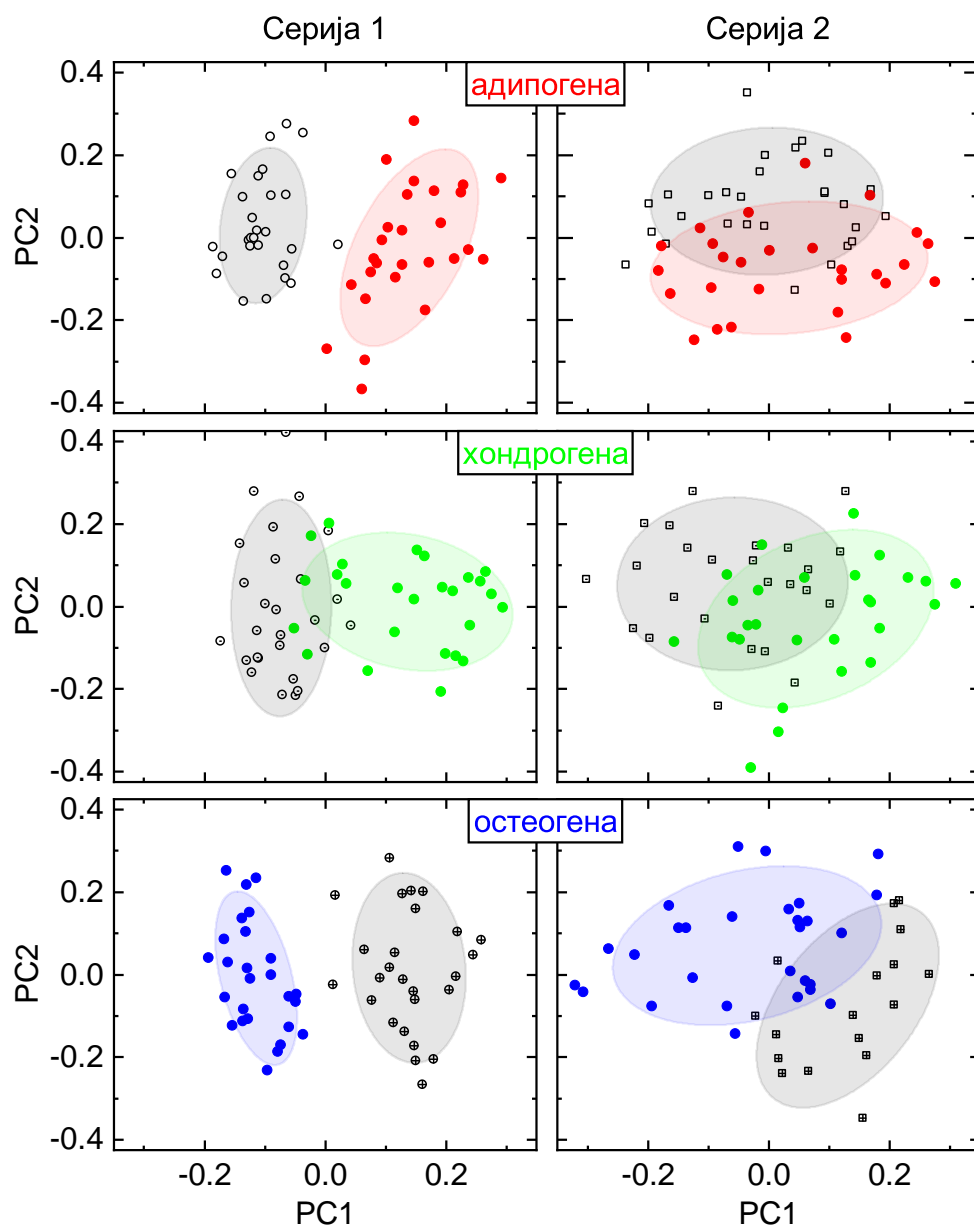
Хондрогену диференцијацију катактеришу приметно већи релативни интензитети пикова на 1065 cm⁻¹, 1250 – 1450 cm⁻¹ и 1630 cm⁻¹, као што се види на Слици 3.2 (а), услед повећања садржаја протеина, али и протеогликана који настају у овом процесу [55, 106, 107].

Остеогена диференцијација истиче се спектралним променама [Слика 3.3 (а)] у виду нижег релативног интензитета мода у спектралном региону од 1170 cm⁻¹ до 1220 cm⁻¹ и од 1450 cm⁻¹ до 1490 cm⁻¹, као и од вишег релативног интензитета пикова на око 1045 cm⁻¹, 1070 cm⁻¹ и 1600 cm⁻¹. Ове промене изазване су смањењем садржаја аминокиселина и, највероватније, липида, и повећаним садржајем карбоната и фосфата, што је и очекивано у овом процесу услед формирања екстрацелуларног матрикса. Смањење

интензитета линије у региону који се доводи у везу са липидима, може се тумачити као промена односа протеина и липида. Типични спектрални маркер за овај тип ћелија је хидроксиапатит [106], али услед доприноса супстрата (стакла), тај део спектра није у посматраном опсегу. Повећање релативног интензитета раманских мода протеина и смањење релативног интензитета раманских мода нуклеинских киселина је конзистентна промена која је уочавана у спектрима за све три лозе током процеса диференцијације и у складу је са литературом [44, 47]. Наиме, диференцијацијом ћелије постепено искоришћавају информациону РНК током синтезе нових функционалних

Табела 3.1: Вибрације у ПД – ММЋ и њихове енергије у Раман спектру. (А) аденин, (U) урацил, (C) цитозин, (T) тимин, (G) гуанин, (Phe) фенилаланин, (Trp) триптофан, (Tyr) тирозин, (vib) вибрација, (bg) савијање (енгл. bending), (br) дисање (енгл. breathing), (bk) backbone, (def) деформација, (tw) увијање (енгл. twist), (sym) симетрично (енгл. symmetric), (asym) асиметрично (енгл. asymmetric), (str) издуживање (енгл. stretch) [46, 61, 99, 100, 101, 102, 103, 104].

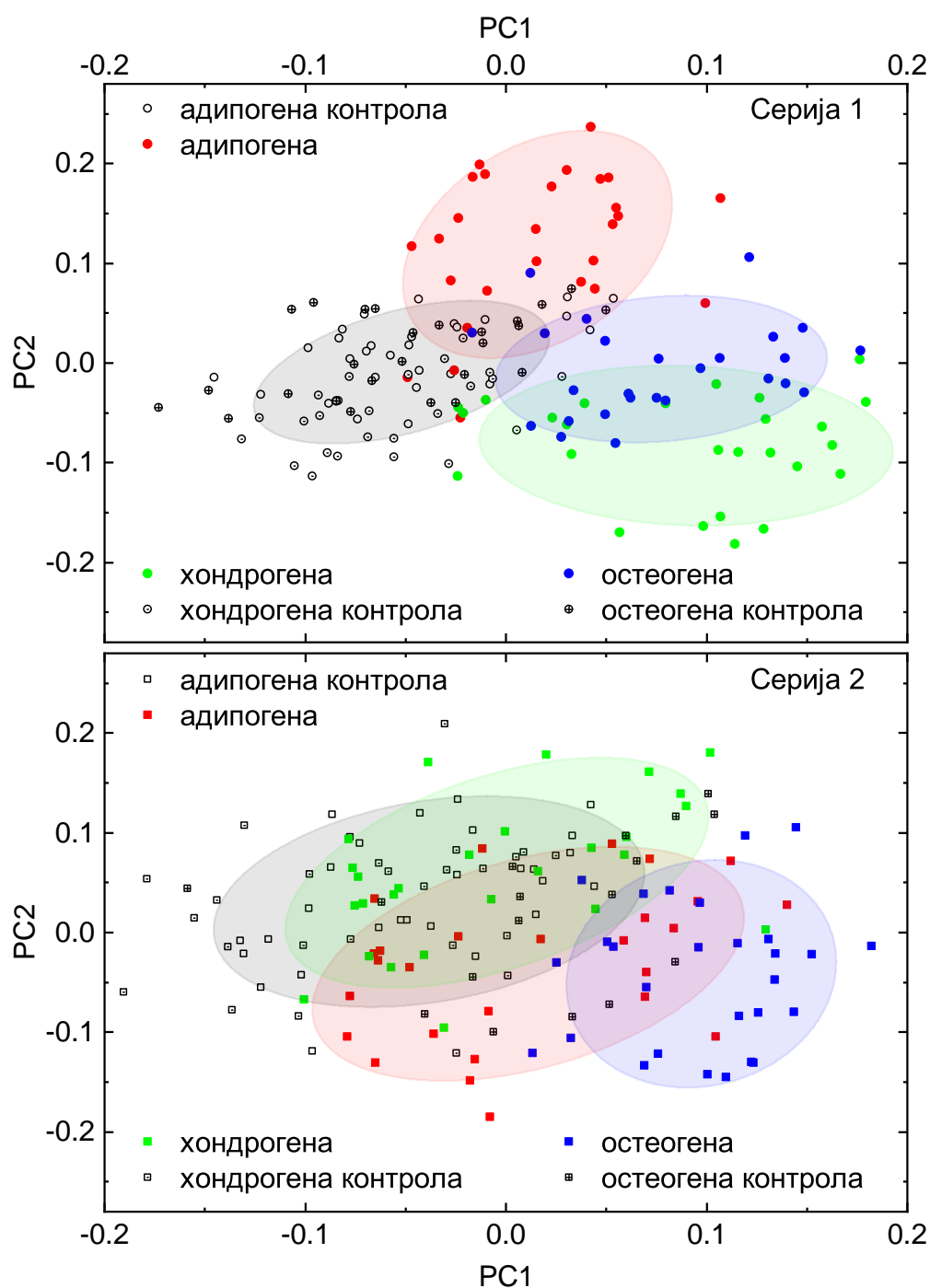
Енергија (cm^{-1})	Означавање
1004	Phe
1032	Phe
1061	C-N and C-C str
1080	PO_2^- sym str
1085	C-O str
1105	PO_2^- str (sym)
1130	C-N and C-C asym str
1155	C-C and C-N str of proteins
1165	C-O str, COH bg
1172	G str (прстен)
1178	CH bg Tyr
1209	C-C ₆ H ₅ str, Phe, Trp
1228	asym str фосфатне групе
1250	T, амид III _β
1260	N-H and C-H bg (амид III)
1265	амид III _α
1315	G, CH def.
1332	ДНК-пуринске базе (CH ₃ CH ₂ wagging mode полинуклеотидног ланца)
1450	CH ₂ str def метиленских група у липидима
1456	CH def.
1556	амид II
1604	Phe, Tyr
1654	амид I, α хеликс
1670	амид I, β набрана плоча



Слика 3.4: Графички приказ факторских оцена рачунатих независно помоћу РСА за раманске спектре три групе контролних узорака (представљени црном бојом) и диференцираних (адипогена, хондрогена и остеогена лоза) ПД – ММЋ, подељених у две серије. Осенчене области представљају 1σ 2D ниво поузданости.

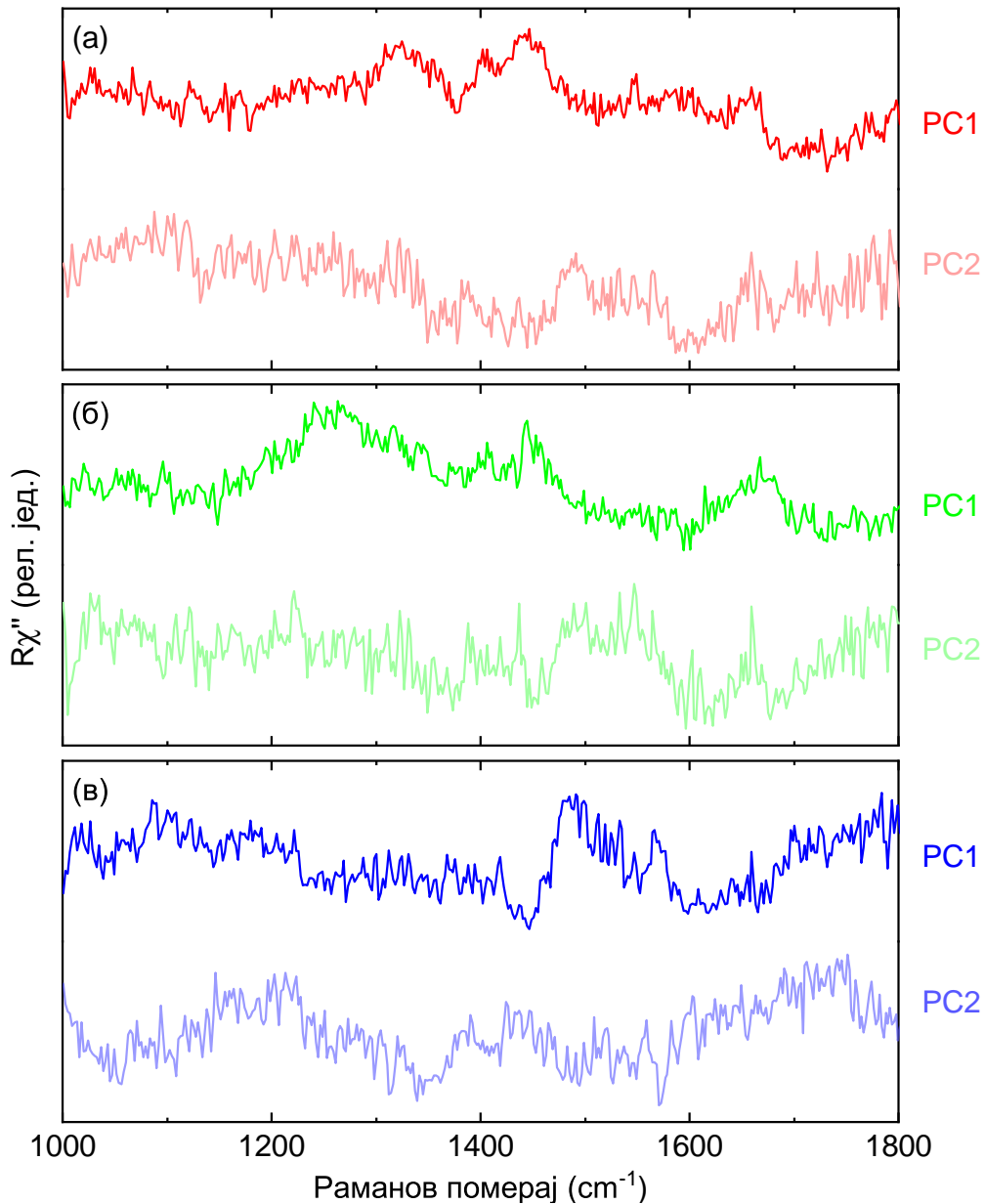
протеина, специфичних за одређену ћелијску лозу [44].

Иако директно поређење раманских спектра ПД – ММЋ и њихових диференцираних лоза представља начин да разликујемо МЋ од диференцираних, поступак захтева детаљну анализу спектра. Ако рамански спектар користимо као својствени ”отисак прста” ћелије коју анализирамо, РСА се може користити за препознавање сличности и груписање [44, 96].



Слика 3.5: PCA извршена на свим добијеним раманским спектрима за четири групе узорака укључујући ПД – ММТ (контролни узорци) и њихове диференциране аналоге (остеогена, хондрогена и адипогена лоза) за различите серије. Осенчене области представљају 1σ 2D ниво поузданости.

Слика 3.6 приказује PC1 и PC2 векторе оптерећења за адипогену, хондрогену и остеогену лозу. Као што се може закључити са Сликe 3.1 (б) и Сликe 3.2 (б), спектри разлике приказани на Слици 3.1 (а) и Слици 3.2 (а) у потпуности



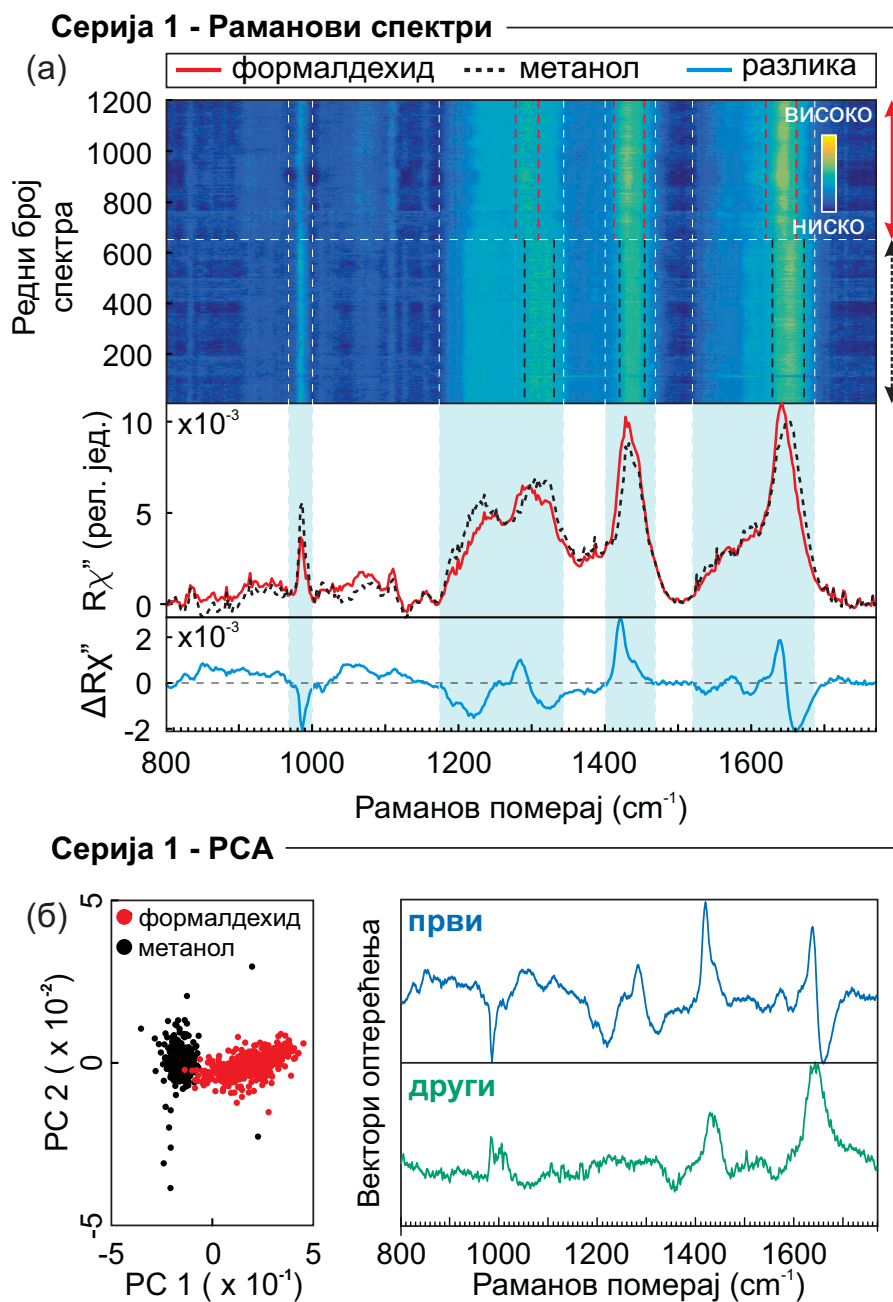
Слика 3.6: (а)–(в) Вектори оптерећења PC1 и PC2 за адипогену, хондрогену и остеогену лозу, респективно.

се могу описати помоћу PC1 и PC2 вектора оптерећења за адипогену и хондрогену лозу, респективно. У случају остеогене лозе, спектар разлике [Слика 3.3 (а)] описан је и PC1 и PC2 векторима оптерећења, као што се види на Слици 3.3 (б). Приметно је да извесни вектори оптерећења или њихове линеарне комбинације у потпуности описују одговарајуће спектралне разлике, те се на основу ове статистичке анализе, може донети исти закључак-да је на основу Раманових спектра могуће разликовати спектре МТ и ћелија насталих њиховом диференцијацијом.

Резултати статистичке анализе раманских спектра три групе контролних узорака ПД – ММЋ и њихових диференцираних лоза приказани су на Слици 3.1 (б), Слици3.2 (б) и Слици3.3 (б). За све три ћелијске лозе, уочено је раздвајање две групе, тако да свака група одговара одређеној ћелијској лози. Такође, у оквиру сваке групације, постоји подгрупација, која указује на варијације и нехомогеност. С обзиром да су у питању примарне ћелије, већи степен хетерогености је и очекиван [18].

На Слици 3.4, приказани су резултати РСА анализе за адипогену, хондрогену и остеогену лозу, за серију 1 и 2 понаособ. Иако се раздвајање у оквиру група може приметити за обе серије, ипак је израженије за серију 1. Највероватније, ово је последица веће нехомогености у оквиру серије 2.

У даљем току анализе, проверавано је да ли се исти приступ може применити за разликовање ћелија различитих диференцираних лоза (адипоцита, хондробласта и остеобласта). У ту сврху, обухваћени су подаци сва три сета експеримената, а након тога је примењена и РСА на комплетним подацима. Добијени резултати приказани су на Слици 3.5. Осенчене површине представљају 1σ 2D ниво поузданости. Веома добро груписање према припадности одређеној ћелијској лози примећено је за серију 1. Слабија сепарација група ћелија уочена је за серију 2, што је у сагласности са резултатима приказаним на Слици 3.4. Додатно, РСА указује на постојање варијација у оквиру групе ПД – ММЋ (нарочито за серију 2) иако то није долазило до изражаја у великој мери при директном поређењу. Када је РСА примењена на ПД – ММЋ из све три контролне групе и упоређена са подацима о диференцираним ћелијама, иако су мале варијације присутне, контролне групе задржавају спектралне карактеристике матичних ћелија. Имајући то у виду, спектрална анализа ПД – ММЋ је у сагласности са резултатима стандардних цитохемијских метода. Како су у питању примарне ћелије, ћелијски диверзитет ММЋ је резултат различитог ткивног порекла, изолационих метода, као и услова култивације. Одсуство јединствених биомаркера за ММЋ и даље отежава њихову идентификацију и карактеризацију [13, 108]. Из тог разлога, ови резултати иду у прилог потенцијалној примени Раманове спектроскопије у карактеризацији ММЋ на нивоу појединачних ћелија.



Слика 3.7: (а) 2D спектрална мапа добијена на серији 1 ПД – ММТ фиксираним формалдехидом и метанолом, њихови усредњени спектри, као и спектрална разлика за спектрални регион између 800 cm^{-1} и 1770 cm^{-1} ; (б) графички приказ PCA факторских оцена за ове две групе ћелија и PCA вектори оптерећења за серију 1. Процент варијансе PC1 - PC2: 19.85% - 5.76%.

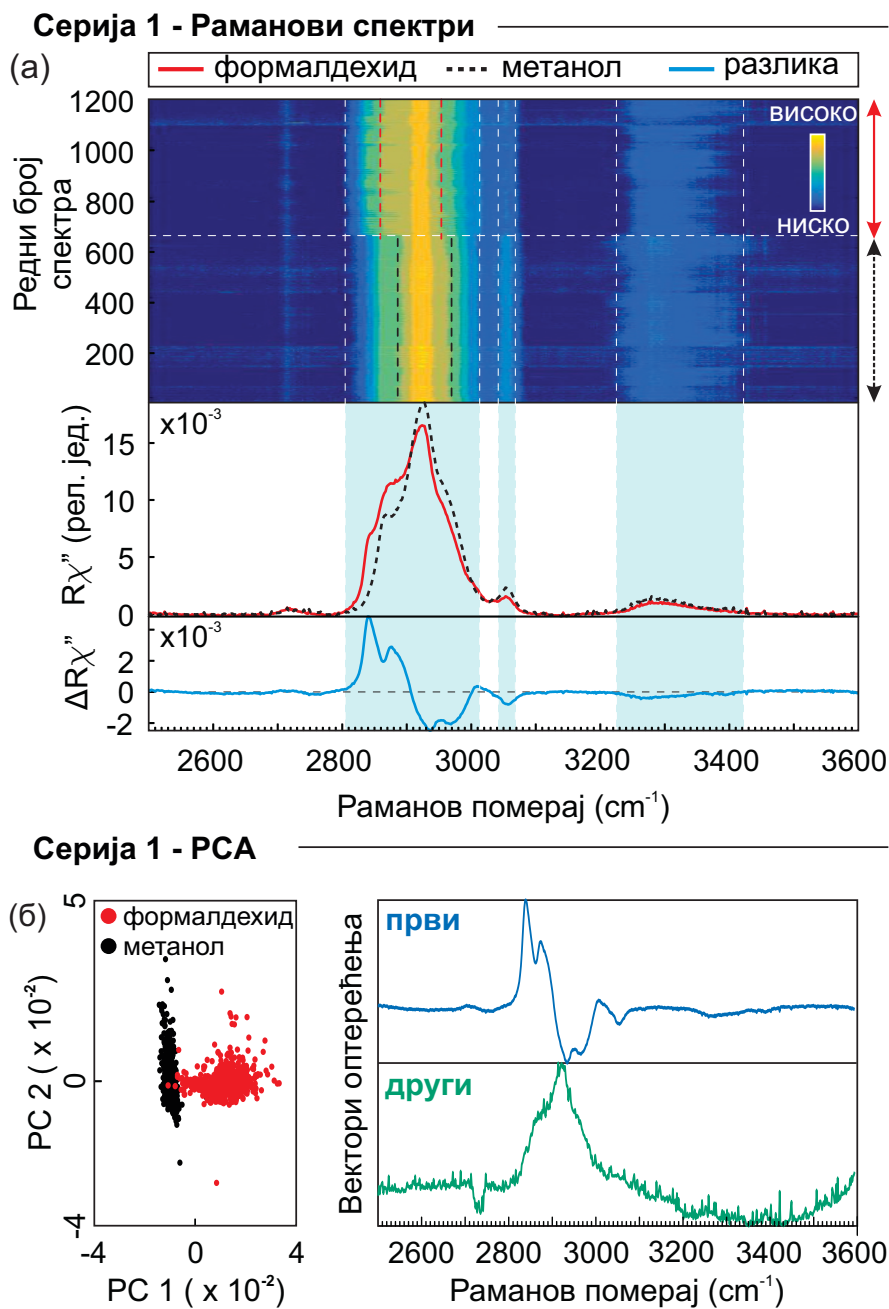
3.2 Праћење утицаја хемијске фиксације на примарне ММТ методом Раманове спектроскопије: резултати и дискусија

Познато је да ефекат процеса хемијске фиксације зависи од врсте ћелије и самог фиксатива [71]. Различити хемијски механизми њиховог дејства

могу резултовати варијацијама у раманским спектрима. Док би губитак одређеног садржаја резултовао смањењем интензитета одговарајуће Раман линије, различите пертурбације електронског облака довеле би до промена положаја одговарајућих спектралних линија и њихових полуширина. Како промена електронске структуре може утицати на вероватноћу да уопште дође до нееластичног расејања, не искључује се могућност промена интензитета Раманове линије. У испитиваном случају, најизраженије промене забележене су у два спектрална региона [Слика 2.10], почевши од 800 cm^{-1} до 1770 cm^{-1} и од 2500 cm^{-1} до 3600 cm^{-1} . Када је у питању статистичка обрада података, ова два региона анализирана су независно због ограничења која су последица дизајна спектрометра.

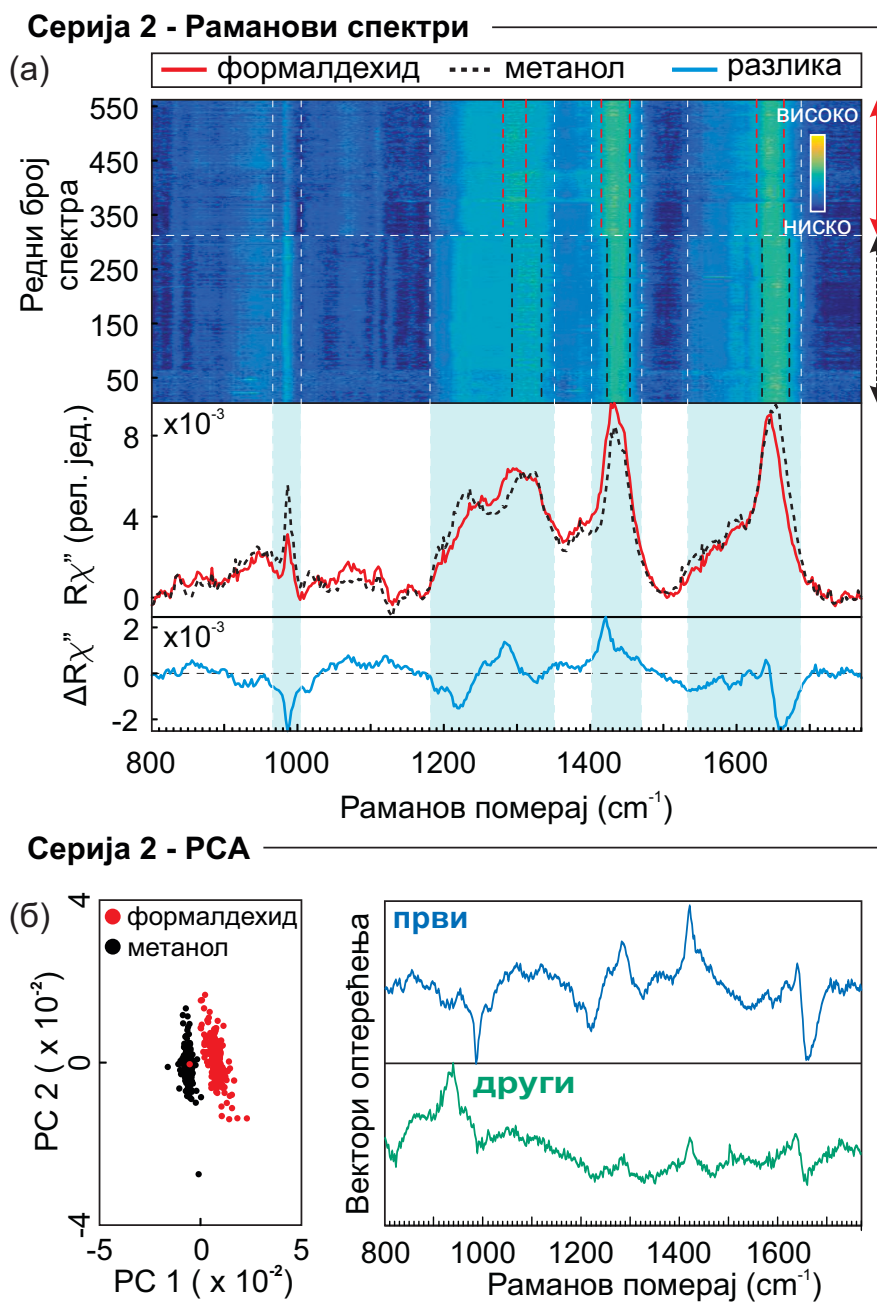
2D Раман спектрална мапа, усредњени спектри, њихова разлика и РСА за серију 1 и серију 2 ПД- ММТ, фиксираних формалдехидом и метанолом, приказани су на Слици 3.7 и Слици 3.8 респективно, за спектрални регион од 800 cm^{-1} до 1770 cm^{-1} . Детаљна анализа 2D мапе Раман спектра ПД – ММТ фиксираних формалдехидом и метанолом [Слика 3.7 (а) и Слика 3.8 (а)] указује на постојање спектралних разлика између ПД – ММТ фиксираних различитим фиксативима. Релативна промена интензитета и/или промена енергије уочена је за бројне Раман моде. Ово још више долази до изражаја при анализи спектра разлике између усредњених спектра ћелија фиксираних формалдехидом и метанолом [Слика 3.7 (а) и Слика 3.8 (а)]. Може се видети да су моде фенилаланина на 1002 cm^{-1} и 1030 cm^{-1} већег интензитета у раманским спектрима ћелија фиксираних метанолом у поређењу са ћелијама фиксираним формалдехидом. Раман моде на 1095 cm^{-1} , 1130 cm^{-1} и 1330 cm^{-1} , које су заправо вибрације молекула ДНК [46, 59, 61, 99, 100, 101, 104, 105], већег су интензитета у спектрима ПД – ММТ фиксираних формалдехидом, док је она на 1330 cm^{-1} и померена. Раман мода Амида III [46, 59, 61, 99, 100, 103, 104, 105] на око 1260 cm^{-1} је значајно померена и већег интензитета у спектру ћелија фиксираних метанолом. Спектралне карактеристике липида у виду њихове Раман моде [46, 59, 61, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105] на 1450 cm^{-1} , она је значајно већег интензитета и померена у спектрима ћелија фиксираних формалдехидом, као и мода Амида I [46, 59, 61, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105] на око 1660 cm^{-1} [Табела 3.1].

Забележено понашање у складу је са биохемијском сликом према којој је садржај протеина већи у ћелијама фиксираним метанолом, што се може закључити из израженијег пика фенилаланина, али је секундарна структура протеина очуванија у ћелијама фиксираним формалдехидом (Раман мода



Слика 3.8: (а) 2D спектрална мапа добијена на серији 1 ПД – ММТ фиксираним формалдехидом и метанолом, њихови усредњени спектри, као и спектрална разлика за спектрални регион између 2500 cm^{-1} и 3600 cm^{-1} ; (б) графички приказ PCA факторских оцена за ове две групе ћелија и PCA вектори оптерећења за серију 1. Процент варијансе PC1 - PC2: 64.09% - 12.59%.

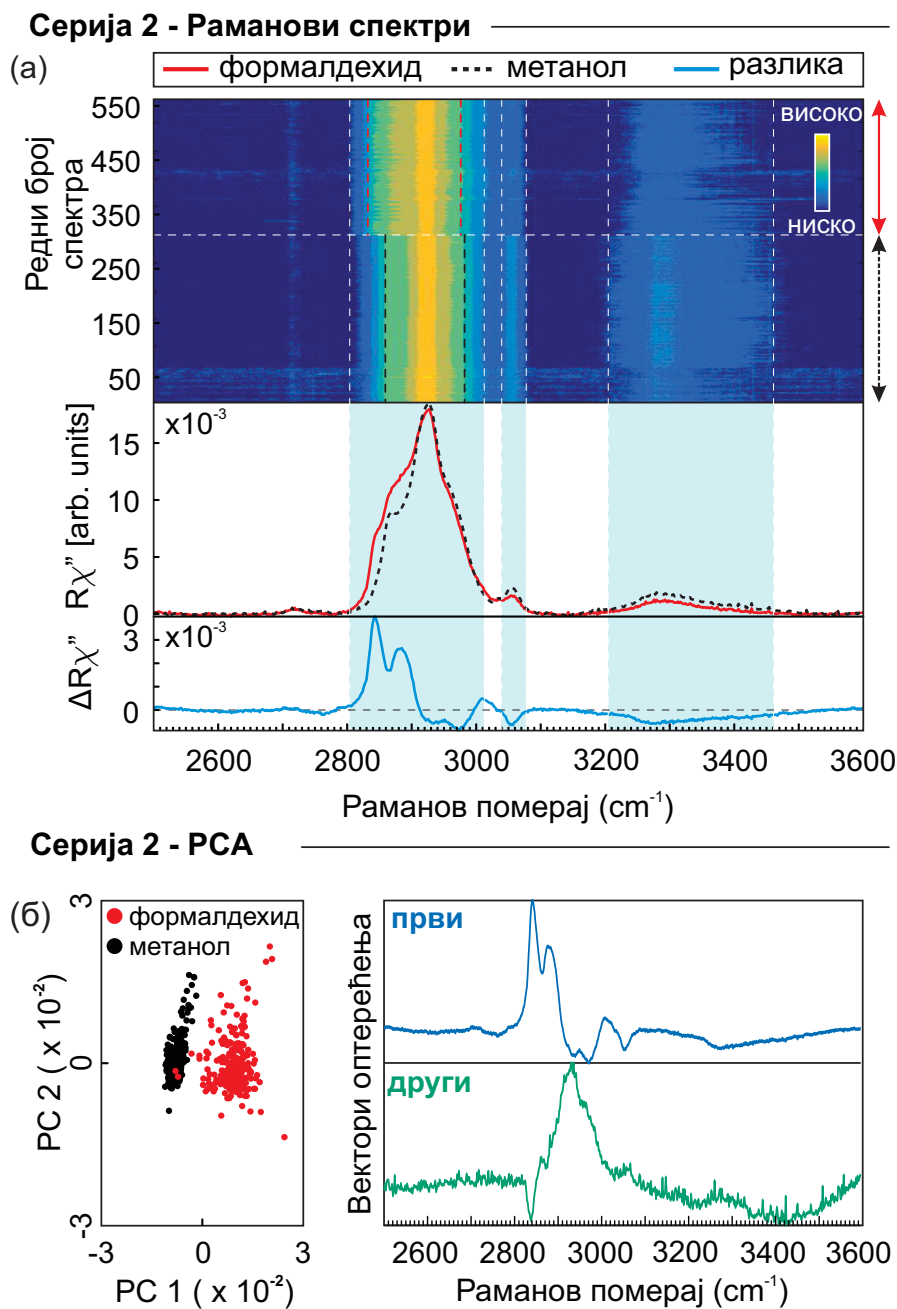
Амида I)[73, 74, 109]. Измене настале утицајем формалдехида на нативне протеине не мења у великој мери њихову секундарну структуру. Липидни садржај очуванији је у ћелијама фиксираним формалдехидом, што је у сагласности са литературом, јер метанол изазива цурење липида кроз ћелијску



Слика 3.9: (а) 2D спектрална мапа добијена на серији 2 ПД – ММТ фиксираним формалдехидом и метанолом, њихови усредњени спектри, као и спектрална разлика за спектрални регион између 800 cm^{-1} и 1770 cm^{-1} ; (б) графички приказ PCA факторских оцена за ове две групе ћелија и PCA вектори оптерећења за серију 2. Процент варијансе PC1 - PC2: 17.95% - 7.43%.

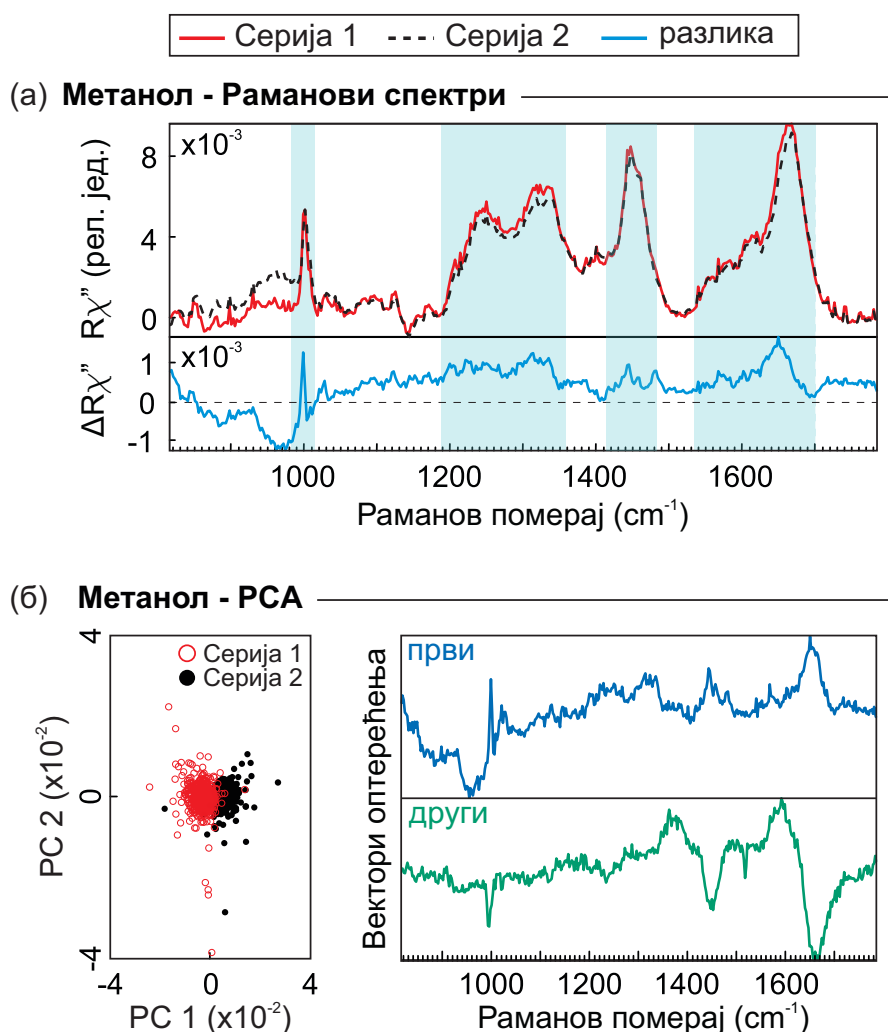
мембрану коју и разара. Као последица механизма дејства формалдехида унакрним везивањем (cross-linking), нивои ДНК су у већој мери присутни управо у ћелијама фиксираним овим једињењем [68, 70, 110].

Усредњени спектри формалдехидом и метанолом фиксираних ПД – ММТ



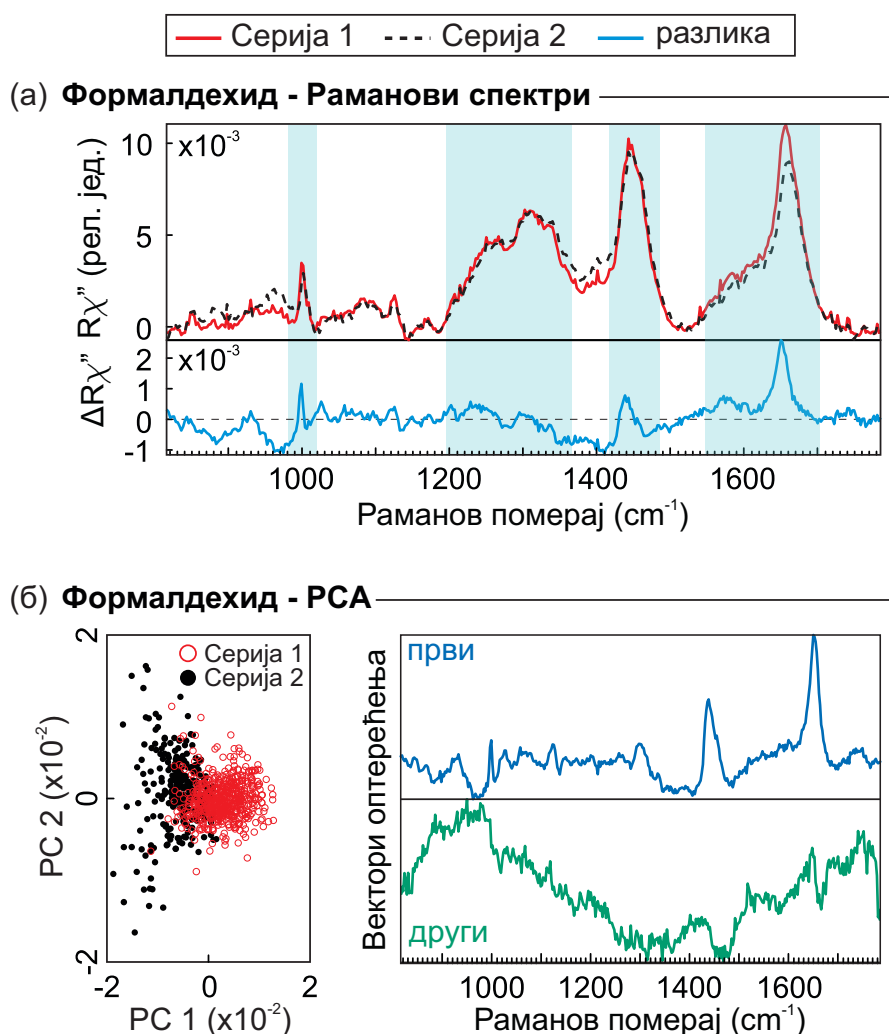
Слика 3.10: (а) 2D спектрална мапа добијена на серији 2 ПД – ММЋ фиксираним формалдехидом и метанолом, њихови усредњени спектри, као и спектрална разлика за спектрални регион између 2500 cm^{-1} и 3600 cm^{-1} ; (б) графички приказ PCA факторских оцена за ове две групе ћелија и PCA вектори оптерећења за серију 2. Процент варијансе PC1 - PC2: 60.08% - 14.46%.

из серије 2, као и њихова разлика, дати су на Слици 3.8 (а). Једина уочена разлика у односу на серију 1 је нижи интензитет Амид I моде на 1660 cm^{-1} и то у спектру формалдехидом фиксираних ћелија, у односу на спектар ћелија фиксираних метанолом.



Слика 3.11: (а) Усредњени рамански спектри ПД – ММЋ фиксираних метанолом из серија 1 и серије 2 и њихова разлика за спектрални регион од 800 cm $^{-1}$ до 1770 cm $^{-1}$. (б) Одговарајући графички прикази факторских оцена рачунати по серијама за ћелије фиксиране метанолом, као и њихови РСА вектори оптерећења. Процент варијансе PC1 - PC2: 12.09% - 5.97%.

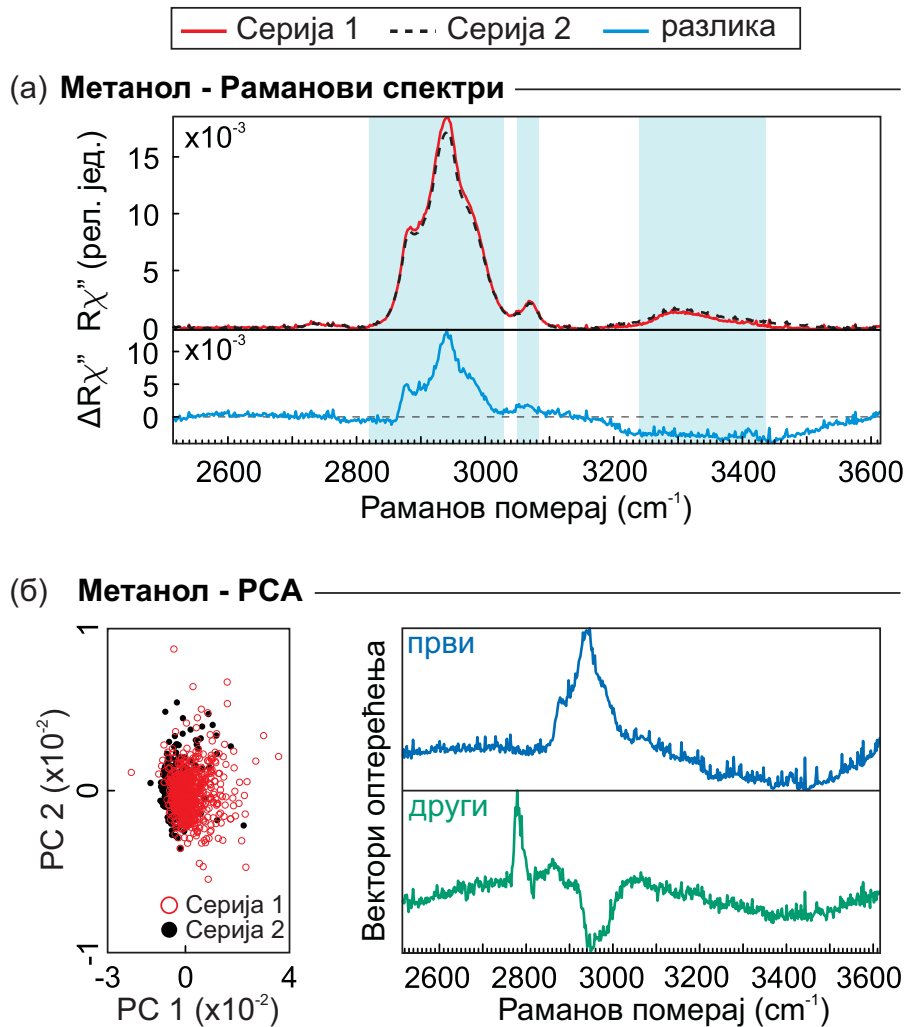
Исти поступак поновљен је и за спектрални регион од 2500 cm $^{-1}$ до 3600 cm $^{-1}$. На Слици 3.9 и Слици 3.10 представљени су: 2D Раман спектрална мапа, усредњени спектри, њихова разлика, као и РСА за серију 1 и серију 2 ћелија фиксираних формалдехидом и метанолом. Поново су упоређени Раман спектри ПД – ММЋ фиксираних формалдехидом и метанолом у овом делу спектра који рефлектује садржај протеина, липида и воде. На Слици 3.9 (а) и Слици 3.10 (а), може се уочити из усредњеног спектра разлике да су моде на 2860 cm $^{-1}$ и 2890 cm $^{-1}$ већег интензитета у раманским спектрима ПД – ММЋ фиксираних формалдехидом. Ове две моде представљају CH $_2$ и CH $_3$



Слика 3.12: (а) Усредњени рамански спектри ПД – ММЋ фиксираних формалдехидом из серија 1 и серије 2 и њихова разлика за спектрални регион од 800 cm^{-1} до 1770 cm^{-1} . (б) Одговарајући графички прикази факторских оцена рачунати по серијама за ћелије фиксиране формалдехидом, као и њихови РСА вектори оптерећења. Процент варијансе PC1-PC2: 13.6%-6.18%.

симетрично истезање у липидима и протеинима [111]. Раман мода на 2940 cm^{-1} означена је СН вибрацијама у липидима и протеинима [Табела 3.1] и израженија је у спектрима ћелија фиксираних метанолом. Ово потврђује поменуте тврдње да формалдехид боље одржава нивое липида у односу на метанол. Насупрот томе, метанол одржава нивое протеина.

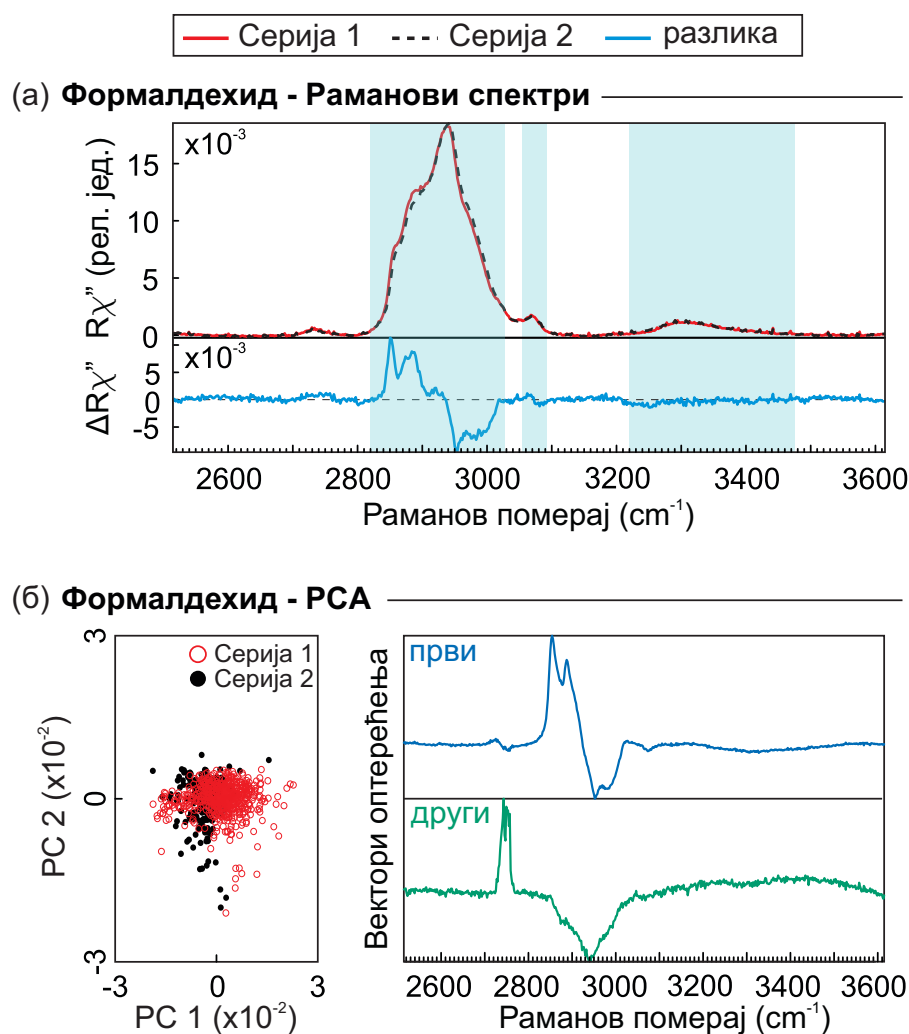
У даљем току анализе, РСА је примењена ради статистичког третмана спектралних података и резултати ове анализе приказани су на Сликама 3.7 (б) и 3.8 (б) и на Сликама 3.9 (б) и 3.10 (б) за серију 1 и серију 2, респективно. Анализом резултата, уочено је јасно груписање ћелија фиксираних истим



Слика 3.13: (а) Усредњени рамански спектри ПД – ММЋ фиксираних метанолом из серија 1 и серије 2 и њихова разлика за спектрални регион од 2500 cm^{-1} до 3600 cm^{-1} . (б) Одговарајући графички прикази факторских оцена рачунати по серијама за ћелије фиксирание метанолом, као и њихови РСА вектори оптерећења. Процент варијансе PC1 - PC2: 44.44% - 3.62%

фиксативом и, као што је и очекивано, у свим случајевима, PC1 је компонента која испољава разлику [Слике 3.7 (б) и 3.8 (б), Слике 3.9 (б) и 3.10 (б)]. Постоји свега неколико тачака које се преклапају, као последица хетерогености узорака и/или променљивог односа сигнала и шума. Ради илустрације, PC2 и одговарајући вектори оптерећења такође су приказани. Они представљају унутарћелијске и међућелијске варијације у оквиру групе ћелија фиксираних истим фиксативом. PC1 вектори оптерећења у сагласности су са одступањима директно читаних из раманских спектра разлике. Ово није неочекивано, имајући у виду природу ове РС и примењених алгоритама.

Подробнија анализа РСА факторских оцена [Слике 3.7 (б) и 3.8 (б) и Слика 3.9 (б) и 3.10 (б)] открива веће раздвајање дуж РС1 за серију 1, нарочито за спектрални регион од 800 cm^{-1} до 1770 cm^{-1} ћелија фиксираних формалдехидом. Највероватније, ово је последица хетерогености примарних ћелија. У зависности од природе унутарћелијских и међућелијских разлика, сам процес фиксирања може да појача или супримира њихове спектралне карактеристике [68, 69, 70, 71, 72].



Слика 3.14: (а) Усредњени рамански спектри ПД – ММЋ фиксираних формалдехидом из серија 1 и серије 2 и њихова разлика за спектрални регион од 800 cm^{-1} до 1770 cm^{-1} . (б) Одговарајући графички прикази факторских оцена рачунати по серијама за ћелије фиксиране формалдехидом, као и њихови РСА вектори оптерећења. Процент варијансе РС1-РС2: 39.39%-19.37%.

Даљом анализе, упоређене су серије узорака за оба хемијска фиксатива. На Слици 3.11 (а) приказани су усредњени рамански спектри добијени за

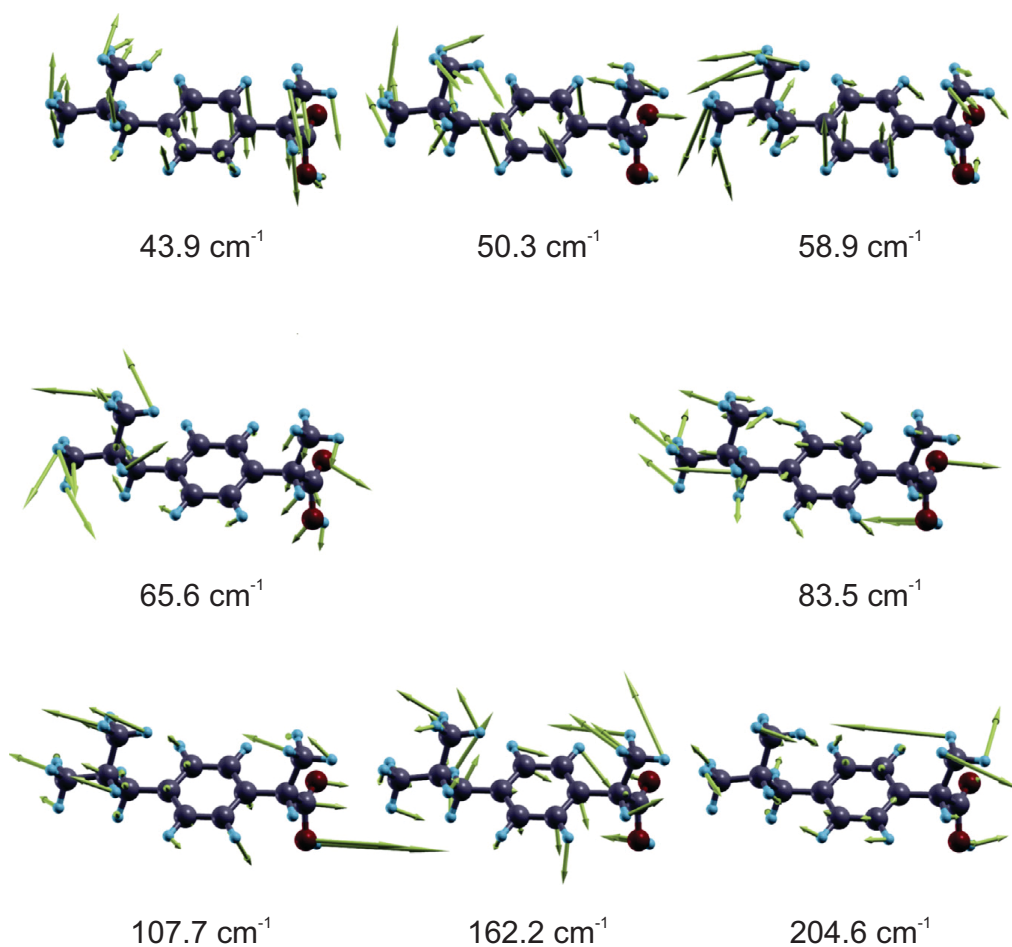
ПД – ММТ серије 1 и серије 2 које су фиксирани метанолом, за спектрални регион од од 800 cm^{-1} до 1770 cm^{-1} , док су на Слици 3.11 (б) приказани резултати РСА. Иста поређења, али за спектрални регион од 2500 cm^{-1} до 3600 cm^{-1} приказани су Слици 3.13 (а), а графички приказ факторских оцена, као и вектори оптерећења РС1 и РС2 приказани су на истој Слици под (б). Идентичан поступак поновљен је и за ћелије фиксирани формалдехидом и резултати су приказани на Слици 3.12 и Слици 3.14. У оба спектрална региона, разлике су приметне на истим енергијама, независно од избора фиксатива. Релативне варијације интензитета раманских мода највероватније потичу од механизма фиксације и његовог утицаја на интензитета специфичних обележја (маркера) у раманским спектрима. Ипак, када се примене подаци добијени помоћу РСА, долази до изражаја значајно преклапање резултата у оба региона и за оба фиксатива. Многбројни фактори, укључујући температурске ефекте и природу ћелија, могу допринети спектралним разликама, а ћелијска хетерогеност највероватније има доминантну улогу [110, 112]. Треба напоменути да је у свим случајевима већа распрострањеност (мање груписање) дуж РС1 за узорке из серије 1, које указује на већи степен хетерогености.

4. Полиморфизам фармаколошки активних једињења: ибупрофен

4.1 Кристална структура (RS) – ибупрофена

Органске молекулске кристале карактерише значајна разлика између јаких ковалентних унутармолекулских веза и слабих ван дер Валсових међумолекулских интеракција или водоничних веза које учествују у њиховом груписању. Међумолекулске интеракције одговорне су за специфичне физичке особине молекуларних једињења, а јаке ковалентне везе чувају унутрашњу структуру упркос међумолекулским интеракцијама. Једна од последица специфичне грађе органских молекулских кристала је и "очување" вибрационе структуре појединачних молекула након њихове организације у кристалну структуру. На основу симетријске анализе, након кристализације долази до цепања вибрација појединачних молекула у мултиплете, у зависности од броја молекулских јединица које се налазе у јединичној ћелији новонастале кристалне структуре. Међутим, услед значајно слабијих међумолекулских веза, ова цепања су веома мала и често се не могу детектовати у експерименту, где се типично детектује појединачна вибрација мало измењене енергије и полуширине у односу на ону у појединачном молекулу. Поред ових унутрашњих вибрација, у вибрационом спектру молекулских кристала могу се уочити и међумолекулске вибрације (транслације и либрације) које потичу од узајамних транслационих и ротационих кретања читавих молекула. Оне директно одговарају кристалној структури, одређују физичке особине молекулских кристала, обезбеђујући на молекуларном нивоу информацију о стабилности агрегатног стања, као и природу трансформација у чврстом стању.

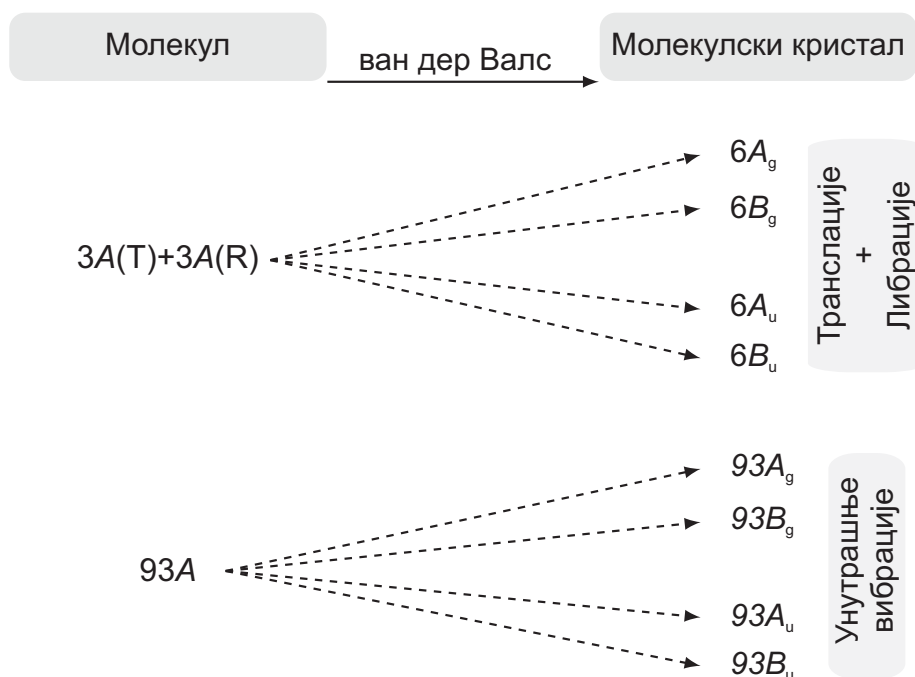
Ибупрофен (ИБП), 2(4-изобутилфенил)пропанска киселина, широко је примењиван нестероидни антиинфламаторни лек који има аналгетско и антипиретско дејство. Може се наћи у два енантиомерна облика: S(+)- ИБП и R(-)- ИБП, где је S(+)- ИБП фармаколошки активни облик. Комерцијални



Слика 4.1: Шематски прикази вибрација рамански активних мода (RS) – ибупрофена. Дужине стрелица пропорционалне су амплитудама вибрација.

лек је заправо рацемска смеша ова два облика и на собној температури је бели кристални прах. Рацемска смеша ибупрофена у својој кристалној фази I ((RS)–ИБП) стабилна је до тачке топљења $T_{mI}=349$ К [113]. Пре извесног времена, пријављено је постојање још једне фазе у чврстом агрегатном стању [114, 115].

Структура молекула ИБП, као и шематски приказ вибрација рамански активних мода у том молекулу, може се видети на Слици 4.1. Молекул је сачињен од 33 атома који резултују са 93 карактеристичне вибрације једног молекула ИБП A симетрије. Услед одсуства центра инверзије, све моде су и инфрацрвено и рамански активне. Комерцијално, ИБП је рацемат молекулских кристала, који кристалишу у моноклинични тип структуре са четири ($Z = 4$) молекулске јединице по елементарној ћелији [116, 117, 118, 119, 120]. Рацемат, као и енантиомери R(-) – и S(+) – ИБП формирају цикличне димере водоничним везама преко својих карбоксилних група кроз центар инверзије. То води повећању симетрије од $P2_1$ за S(+) – ИБП до $P2_1/c$ у случају (RS) – ИБП.

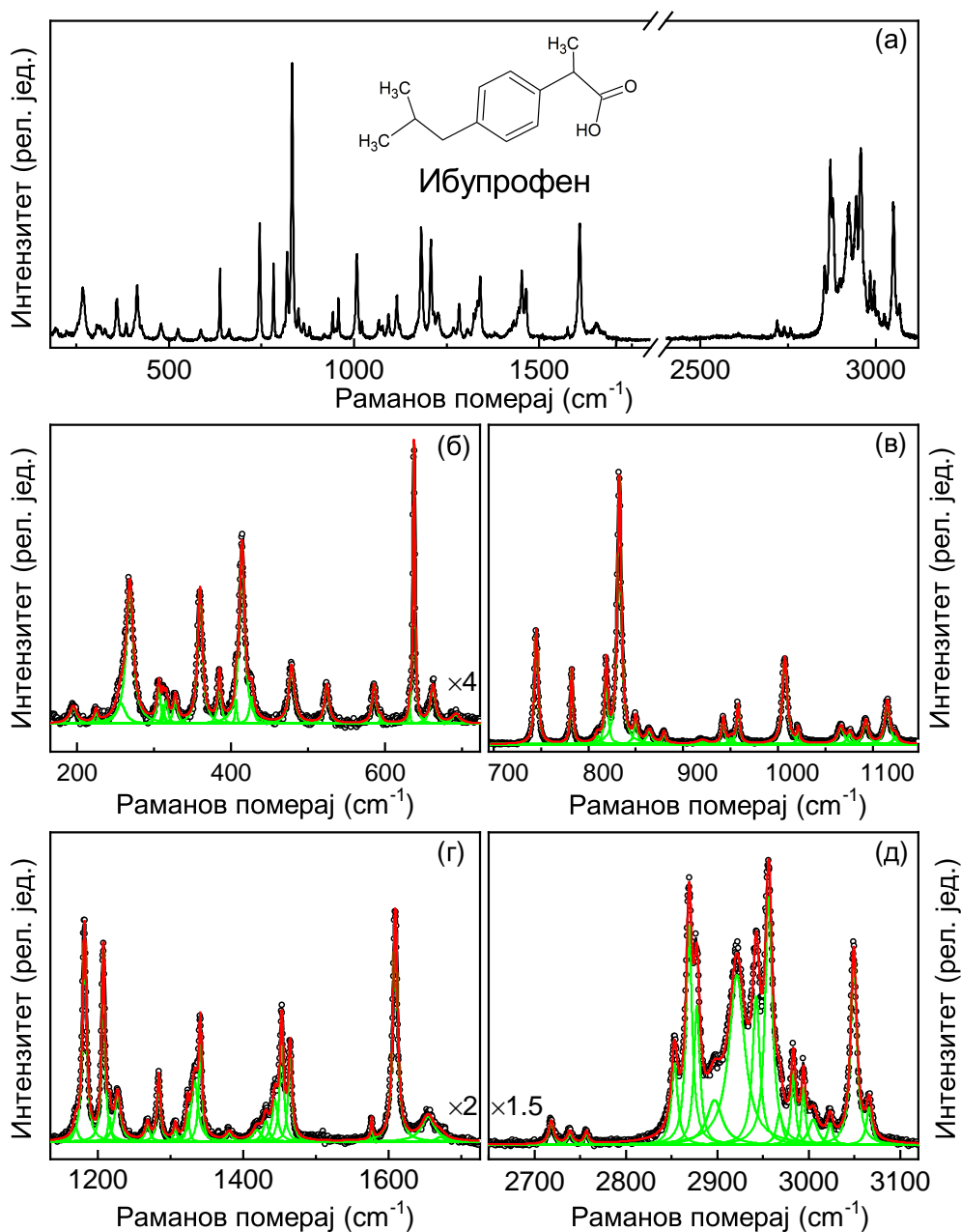


Слика 4.2: Дијаграм корелација између вибрационе структуре појединачног молекула и вирационе структуре молекулског кристала.

Последица измене симетрије у кристалу је раздвајање Раман и инфрацрвено активних мода у виду мултиплета.

4.2 Унутрашње вибрације (RS) – ибупрофена

Да би вибрациона структура рацемског ИБП била одређена, примењен је корелациони метод [121]. Успостављањем корелације између симетрије молекулских кретања, симетрије позиције и симетрије кристала, узимајући у обзир и особености кристалне структуре (RS) – ИБП (види Сliku 4.2), у Рамановом спектру очекује се 186 унутрашњих мода ($93A_g + 93B_g$), које потичу од молекулских вибрација изолованих молекула. Овај значајни пораст броја вибрационих мода у молекулском кристалу, у поређењу са појединачним молекулом, последица је интеракције међу молекулима. Имајући у виду да су молекули међусобно повезани slabим ван дер Валсовим интеракцијама, унутрашње моде ће се појавити као A_g - B_g дублети на енергијама које одговарају енергијама вибрација појединачних молекула. Такође, раздвајање дублета је изузетно мало тако да се типично могу видети као једна линија у раманском спектру. На Слици 4.3 (а) прилазан је рамански спектар (RS) – ИБП мерен на собној температури у широком опсегу енергија. Поједине раманске линије



Слика 4.3: (а) Раманов спектар (RS) – ИБП мерен на собној температури у широком температурском опсегу. (б)-(д) Теоријска анализа унутармолекулских вибрација (RS) – ИБП. Црвена линија је укупни израчунати спектар. Зелене линије одговарају Лоренцовим профилима појединачних вибрационих доприноса раманском спектру.

приказане су на Слици 4.3 (б)-(д). Уочене раманске моде могу се означити на начин приказан у Табели 4.1.

Природа интермолекулских интеракција указује да се спољашње вибрације очекују у нискоенергијском делу Рамановог спектра, док се унутрашње вибрације типично налазе на већим енергијама (преко 200 cm⁻¹). Ипак,

4. Полиморфизам фармаколошки активних једињења: Ибупрофен

Тип вибрације	Област (cm ⁻¹)	Интензитет
$\nu(O - H)$	3650-3000	с
$\nu(N - H)$	3500-3300	ср
$\nu(\equiv C - H)$	3300	с
$\nu(= C - H)$	3100-3000	ј
$\nu(-C - H)$	3000-2800	ј
$\nu(-S - H)$	2600-2550	ј
$\nu(C \equiv N)$	2255-2220	ср-ј
$\nu(C \equiv C)$	2250-2100	вј
$\nu(C = O)$	1820-1680	ј-с
$\nu(C = C)$	1900-1500	вј-ср
$\nu(C = N)$	1680-1610	ј
$\nu(N = N)$, алифатични супституент	1580-1550	ср
$\nu(N = N)$, ароматични супституент	1440-1410	ср
$\nu_a((C-)NO_2)$	1590-1530	ср
$\nu_s((C-)NO_2)$	1380-1340	вј
$\nu_a((C-)SO_2(-C))$	1350-1310	с-0
$\nu_s((C-)SO_2(-C))$	1160-1120	ј
$\nu(C = S)$	1250-1000	ј
$\delta(CH_2)$, $\delta_a(CH_3)$	1470-1400	ср
$\delta_s(CH_3)$	1380	ср-с
$\nu(CC)$, ароматично	1600, 1580	ј-ср
	1500, 1450	ср-с
	1000	с
$\nu(CC)$, алициклични и афилатични ланци	1300-600	ј-ср
$\nu_a(C - O - C)$	1150-1060	с
$\nu_s(C - O - C)$	970-800	ј-ср
$\nu_a(Si - O - Si)$	1110-1000	с-0
$\nu_s(Si - O - Si)$	550-450	вј
$\nu(O - O)$	900-845	ј
$\nu(S - S)$	550-430	ј
$\nu(Se - Se)$	330-290	ј
$\nu(C(\text{ароматично})-S)$	1100-1080	ј
$\nu(C(\text{алифатично})-S)$	790-630	ј
$\nu(C - Cl)$	800-550	ј
$\nu(C - Br)$	700-500	ј
$\nu(C - I)$	660-480	ј

Табела 4.1: Типови, енергије и интензитетети вибрација органских молекула које се могу уочити у експерименту нееластичног расејања светлости: ν -истезање, δ -савијање, ν_s -симетрично истезање, ν_a -асиметрично истезање; вј-врло јак, ј-јак, ср-средњи, с-слаб, 0-врло слаб или неактиван [122].

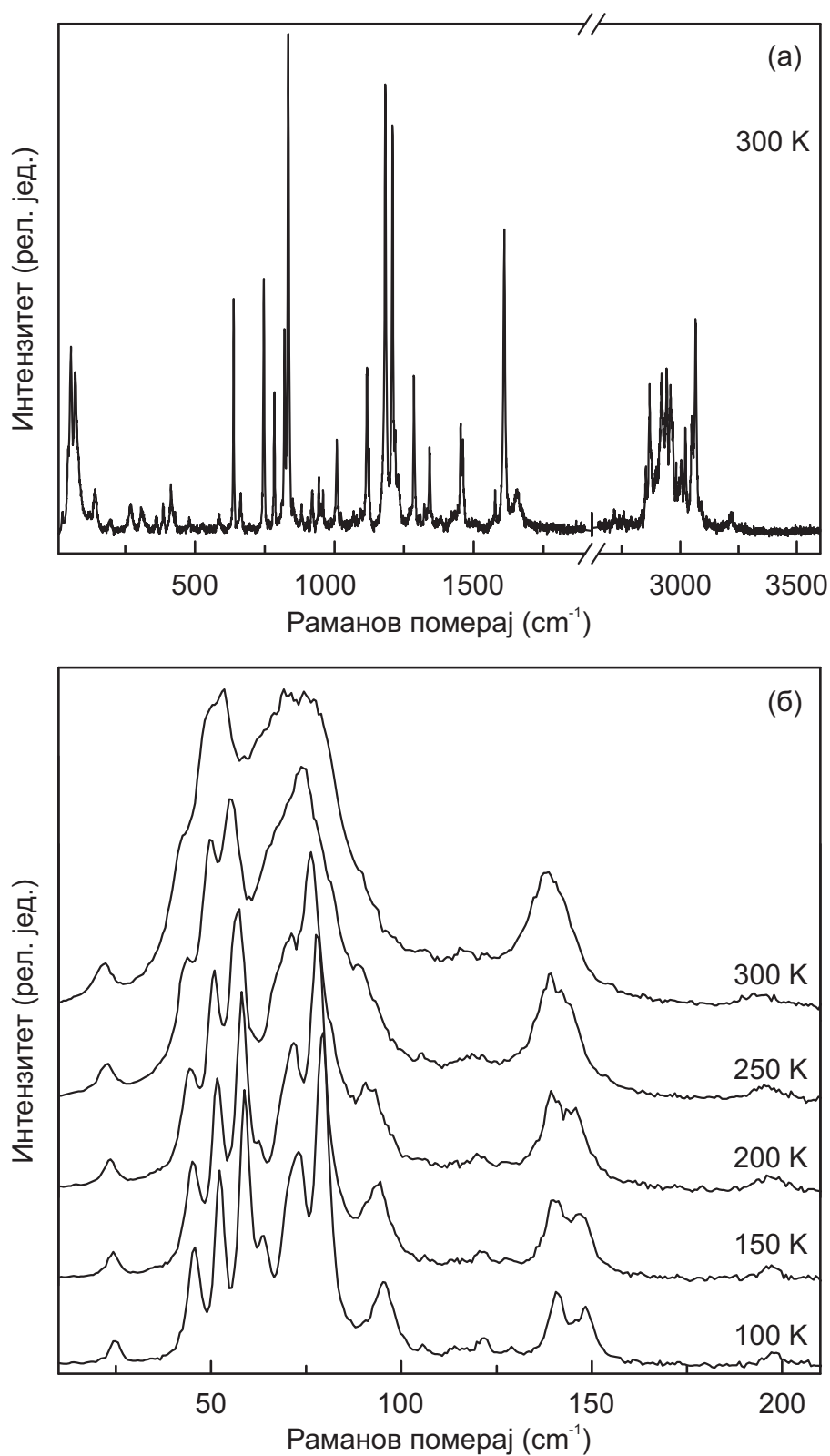
ибупрофен је изузетно флексибилан молекул, те се очекује и изванредно број нисколежећих дублета, од којих сваки потиче од мода појединачних молекула [Слика 4.2].

Да би вибрациони спектар појединачног молекула био одређен, извршене су калкулације из првих принципа на динамичким особинама молекула ибупрофена, у оквиру пертурбативне теорије функционала густине [123], на начин који је имплементиран у пакет QUANTUM ESPRESSO [124]. Коришћени су ултра-меки псевдопотенцијали у скаларно релативистичкој апроксимацији, генерисани у оквиру општих апроксимација генерализованих градијената са Perdew–Burke–Ernzerhof изменско корелационим функционалом. Структурни параметри су релаксирани тако да укупна сила која делује на сваки атом буде мања од 10^{-4} Ry/a.u. Да би изоловани молекул био анализиран, јединична ћелија је направљена тако да буде неколико пута већа од величине самог молекула и све калкулације су изведене за центар Брилуенове зоне. Гранична енергија за таласне функције и густине електрона су 60 Ry и 800 Ry, респективно, одређене ради обезбеђивања стабилне конвергенце. Израчунате енергије вибрационих мода за појединачни S – ИБП молекул у нискоенергијском делу спектра приказане су у Табели 4.2. Одговарајући вибрациони модови представљени су на Слици 4.1. Такође, извршене су и калкулације на R – ИБП молекулу и не постоје значајније разлике у енергијама фонона између два енантиомера. Добијене енергије вибрационих мода на енергијама већим од 200 cm^{-1} у сагласности су са подацима из литературе [125, 126, 127, 128], као и са резултатима експеримента приказаним на Слици 4.3.

4.3 Међумолекулске вибрације (RS) – ибупрофена

Као што је претходно дискутовано, у молекулским кристалима разликују се два типа вибрација: екстерне, спољне (између молекула) и интерне, унутрашње (унутар молекула). У зависности од типа, спољне вибрације могу бити translације, које представљају транслаторно кретање молекула и либрације, које представљају ротације.

Иако је информација о нискоенергијским екстерним вибрацијама од пресудног значаја за идентификацију различитих чврстих фаза, претходна истраживања вибрационих особина (RS) – ИБП анализом Рамановог расејања, као и теоријске студије, биле су усредсређене углавном на унутрашње (молекуларне) вибрације на енергијама вишим од 200 cm^{-1} [125, 126, 127, 128]. Нискоенергијски спектрални регион рацемског ибупрофена испитиван је једино у чланку Hédoux и др. [115]. Аутори су уочили три моде на око 20 cm^{-1} , 50



Слика 4.4: (а) Раманов спектар (RS)– ИБП у широком енергијском опсегу. (б) Температурска зависност спектра (RS) – ИБП у нискоенергијском спектралном опсегу.

Табела 4.2: Израчунате енергије молекулских вибрационих мода, симетрија и активност појединачног молекула S – ИБП у региону ниске енергије.

Симетрија	Израчуната енергија (cm^{-1})	Активност
A	43.9	P+ИЦ
A	50.3	P+ИЦ
A	58.9	P+ИЦ
A	65.6	P+ИЦ
A	83.5	P+ИЦ
A	107.7	P+ИЦ
A	162.2	P+ИЦ

cm^{-1} и 80 cm^{-1} и означили их као фононске моде, мада симетријске особине кристалне структуре (RS) – ИБП указују на постојање већег броја екстерних вибрација. До сада, детаљна анализа спектара, са освртом на специфичну симетрију овог молекулског кристала, није извршена. Стога, извршено је детаљно испитивање нискоенергијског региона раманског спектра рацемског ибупрофена на различитим температурама. Специфичности његове кристалне структуре су у фокусу анализе вибрационих особина ове фармаколошки активне супстанце.

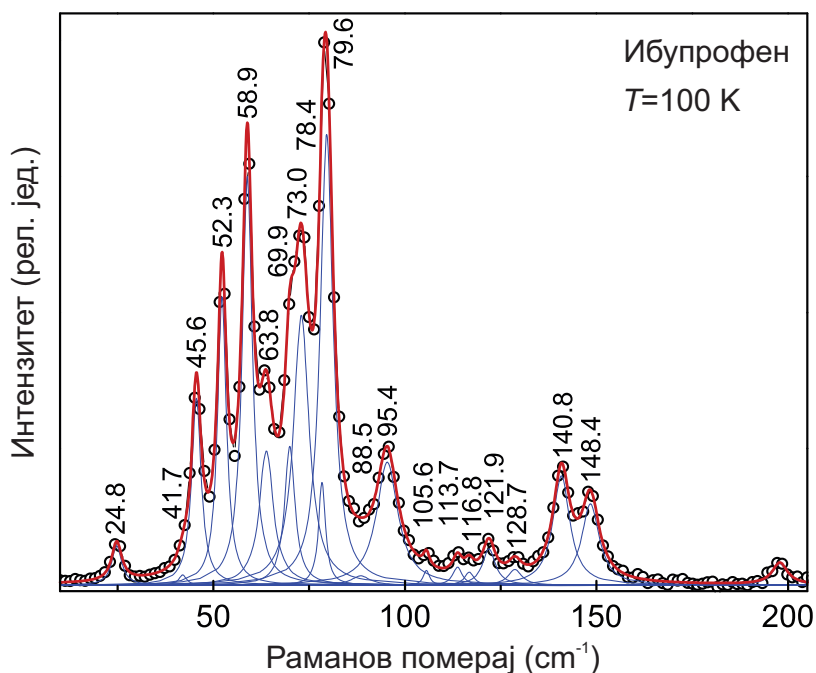
Корелишући транслационе и ротационе моде појединачног молекула са позиционом и кристалном симетријом (4.2), добијена је расподела међумолекулских вибрационих мода у центру Брилуенове зоне (Γ тачка):

$$\begin{aligned}\Gamma_{Raman} &= 6A_g + 6B_g, \\ \Gamma_{infrared} &= 5A_u + 4B_u, \\ \Gamma_{acoustic} &= A_u + 2B_u\end{aligned}$$

Према томе, могу се очекивати 12 Раман активних мода које потичу од спољних (међумолекулских) вибрација у експерименту Рамановог расејања.

Према нумеричким прорачунима вибрација атома унутар појединачног молекула ИБП, нађено је да се у спектралном региону испод 200 cm^{-1} очекује седам интрамолекулских дублета (види Табелу 4.2), од којих сваки потиче од моде појединачног молекула. То значи да се у овом делу спектра може очекивати 26 Раман активних мода. Присуство унутарашњих и спољашњих вибрационих мода у истом спектралном региону указује на њихово јако мешање [129, 130, 131].

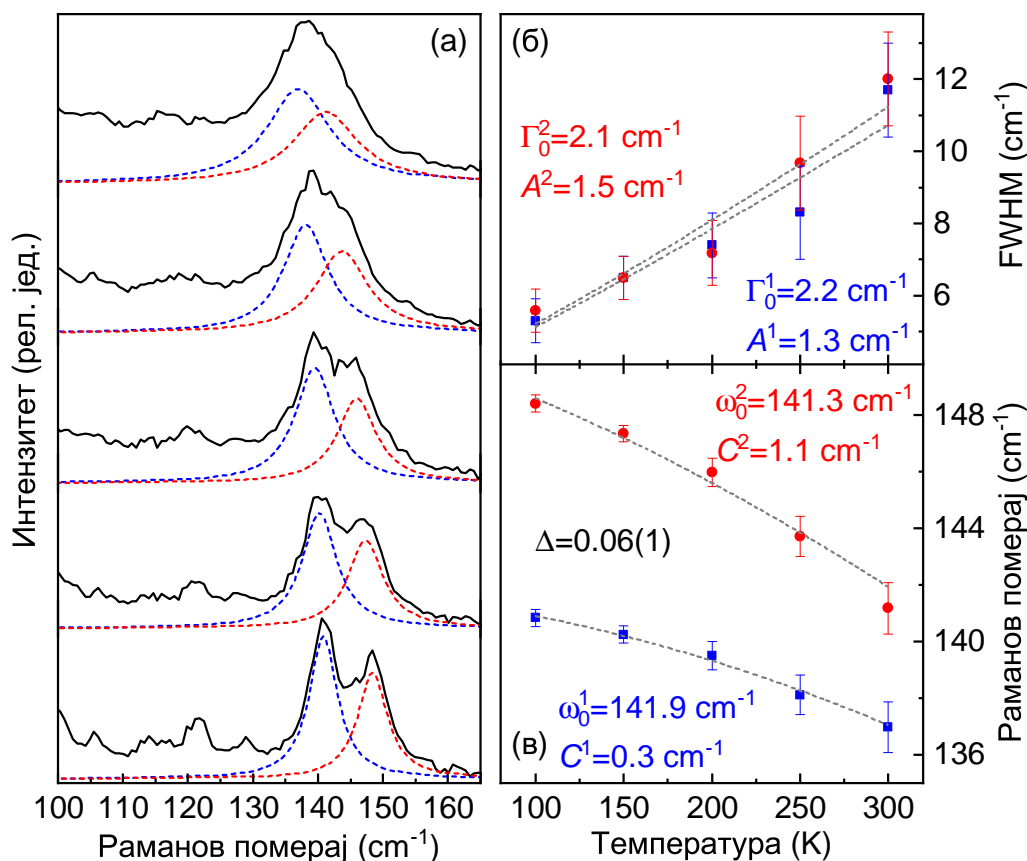
На Слици 4.4 приказан је нискоенергијски део раманског спектра рацемског



Слика 4.5: Раманов спектар (RS) – ибупрофена мерен на 100 К (кружићи). Црвена линија је укупни израчунати спектар. Плаве линије одговарају Лоренцовим профилима појединачних вибрационих доприноса раманском спектру.

ИБП, мерен на различитим температурама. На собној температури се само четири структуре на 21 cm^{-1} , 52 cm^{-1} , 74 cm^{-1} и 138 cm^{-1} могу јасно разликовати. То је у сагласности са налазима Hédox и др. [115], где су аутори уочили три мода на око 20 cm^{-1} , 50 cm^{-1} и 80 cm^{-1} и асигнирали их као модове фонона. Ипак, као што је већ поменуто, симетрија система предвиђа много већи број пикова. Стога, може се сматрати да се ове структуре састоје од више модова. Да бисмо их раздвојили, мерења су извршена на нижим температурама. Услед ефекта анхармоничности, смањењем температуре, полуширина сваке моде се смањује [132]. Последично, велики број вибрационих мода постаје видљив на 100 К [Слика 4.4].

Раманов спектар (RS) – ибупрофена мерен на 100 К представљен је кружићима на Слици 4.5. Црвеном линијом приказан је спектар добијен анализом експерименталних података методом најмањих квадрата са вишеструким Лоренцијаном (плаве линије представљају допринос појединачних вибрација). Уочено је 19 од 26 мода предвиђених структурном анализом. Њихове енергије означене су на Слици 4.5. За моде на енергијама нижим од 140 cm^{-1} очекује да имају, у одређеној мери, мешани карактер. За моде на енергијама вишим од 140 cm^{-1} можемо са сигурношћу рећи да су



Слика 4.6: (а) Неполарисани Раманови спектри двоструке моде на око 145 cm^{-1} (RS) – ИБП мерени на различитим температурама. (б) и (в) Температурска зависност полуширина и енергија дублета на око око 145 cm^{-1} . Испрекидане линије одговарају теоријској анализи на основу израза 4.1 и 4.2

унутармолекулски дублети.

На Слици 4.6 (а) приказани су Раман спектри структура на око 145 cm^{-1} рацемског ИБП мерени на различитим температурама. Иако је само једна мода предвиђена нумеричким прорачунима за молекулу ИБП у овом спектралном региону (види Табелу 4.2), две моде се јасно уочавају на ниским температурама. Из тог разлога, ова мода може бити означена као A_g - B_g дублет, што је и предложено симетријском анализом [Слика 4.2]. Раздвајање енергија у дублету у вези је са интеракцијом молекула и кристалне структуре узорка и познато је као Давидовљево цепање мода [133]. Порастом температуре, моде су померене ка нижим таласним бројевима и прогресивно се шире, што се објашњава ефектом анхармоничности [Слика 4.6 (б)].

У општем случају, температурска зависност енергија вибрационих мода $\Omega(T)$ је одређена ефектима анхармоничности. Ради поједностављења, ако бисмо разматрали асиметрични распад нисколежећих оптичких вибрација

у две акустичке вибрације, температурска зависност енергије изазвана анхармоничношћу може бити описана са [132, 134]:

$$\Omega(T) = \Gamma_0 + A\left(1 + \frac{2}{e^x - 1}\right), \quad (4.1)$$

$$\Omega(T) = \Omega_0 - C\left(\frac{2}{e^x - 1}\right), \quad (4.2)$$

где је Ω_0 хармонијска енергија Раман моде, Γ_0 полуширина, A и C су анхармонијске константе и $x = \hbar\Omega_0/2k_B T$.

Температурска зависност полуширина и енергија A_g - B_g дублета на око 145 cm^{-1} приказане су на Слици 4.6 (б) и (в). Испрекиданим линијама приказан је спектар израчунат помоћу израза 4.1 и 4.2. Добро слагање експерименталних података са израчунатим спектрима указује да је температурска зависност Раман активних мода (RS)- ИБП на ниским енергијама у највећој мери диригована ефектима анхармоничности. На основу познавања хармонијских енергија¹ A_g - B_g дублета, може се проценити однос унутармолекулских и међумолекулских интеракција на основу израза $\Delta = 2\left|\frac{\Omega_0^1 - \Omega_0^2}{\Omega_0^1 + \Omega_0^2}\right| = 0.06(1)$, из чега произилази да су унутармолекулске интеракције, које су модулисане овим вибрацијама [Слика 4.3], око 20 пута јаче од међумолекулских.

У општем случају, сама сазнања о температурској зависности енергије Раманових мода нису довољна да би се разликовале нисколежеће унутрашње од спољашњих мода [135, 136]. Свеобухватнији приступ одређивања типова мода захтевао би комбинацију мерења на различитим притисцима и температурама [136].

¹Хармонијска енергија фонона представљена је чланом Ω_0 у изразима 4.1 и 4.2 и представља енергију неинтерагујућег хармонијског система. У експериментима директно се уочава њихова ренормализована вредност, тј. након урачунавања анхармонијских доприноса као и интеракција са другим (квази)честицама.

5. Закључак

У овој дисертацији, Раманова спектроскопија примењена је за анализу ПД-ММТ на стакленој подлози, као и ћелија насталих њиховом диференцијацијом. Директним поређењем раманских спектра ПД-ММТ и диференцираних ћелија, уочене су разлике у релативним интензитетима одређених вибрационих мода у спектру. Праћењем релативних интензитета мода нуклеинских киселина и протеина (у односу на интензитет вибрационе моде на 1660 cm^{-1}), могу се разликовати спектри матичних ћелија и њихових диференцираних аналога. Додатна мултиваријантна статистичка анализа јединствених раманских спектра ових ћелија, методом анализе главних компонената, указује на изражено груписање спектра засновано на заједничким спектралним карактеристикама. Тиме се отвара могућност примене овог метода не само за брзу и једноставну детекцију одређених ћелијских лоза, већ и за откривање разлика унутар истих. С обзиром на ниске захтеве када је у питању припрема узорака и одсуство реагенса који се иначе користе у стандардним биолошким тестовима, Раманова спектроскопија може бити коришћена као додатни метод у карактеризацији ММТ. Са становишта терапијског потенцијала ММТ, поједностављење процедуре детекције и идентификације ћелија би значајно унапредиле и убрзале њихову примену у биомедицини. Комплетирање базе спектра, истицање спектралних карактеристика од значаја, избор оптималних експерименталних услова и стандардизација читавог приступа допринеће да Раманова спектроскопија постане референтни метод у овој области.

Како се већина анализа врши на фиксираним ћелијама, а познато је да фиксативи изазивају драматичне промене свих врста ћелија, у различитом обиму, неопходно је утврдити њихов тачан ефекат, посебно када је у питању Раманова спектроскопија. Од пресудног значаја за избор фиксатива је сам циљ анализе, односно шта се од самог узорка даље очекује, као и њихова природа. Презервација ћелија третирањем формалдехидом и метанолом представља стандардну процедуру у већини лабораторијских протокола. У оквиру ове дисертације, испитиван је ефекат ових хемијских супстанци на

Раманове спектре примарних ћелија–ПД-ММТ. Оба третмана омогућила су добијање квалитативно и квантитативно сличних Раманових спектра, који се могу сматрати карактеристичним и јединственим за дати узорак. Директним поређењем спектра, као и статистичким третманом, суптилне разлике су уочене у спектрима за ове две групе ћелија које одсликавају разлике у садржају липида и протеина. Када је у питању Раманова спектроскопија ПД–ММТ, избор и формалдехида и метанола је прихватљив, али треба имати у виду различиту способност очувања биомолекула од значаја за анализу.

Недвосмислена идентификација полиморфног облика ФАС од изузетног је значаја за процес развоја једног лека, његовог дозирањег облика, као и за индустријску производњу. Методом раманске спектроскопије, доказивање полиморфа може се извршити анализом међумолекулских вибрација које су у "1-1" вези са кристалном структуром. У овој дисертацији извршено је испитивање кристалне структуре ибупрофена. Детаљна анализа симетрије кристала овог једињења предвиђа постојање 12 међумолекулских вибрација. Према нумеричким прорачунима, постојање унутармолекулских вибрација је такође очекивано на нискоенергијском делу спектра, карактеристичном за међумолекулске вибрације, углавном у облику A_g-B_g дублета, као у случају структуре на $141-148\text{ cm}^{-1}$. Потпуно раздвајање доприноса ових вибрација извршено је анализом раманских спектра (RS)-ИБП мерених на различитим температурама. Укупно 19 Раман активних мода, карактеристичних за испитивани полиморфни облик, уочено је и идентификовано у спектралном региону испод 200 cm^{-1} . Њихова температурска зависност објашњена је утицајем ефекта анхармоничности.

Библиографија

- [1] Paul N Devine, Roger M Howard, Rajesh Kumar, Matthew P Thompson, Matthew D Truppo, and Nicholas J Turner. Extending the application of biocatalysis to meet the challenges of drug development. *Nature Reviews Chemistry*, 2(12):409–421, 2018. 1
- [2] Cavit Akin. Biocatalysis with immobilized cells. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 5(1):319–367, 1987. 1
- [3] John M Woodley. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends in biotechnology*, 26(6):321–327, 2008. 1
- [4] Joseph P Adams, Murray JB Brown, Alba Diaz-Rodriguez, Richard C Lloyd, and Gheorghe-Doru Roiban. Biocatalysis: a pharma perspective. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 361(11):2421–2432, 2019. 1
- [5] Andreas S Bommarius. Biocatalysis: a status report. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 6:319–345, 2015. 1
- [6] Jan Hansmann, Florian Groeber, Alexander Kahlig, Claudia Kleinhans, and Heike Walles. Bioreactors in tissue engineering—principles, applications and commercial constraints. *Biotechnology journal*, 8(3):298–307, 2013. 1, 9
- [7] Xin Wei, Xue Yang, Zhi-peng Han, Fang-fang Qu, Li Shao, and Yu-fang Shi. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(6):747–754, 2013. 2
- [8] Daniel Howard, Lee D Buttery, Kevin M Shakesheff, and Scott J Roberts. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *Journal of anatomy*, 213(1):66–72, 2008. 2
- [9] Darwin J Prockop. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276(5309):71–74, 1997. 2

- [10] AJ Friedenstein, RK Chailakhjan, and KS Lalykina. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation*, 3(4):393–403, 1970. 2
- [11] Yasushi Sato, Hironobu Araki, Junji Kato, Kiminori Nakamura, Yutaka Kawano, Masayoshi Kobune, Tsutomu Sato, Koji Miyanishi, Tetsuji Takayama, Minoru Takahashi, et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*, 106(2):756–763, 2005. 2
- [12] Catalin Toma, Mark F Pittenger, Kevin S Cahill, Barry J Byrne, and Paul D Kessler. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 105(1):93–98, 2002. 2
- [13] MLBK Dominici, K Le Blanc, I Mueller, I Slaper-Cortenbach, FC Marini, DS Krause, RJ Deans, A Keating, DJ Prockop, and EM Horwitz. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4):315–317, 2006. 3, 25, 43
- [14] Aleksandra Klimczak and Urszula Kozłowska. Mesenchymal stromal cells and tissue-specific progenitor cells: their role in tissue homeostasis. *Stem cells international*, 2016:1–11, 2016. 3
- [15] Paolo Bianco, Pamela Gehron Robey, and Paul J Simmons. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell*, 2(4):313–319, 2008. 3
- [16] Donald G Phinney and Darwin J Prockop. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem cells*, 25(11):2896–2902, 2007. 3
- [17] Ralf Hass, Cornelia Kasper, Stefanie Böhm, and Roland Jacobs. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (msc): a comparison of adult and neonatal tissue-derived msc. *Cell Communication and Signaling*, 9(1):12, 2011. 3
- [18] Donald G Phinney. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. *Journal of cellular biochemistry*, 113(9):2806–2812, 2012. 3, 43

- [19] Marina Gazdic, Vladislav Volarevic, Nebojsa Arsenijevic, and Miodrag Stojkovic. Mesenchymal stem cells: a friend or foe in immune-mediated diseases. *Stem Cell Reviews and Reports*, 11(2):280–287, 2015. 3
- [20] Reza Abdi, Paolo Fiorina, Chaker N Adra, Mark Atkinson, and Mohamed H Sayegh. Immunomodulation by mesenchymal stem cells a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes*, 57(7):1759–1767, 2008. 3
- [21] Karen English, Bernard P Mahon, and Kathryn J Wood. Mesenchymal stromal cells; role in tissue repair, drug discovery and immune modulation. *Current drug delivery*, 11(5):561–571, 2014. 3
- [22] Isabel C Gay, Shuo Chen, and Mary MacDougall. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthodontics & craniofacial research*, 10(3):149–160, 2007. 3
- [23] S Ivanovski, S Gronthos, S Shi, and PM Bartold. Stem cells in the periodontal ligament. *Oral diseases*, 12(4):358–363, 2006. 3
- [24] Masaki Shimono, Tatsuya Ishikawa, Hiroki Ishikawa, Hirokazu Matsuzaki, Sadamitsu Hashimoto, Takashi Muramatsu, Kaori Shima, Ken-Ichi Matsuzaka, and Takashi Inoue. Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microscopy research and technique*, 60(5):491–502, 2003. 3, 27, 38
- [25] Miletić, Maja and Mojsilović, S and Okić- Djordjević, Ivana and Kukolj, Tamara and Jauković, Aleksandra and Santibanez, JF and Jovčić, Gordana and Bugarski, Diana. Mesenchymal stem cells isolated from human periodontal ligament. *Archives of Biological Sciences*, 66(1):261–271, 2014. 3, 25
- [26] Tamara Kukolj, Drenka Trivanović, Ivana Okić Djordjević, Slavko Mojsilović, Jelena Krstić, Hristina Obradović, Srdja Janković, Juan Francisco Santibanez, Aleksandra Jauković, and Diana Bugarski. Lipopolysaccharide can modify differentiation and immunomodulatory potential of periodontal ligament stem cells via erk1, 2 signaling. *Journal of cellular physiology*, 233(1):447–462, 2018. 3
- [27] Hiroshi Egusa, Wataru Sonoyama, Masahiro Nishimura, Ikiru Atsuta, and Kentaro Akiyama. Stem cells in dentistry—Part II: Clinical applications. *Journal of prosthodontic research*, 56(4):229–248, 2012. 4

-
- [28] Wenjia Liu, Anna Konermann, Tao Guo, Andreas Jäger, Liqiang Zhang, and Yan Jin. Canonical Wnt signaling differently modulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and from periodontal ligament under inflammatory conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(3):1125–1134, 2014. 4
- [29] Lei Wang, Huan Shen, Wei Zheng, Liang Tang, Zhenhua Yang, Yuan Gao, Qingtian Yang, Chen Wang, Yinzong Duan, and Yan Jin. Characterization of stem cells from alveolar periodontal ligament. *Tissue Engineering Part A*, 17(7-8):1015–1026, 2010. 4
- [30] Je Seon Song, Seong-Oh Kim, Seung-Hye Kim, Hyung-Jun Choi, Heung-Kyu Son, Han-Sung Jung, Chang-Sung Kim, and Jae-Ho Lee. In vitro and in vivo characteristics of stem cells derived from the periodontal ligament of human deciduous and permanent teeth. *Tissue Engineering Part A*, 18(19-20):2040–2051, 2012. 4
- [31] Dimas T Covas, Rodrigo A Panepucci, Aparecida M Fontes, Wilson A Silva Jr, Maristela D Orellana, Marcela CC Freitas, Luciano Neder, Anemari RD Santos, Luiz C Peres, and Maria C Jamur. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Experimental hematology*, 36(5):642–654, 2008. 4
- [32] Lindolfo da Silva Meirelles, Pedro Cesar Chagastelles, and Nance Beyer Nardi. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*, 119(11):2204–2213, 2006. 4
- [33] Wenjun Zhu and Min Liang. Periodontal ligament stem cells: current status, concerns, and future prospects. *Stem cells international*, 2015, 2015. 4
- [34] Wei Zheng, Shi Wang, Dandan Ma, Liang Tang, Yinzong Duan, and Yan Jin. Loss of proliferation and differentiation capacity of aged human periodontal ligament stem cells and rejuvenation by exposure to the young extrinsic environment. *Tissue Engineering Part A*, 15(9):2363–2371, 2009. 4
- [35] Karina Gonzales Silvério, Thaisângela Lopes Rodrigues, Ricardo Dela Colletta, Luciana Benevides, João Santana Da Silva, Márcio Zaffalon Casati, Enilson Antônio Sallum, and Francisco Humberto Nociti. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. *Journal of periodontology*, 81(8):1207–1215, 2010. 4

-
- [36] K Ji, Y Liu, W Lu, F Yang, J Yu, X Wang, Q Ma, Z Yang, L Wen, and K Xuan. Periodontal tissue engineering with stem cells from the periodontal ligament of human retained deciduous teeth. *Journal of Periodontal Research*, 48(1):105–116, 2013. 4
- [37] Andrew Downes, Rabah Mouras, and Alistair Elfick. Optical spectroscopy for noninvasive monitoring of stem cell differentiation. *BioMed Research International*, 2010:1–10, 2010. 4, 32
- [38] Andrew Downes, Rabah Mouras, Pierre Bagnaninchi, and Alistair Elfick. Raman spectroscopy and CARS microscopy of stem cells and their derivatives. *Journal of Raman Spectroscopy*, 42(10):1864–1870, 2011. 4, 5, 8
- [39] Chandrasekhara Venkata Raman and Kariamanikkam Srinivasa Krishnan. A new type of secondary radiation. *Nature*, 121(3048):501, 1928. 5, 15
- [40] CV Raman and KS Krishnan. The optical analogue of the Compton effect. *Nature*, 121(3053):711–711, 1928. 5
- [41] CV Raman and KS Krishnan. The negative absorption of radiation. *Nature*, 122(3062):12–13, 1928. 5
- [42] G Landsberg and L Mandelstam. A novel effect of light scattering in crystals. *Naturwissenschaften*, 16(5):5, 1928. 5, 15
- [43] Dieter Naumann. FT-infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. *Applied Spectroscopy Reviews*, 36(2-3):239–298, 2001. 5
- [44] James W Chan and Deborah K Lieu. Label-free biochemical characterization of stem cells using vibrational spectroscopy. *Journal of biophotonics*, 2(11):656–668, 2009. 5, 7, 32, 39, 40
- [45] Almar F Palonpon, Jun Ando, Hiroyuki Yamakoshi, Kosuke Dodo, Mikiko So-deoka, Satoshi Kawata, and Katsumasa Fujita. Raman and SERS microscopy for molecular imaging of live cells. *Nature protocols*, 8(4):677–692, 2013. 5
- [46] Ioan Notingher, Isabelle Bisson, Anne E Bishop, Wesley L Randle, Julia MP Polak, and Larry L Hench. In situ spectral monitoring of mRNA translation in embryonic stem cells during differentiation in vitro. *Analytical chemistry*, 76(11):3185–3193, 2004. 5, 7, 36, 39, 45
- [47] Eva Brauchle and Katja Schenke-Layland. Raman spectroscopy in biomedicine—non-invasive in vitro analysis of cells and extracellular matrix

- components in tissues. *Biotechnology journal*, 8(3):288–297, 2013. 6, 7, 25, 32, 39
- [48] Björn Lorenz, Christina Wichmann, Stephan Stöckel, Petra Rösch, and Jürgen Popp. Cultivation-free Raman spectroscopic investigations of bacteria. *Trends in microbiology*, 25(5):413–424, 2017. 7
- [49] Anthony P Esposito, Chad E Talley, Thomas Huser, Christopher W Hollars, Charlene M Schaldach, and Stephen M Lane. Analysis of single bacterial spores by micro-Raman spectroscopy. *Applied spectroscopy*, 57(7):868–871, 2003. 7
- [50] L-P Choo-Smith, Kees Maquelin, T Van Vreeswijk, HA Bruining, GJ Puppels, NA Ngo Thi, C Kirschner, Dieter Naumann, D Ami, AM Villa, et al. Investigating microbial (micro) colony heterogeneity by vibrational spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(4):1461–1469, 2001. 7
- [51] C Kirschner, K Maquelin, P Pina, NA Ngo Thi, L-P Choo-Smith, GD Sockalingum, C Sandt, D Ami, F Orsini, SM Doglia, et al. Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. *Journal of clinical microbiology*, 39(5):1763–1770, 2001. 7
- [52] Joke De Gelder, Kris De Gussem, Peter Vandenabeele, Paul De Vos, and Luc Moens. Methods for extracting biochemical information from bacterial Raman spectra: an explorative study on *Cupriavidus metallidurans*. *Analytica chimica acta*, 585(2):234–240, 2007. 7
- [53] Marieke Pudlas, Steffen Koch, Carsten Bolwien, Sibylle Thude, Nele Jenne, Thomas Hirth, Heike Walles, and Katja Schenke-Layland. Raman spectroscopy: a noninvasive analysis tool for the discrimination of human skin cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 17(10):1027–1040, 2011. 7
- [54] N Uzunbajakava, Aufrid Lenferink, Y Kraan, B Willekens, GFJM Vrensen, Jan Greve, and Cornelis Otto. Nonresonant Raman imaging of protein distribution in single human cells. *Biopolymers*, 72(1):1–9, 2003. 7
- [55] Marieke Pudlas, Eva Brauchle, Travis J Klein, Dietmar W Huttmacher, and Katja Schenke-Layland. Non-invasive identification of proteoglycans and chondrocyte differentiation state by Raman microspectroscopy. *Journal of biophotonics*, 6(2):205–211, 2013. 7, 38

-
- [56] H Georg Schulze, Stanislav O Konorov, Nicolas J Caron, James M Piret, Michael W Blades, and Robin FB Turner. Assessing differentiation status of human embryonic stem cells noninvasively using Raman microspectroscopy. *Analytical chemistry*, 82(12):5020–5027, 2010. 7
- [57] S Verrier, I Notingher, JM Polak, and LL Hench. In situ monitoring of cell death using Raman microspectroscopy. *Biopolymers*, 74(1-2):157–162, 2004. 7
- [58] Christoph Krafft and Jurgen Popp. The many facets of Raman spectroscopy for biomedical analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(3):699–717, 2015. 7
- [59] Ceren Aksoy and Feride Severcan. Role of vibrational spectroscopy in stem cell research. *Journal of Spectroscopy*, 27(3):167–184, 2012. 7, 36, 45
- [60] Adrian Ghita, Flavius C Pascut, Virginie Sottile, Chris Denning, and Ioan Notingher. Applications of Raman micro-spectroscopy to stem cell technology: label-free molecular discrimination and monitoring cell differentiation. *EPJ Techniques and Instrumentation*, 2(1):1–14, 2015. 7
- [61] H Bai, P Chen, H Fang, L Lin, GQ Tang, GG Mu, W Gong, ZP Liu, H Wu, and H Zhao. Detecting viability transitions of umbilical cord mesenchymal stem cells by Raman micro-spectroscopy. *Laser Physics Letters*, 8(1):78–84, 2010. 8, 36, 39, 45
- [62] Huihua Kenny Chiang, Feng-Ying Peng, Shih-Chieh Hung, and Ya-Ching Feng. In situ Raman spectroscopic monitoring of hydroxyapatite as human mesenchymal stem cells differentiate into osteoblasts. *Journal of Raman Spectroscopy*, 40(5):546–549, 2009. 8
- [63] Erez Azrad, Dany Zahor, Razi Vago, Zvi Nevo, Rani Doron, Dror Robinson, Levi A Gheber, Salman Rosenwaks, and Ilana Bar. Probing the effect of an extract of elk velvet antler powder on mesenchymal stem cells using Raman microspectroscopy: enhanced differentiation toward osteogenic fate. *Journal of Raman Spectroscopy*, 37(4):480–486, 2006. 8
- [64] Brandon S Kim, C Chang I Lee, Jared E Christensen, Thomas R Huser, James W Chan, and Alice F Tarantal. Growth, differentiation, and biochemical signatures of rhesus monkey mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*, 17(1):185–198, 2008. 8

-
- [65] Linda Harkness, Sergey M Novikov, Jonas Beermann, Sergey I Bozhevolnyi, and Moustapha Kassem. Identification of abnormal stem cells using Raman spectroscopy. *Stem cells and development*, 21(12):2152–2159, 2012. 8
- [66] Antonio Uccelli, Lorenzo Moretta, and Vito Pistoia. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews immunology*, 8(9):726, 2008. 10
- [67] Fiona Lyng, Ehsan Gazi, and Peter Gardner. Preparation of tissues and cells for infrared and Raman spectroscopy and imaging. *Biomedical applications of synchrotron infrared microspectroscopy: a practical approach. Royal Society of Chemistry, Cambridge*, pages 147–191, 2010. 8
- [68] Svitlana M Levchenko, Xiao Peng, Liwei Liu, and Junle Qu. The impact of cell fixation on CARS signal intensity in neuronal and glial cell lines. *Journal of biophotonics*, 12(1):203–218, 2019. 8, 47, 52
- [69] James W Chan, Douglas S Taylor, and Deanna L Thompson. The effect of cell fixation on the discrimination of normal and leukemia cells with laser tweezers Raman spectroscopy. *Biopolymers*, 91(2):132–139, 2009. 9, 52
- [70] Aidan D Meade, Colin Clarke, Florence Draux, Ganesh D Sockalingum, Michel Manfait, Fiona M Lyng, and Hugh J Byrne. Studies of chemical fixation effects in human cell lines using Raman microspectroscopy. *Analytical and ioanalytical chemistry*, 396(5):1781–1791, 2010. 10, 47, 52
- [71] Melissa M Mariani, Peter Lampen, Juergen Popp, Bayden R Wood, and Volker Deckert. Impact of fixation on in vitro cell culture lines monitored with Raman spectroscopy. *Analyst*, 134(6):1154–1161, 2009. 10, 11, 44, 52
- [72] Elizabeth A Hoffman, Brian L Frey, Lloyd M Smith, and David T Auble. Formaldehyde crosslinking: a tool for the study of chromatin complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 290(4):26404–26411, 2015. 11, 52
- [73] Masayuki Noguchi, J Shuichiroh Furuya, Tomoyo Takeuchi, and Setsuo Hirohashi. Modified formalin and methanol fixation methods for molecular biological and morphological analyses. *Pathology international*, 47(10):685–691, 1997. 11, 46
- [74] J Shaham, Y Bomstein, A Meltzer, Z Kaufman, E Palma, and J Ribak. DNA-protein crosslinks, a biomarker of exposure to formaldehyde—in vitro and in vivo studies. *Carcinogenesis*, 17(1):121–126, 1996. 11, 46

- [75] Giancarlo Fini. Applications of Raman spectroscopy to pharmacy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 35(5):335–337, 2004. 12
- [76] Bruno Lenain, Herve Lucas, Carsten Uerpmann, Kevin L Davis, Mary Ann Ehly, Mark S Kemper, and Ian R Lewis. Raman spectroscopy for process control in chemical and pharmaceutical manufacturing. *STP Pharma Techniques Pratiques Reglementations*, 17(3):171–174, 2007. 12
- [77] Piotr H Karpinski. Polymorphism of active pharmaceutical ingredients. *Chemical Engineering & Technology*, 29(2):233–237, 2006. 13
- [78] D Giron, M Mutz, and S Garnier. Solid-state of pharmaceutical compounds. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 77(2):709–747, 2004. 13
- [79] Jie Lu and Sohrab Rohani. Polymorphism and crystallization of active pharmaceutical ingredients (APIs). *Current medicinal chemistry*, 16(7):884–905, 2009. 13
- [80] Clare J Strachan, Sarah L Howell, Thomas Rades, and Keith C Gordon. A theoretical and spectroscopic study of carbamazepine polymorphs. *Journal of Raman Spectroscopy*, 35(5):401–408, 2004. 14
- [81] Adolf Smekal. Zur Quantentheorie der Dispersion. *Naturwissenschaften*, 11(43):873–875, 1923. 15
- [82] H. A. Kramers and W. Heisenberg. Uber die Streuung von Strahlung durch Atome. *Zeitschrift für Physik*, 31(1):681–708, 1925. 15
- [83] Kevin Buckley and Alan G Ryder. Applications of Raman spectroscopy in biopharmaceutical manufacturing: A short review. *Applied spectroscopy*, 71(6):1085–1116, 2017. 16
- [84] Derek A. Long. *Classical Theory of Rayleigh and Raman Scattering*. John Wiley & Sons, Ltd, 2002. 16
- [85] Hans Kuzmany. *Solid-state spectroscopy: an introduction*. Springer, 2009. 16
- [86] Richard Fisher Wallis and Minko Balkanski. *Many-body aspects of solid state spectroscopy*. North-Holland, 1986. 16, 19
- [87] Mirjana Grujić-Brojčin Zoran V. Popović Zorana D. Dohčević-Mitrović, Maja J. Šćepanović. *Optička svojstva nanomaterijala*. Akademska misao, Beograd, Srbija, 2012. 17, 20

- [88] GJ Puppels, JHF Olminkhof, Gezina MJ Segers-Nolten, Cornelis Otto, FFM De Mul, and Jan Greve. Laser irradiation and Raman spectroscopy of single living cells and chromosomes: sample degradation occurs with 514.5 nm but not with 660 nm laser light. *Experimental cell research*, 195(2):361–367, 1991. 25
- [89] Jolanta Kujawa, Ilya B Zavodnik, Alena Lapshina, Magdalena Labieniec, and Maria Bryszewska. Cell survival, DNA, and protein damage in B14 cells under low-intensity near-infrared (810 nm) laser irradiation. *Photomedicine and Laser Therapy*, 22(6):504–508, 2004. 25
- [90] Tamara M. Kukulj. *Uticaj LPS i IL-33 na adultne matične ćelije tkiva periodoncijuma: funkcijske promene i aktivirani molekularni mehanizmi*. PhD thesis, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, 2018. 25, 27
- [91] Antonio Nanci and Dieter D Bosshardt. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000*, 40(1):11–28, 2006. 27, 38
- [92] Takanori Iwata, Masayuki Yamato, Zheng Zhang, Shigeki Mukobata, Kaoru Washio, Tomohiro Ando, Jan Feijen, Teruo Okano, and Isao Ishikawa. Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use. *Journal of clinical periodontology*, 37(12):1088–1099, 2010. 27, 38
- [93] Drenka Trivanović, Aleksandra Jauković, Branka Popović, Jelena Krstić, Slavko Mojsilović, Ivana Okić-Djordjević, Tamara Kukulj, Hristina Obradović, Juan Francisco Santibanez, and Diana Bugarski. Mesenchymal stem cells of different origin: comparative evaluation of proliferative capacity, telomere length and pluripotency marker expression. *Life sciences*, 141:61–73, 2015. 27, 38
- [94] Wolfgang Wagner, Patrick Horn, Mirco Castoldi, Anke Diehlmann, Simone Bork, Rainer Saffrich, Vladimir Benes, Jonathon Blake, Stefan Pfister, Volker Eckstein, et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS one*, 3(5):e2213, 2008. 28
- [95] Yueh-Hsun Kevin Yang, Courtney R Ogando, Carmine Wang See, Tsui-Yun Chang, and Gilda A Barabino. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem cell research & therapy*, 9(1):131, 2018. 28

-
- [96] Taro Ichimura, Katsumasa Fujita Liang-da Chiu, Satoshi Kawata, Tomonobu M Watanabe, Toshio Yanagida, and Hideaki Fujita. Visualizing cell state transition using Raman spectroscopy. *PloS one*, 9(1):1–8, 2014. 32, 40
- [97] Franck Bonnier and HJ Byrne. Understanding the molecular information contained in principal component analysis of vibrational spectra of biological systems. *Analyst*, 137(2):322–332, 2012. 32
- [98] Ian Jolliffe. Principal component analysis. In *International encyclopedia of statistical science*, pages 1094–1096. Springer, 2011. 32
- [99] A Rygula, Katarzyna Majzner, Katarzyna M Marzec, Agnieszka Kaczor, Marta Pilarczyk, and M Baranska. Raman spectroscopy of proteins: a review. *Journal of Raman Spectroscopy*, 44(8):1061–1076, 2013. 36, 39, 45
- [100] K Czamara, K Majzner, MZ Pacia, K Kochan, A Kaczor, and M Baranska. Raman spectroscopy of lipids: a review. *Journal of Raman Spectroscopy*, 46(1):4–20, 2015. 36, 37, 39, 45
- [101] Kees Maquelin, C Kirschner, L-P Choo-Smith, Nicole van den Braak, H Ph Endtz, Dieter Naumann, and GJ Puppels. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *Journal of microbiological methods*, 51(3):255–271, 2002. 36, 39, 45
- [102] Graeme Clemens, James R Hands, Konrad M Dorling, and Matthew J Baker. Vibrational spectroscopic methods for cytology and cellular research. *Analyst*, 139(18):4411–4444, 2014. 36, 39, 45
- [103] Quinn Matthews, Andrew Jirasek, Julian Lum, Xiaobo Duan, and Alexandre G Brolo. Variability in raman spectra of single human tumor cells cultured in vitro: correlation with cell cycle and culture confluency. *Applied spectroscopy*, 64(8):871–887, 2010. 36, 39, 45
- [104] Zanyar Movasaghi, Shazza Rehman, and Ihtesham U Rehman. Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 42(5):493–541, 2007. 36, 39, 45
- [105] E Brauchle, S Noor, E Holtorf, C Garbe, K Schenke-Layland, and C Busch. Raman spectroscopy as an analytical tool for melanoma research. *Clinical and experimental dermatology*, 39(5):636–645, 2014. 36, 45

-
- [106] Gurjit S Mandair and Michael D Morris. Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength. *BoneKEy reports*, 4(1):1–8, 2015. 38, 39
- [107] Sonja Gamsjaeger, Klaus Klaushofer, and Eleftherios P Paschalis. Raman analysis of proteoglycans simultaneously in bone and cartilage. *Journal of Raman Spectroscopy*, 45(9):794–800, 2014. 38
- [108] Julianna Kobolak, Andras Dinnyes, Adnan Memic, Ali Khademhosseini, and Ali Mobasher. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods*, 99:62–68, 2016. 43
- [109] Ehsan Gazi, John Dwyer, Nicholas P Lockyer, J Miyan, Peter Gardner, C Hart, M Brown, and Noel W Clarke. Fixation protocols for subcellular imaging by synchrotron-based Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biopolymers*, 77(1):18–30, 2005. 46
- [110] Alison J Hobro and Nicholas I Smith. An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging. *Vibrational Spectroscopy*, 91:31–45, 2017. 47, 53
- [111] Abdullah Chandra Sekhar Talari, Zanyar Movasaghi, Shazza Rehman, and Ihtesham Ur Rehman. Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50(1):46–111, 2015. 50
- [112] Youmna Kfoury and David T Scadden. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell stem cell*, 16(3):239–253, 2015. 53
- [113] German L Perlovich, Sergey V Kurkov, Lars Kr Hansen, and Annette Bauer-Brandl. Thermodynamics of sublimation, crystal lattice energies, and crystal structures of racemates and enantiomers:(+)-and (±)-ibuprofen. *Journal of pharmaceutical sciences*, 93(3):654–666, 2004. 55
- [114] Emeline Dudognon, Florence Danède, Marc Descamps, and Natália T Correia. Evidence for a new crystalline phase of racemic ibuprofen. *Pharmaceutical research*, 25(12):2853–2858, 2008. 55
- [115] Alain Hédoux, Yannick Guinet, Patrick Derollez, Emeline Dudognon, and Natália T Correia. Raman spectroscopy of racemic ibuprofen: Evidence of molecular disorder in phase II. *International journal of pharmaceuticals*, 421(1):45–52, 2011. 55, 59, 62

-
- [116] N Shankland, CC Wilson, AJ Florence, and PJ Cox. Refinement of ibuprofen at 100K by single-crystal pulsed neutron diffraction. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 53(7):951–954, 1997. 55
- [117] Andrew A Freer, Jillian M Bunyan, Norman Shankland, and David B Sheen. Structure of (S)-(+)-ibuprofen. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 49(7):1378–1380, 1993. 55
- [118] Lars K Hansen, German L Perlovich, and Annette Bauer-Brandl. Redetermination and H-atom refinement of (S)-(+)-ibuprofen. *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online*, 59(9):1357–1358, 2003. 55
- [119] Kenneth Shankland, WIF David, T Csoka, and L McBride. Structure solution of ibuprofen from powder diffraction data by the application of a genetic algorithm combined with prior conformational analysis. *International Journal of Pharmaceutics*, 165(1):117–126, 1998. 55
- [120] Norman Shankland, Alastair J Florence, Philip J Cox, Chick C Wilson, and Kenneth Shankland. Conformational analysis of ibuprofen by crystallographic database searching and potential energy calculation. *International journal of pharmaceutics*, 165(1):107–116, 1998. 55
- [121] William G Fateley. *Infrared and Raman selection rules for molecular and lattice vibrations: the correlation method*. Krieger Pub Co, 1972. 56
- [122] Bernhard Schrader. *Infrared and Raman spectroscopy: methods and applications*. John Wiley & Sons, 2008. 58
- [123] Stefano Baroni, Stefano De Gironcoli, Andrea Dal Corso, and Paolo Giannozzi. Phonons and related crystal properties from density-functional perturbation theory. *Reviews of Modern Physics*, 73(2):515, 2001. 59
- [124] Paolo Giannozzi, Stefano Baroni, Nicola Bonini, Matteo Calandra, Roberto Car, Carlo Cavazzoni, Davide Ceresoli, Guido L Chiarotti, Matteo Cococcioni, Ismaila Dabo, et al. Quantum espresso: a modular and open-source software project for quantum simulations of materials. *Journal of physics: Condensed matter*, 21(39):395502, 2009. 59
- [125] Barbara Rossi, Paolo Verrocchio, Gabriele Viliani, Ines Mancini, Graziano Guella, Eveline Rigo, Giorgina Scarduelli, and Gino Mariotto. Vibrational

- properties of ibuprofen-cyclodextrin inclusion complexes investigated by Raman scattering and numerical simulation. *Journal of Raman Spectroscopy*, 40(4):453–458, 2009. 59
- [126] Alicia Jubert, María Leticia Legarto, Néstor E Massa, Leonor López Tévez, and Nora Beatriz Okulik. Vibrational and theoretical studies of non-steroidal anti-inflammatory drugs ibuprofen [2-(4-isobutylphenyl) propionic acid]; naproxen [6-methoxy- α -methyl-2-naphthalene acetic acid] and tolmetin acids [1-methyl-5-(4-methylbenzoyl)-1h-pyrrole-2-acetic acid]. *Journal of molecular structure*, 783(1-3):34–51, 2006. 59
- [127] ML Vueba, ME Pina, and LAE Batista De Carvalho. Conformational stability of ibuprofen: assessed by DFT calculations and optical vibrational spectroscopy. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(2):845–859, 2008. 59
- [128] Laban Bondesson, Kurt V Mikkelsen, Yi Luo, Per Garberg, and Hans Ågren. Hydrogen bonding effects on infrared and Raman spectra of drug molecules. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 66(2):213–224, 2007. 59
- [129] Giuseppe Filippini and Carlo Maria Gramaccioli. Lattice-dynamical calculations for tetracene and pentacene. *Chemical physics letters*, 104(1):50–53, 1984. 61
- [130] Raffaele Guido Della Valle, Elisabetta Venuti, Luca Farina, Aldo Brillante, Matteo Masino, and Alberto Girlando. Intramolecular and low-frequency intermolecular vibrations of pentacene polymorphs as a function of temperature. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(6):1822–1826, 2004. 61
- [131] N Lazarević, MM Radonjić, D Tanasković, Rongwei Hu, Cedomir Petrovic, and ZV Popović. Lattice dynamics of fcsb2. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 24(25):255402, 2012. 61
- [132] M Balkanski, RF Wallis, and E Haro. Anharmonic effects in light scattering due to optical phonons in silicon. *Physical Review B*, 28(4):1928, 1983. 62, 64
- [133] Zoran V. Popović. 63
- [134] N Lazarević, ZV Popović, Rongwei Hu, and C Petrovic. Evidence for electron-phonon interaction in $\text{Fe}_{1-x}\text{M}_x\text{Sb}_2$ (M= Co and Cr; $0 \leq x \leq 0.5$) single crystals. *Physical Review B*, 81(14):144302, 2010. 64

- [135] Paras N Prasad and Raoul Kopelman. External, internal and semi-internal vibrations in molecular solids: spectroscopic criteria for identification. *Chemical Physics Letters*, 21(3):505–510, 1973. 64
- [136] R Zallen and ML Slade. Influence of pressure and temperature on phonons in molecular chalcogenides: crystalline As_4S_4 and S_4N_4 . *Physical Review B*, 18(10):5775, 1978. 64

Списак научних публикација

- [1] **J. J. Lazarević**, S Uskoković-Marković, M Jelikić-Stankov, M Radonjić, D Tanasković, N Lazarević, ZV Popović, *Intermolecular and low-frequency intramolecular Raman scattering study of racemic ibuprofen*, SPECTROCHIM ACTA A, 126, 301–305 (2014).
- [2] **Jasmina J. Lazarević**, Tamara Kukolj, Diana Bugarski, Nenad Lazarević, Branko Bugarski, and Zoran V. Popović, *Probing primary mesenchymal stem cells differentiation status by micro-Raman spectroscopy*, SPECTROCHIM ACTA A, 213, 384–390 (2019).
- [3] **Jasmina J. Lazarević**, Uroš Ralević, Tamara Kukolj, Diana Bugarski, Nenad Lazarević, Branko Bugarski, and Zoran V. Popović, *Influence of chemical fixation process on primary mesenchymal stem cells evidenced by Raman spectroscopy*, SPECTROCHIM ACTA A, 216, 173–178 (2019).

Биографија

Јасмина Лазаревић је рођена 05.10.1985. године у Београду. Основну школу и гимназију завршила је у Зрењанину, као носилац Вукове дипломе. Школске 2004/2005. године уписала је основне академске студије на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду, смер дипломирани фармацеут. Дипломирала је у априлу 2011. године са радом под називом „Примена раманске спектроскопије у фармацији“, са просечном оценом 8,26. Након обавезног једногодишњег приправничког стажа (Апотека Београд, апотека специјалне болнице за плућне болести Др Васа Савић, Зрењанин) и положеног стручног испита, школске 2012/13. године запослена је као сарадник у настави на Катедри за аналитичку хемију Фармацеутског факултета Универзитета у Београду. Докторске академске студије уписала је на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду школске 2013/2014. године, студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија. Положила је све испите предвиђене планом и програмом са просечном оценом 10,00. Као истраживач сарадник ангажована је на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја ИИИ 46010 „Развој нових инкапсулационих ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“ од децембра 2013. године у Иновационом центру ТМФ-а. Ангажовање у оквиру истог пројекта настављено је 1. маја 2018. године у Институту за физику Универзитета у Београду. Област научно-истраживачког рада Јасмине Лазаревић је примена оптичке спектроскопије, посебно Раманове спектроскопије, у анализи фармаколошки активних супстанци и биолошких/биотехнолошких узорака.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јасмина Ј. Лазаревић

Број индекса 4001/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Раманова спектроскопија фармаколошки активних супстанци и биокатализатора

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 16.12.2019.

Јасмина Лазаревић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јасмина Ј. Лазаревић

Број индекса 4001/2013

Студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада Раманова спектроскопија фармаколошки активних супстанци и биокатализатора

Ментор проф. др Бранко Бугарски

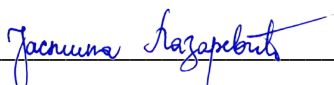
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 16.12.2019.



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Раманова спектроскопија фармаколошки активних једињења и биокатализатора

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

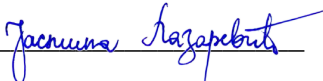
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 16.12.2019.

Потпис аутора



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.