Rezumatul tezei de doctorat

Spectroscopia Raman aplicată în studiul sistemelor biologice

Student doctorand: Alexandra Falamaş

Coordonator ştiinţific: Prof. Dr. Vasile Chiş

Facultatea de Fizică, Universitatea Babeş-Bolyai
Cluj-Napoca
2012

Contents

1 Introducere **1**

2 Caracterizarea vibrațională a unor compuși farmacologici naturali **3**
2.1 Introducere . . . 3
2.2 Rezultate și discuții . . . 4
2.2.1 Investigații FT-Raman ale scoarței de mesteacăn și ale extractelor naturale be bază de scoarță . . . 4
2.2.2 Caracterizarea vibrațională a betulinului . . . 5
2.2.3 Investigații spectroscopice ale compușilor de incluziune pe bază de substanțe active extrase din scoarța de mesteacăn . . . 8
2.3 Concluzii . . . 11

3 Caracterizarea vibrațională a dacarbazinei, medicament anti-canceros **12**
3.1 Introducere . . . 12
3.2 Rezultate și discuții . . . 12
3.2.1 Optimizarea geometriei . . . 12
3.2.2 Spectrele Raman ale dacarbazinei la diferite pH-uri . . . 12
3.2.3 Spectrele SERS ale dacarbazinei la difereite pH-uri . . . 13
3.3 Concluzii . . . 15

4 Spectroscopiile Raman și SERS aplicate în studiul unor țesuturi de piele de șoarece **17**
4.1 Introducere . . . 17
4.2 Rezultate și discuții . . . 18
4.2.1 Caracterizarea Raman *in vivo* a pielii de șoarece . . . 18
4.2.2 Monitorizarea SERS a țesuturilor de piele de șoarece . . . 21
4.3 Concluzii . . . 24

5 Microspectroscopia Raman aplicată pentru studiul celulelor stem **26**
5.1 Introducere . . . 26
5.2 Rezultate și discuții . . . 27
5.2.1 Microspectroscopia Raman și imunofluorescența celulelor . . . 27
5.2.2 Identificarea acizilor nucleici, biomarkeri Raman caracterisyici procesului de diferențiere 27
5.3 Concluzii . . . 32

6 Concluzii **33**
6.1 Concluzii . . . 33
6.2 Perspective de viitor . . . 35

Bibliografie **36**

Keywords: spectroscopia Raman, compuși naturali, melanom, celule stem

Chapter 1

Introducere

Această teză prezintă aplicații practice ale spectroscopiei Raman (RS) în domeniul medical și farmaceutic. În primul rand, RS este aplicată pentru studiul unor entități chimice cu proprietăți farmaceutice promițătoare pentru tratamentul unor boli de piele. Astfel, principalii compuși extrași din scoarța de mesteacăn, precum și compușii rezultați din încapsularea acestora cu scopul de îmbunatățire a solubilității lor, sunt identificați și caracterizați din punct de vedere spectroscopic. Mai mult, dacarbazina un medicament anti-canceros utilizat in special pentru tratmentul cancerului de piele, este analizată din punct de vedere spectroscpic. Aplicatiile bio-medicale ale spectroscopiei Raman urmărite in această teză se desfășoară pe două direcții. Pe de o parte sunt prezentate investigații Raman și SERS *in vivo* ale pielii de șoarece cu scopul de a caracteriza patologia țesuturilor și de a monitoriza tratamentul medicamentos aplicat la nivelul pielii. Spectroscopia Raman de amplificare la suprafața (SERS) a fost aplicată cu scopul de intensifica semnalul slab provenit de la țesuturi biologice prin utilizarea nanostructurilor de Ag. Pe de altă parte, microspectroscopia Raman este aplicată pentru studiul procesului de diferențiere al celulelor stem embrionare. Principalul scop al acestei aplicații a fost caracterizarea neinvazivă a celulelor stem umane embrioanre (hESCs) și a celulelor fibroblaste diferențiate din hESCs și identificarea și monitorizarea distribuției intracelulare a unor biomarkeri specifici procesului de diferențiere.

Primul capitol al tezei prezintă o privire de ansamblu al fundalului cercetarilor biologice și al stadiului curent al tehnologiilor utilizate în domeniile farmaceutice și bio-medicale, cu accent pe spectroscopia Raman. Capitolul doi pune bazele teoretice ale tehnicilor utilizate în această teză, explicând în detaliu teoria împrăștierii Raman precum și tehnicile Raman utilizate în aplicații bio-medicale. De asemenea sunt introduse spectroscopia Raman de amplificare la suprafață, spectroscopia infraroșu, vizibil și ultraviolet, precum și metodele chimice computaționale.

Capitolul trei prezintă studiile spectroscopice vibraționale ale compușilor naturali extrași din scoarța de mesteacan. Datorită incidenței crescute a diferitelor tipuri de cancer, nevoia de metode analitice pentru identificarea medicamentelor cu proprietăți anti-canceroase este extrem de crescută. Astfel, metode spectroscopice vibraționale și metode computaționale au fost aplicate aici pentru investigarea unor produse naturale, posibili candidați anti-cancerosi.

Capitolul patru continuă aplicațiile farmaceutice prezentând investigațiile unui medicament chemoterapeutic, dacarbazina, utilizat în momentul de față in tratamentul melanomului. Studiile de pH prezentate aici au avut ca scop identificarea speciilor moleculare ale dacarbazinei sensibile la modificarea condițiilor mediului înconjurator.

Melanomul este un cancer de piele extrem de agresiv, care însă ar putea fi vindecat dacă ar fi identificat în stadiul incipient. Studiile prezentate in capitolul cinci al acestei teze au ca scop implementarea spectroscopiei vibraționale pentru caracterizarea și diagnosticarea *in vivo* a țesuturilor de piele de șoarece de diferite patologii: sănătoase, de melanom, sau tratate cu compuși naturali pe bază de mesteacan. Datorită semnalului Raman slab al țesuturilor biologice, potențialul spectroscopiei Raman de amplificare la suprafață a fost investigat în aplicații bio-medicale. Astfel, capitolul cinci prezintă în continuare o caracterizare SERS a țesuturilor de piele de șoarece precum și rezultatele preliminare ale dezvoltării de

senzori optici pe bază de nanostructuri marcate cu cresil violet.

Capitolul șase descrie studii microspectroscopice Raman bazate pe identificarea si monitorizarea intracelulară a distribuției markerilor biomoleculari specfici procesului de diferențiere a celulelor stem embrionare umane în celule fibroblaste. Nevoia curentă de metode neinvazive pentru caracterizarea procesului de diferențiere în celule stem poate fi intâmpinată de spectroscopia Raman datorită potentialului său de a examina într-un mod nedistructiv și rapid conținutul biochimic al celulelor. Astfel, acizii nucleici au fost identificați drept biomarkeri Raman caracteristici procesului de diferențiere și distribuția lor intracelulară a fost observată. Studii de fluorescența sunt prezentate adiacent pentru a susține aceste rezultate și pentru a oferi informații suplimentare.

Concluziile sunt rezumate in capitolul șapte, unde sunt punctate și viitoare posibile direcții de cercetare.

Chapter 2

Caracterizarea vibrațională a unor compuși farmacologici naturali

2.1 Introducere

În cadrul medicinei moderne, compușii naturali au dovedit a fi o sursă extrem de importantă de compuși bioactivi utilizați în diferite domenii terapeutice. Câteva din activitățile lor bio-medicale sunt anti-infecțioase (penicilina, chinina), imunologice, sau anti-canceroase [1,2]. Coaja de mesteacăn a fost subiectul de respect și admirație de-a lungul preistoriei și istoriei, precum și obiectul de cercetare științifică în lumea modernă [3]. Coaja exterioară a arborelui de mesteacăn este bogată în componente pentaciclice triterpene, cum ar fi betulinul, acidul betulinic, aldehida betulinică, lupeol, precum și alte componente minore [4]. În ciuda unor dezavantaje care pot inhiba candidaturile lor ca medicamente viitoare, cum ar fi solubilitate scazută în apă sau greutate moleculara mare, acidul betulinic este cercetat pentru potențiale studii clinice în cadrul Institutului Național de Cancer (NCI) [5]. Betulin (lup-20(29)-ene-3β,28-diol) se găsește în straturile exterioare ale scoarței de mesteacăn și este responsabil pentru culoarea albă a acesteia. Studii anterioare au identificat un domeniu larg de proprietăți biologice anti-canceroase, anti-bacteriene, anti-inflamatorii, activități anti-fungice, anti-virale [6–8]. Funcțiile betulinului sunt legate de structura sa și modificări la pozițiile C3 sau C28 ale grupărilor hidroxil, sau C20 ale grupului alchenic pot crește sau scădea proprietățile sale medicinale [6,8].

Activitățile biologice promițătoare ale triterpenelor precum și cercetările ample pe acest subiect, ne-au condus spre a iniția un proiect de cercetare (`http://phys.ubbcluj.ro/cercetare/granturi/pinzaru/english/index_en.htm`) bazat pe caracterizarea spectroscopică a compusilor pe bază de extracte naturale din scoarța de mesteacan, cu scopul de a le aplica în tratamentele pielii de șoarece. Procesul descoperirii de medicamente din plante este un proces complex care implică mai multe etape, cum ar fi colectarea plantelor, pregătirea extractelor din plante, bio-analiza cantitativa a extractelor, precum și elucidarea structurii componentelor active și izolarea lor, urmată de studii de toxicitate și de livrare. Extrase naturale au fost obținute din coaja de mesteacan colectată din păduri din România și investigațiile spectroscopice au fost efectuate cu scopul de a caracteriza și identifica componentele principale. Astfel sunt stabilite primele două ipoteze ale acestui studiu: principalele componente din coaja de mesteacan și extractele naturale pot fi identificate cu ajutorul spectroscopiei FT-Raman și o caracterizare vibrațională completă a ingredientelor active principale din coaja de mesteacăn poate fi efectuată pe baza datelor experimentale și teoretice.

În încercarea de a prepara unguente și alți compuși farmaceutici bazați pe triterpene, principala dificultate întâlnită a fost solubilitatea lor redusă. Literatura recentă de specialitate sugerează utilizarea ciclodextrinelor (CD-uri) pentru creșterea solubilității acestor compuși (Fig. 2.1) [9–11]. Complexarea cu ciclodextrine conduce la creșterea solubilizării compușilor incluși în acestea, la o absorbție mai rapidă (timpul între administrarea și debutul efectului biologic va fi mai scurt) [12]. Nanoemulsiile (NE) sunt dis-

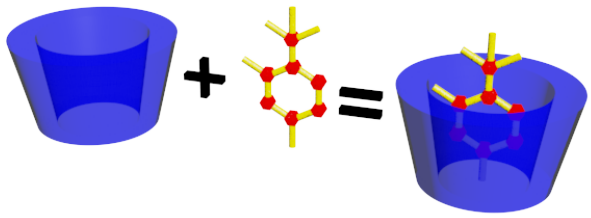


Figure 2.1: Reprezentare schematică a încapsulării moleculare în ciclodextrine.

persii de ulei și apă stabilizată de o picatură de film interfacială cu dimensiuni mai mici de 500 nm [13,14], care pot include medicamente, cu scopul de a le crește solubilitatea . Aici, nanoemulsii bazate pe betulin au fost pregătite și investigate în asociere cu Departamentul de Toxicologie de la Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicina și Farmacie din Timișoara, România și Departamentul de Științe Farmaceutice de la Universitatea Northeastern din Boston, Massachusetts, Statele Unite ale Americii. Pe lângă caracterizarea prezentată în acest capitol, nanoemulsiile au fost în continuare utilizate în tratamentele pielii și efectele au fost investigate cu ajutorul microspectroscopiei Raman (a se vedea secțiunea 4.2.1). Astfel a treia ipoteza și ultima a acestui studiu este de a furniza o caracterizare vibrațională a compușilor rezultați în urma metodelor propuse pentru creșterea solubilității triterpenele pentaciclice obținute din scoarța de mesteacăn.

2.2 Rezultate și discuții

2.2.1 Investigații FT-Raman ale scoarței de mesteacăn și ale extractelor naturale be bază de scoarță

Extractele naturale

Șase eșantioane de extracte naturale au fost obținute din partea exterioară a scoarței de mesteacăn recoltată din Munții Aninei (regiunea Banat, sud-vestul României). Spectrele FT-Raman au fost înregistrate de la fiecare proba și sunt prezentate în Fig. 2.2. Semnalul de intensitate cea mai mare prezentând benzi Raman bine rezolvate a fost inregistrat de la precipitate, două dintre probele obținute ce indică o soluție cremoasă (spectrele a și b in Fig. 2.2).

Principalele triterpene

Pentru a identifica și diferenția între componentele găsite în extracte naturale au fost înregistrate spectrele FT-Raman ale triterpenelor principale cunoscute găsite în coaja exterioara a arborelui de mesteacan și acestea sunt prezentate în Fig. 2.3 în comparație cu un spectru FT-Raman al unui extract natural. Caracteristici Raman corespunzatoare grupurilor structurale-funcționale ale fiecareia dintre triterpenele pentaciclice principale au fost identificate. Caracterizarea vibrationala a benzilor Raman active indică faptul că betulinul este principala triterpenă identificată în extractele naturale, deși alți compuși in cantități mai mici pot fi prezenți. În urma identificarii componentei principale din extractele naturale, o caracterizare spectroscopică a coajei de mesteacăn a fost urmarită. Scopul acestui studiu a fost de a

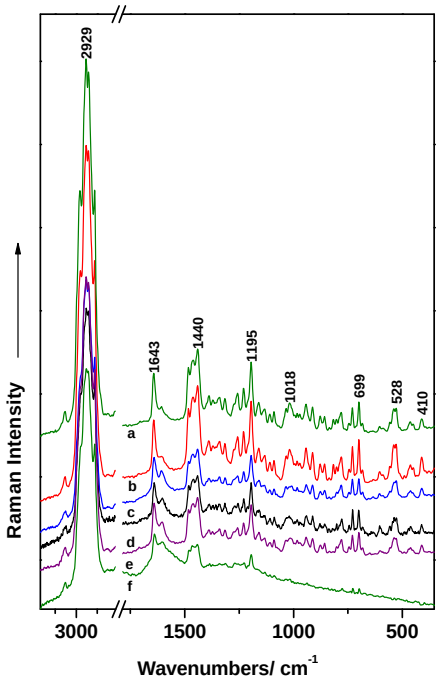


Figure 2.2: Spectrele FT-Raman ale extractelor naturale.

investiga compoziția coajei de mesteacan. Fig. 2.3 prezintă spectrul FT-Raman al coajei de mesteacan (spectrul g), în comparație cu spectrele FT-Raman ale triterpenelor principale și al unui extract natural. Benzile Raman caracteristice tuturor triterpenelor analizate anterior au fost identificate în coaja de mesteacan printre alte impurități. Aceste rezultate arată cu succes selectivitatea uimitoare a tehnicii FT-Raman pentru identificarea speciilor active din sursa lor naturală.

2.2.2 Caracterizarea vibrațională a betulinului

Având în vedere că rezultatele anterioare au identificat betulinul ca principalul compus din coaja exterioară a arborelui de mesteacăn, obiectivul urmator al acestui studiu este de a oferi o caracterizare vibrationala completă a acestui compus. Investigarea a fost realizată prin angajarea tehnicilor spectroscopice FT-Raman și FT-IR, precum și a calculelor cuantice DFT.

Optimizarea geometriei

Geometria optimizată a betulinului obținuta la nivelul de teorie B3LYP/6-31 G(d) este prezentată în Fig. 2.4. Betulin ($C_{30}H_{50}O_2$) este o triterpenă cuprinzând patru inele de șase membri și un inel din cinci membri. Este important a se observa și gruparea hidroxil primară din poziția C28, gruparea hidroxil secundară din poziția C14 și fracțiunea alchenică din poziția C75.

Analiza spectrelor vibraționale

Spectrele experimentale și teoretice FT-IR și FT-Raman ale betulin sunt prezentate în Fig. 2.5. Numerele de undă calculate, intensitățile lor IR și activitățile Raman au fost folosite pentru a identifica modurile de vibrație ale betulinului în mod explicit. Benzile FT-IR și FT-Raman principale, numerele de undă

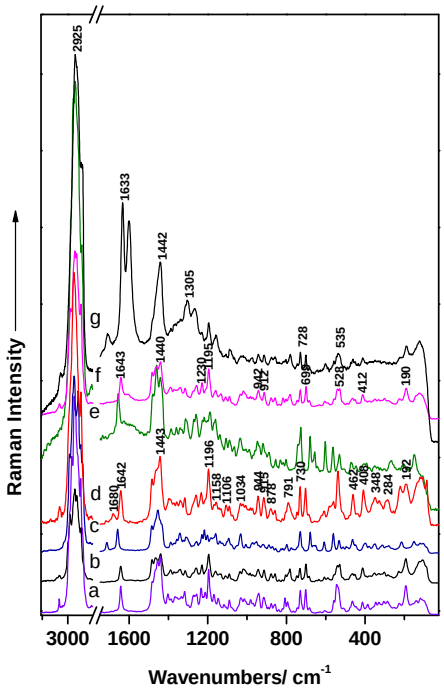


Figure 2.3: Spectrele FT-Raman caracteristice (a) lupeolului, (b) betulinului, (c) acidului ursolic, (d) acidului betulinic, (e) acidului oleanolic, (f) extractului natural și (g) scoarței de mesteacăn.

calculate, precum și atribuirile vibraționale ale modurilor fundamentale ale betulinului sunt prezentate în tabelul 2.1.

Benzile dominante observate în spectrul FT-IR sunt evaluate la 1643, 1450, 1373, 1006, 876 cm^{-1}. Banda de la 1643 cm^{-1} este atribuită unei contribuții complexe a vibrațiilor de întindere C = C și vibrațiilor de deformare CH_2 în grupul metil terminal. Majoritatea benzilor din această zonă spectrală sunt alocate vibrațiilor de legănare și deformare a grupărilor OH, CH, CH_2 si CH_3, precum și modurilor de îndoire scheletice (Tabelul 2.1). Banda de la 1450 cm^{-1} este atribuită vibrațiilor de deformare ale grupurilor CH_3 și CH_2, banda de la 1373 cm^{-1} este atribuită modului umbrelă a grupărilor CH_3. Benzile localizate la 1006 și 984 cm^{-1} corespund în principal vibrațiilor de întindere, legănare, și deformare ale grupului CH_2CH_3. Banda intensă de la 876 cm^{-1} este atribuită vibrațiilor de bătaie ale grupării CH_2 din fracțiunea alchenică.

În regiunea numerelor de undă mari, o bandă complexă centrată la 2927 cm^{-1} a fost observată, în timp ce în regiunea amprentă a spectrului FT-Raman, benzi complexe au fost observate la 1643, 1484, 1464, 1440, 1195, 701, 530, 411, ?i 191 cm^{-1}. Grupul de benzi intense observate la 1484, 1464, și 1440 cm^{-1} este atribuit vibrațiilor de deformare ale grupărilor CH_2 și CH_3. Banda observată la 1195 cm^{-1} apare datorită vibrațiilor de deformare OH și de răsucire CH_2. Banda intensă 701 cm^{-1} este atribuită vibrațiilor de torsiune din gruparea alchenică terminală. Banda intensă observată la 411 cm^{-1} apare datorită vibrațiilor de balansare ale grupării CH_2OH și vibrațiilor de bătaie C-C și CH_2 și CH_3.

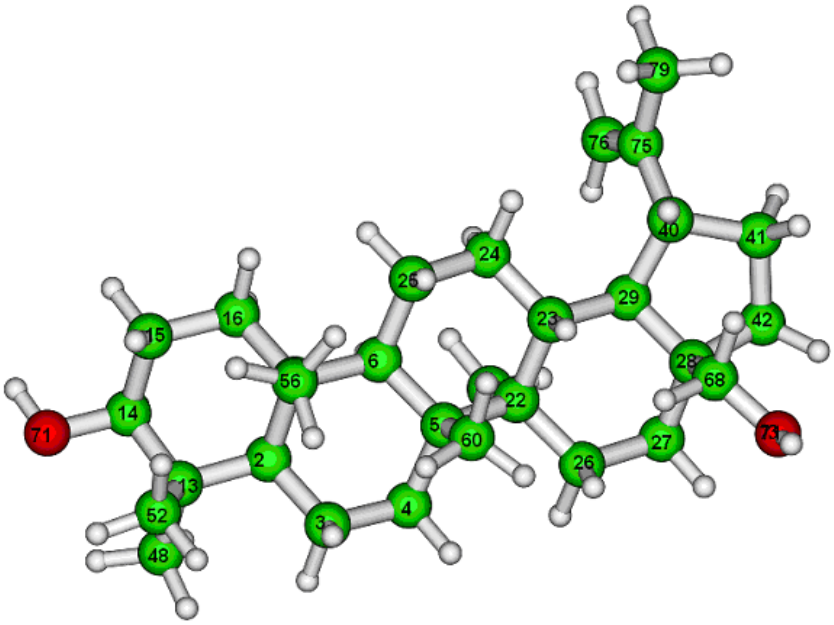


Figure 2.4: Geometria optimizată a moleculei de betulin la nivelul teoretic B3LYP/6-31 G(d).

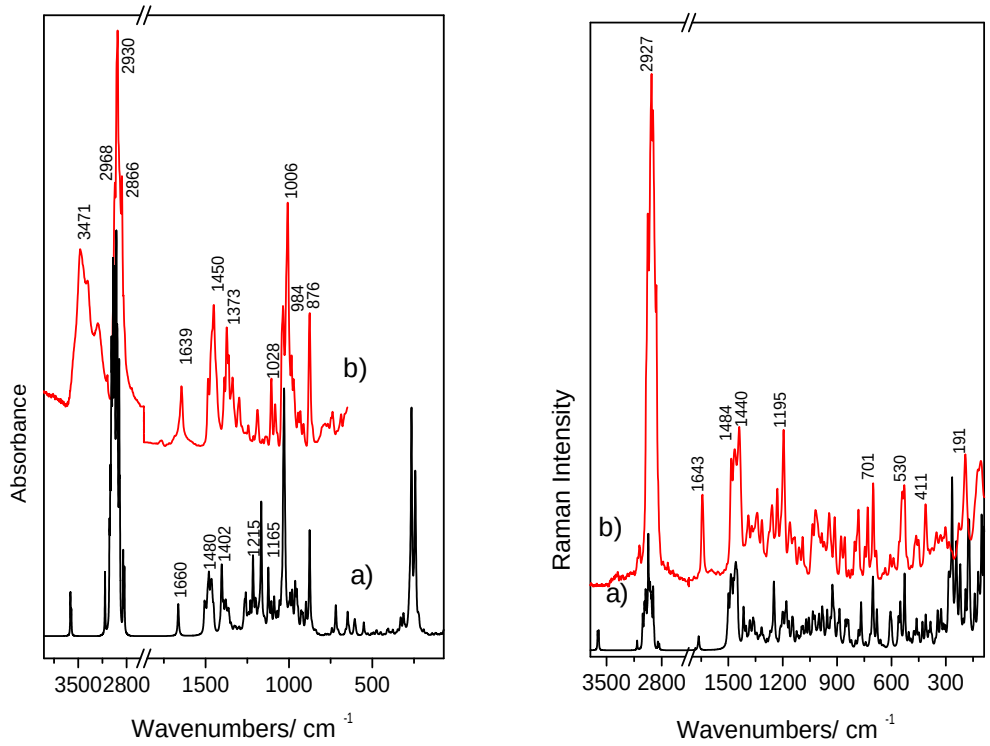


Figure 2.5: Spectrele FT-IR (stânga) și FT-Raman (dreapta) teoretice (a) și experimentale (b) ale betulinului.

Table 2.1: Numerele de undă calculate la nivelul teoretic B3LYP/6-31G(d), măsurate IR și Raman, și atribuirea lor vibrațională

Nr	Numere de undă			
	Teoretice	Experimentale		Atribuirea vibrațională
	ν scalate (cm^{-1})	IR	Raman	
4	191.64		228 sh	$\tau(CH_3) + \rho(CH_2OH)$
11	411.47		411 s	$\omega(CH_3) + \omega(CH_2) + \rho(CH_2) + \rho(CH_2OH)$
17	526.75		530 s	$\rho(CH_2) + \delta$(C–C)
25	701.91		701 s	τ(H77–C76–H78)
53	1179.36		1195 s	$\delta(OH) + \tau(CH_2)$
69	1458.5		1440 s	$\delta(CH_3)R1 + \delta(CH_2)R1, R2, R4.R5$
72	1485.39		1464 s	$\delta(CH_3) + \delta$(H17–C15–H18) $+ \delta(CH_2)R3$
73	1499.06	1485 sh	1484 s	$\delta(CH_3)R1, R2, R3 + \delta(CH_2)R1, R3$
74	1663.73	1639 m	1645 s	$\delta(CH_2) + \nu$(C=C) alkene $+ \delta$(CH)R5
80	2970.29		2927 vvs	$\nu(CH_3)R2, R3, R4 + \nu_{as}(CH_2)R1, R3$
87		3362 s	3358 vw	ν(O71–H72)
88	3612.62	3465 s	3437 vvw	ν(O73–H74)

Abreviații: δ - deformare, ν - întindere, ω - bătaie, τ - răsucire, ρ - legănare, vw - foarte slab, w - slab, m - mediu, s - intens, vs - foarte intens, sh- umăr.

2.2.3 Investigații spectroscopice ale compușilor de incluziune pe bază de substanțe active extrase din scoarța de mesteacăn

Studii experimentale și teoretice ale complecșilor de incluziune betulin-ciclodextrine

Datorită activităților biomedicale ale betulinului [6,15,16], o atenție deosebită a fost acordată posibilității de a crea produse farmaceutice pe bază de betulin. Cu toate acestea, solubilitatea scăzută a moleculei împiedică formularea, astfel metode de creștere a solubilității trebuie abordate. Două metode diferite de încapsulare sunt prezentate aici, iar produsele rezultate sunt investigate folosind tehnici spectroscopice experimentale și teoretice.

Prima metoda propune includerea substanței active în ciclodextrine, molecule capabile de a incorpora agenți străini în cavitățile lor [11, 17]. Complexul de incluziune astfel creat ar trebui sa îmbunătățească solubilitatea și biodisponibilitatea substanței active [18]. Ciclodextrinele utilizate în acest studiu sunt hidroxil-propil-gamma-ciclodextrine (HPGCD). Complecșii de incluziune au fost formulați în raport molecular de 1:1 și 1:2 pe bază de betulin și acid betulinic pe de o parte, și ciclodextrine pe de alta parte. Cu scopul de a investiga relația structură-funcție între betulin și HPGCD, moleculele au fost supuse unor calcule teoretice. În primul rând, un calcul de optimizare pe moleculele separate, urmate de calcule pe complexul de incluziune 1:1 au fost realizate la nivelul de teorie AM1. Geometriile optimizate ale betulinului și HPGCD precum și ale complexului de incluziune sunt prezentate în Fig. 2.6.

Molecula de ciclodextrină constă din opt unități de glucoză. După optimizarea geometriilor moleculelor separate, molecula de betulin a fost plasată în interiorul cavității ciclodextrinei și o optimizare a fost efectuată pe acest complex. Pentru a elucida modul în care cele doua molecule interacționează, complexul de incluziune și moleculele separate, au fost în continuare supuse unui calcul de frecvența, precum și unor studii spectroscopice FT-Raman.

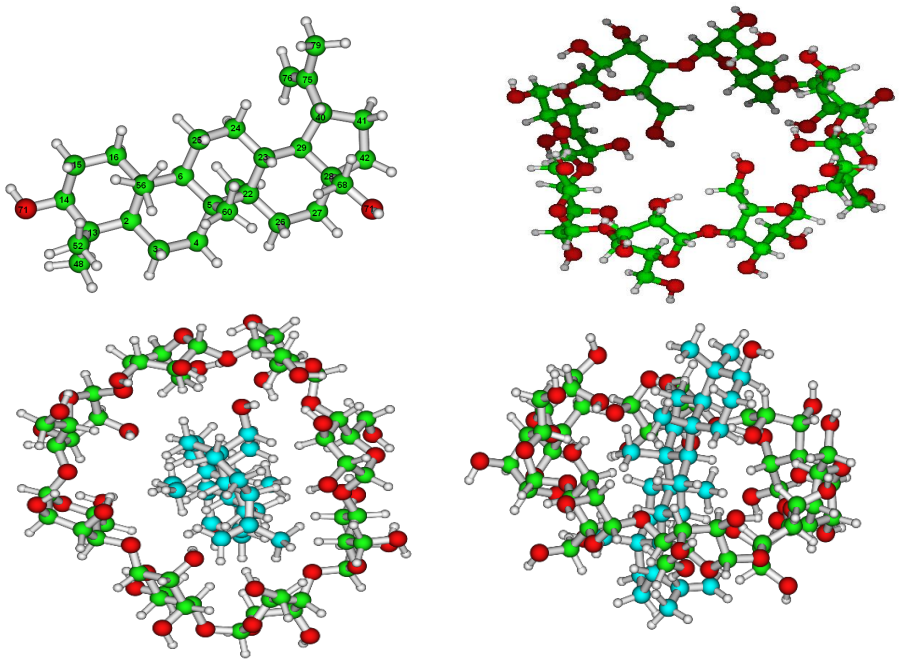


Figure 2.6: Geometriile optimizate AM1 ale betulinului (stânga sus), gamma-ciclodextrină (dreapta sus) și produsului incluziune 1:1 a celor două molecule văzut din două perspective diferite (jos).

Complexul de incluziune betulin-ciclodextrină

Capacitatea tehnicii FT-Raman de a identifica fiecare dintre compușii prezenți într-un amestec a fost examinată in acest studiu. Fig. 2.7 prezintă spectrele FT-Raman ale betulinului, complecșilor de incluziune 1:1 și 1:2, HPGCD, și spectrul teoretic AM1 al compusului de incluziune 1:1 prezentat in Fig. 2.6. La o primă privire, spectrele Raman ale complecșilor de incluziune prezintă principalele caracteristici ale ciclodextrinei, precum și unele contribuții suplimentare care pot fi atribuite speciei oaspete.

Spectrul FT-Raman al complexului de incluziune 1:1 se aseamană cu suma spectrelor individuale ale moleculelor oaspete (betulin) și gazdă (ciclodextrina). Mai mult decât atât, se poate observa lipsa benzilor caracteristice ciclodextrinei în urmatoarele intervale spectrale: 150–200, 400–50, 700–50, 1190–1250, și 140–1500, și 1645 cm^{-1}. Pentru a examina modificările cauzate de interacțiunea celor doua specii, o analiză suplimentară a acestor regiuni spectrale a fost realizată.

Analiza vibrațională sugereaza existența unei interacțiuni slabe intre betulin și ciclodextrină. Lărgirea, scădearea în intensitate, și deplasarea numerelor de undă ale modurilor de vibrație caracteristice betulinului observate în spectrele FT-Raman ale complexului de incluziune confirmă interacțiunea celor două specii. Spectrul complexului de incluziune 1:1 prezintă lărgirea benzilor de la 1229, 1195, și 192 cm^{-1}, banda de la 1229 cm^{-1} prezentând cea mai mare creștere a semilărgimii la jumătatea înălțimii. Atât banda de la 1195 cât și 1229 cm−1 sunt atribuite vibrațiilor de deformare CH și OH în ambele grupări hidroxil ale betulinului. Spectrul AM1 calculat al complexului de incluziune 1:1 prezintă cea mai intensă bandă la 1177 cm^{-1} și este atribuită vibrațiilor de deformare CH și de intindere OH ale grupării hidroxil din poziția C28 a betulinului și vibrațiilor de deformare OH ale ciclodextrinei. Aceste rezultate sugerează formarea de legături de hidrogen intre grupul CH_2OH al betulinului și cavitatea HPGCD în cazul complexului de incluziune 1:1. În cazul complexului de incluziune 1:2, banda de la 1645 cm^{-1} atribuită vibrațiilor de deformare CH_2 și de întindere C=C din grupul terminal alchenic al moleculei de betulin, o lărgire a semilărgimii la jumatatea înălțimii de la 11.42 (pur betulin) la 14.02 cm^{-1} și o scădere în intensitate poate fi observată. Creșterea lărgimi benzii sugerează scăderea timpului de relaxare vibrațională și confirmă formarea complexului de incluziune [19]. Această observație sugerează formarea complexului de incluziune

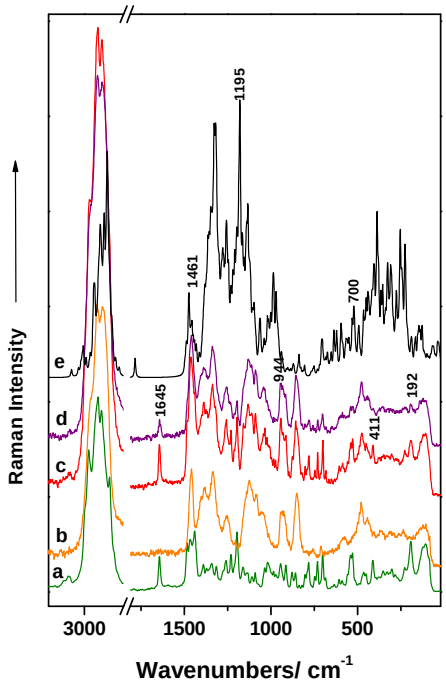


Figure 2.7: Spectrele FT-Raman ale betulinului (a), HPGCD (b), complexul de incluziune 1:1 (c) și 1:2 (d), și spectrul Raman teoretic al complexului de incluziune 1:1 (e).

prin interacțiuni între grupul CH_2 din terminalul alchenic al betulinului și cavitatea ciclodextrinei.

Formularea nanoemulsiei și caracterizarea FT-Raman

A doua metodă de încapsulare propusă pentru creșterea solubilității betulinului este formularea sa în nanoemulsii de ulei [13]. Imaginile de microscopie electronică de transmisie (TEM) arată că nanoemulsia rezultată este compusă din picături sferice cu distribuție uniformă (Fig. 2.8 stânga). Diametrul mediu al picaturilor nanoemulsiei este de 200 nm, în timp ce valorile potențialului zeta sunt în intervalul -23 mV (pentru nanoemulsia de betulin) la -40 mV (pentru nanoemulsia martor). Scăderea sarcinii în cazul nanoemulsiei de betulin se poate datora unor partiții de betulin la interfață sau în faza apoasă. Cu toate acestea, nanoemulsiile sunt de obicei stabile la această valoare și nu floculează [20, 21]. Măsurătorile au indicat ca eficiența de încapsulare a fost de $\simeq$90%.

Pentru o caracterizare completă a nanoemulsiei martor și a nanomeulsiei de betulin, spectroscopia FT-Raman a fost de asemenea utilizată. Scopul acestui studiu a fost de a proba capacitatea spectroscopiei Raman pentru evidențierea caracteristicilor spectrale ale nanoemulsiilor, precum și în identificarea betulinului, specia activă in acest caz. Fig. 2.8 prezintă spectrele FT-Raman ale betulinului (a), în comparație cu cel al nanoemulsiilor (b și c). Semnalul FT-Raman al ambelor nanoemulsii este dominat de benzile Raman caracteristice uleiului din semințe de in (nu sunt prezentate aici). Suprapunerea benzilor Raman ale nanoemulsiei cu cele caracteristice betulinului împiedica monitorizarea acestuia în nanoemulsie folosind spectroscopia Raman convențională. Singurele diferențe între spectrele Raman ale celor două emulsii este ușoara deplasare spre numere de undă mai mici ale unor benzi caracteristice nanoemulsiei de betulin (447, 1745 și 3216 cm^{-1}), în comparație cu cele corespunzătoare nanemulsiei martor. Având în vedere rezultatul eficienței încapsulării betulinului în picăturile de ulei, precum și nefericita suprapunere a benzilor caracteristice betulinului cu cele ale uleiului din semințe de in, putem concluziona că tehnica FT-Raman nu a putut fi folosită pentru monitorizarea speciei active din nanoemulsii. Cu toate acestea,

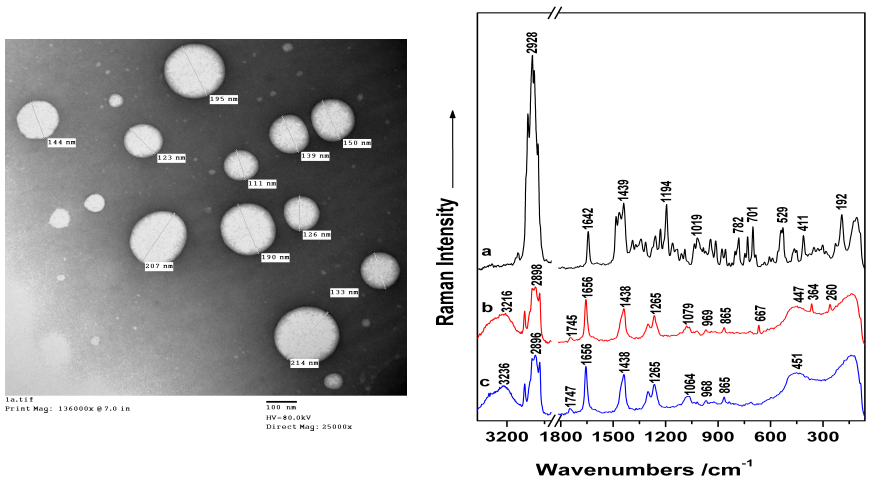


Figure 2.8: (stânga) Analiza de microscopie electronică de transmisie a nanoemulsiei de betulin (dreapta) și spectrul FT-Raman al betulinului (a) în comparație cu cel al nanomeulsiei de betulin (b) și al nanoemulsiei martor (c).

o caracterizare vibrațională a fost posibilă, tehnica FT-Raman evidențiind astfel faza de ulei a emulsiei.

2.3 Concluzii

Acest studiu prezintă investigațiile spectroscopice ale unor compuși naturali prezenți în coaja de mesteacăn, cu scopul de a identifica și caracteriza principalele ingrediente active. Această anchetă este de mare importanță in formularea de compuși farmaceutici pe bază de aceste entități moleculare, precum și în identificarea acestora în diferite medii.

Caracterizarea FT-Raman a demonstrat că părțile componente ale extractelor de coajă de mesteacan pot fi recunoscute și diferențiate. În plus, betulinul a fost identificat ca și componentă principală în scoarța de mesteacăn și în extractele naturale. O caracterizare vibrațională completă a betulinului a fost realizată pe baza datelor experimentale și teoretice. Poziția numerelor de undă și atribuirea benzilor de vibrație ale principalelor grupărș caracteristice funcționale ale moleculei de betulin au fost identificate si discutate.

A doua parte a capitolului s-a axat pe caracterizarea metodelor de creștere a solubilității triterpenelor prin spectroscopie vibrațională. Ancheta prezintă pentru prima dată o caracterizare a compusului de inlcuziune betulin-ciclodextrină. Caracterizarea vibrațională se bazează pe datele spectroscopice FT-Raman și calculele DFT. În cazul complexului de incluziune 1:1, analiza vibrationala a relevat existența unor interacțiuni între gruparea CH_2OH a betulinului și cavitatea moleculei de HPGCD. Terminalul alchenic al betulinului este disponibil pentru alte interacțiuni. In cazul complexului de incluziune 1:2 intre betulin și două molecule HPGCD, situația diferă ușor. Spectrul complexului de incluziune este dominat de caracteristicile spectrale ale ciclodextrinelor, în timp ce caracteristicile spectrale ale betulinului scad drastic în intensitate. Formarea legaturilor de hidrogen este sugerată de largirea și deplasarea numerelor de unda ale benzilor caracteristice grupărilor CH_2OH si alchenică ale betulinului. Acest lucru poate sugera ca moleculele de ciclodextrină înconjoară molecula de betulin într-o încercare de a forma complexul de incluziune oaspete-gazdă.

Cea de-a doua alternativă propusă pentru creșterea solubilității betulinului s-a bazat pe formularea de nanomulsii. Caracterizarea FT-Raman a nanoemulsiei a fost însa împiedicată de faza uleioasa a acesteia a carei benzi domină spectrul FT-Raman și fac imposibilă monitorizarea betulinului.

Chapter 3

Caracterizarea vibrațională a dacarbazinei, medicament anti-canceros

3.1 Introducere

Dacarbazina, (5 - (3,3-dimethyltriazeno) imidazol-4-carboxamida) (DTIC) este un agent activ pentru tratarea melanomului malign aprobat de US Food and Drug Administration. DTIC, sintetizat prima dată în 1959, este un compus fotosensibil aprobat pentru tratamentul melanomului metastatic și a altor boli de piele [22].

Dacarbazina este încă supusă unor studii preclinice cu scopul de caracterizare a proprietăților sale fizico-chimice și bio-farmaceutice, acestea indicând domeniul larg de necunoscute legate de acest compus. Exemple de studii recente sunt studii LC-MS și LC-UV de stabilitate și compatibilitate cu diferite materiale [23, 24], studii LC-MS/MS pentru determinarea DTIC și a 2-azahypoxanthine (AIC), metabolitul său final în plasma sangvină [25]. Dacarbazina s-a dovedit a fi instabilă în soluții și s-a foto-descompus rapid. Ca o concluzie, o doză uzuală de 800 ng/m^2 soluție dacarbazină ar putea furniza o doza de 60.2 mg/m^2 a 2-azahypoxanthine, produs de degradare principal care a fost considerat principala cauza pentru aparitia efectelor adverse. Protejarea dacarbazinei împotrvia expunerii la lumină, și deci reducerea degradării sale, conduce la o inhibare a efectelor adverse [26]. Aceste studii susțin convingerea că, în ciuda utilizării sale în studiile clinice exista înca multe necunoscute legate de proprietățile sale și mecanismul de acțiune. Având în vedere importanța biomedicală a dacarbazinei, scopul acestui studiu este de a elucida mai multe fapte legate de proprietățile moleculare fizice și chimice prin utilizarea metodelor spectroscopice vibrationale și de calcul DFT.

3.2 Rezultate și discuții

3.2.1 Optimizarea geometriei

Structura DTIC este compusă dintr-un grup de carboxamidă (C=O-NH_2), un inel de imidazol ($C_3H_4N_2$), un lanț triazenic (N_3H_3), și două grupuri de metil (Fig. 3.1). Inelul de imidazol există în două forme tautomerice, deoarece fiecare dintre azoți poate fi protonat. Conformația minimului energetic rezultat în urma unei scanari a energiei potențiale a DTIC a fost optimizat la nivelul de teorie B3LYP/6-31 G(d) și în continuare verificat de frecvențe imaginare prin efectuarea unei analize vibrționale.

3.2.2 Spectrele Raman ale dacarbazinei la diferite pH-uri

Spectroscopia Raman a fost utilizată aici pentru evidențierea speciilor moleculare protonate și deprotonate ale dacarbazinei in soluții apoase saturate (Fig. 3.2). Pentru o atribuire adecvată a benzilor Raman

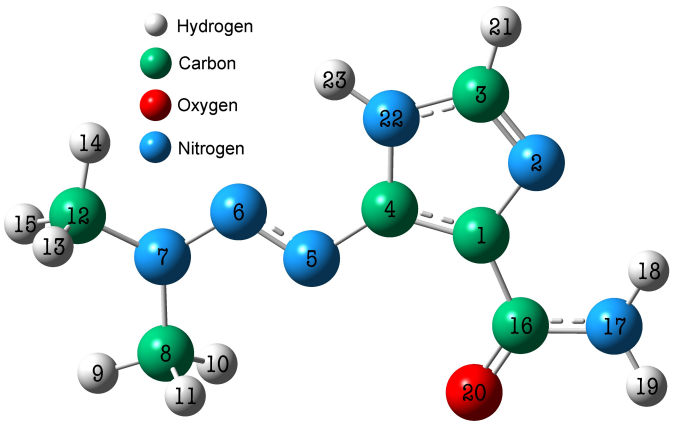


Figure 3.1: Structura moleculară optimizată B3LYP/6-31 G(d) a minimului energetic global al DTIC.

observate experimental, calcule DFT in gaz și in apă efectuate la nivelul de teorie B3LYP/6-31++ G(d,p) au fost folosite.

Trei specii de dacarbazină au fost detectate, dupa cum urmeaza: la pH mai mic de 3 spectrele Raman indica prezența formei protonate de dacarbazină. Specia protonată a moleculei DTIC este indicată de banda intensă centrată la 1343 cm^{-2} care include vibrații de deformare ale site-ului protonat NH (Fig. 3.3 a). Alte benzi caracteristice sunt observate la 1470 cm^{-1} atribuită vibrațiilor de deformare NH ale site-ul protonat N3, 1514 cm^{-1} atribuită vibrațiilor de deformare NH și CH și 1621 cm^{-1} atribuită vibrațiilor de deformare NH_2 și NH la site-ul protonării din inelul de imidazol și vibrațiilor de întindere C-C.

La pH 4, ambele forme protonată și neutră pot fi detectate, iar forma neută devine proeminentă cu creșterea pH-ului. Banda de la 1343 cm^{-1} scade în intensitate, în timp ce umărul observat la 1364 cm^{-1} se deplasează la 1375 cm^{-1} și crește în intensitate devenind foarte puternic la pH-uri mai mari. Această bandă este atribuită vibrațiilor de întindere N-N cuplate cu vibrațiile de tip umbrelă CH_3 și vibrațiile de deformare NH de la locația N23. Benzi noi caracteristice formei neutre observate în intervalul pH 4–11 sunt măsurate la 1410, 1445 și 1489 cm^{-1} atribuite în principal vibrațiilor de deformare CH_3, banda de la 1548 cm^{-1} atribuită vibrațiilor de deformare NH_2 și banda de la 1589 cm^{-1} atribuită vibrațiilor de deformare NH și de intindere C-C, toate acestea evidențiind prezența formei neutre a moleculei de dacarbazină.

La pH 12 și 13, ambele forme neutră și deprotonată ale DTIC coexistă. Crescand pH-ul la 14, forma deprotonata a moleculei DTIC este predominantă și spectrul Raman caracteristic este obținut. O nouă bandă foarte intensă este obsrvată la 1501 cm^{-1} și este atribuită vibrațiilor de deformare CH_3 și vibrațiilor de intindere N-N. Banda nouă de la 1463 cm^{-1} corespunde vibrațiilor de deformare CH_3 cuplate cu vibrații de întindere C-C și vibrații de deformare NH_2. Prezența formei deprotonate este indicată de cele doua benzi intense de la 1380 și 1344 cm^{-1} atribuite vibrațiilor de întindere N-N cuplate cu vibrațiile de tip umbrelă CH_3 și vibrațiilor de deformare CH cuplate cu vibrații de întindere C-N.

3.2.3 Spectrele SERS ale dacarbazinei la difereite pH-uri

Complementar spectrosocpiei Raman, spectroscopia de amplificare Raman la suprafață poate monitoriza moleculele adsorbite sau în imediata apropiere a suprafeței de metal, oferind un semnal îmbunătățit Raman datorită rezonanțelor plasmonice care apar la suprafața metalelor. Este bine stabilit faptul că spectroscopia SERS poate fi folosită pentru determinarea modurilor de adsorbție și orientării moleculelor la suprafața nanostructurilor metalice, ca funcție de concentrația la suprafața metalică și chiar a valorii pH-ului [27, 28]. Aici, efectul SERS a fost angajat pentru identificarea mecanismului de adsorbție a speciilor de DTIC la suprafața de Ag coloidal (Fig. 3.4).

Adsorbția speciilor protonate la nano-suprafața de argint este detectată în condiții puternic acide.

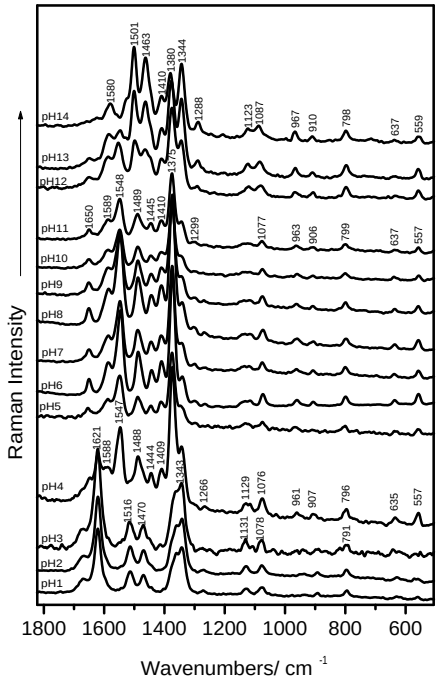


Figure 3.2: Spectrele Raman ale soluției apoase de dacarbazină 1M inregistrate la diferite pH-uri. Excitarea 63 nm.

Creșterea pH-ului la 4 permite detectarea speciilor protonată și neutră de DTIC adsorbite la suprafața metalică, în timp ce la un pH mai mare de 6 numai speciile neutre adsorbite la suprafața de argint mai pot fi detectate. Adsorbția speciilor deprotonate este detectată la valori ale pH-ului mai mari de 12. Bazându-ne pe spectrele SERS și pe potențialul electrostatic molecular (MEP) calculat pentru a ajuta la interpretarea și predicția pozițiilor posibil reactive ale dacarbazinei, chemisorpșia moleculei de DTIC a fost propusă. Astfel, s-a concluzionat că molecula de dacarbazină se adsoarbe la suprafața nanoparticulelor metalice prin gruparea NH_2 într-o posibilă orientare înclinată față de suprafață cu grupările CH_3 în apropierea acesteia.

Table 3.1: Atribuirea vibrațională a unor moduri Raman și IR corespunzătoare dacarbazinei

B3LYP/6-31 G(d) în gaz	B3LYP/6-31 G(d) în apă	B3LYP/6-31++ G(d) în gaz	FT-IR	FT-Raman	Raman pH 2	Raman pH 7	Raman pH 14	Atribuire
3138	3113		3150 m	3135 w				ν(CH)
2927	2939			2928 w				$\nu_s(CH_3)$
1543	1538	1535		1545 vs		1548 s	1526 sh	$\delta(NH_2)$
1490	1482	1478	1472 m	1488 s		1489 m	1501 s	$\delta(CH_3)$
1459	1444	1448		1444 m		1445 w		$\delta(CH_3)$+ ν(N-N)

Table 3.1: Continued

B3LYP/6-31 G(d) în gaz	B3LYP/6-31 G(d) în apă	B3LYP/6-31++ G(d) în gaz	FT-IR	FT-Raman	Raman pH 2	Raman pH 7	Raman pH 14	Atribuire
1390	1376	1385	1399 s	1372 vvs	1364 sh	1375 s	1380 s	ν(NN) +u(CH_3) +δ(NH)
1346	1350	1343	1337 m	1341 m	1343 s	1344 sh	1344 s	ν(CN)+ δ(N-N-N)+ $\delta(CH_3)$ + δ(NH)

Abreviații: δ - deformare, ν - întindere, ω - bătaie, τ - răsucire, ρ - legănare, vw - foarte slab, w - slab, m - mediu, s - intens, vs - foarte intens, sh- umăr.

3.3 Concluzii

Acest studiu prezintă o atribuire vibrațională completă a dacarbazinei, medicament anti-canceros utilizat în tratamentul melanomului. Atribuirea vibrațională se bazează atât pe datele experimentale Raman și IR cât și pe date teoretice DFT. Benzile Raman caracteristice grupurilor chimice ale moleculei de dacarbazină au fost identificate și discutate. Modificările structurale moleculare ale dacarbazinei în diferite medii au fost evidențiate prin spectroscopia Raman. Trei specii de DTIC au fost identificate, forma protonată la inelul de imidazol identificată la valori de pH acid, forma neutră detectată în intervalul de pH 6–10 și speciile deprotonate identificate la valori bazice ale pH-ului.

Prezența speciilor moleculare de dacarbazina atașate la suprafața nanoparticulelor de argint au fost detectate și modul de adsorbție a fost elucidat. S-a ajuns la concluzia ca specia protonată de DTIC este adsorbită prin gruparea NH_2 și molecula se află într-o orientare ușor înclinată față de suprafața de argint, posibil cu atomul liber de azot din inelul imidazol mai aproape de metal. Un mecanism de adsorbție similar este propus pentru speciile neutre și protonate ale DTIC. În aceste cazuri, gruparea CH_3 a moleculei ar trebui sa se afle în imediata apropiere a suprafeței de argint.

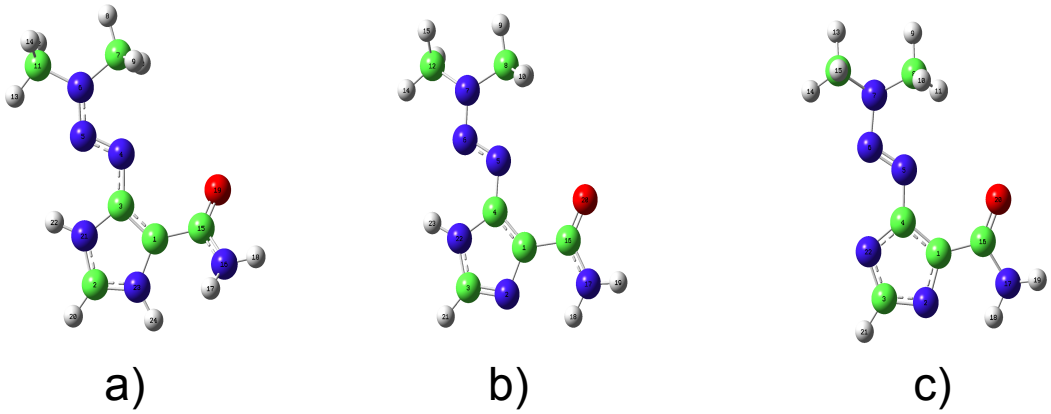


Figure 3.3: Structurile geometrice optimizare ale speciilor moleculare de dacarbazină protonată (stânga), neutră (mijloc), și deprotonată (drepata) obținute la nivelul de teorie B3LYP/6-31++ G(d,p).

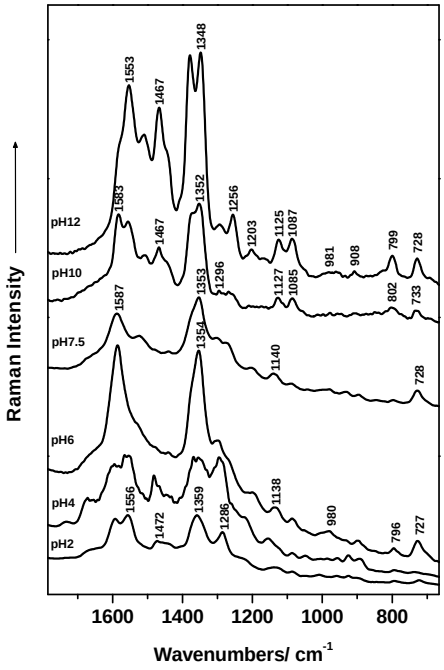


Figure 3.4: Spectre SERS ale soluției apoase de dacarbazină 10^{-4}M achiziționate la diferite pH-uri. Excitație 532 nm.

Chapter 4

Spectroscopiile Raman și SERS aplicate în studiul unor țesuturi de piele de șoarece

4.1 Introducere

Melanomul este un tip agresiv de cancer, care ar putea fi vindecat daca este descoperit în faza inițială. Metodele curente utilizate pentru caracterizarea leziunilor suspicioase sunt însă invazive și depind enorm de interpretarea examinatorului. Spectroscopia Raman poate fi însa aplicată *in vivo*, nedistructiv și poate oferi informații despre modificările apărute la nivel molecular, fapt exploatat în aceast capitol.

Țesuturile afectate de cancer prezintă celule cu nucleu crescut față de citoplasmă, deficiențe în structura ADN-ului, activitate metabolică mai mare, precum și modificări la nivelul lipidelor și proteinelor [29], care diferă de țesuturile sănătoase. Microspectroscopia Raman este potrivită pentru diagnosticarea cancerului din cauza sensibilității sale în detectarea acestor schimbări biochimice subtile, astfel un prim obiectiv al studiului a fost de a investiga și diagnostica prin microspectroscopia Raman varii patologii de piele de șoarece.

Chemoprevenția presupune administrarea de agenți anti-cancerogeni cu scopul de a preveni posibilele mutații care au loc în timpul proliferării anormale a celulelor [30]. În momentul de față există o constantă cerere de noi medicamente care pot fi utilizate ca agenți chemoterapeutici în tratamentul cancerului [31]. În studiul de față, activitatea chemoterapeutică a compușilor naturali extrași din coaja exterioară a arborelui de mesteacăn a fost investigată. Spectroscopia Raman a fost utilizată pentru monitorizarea schimbărilor moleculare induse de tratamentul pe bază de produse naturale la nivelul pielii. Monitorizarea exactă a tratamentului clinic este esențială pentru calitatea vieții, indicele de performanță și de supraviețuire a pacienților. Astfel, este esențială dezvoltarea de tehnici sensibile care pot diagnostica boli și monitoriza direct modificările induse de tratament. Atracția microspectroscopiei Raman recent aplicată în domeniul biomedical constă mai ales în potențialul său pentru aplicații *in vivo*.

Prima parte a acestui studiu prezintă aplicațiile *in vivo* ale microspectroscopie Raman pentru detectarea și caracterizarea diferitelor patologii de piele de șoarece. Rozătoarele investigate aici au fost clasificate în patru grupe: grupul melanom (rezultat în urma tratamentului cu cancerigene chimice 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) în calitate de inițiator și 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) în calitate de promotor de cancer), grupul control, care a fost păstrat sanatos, grupul tratat cu nanoemulsia pe bază de betulin (a se vedea secțiunile 2.2.2 și 2.2.3) dupa inițierea carcinomului prin aplicarea DMBA, precum și grupul tratat cu acetonă, care a fost inclus ca și control datorită solventului utilizat pentru dizolvarea substanțelor chimice cu scopul de a identifica posibile modificări biochimice induse de acesta. Experimentul face parte dintr-o abordare multidisciplinară mare în care melanom reproductibil a fost obținut pe specii șoareci și formulări farmaceutice noi pe bază de betulin cu potențial în tratarea

cancerului de piele au fost preparate și testate. Microspectroscopia Raman a fost angajată pentru monitorizarea *in vivo* efectelor penetrării nanoemulsiei de betulin și a tratamentului chimic aplicat la nivelul pielii rozătoarelor.

Este bine cunoscut faptul ca împrăștierea Raman este un efect slab [32]. Mai mult decât atât, semnalul Raman de la probe biologice este acoperit de auto-fluorescența probelor investigate [33]. Spectrosocpia Raman de amplificare la suprafața (SERS) poate fi folosită pentru a amplifica efectul Raman cu ajutorul nanoparticulelor metalice. Semnalul SERS se datorează unor mecanisme combinate, chimice și electromagnetice, care implică adsorbția la suprafața metalică [34]. Capacitatea tehnicii SERS a fost demonstrată recent pentru aplicații biomedicale [35–37], astfel obiectivul următor al acestui studiu a fost de a folosi tehnica SERS pentru amplificarea semnalului Raman achiziționat de la țesuturi de piele de șoarece . Aici, efectul SERS este angajat atât pentru aplicații *in vivo* cât și *ex vivo*.

Nanobiosensorii sunt relativ o clasă noua de dispozitive "biosensing" care au capacitatea de sondare chimică locală a moleculelor biologice native în sistemele vii [38]. Dezvoltarea de etichete de dimensiuni nano utilizate pentru aplicații in biologia celulara și bio-chimie este în prezent o ramură majoră de cercetare [39, 40]. Etichetele pe bază SERS sunt compuse dintr-o molecula reporter Raman atașat de nanoparticule de Au sau Ag [41]. Aceste etichete pot fi inoculate în celule sau țesuturi și localizarea lor se realizeaza pe baza amprentei SERS a moleculei anexate [36, 42, 43]. În plus, semnalul SERS se poate obține din imediata vecinătate a etichetei [44]. Inocularea de molecule reporter atașate nanoparticulelor de Au/Ag în interiorul organismelor sau celulelor ar putea permite identificarea unor modificări chimice din imediata lor vecinatate (interval de ordinul a cativa nanometrii). Scopul acestui studiu a fost de a monitoriza etichetele SERS bazate pe nanostructuri de Ag decorate cu molecule de cresil violet ca și reporter Raman îngropate în țesuturi biologice. Cresil violet (CV), colorantul folosit aici a fost utilizat datorită împrastierii Raman mare observată de la modurile sale de vibrație absorbite de nanoparticule metalice.

4.2 Rezultate și discuții

4.2.1 Caracterizarea Raman *in vivo* a pielii de șoarece

Spectrele Raman mediate corespunzatoare fiecarui din cele patru grupuri de șoareci sunt prezentate in Fig. 4.1 cu scopul de a identifica principalele diferențe între spectre și benzile Raman marker corespunzatoare fiecărui tratament/grup.

Grupurile control și tratat cu solventul acetonă

Cele mai intense benzi observate in spectrul Raman mediat corespunzător grupului control (Fig. 4.1 label N) sunt amida I localizată la 1657 cm^{-1}, vibrația de deformare CH_2CH_3 în proteine și lipide de la 1445 cm^{-1}, amida III caracteristică colagenului de la 1270 cm^{-1}, vibrația de întindere C-C a lipidelor sau de întindere C-N și C-O de la proteine și carbohidrați de la 1128 cm^{-1}, banda fenilalaninei de la 1003 cm^{-1}, vibrația de întindere C-C corespunzatoare proteinelor de la 936 cm−1 și banda amino acizilor de la 855 cm^{-1} [45–47]. În regiunea numerelor de undă mare, cele mai intense benzi sunt benzile lipidelor observate la 2850 și 2880 cm^{-1}, și vibrația de intindere asimetrică CH_2 de la 2934 cm^{-1}. Moduri caracteristice colagenului sunt prezente în întreaga regiune spectrală, indicând colagenul ca și componentă principală în pielea investigată [48].

Spectrul caracteristic grupului tratat cu acetonă (Fig. 4.1a) prezintă moduri vibraționale similare spectrului Raman corespunzator grupului sănătos, totuși, mici scăderi ale intensității relative ale benzilor amidei I și III pot fi observate. Mai mult, aceste moduri prezintă o deplasare către numere de undă mai mici, la 1655 și 1265 cm−1, în timp ce modul de deformare CH_2CH_3 al proteinelor și lipidelor prezintă o usoară deplasare către numere de undă mai mari (1448 cm^{-1}).

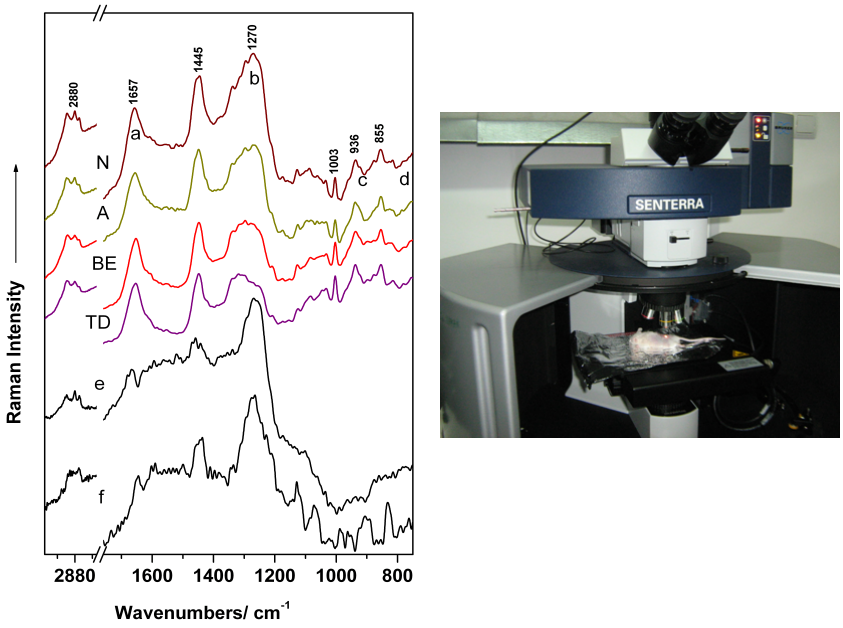


Figure 4.1: (stanga) Spectrele Raman mediate corespunzătoare grupului normal (N), de melanom (TD), tratat cu acetonă (A) și cu nanoemulsia de betulin (BE). Următoarele modificări spectrale sunt indicate: (a) banda amidă I a proteinelor, (b) banda amidă III de la 1270 cm^{-1} indicând o descreștere de la spectrul N la celelalte spectre și regiunea acizilor nucleici și a lipidelor în întervalul spectral 1300-1400 cm^{-1} indicând o creștere în spectrul TD, (c) banda de la 936 cm^{-1} corespunzătoare vibrațiilor de întindere în proteine și (d) banda ADN-ului de la 788 cm^{-1}. (e) Spectrele diferență calculate pentru N-BE și (f) BE-TD. Spectrul (f) a fost multiplicat cu un factor de 2 pentru o mai bună vizibilitate. (dreapta) Imaginea indică raza laser focusată la nivlul pielii unui șoarece anesteziat.

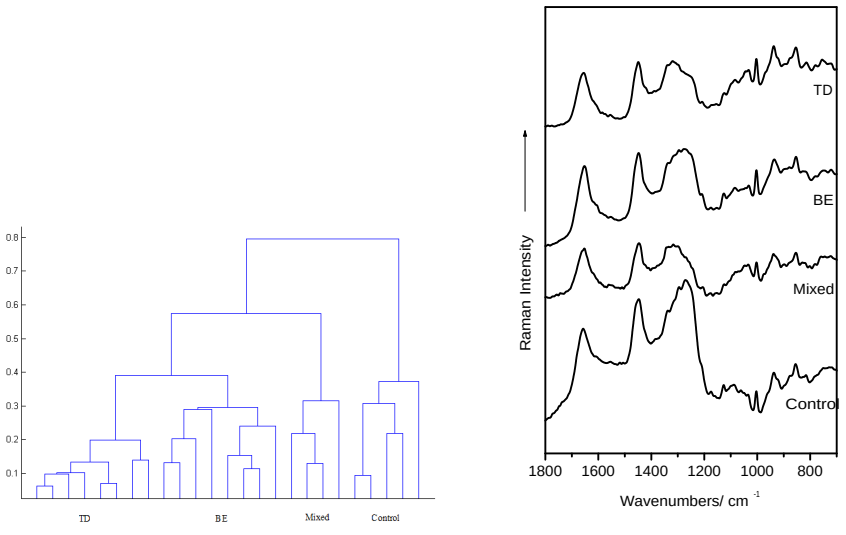
Grupurile melanom și tratat cu nanoemulsia de betulin

Spectrele Raman mediate caracteristice pielii tratate cu substanțe cancerigene, pe de o parte, și nanoemulsia de betulin dupa aplicarea inițiatorului cancerigen pe de altă parte, sunt prezentate în Fig. 4.1TD și respectiv BE. O modificare a compoziției moleculare în proteine este sugerată de scăderea in intensitate a benzii amida I, precum și deplasarea spre numere de undă mari a vibrației de deformare CH_2CH_3 a proteinelor și lipidelor. Principalele diferențe observate între spectrul mediat caracteristic grupului normal pe de o parte, și spectrele mediate caracteristice grupului melanom și tratat cu nanoemulsia de betulin pe de altă parte, sunt observate în intervalul spectral 1240–1340 cm^{-1}. Spectrul caracteristic grupului TD arată o scădere drastică a benzilor de la 1270 și 1244 cm^{-1} corespunzătoare amidei III și o creștere a benzilor de la 1299 cm^{-1} (vibrația de răsucire CH în lipide), 1319 cm^{-1} (atribuită atât colagenului cât și acizilor nucleici, mai precis bazelor purinice guanina și adenina [49]), și 1339 cm^{-1} (atribuită vibrațiilor de răsucire CH în lipide sau acizi nucleici [45]).

Spectrul caracteristic grupului BE pe de alta parte, prezintă o creștere în înălțime a benzii de la 1270 cm^{-1} caracteristică amidei III și o scădere a intensității relative a benzilor din regiuniea spectrală 1300–1340 cm^{-1} caracteristice lipidelor și acizilor nucleici. Creșterea intensității relative a acestor moduri în spectrul corespunzător grupului TD sugerează o schimbare a structurii moleculare a proteinelor și un conținut mai mare de acizi nucleici în asociere cu transformările tumorale [50]. Pentru a identifica mai bine schimbările bio-moleculare caracteristice fiecărui grup, spectrele diferență au fost calculate. Astfel, s-a demonstrat că spectrul caracteristic grupului BE prezintă o intensitate relativă mai mare a benzilor amidă I și III ale colagenului indicând astfel un conținut de proteine mai ridicat în comparație cu grupul TD.

Regiunile care prezintă deosebirile principale între spectrele medie au fost considerate în continuare. Raporturi de intensitate au fost calculate pentru aceste benzi, iar rezultatele au fost comparate pentru fiecare tratament al pielii. Următoarele rapoarte au fost selectate pentru discriminarea între spectre:

$$r_1 = \frac{I_{1270}}{I_{1330}}; r_2 = \frac{I_{1660}}{I_{1445}}; r_3 = \frac{I_{788}}{I_{1003}} \tag{4.1}$$



(a) (b)

Figure 4.2: (a) Dendrograma prezentând separarea spectrelor Raman și cele patru clustere rezultate și (b) spectrele Raman maediate caracterstice fiecărui din cele patru clustere.

Analiza ierarhică a clusterilor (HCA) a fost aplicată pentru gruparea spectrelor pre-procesate rezultând în final patru grupuri: grupul TD (75% spectre achiziționate de la soarecele cu melanom), clusterul BE (77% din spectrele achiziționate de la soarecele tratat cu nanoemulsia de betulin și o șesime din totalitatea spectrelor achiziționate de la soarecele cu melanom), clusterul mixt (compus din restul spectrelor achiziționate de la șoarecele cu melanom și de la șoarecele tratat cu nanoemulsia de betulin și 30% din totalitatea spectrelor achiziționate de la soarecele tratat cu acetonă) și clusterul control (format din spectrele achiziționate de la soarecele sănătoas și restul de 70% din spectrele achiziționate de la soarecele tratat cu acetonă). Metoda de grupare K-means a fost ulterior utilizată pentru verificarea rezultatelor obținute în urma aplicării HCA și spectrele Raman obținute mediate caracteristice fiecărui grup sunt prezentate în Fig. 4.2b.

Grupul melanom (TD) este caracterizat prin concentrații crescute de acizi nucleici, banda amidă I de intensitate mare relativ la banda CH_2 a proteinelor și lipidelor, și conținut foarte scăzut de carbohidrați. O tendință similară a fost identificată anterior în alte studii de diagnosticare a țesuturilor de piele canceroase prin spectroscopie Raman [47, 49]. Astfel, se poate concluziona că clusterul TD corespunde pielii canceroase și că tratamentul chimic (TPA și DMBA) a indus o scădere a conținutului de colagen, însoțită de o creștere a acizilor nucleici și a conținutul de lipide. Spectrele Raman achiziționate de la lotul sănătos de rozatoare și de la cel tratat cu acetonă au fost grupate într-un al doilea cluster. Câteva dintre caracteristicile spectrale ale acestui grup au indicat conținut ridicat de amida III a colagenului și de carbohidrați, și o intensitate scazută a amidei I în comparație cu grupurile anterioare. Majoritatea spectrelor Raman colectate de la rozatoarele corespunzătoare grupului tratat cu nanoemulsia de betulin au fost reunite intr-un singur grup cu un procent mic de spectre colectat de la grupul TD. Acest grup, denumit BE prezintă un conținut ridicat de amida III a colagenului și un conținut ridicat de glucide, sugerând un efect benefic al tratamentului cu nanoemulsia de betulin. În plus, acest fapt sugerează posibilitatea ca nici melanomul, nici tratamentul cu nanoemulsi de betulin să nu se fi raspândit omogen pe întreaga suprafață a pielii, tratând unele regiuni mai agresiv decât altele. Astfel este posibil ca anumite zone de țesut de piele aparținând celor două grupuri să prezinte patologii similare. Mai mult, clusterul mixt rezultat în urma aplicării metodelor chemometrice susține această teorie datorită grupării unor spectre achiziționate de la grupul melanom, cel tratat cu nanoemulsia de betulin și cel tratat cu acetonă într-un singur cluster.

În concluzie, capacitatea spectroscopiei Raman pentru monitorizarea *in vivo* a terapiei este susținută de acest studiu și rezultatele indică o bioactivitate benefică a nanoemulsiei de betulin, confirmată și de examenul histopatologic. Nano-boabele de betulin au pătruns în pielea șoarecilor, conducând la modificări moleculare care, patologic vorbind, indică reducerea zonelor inflamate și inhibarea malignității. Concluzia principală a studiului de față este aceea că betulinul poate fi aplicat ca un compus profilactic și terapeutic pentru tratatmentul pielii, mai ales în leziunile cutanate.

4.2.2 Monitorizarea SERS a țesuturilor de piele de șoarece

Odată cu dezvoltarea nanotehnologiei, diferite tipuri de nanoparticule metalice au fost sintetizate și avantajele acestora pentru aplicații biomedicale au fost studiate extensiv [40, 41, 51, 52]. Punerea în aplicare a nanosenzorilor în depistarea precoce a bolilor și pentru monitorizarea tratamentelor poate duce la rezultate promițătoare pentru domeniul bio-medical. Având în vedere capacitatea tehnicii SERS de a achiziționa informații spectrale din imediata vecinătate a materialelor nanostructurate, nanosenzori SERS pot fi dezvoltați ca instrumente ideale pentru investigarea structurilor morfologice mici în celule, țesuturi și organisme vii.

Analize SERS *in vivo* și *ex vivo*

Pentru a determina dacă pot fi achiziționate spectre SERS de la nanoparticule îngropate în țesuturile de animale, doze mici de nanoparticule de argint au fost injectate subcutanat în pielea unor rozătoare și semnalul a fost achiziționat din punctele respective. Fig. 4.3 prezintă semnalul Raman și SERS achiziționat dintr-un loc în care au fost injectate nanoparticule. Prin focusarea laserului la diferite adâncimi in țesut au

fost achiziționate semnale spectrale caracteristice. Astfel semnalul achiziționat diferă de la o măsurătoare la alta, după cum se poate observa in Fig. 4.3, care prezintă două spectre Raman achizționate din zone mai aprope de suprafața pielii șoarecelui și un spectru SERS care a fost înregistrat la aceeași poziție x-y, însă la o adâncime de 3000 μm. Utilizând apertura confocală de 50 x 1000 μm și focusând laserul pe țesutul biologic cu obiectivul de 50x, o rezoluție axială de 3,2 mm poate fi obținută.

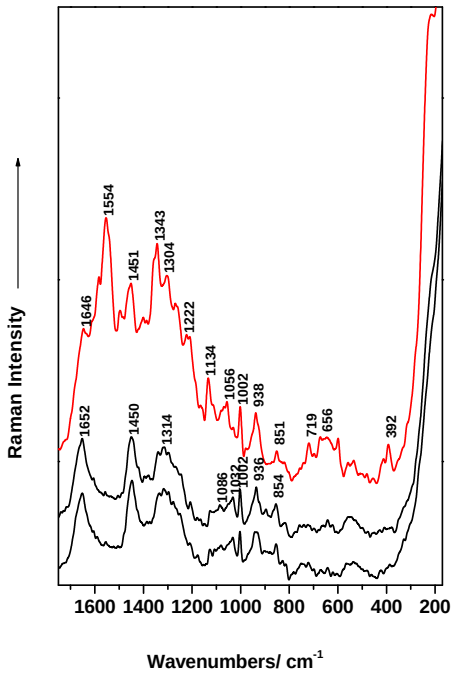


Figure 4.3: Spectrele Raman (spectrele de jos) și spectrul SERS (spectrul roșu de sus) achiziționate de la diferite adâncimi din straturile de piele dintr-un loc în care au fost injectate nanoparticule de Ag.

Primele două spectre prezintă semnal Raman caracteristic de țesut și sunt foarte asemanatoare între ele, ceea ce indică faptul că, din cauza rezoluției axiale semnalele au fost achiziționate practic din același punct. Cu toate acestea, atunci când masa microscopică pe care a fost plasat șoarecele anesteziat a fost deplasată, permițînd focusarea spotului laser în straturile adânci ale pielii (3000 μm), a fost posibilă achiziția semnalului de la straturile interioare ale pielii, din zona unde au fost injectate nanoparticule de Ag. Astfel, spectrul (c) din Fig. 4.3 prezintă noi benzi, precum și o intensitate mai mare față de spectrele Raman precedent achiziționate. Una dintre principalele diferențe dintre spectre Raman și SERS o reprezintă scăderea în intensitate a benzii amidă I a proteinelor de la 1646 cm^{-1} observată în spectrul SERS. Alte benzi noi au fost măsurate la 1554 cm^{-1} cu un umăr la 1575 cm $^{-1}$, banda intensă și ascuțită de la 1343 cm^{-1} cu umeri la 1304, 1269 și 1222 cm^{-1}, benzile 1134, 1056, 719 și 656 cm^{-1}, precum și banda de intensitate mare de la 220 cm^{-1}. Conform regulilor de selecție SERS [53], modurile vibraționale cu componenta polarizabilității perpendiculare la suprafața metalică sunt amplificate în spectrele SERS. O tentativă de atribuire vibrațională a benzilor principale observate în spectrul SERS este propusă în continuare pe baza literaturii actuale din domeniu [45, 54–57]. Astfel, au fost identificate benzi caracteristice acizilor nucleici situate la 719 cm^{-1} (adenina), 1056 cm^{-1} (ADN coloana vertebrală), 1222 cm^{-1} (guanina), 1269 cm^{-1} (citozina), 1343 cm^{-1} (adenina), 1575 cm^{-1} (timina și guanina), proteinelor la 1554 cm^{-1} (amida II), 1451 cm^{-1} (CH_2CH_3 deformare), 1343 cm^{-1} (CH_3CH_2 colagen), 1134 cm^{-1} (prolina), 1002 cm^{-1} (fenilalanina), 938 cm^{-1} (vibrații de întindere a inelului C-C al prolinei), 656 cm^{-1} (vibrații de întindere C-C în proteine), în timp ce lipidele sunt observate la 1451

cm^{-1}. O bandă nouă este măsurată la 227 cm^{-1} reprezentativă modului Ag-N în molecule ce conțin N și sunt adsorbite la nano-suprafața de Ag [54]. Spectrele obținute în acest studiu arată capacitatea tehnicii SERS pentru aplicații biomedicale *in vivo* și deschid o direcție de cercetare nouă [51]. Cu toate acestea, este necesară efectuarea de experimente suplimentare pentru stabilizarea semnalului SERS achiziționat și pentru a oferi o caracterizare exactă a unor țesuturi de piele de varii patologii.

În continuare scopul a acestei cercetări a fost de a proba amplificarea Raman la suprafață folosind nanoparticule de Ag coloidal absorbite de către țesuturi de piele obținute în urma autopsiei rozătoarelor. Anterior, grupul nostru a dovedit posibilitatea achiziționării semnalului SERS de la țesuturi de piele imobilizate în formol prin înregistrarea de hărți de la zone anterior definite [9]. Astfel, a fost arătat că spectrele SERS au fost achiziționate numai din unele zone împrăștiate aleator pe toată suprafața ariei selectate, precum și faptul că semnalul diferă de la o achiziție la alta. Pentru a începeut, aici au fost investigate țesuturi de piel sănătosă fixate în formol cu scopul de a verifica posibilele modificări apărute la nivel molecular datorate procedurii de fixare a țesuturilor. În urma investigațiilor, s-a ajuns la concluzia că fixarea în formol nu induce modificări vizibile majore care să poată împiedica analiza SERS *ex vivo* a țesuturilor de piele.

Studiile urmatoare au fost realizate cu scopul de a amplifica semnalul Raman de la țesuturi de piele prin utilizarea nanoparticulelor de Ag inoculate în țesut. Semnale SERS reproductibile și înalt calitative au fost obținute *ex vivo* de la țesuturile de piele colectate în urma autopsiei șoarecilor și păstrate in formol, pe baza cărora patologia țesuturilor poate fi diagnosticată. Variabilitatea spectrelor SERS a fost întâi calculată pentru a verifica posibilitatea medierii spectrelor. Coeficienții de corelare rezultați au arătat că spectrele SERS achiziționate de la probele de piele colectate de la șoarecele cu melanom au fost cele mai reproductibile, pe când cele achiziționate de la probele de piele colectate de la șoarecele tratat cu nanoemulsia de betulin au fost cele mai puțin reproductibile, însă încă prezentând încă un coeficient de corelare foarte bun. Astfel, semnalele corespunzătoare fiecărui tratament au fost mediate și comparate între ele (Fig. 4.4). Cele mai amplificate benzi sunt observate la 1572, 1440, 1329, 1220, 1128, 956, 821, 721, 654, 483, și 232 cm^{-1}.

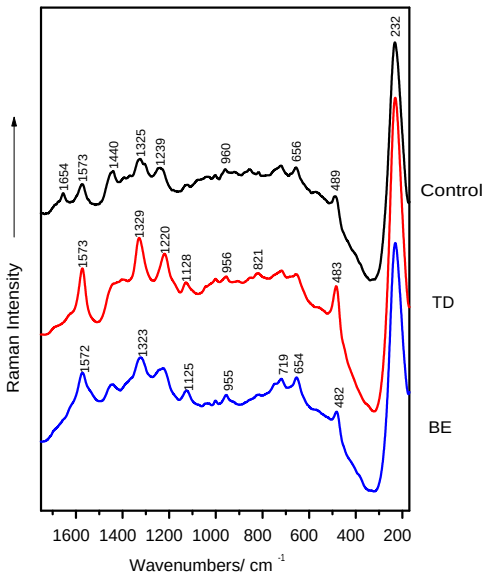


Figure 4.4: Comparație între spectrele SERS mediate caracteristice fiecărui grup: control, melanom (TD) și tratat cu nanoemulsia de betulin (BE).

Diferențele de intensitate observate între modurile vibraționale din spectrele SERS caracteristice

diferitelor patologii ale pielii au permis diagnosticarea și caracterizarea țesuturilor de piele. Biomarkerii SERS principali aleși pentru diferențierea spectrelor au fost benzile de la 722 și 655 cm^{-1} atribuite acizilor nucleici, a caror raport indică o creștere în spectrele caracteristice melanomului comparativ cu spectrele caracteristice probelor de piele sănătoase, în acord cu studiile anterioare [57, 58]. Aceleași rezultate au fost obținute și pentru al doilea studiu care s-a bazat pe investigarea SERS a țesuturilor de pielie colectate de la patru grupuri de șoareci în urma autopsiei: un grup sănătos, un grup melanom, și două grupuri tratate cu formulări farmaceutice pe bază de complecși de incluziune ai compușilor principali din coaja de mesteacăn, betulin și respectiv acid betulinic, cu ciclodextrine.

Monitorizarea și detecția nanosenzorilor optici in țesuturi de piele de șoarece

Ultima parte a acestui studiu s-a axat pe dezvoltarea de nanosenzori optice bazați pe nanoparticule de Ag. Etichetele SERS bazate pe nanostructuri de Ag decorate cu molecule de cresil violet drept reporter Raman, au fost elaborate și inoculate în șesuturi de piele de șoarece cu scopul de a le urmări în interiorul țesuturilor. Rezultatele au arătat posibilitatea obținerii de semnal Raman amplificat corespunzător componentelor moelculare specifice țesuturilor de piele, adiacent semnalului SERS caracteristic etichetei de cresil violet (CV).

Fig. 4.5 prezintă o serie de spectre SERS înregistrate de la țesuturi de piele injectate cu nanoparticule de Ag etichetate și respectiv neetichetate. Semnătura SERS spectrală a etichetei Raman, CV, este prezentată de asemenea (spectrul 9 în figură). Semnalul înregistrat de la țesuturile de piele reprezintă suma semnalului de auto-fluorescență și semnalului caracteristic țesuturilor de piele rezultat din excitația cu o linie laser în vizibil (633 nm). Benzile principale observate în spectrele SERS ale țesuturilor (spectrele 6-8) sunt situate la 1618, 1455, 1359, 1283, 1119, 976, 889, 798 și 752 cm^{-1}. Acestea sunt atribuite proteinelor (889 cm^{-1}, 1119 cm^{-1} modul de întindere C-C în lipide și proteine, 1283 cm^{-1} amida III, 1455 cm^{-1} CH deformare) și acizilor nucleici (798 cm^{-1} modul de întindere O-P-O al ADN-ului, 1359 cm^{-1} guanina).

Inocularea nanosenzorilor optici în țesuturi de piele permite monitorizarea SERS bazată pe semnatura spectrală a moleculei reporter Raman. Banda Raman amprentă situată la 590 cm^{-1} a CV-ului poate fi detectată în mod clar în spectrele SERS, printre alte moduri de vibrație caracteristice moleculelor de CV. Cu toate acestea, dat fiind că etichetele SERS nu au fost protejate cu învelișuri exterioare, moleculele din mediu au fost libere să adsoarbă la suprafața naoparticulelor de Ag [41]. Deși semnatura lor moleculară a scăzut în comparație cu spectrele SERS achiziționate de la nanoparticule de Ag neetichetate inoculate în țesuturile de piele, semnatura SERS spectrală a șesuturilor de piele poate fi încă detectată, împreună cu cea a reporterului Raman. Acest lucru este mai departe demonstrat de lărgirea și ușoara deplasare a benzilor observată pentru mai multe benzi atribuite vibrațiilor grupărilor NH ale moleculelor de CV, indicând astfel formarea de nanoparticule de Ag amino-dublu funcționalizate cu molecule de CV și posibila interacțiune a CV cu componente bio-moleculare din țesuturile de piele.

4.3 Concluzii

Acest studiu arată că spectroscopia Raman pot fi aplicată cu succes pentru caracterizarea *(*in vivo) și diagnosticarea a varii patologii de pielie, precum și pentru monitorizarea tratamentului aplicat la nivel local. Metodele de grupare, precum analiza ierarhică a clusterilor și K-means au distins și identificat principalele diferențe biochimice dintre grupurile de rozătoare, grupându-le în patru clusteri. Clusterul melanom (TD) a fost caracterizat prin concentrații crescute de acizi nucleici, intensitatea mare a benzii amidă I relativ la banda CH_2 a proteinelor și lipidelor, și conținut foarte scăzut de carbohidrați. Clusterul sănătos format din spectrele achiziționate de la gurpul sănătos și majoritatea spectrelor achiziționate de la grupul tratat cu acetonă a fost caracterizat prin conținut crescut de amidă III a colagenului și carbohidraților și conținut scăzut de amida I în comparație cu grupurile anterioare. Clusterul nanoemulsie de betulin, alcătuit din majoritatea spectrelor colectate de la rozătoare tratate cu nanoemulsia de betulin

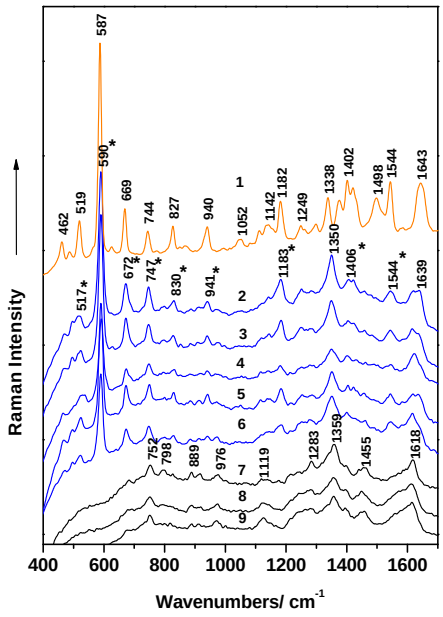


Figure 4.5: Spectre SERS caracteristice țesuturilor de piele inoculate cu nanoparticule de Ag marcate cu cresil violet (1-5) și nemarcate (6-8) și spectrul SERS caracteristic etichetei Raman, cresil violet (9). Asteriscurile indică benzi caracteristice cresilului violet. Excitare 632.8 nm, 1 s timp de integrare, 4 achiziții.

și un procent mic de spectre achiziționate de la șoarecele tratat cu TD a fost caracterizat de un conținut ridicat de amida III a colagenului și de glucide, ceea ce indică efectul benefic asupra pielii al nanoemulsiei de betulin. În plus, aceste rezultate sugerează posibilitatea ca nici melanomul, nici tratamentul cu betulin să nu se fi raspândit omogen pe suprafața pielii. Al patrulea cluster a fost clusterul mixt format din un mic procent de spectre Raman caracteristice pielii tratate cu nanoemulsia de betulin, melanomului și pielii tratate cu acetonă, care întărește presupunerea că tratamentele aplicate nu s-au extins uniform pe toata suprafța pielii șoriceilor, rezultând astfel rozătoare ce prezentau diferite patologii.

Următoarele studii au fost efectuate cu scopul de a amplifica semnalul Raman provenit de la țesuturi de piele prin angajarea nanoparticulelor de argint. Semnal SERS reproductibili și de înaltă calitate a fost obținut atât *in vivo* cât și *ex vivo* pe baza căruia patologia țesuturilor de piele a putut fi caracterizată. Spectrele SERS au prezentat benzi amplificate caracteristice în principal acizilor nucleici și proteinelor, indicând o posibilă interacțiune între componentele bio-moleculare ce conțin atomi de N și nanoparticulele de Ag. Principalii biomarkeri SERS pe bază cărora au fost diagnosticate țesuturile de piele au fost raportul dintre benzile acizilor nucleici de la 722 și 655 cm^{-1}. Astfel, melanomul a indicat o creștere a raportului comparativ cu spectrele sănătoase, în acord cu studiile anterioare și investigațiile Raman *in vivo*.

În ultima parte a acestui capitol au fost prezentate rezultatele preliminare privind dezvoltarea de nanosenzori optici bazați pe nanoparticule de Ag. Caracterizarea etichetelor SERS obținute prin adsorbția moleculelor reporter cresil violet la suprafața nanoparticulelor de Ag este prezentată și monitorizarea nanosenzorilor în interiorul țesuturilor de piele este arătată. Nanosenzorii pot fi localizați pe baza amprentei SERS a moleculei de CV localizată la 590 cm^{-1} care se poate observa ușor în spectre. Mai mult decât atât, spectrele SERS au indicat benzi caracteristice țesuturilor de piele sugerând adsorbția unor bio-molecule la suprafața nanosenzorilor și formarea de nanoparticule de Ag amino-dublu funcționalizate cu molecule de CV.

Chapter 5

Microspectroscopia Raman aplicată pentru studiul celulelor stem

5.1 Introducere

Cercetarea celulelor stem a câștigat o mare apreciere în ultimii ani datorită potențialului benefic al celulelor stem de a transforma abordarea medicinii clinice moderne atunci când se ocupă cu boli dificile care sunt în prezent incurabile (de ex. Alzeihmer's, Parkinson's, boli cardiace, etc.). În timpul dezvoltarii embrionare, celulele câștigă continuu fenotipuri noi și le pierd pe cele vechi. Această capacitate a unei celule de a-și schimba activitățile se bazează pe sinteza de noi specii de ARN și implicit, pe sinteza de noi specii de proteine. O celulă nediferențiată este o celulă fară o anumită specializare. Celule stem embrionare umane (hESCs) au două proprietăți principale, capacitatea de auto-replicare și de generare de celule fiice care se pot transforma in celule diferențiate. Exemple de celule stem diferențiate sunt celulele din piele, sânge, celulele din interiorul intestinului.

Identificarea unor markeri specifici este esențială pentru caracterizarea procesului de diferențiere a celulelor ES și a celulelor descendente din ele. Metodele utilizate la ora actuală sunt invazive, necesită timp îndelungat și fixarea celulelor. Prin urmare, la momentul de față există o mare nevoie de noi metodologii care pot fi folosite pentru a caracteriza și a monitoriza procesul de diferențiere și de a cuantifica biomarkerii cheie într-un mod neinvaziv și rapid.

Utilizarea spectroscopiei micro-Raman (RMS) pentru caracterizarea celulelor stem [59] și discriminarea între celulele nediferențiate și diferențiate [60] se bazează pe detectarea modificărilor biochimice și biofizice la nivel celular care au loc în timpul procesului de diferențiere. Atractivitatea RMS o reprezintă capacitatea tehnicii de a masura diferențele biochimice fără utilizarea de etichete sau alte proceduri invazive. Mai mult decât atât, combinarea microspectroscopiei Raman, care reflectă compoziția biochimică locală pentru o anumită focusare optică cu imagistica de imunofluorescență, care poate oferi informații de înaltă rezoluție spațială despre componente celulare anterior specificate, asigură o caracterizare precisă [59,61,62]. Metode de prelucrare a datelor Raman cum ar fi, analiza componentelor principale (PCA) sau analiza lineara discriminantă (LDA), și metodele de clustering ca de exemplu, K-means sau analiza ierarhică a clusterilor (HCA) pot fi folosite pentru a analiza informația Raman [63–65].

Potrivit fenotipului specific în care o celulă se diferențiază, aceasta produce proteinele necesare care îi permite funcșionarea în mod corespunzator. În timpul procesului de diferențiere a celulelor hES în corpuri embrioide (EBS), cele mai semnificative diferențe observate au fost legate de acizii nucleici [66,67]. O scădere de 25% a benzii ARN-ului de la 813 cm^{-1} a fost observată în celulele EBS diferențiate în comparație cu celulele ES nediferențiate. Diferențele spectrale legate de acizi nucleici și proteine au fost observate și în procesul de diferențiere a celulelor umane ES [64], unde markerii Raman identificați au fost caracteristici triptofanului localizat la 757 cm^{-1} și ADN/ARN caracteristic vibrațiilor de întindere O-P-O de la 784 cm^{-1}. ARN-ul citoplasmatic identificat în celulele nediferențiate stem neurale a fost

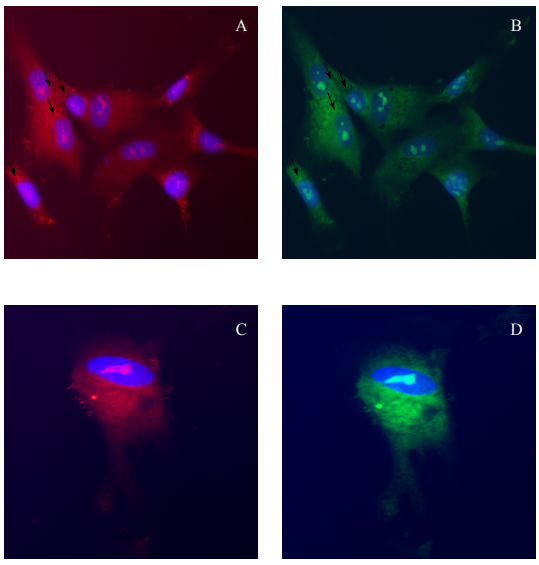


Figure 5.1: Imaginile de imunofluorescență ale unor celule fibroblaste fixe indicând distribuția proteinelor ribozomale S3 (A și C, anticorpi proteine ribozomale S3 marcați cu Cy3), a conținutului total de ARN în verde (B și D, SYTO RNA select), și a nucleelor celulare în albastru (DAPI).

legat de diferențele biochimice observate între celulele stem neurale nediferențiate (NSCS) și celulele gliale derivate din NSCS [68]. Imaginile spectrale Raman au dezvăluit regiuni citoplasmatice cu concentrații de ARN de 4 mg/ml în NSCS și ∼1 mg/ml în celulele gliale.

Descoperirile recente ale markerilor spectrale Raman biochimici caracteristici procesului de diferențiere a celulelor stem a fost principala motivație pentru realizarea acestui studiu. Aici am aplicat capacitatea microspectroscopiei Raman și a imagistici de imunofluorescență pentru a detecta acești biomarkeri în celulele stem embrionare umane și derivatele lor fibroblaste. Imagini Raman de rezoluție spațială înaltă au fost folosite pentru a cartografia distribuția biomarkerilor acizi nucleici și proteine.

5.2 Rezultate și discuții

5.2.1 Microspectroscopia Raman și imunofluorescența celulelor

Un prim obiectiv al acestui studiu a fost de a stabili originea exacta a conținutului crescut de ARN citoplasmatic detectat în celulele nediferențiate în timpul monitorizării micro-Raman a procesului de diferențiere în celule stem [68]. Studiul prezentat aici continuă lucrările raportate anterior cu privire la investigațiile micro-Raman ale procesului de diferențiere prin angajarea de celule stem embrionare umane și a descendeților lor diferențiați fibroblasti. În primul rând, originea ARN a fost cercetată în celulele investigate prin achiziționarea de imagini de fluorescență. Compararea imaginilor de fluorescență care arată distribuția proteinelor ribozomale S3 (stânga, roșu) și distribuția conținutului total de ARN (dreapta, verde), sugerează că cea mai mare parte a ARN-ului detectat în aceste imagini este de fapt ARN ribozomal.

5.2.2 Identificarea acizilor nucleici, biomarkeri Raman caracterisyici procesului de diferențiere

Scopul principal al acestui studiu a fost de a detecta semnale Raman caracteristice ARN-ului în celulele analizate și de a monitoriza distribuția lor intracelulară. Analiza componentelor principale (PCA) s-a dovedit utilă în reducerea dimensiunii datelor Raman pastrând în același timp cea mai mare variație a datelor. Astfel, în unele hESCs investigate, PCA a identificat semnal Raman caracteristic ARN și

distribuția acestuia în celule a putut fi monitorizată prin reproducerea imaginilor Raman corespunzatoare. Componentul principal (PC) caracteristic semnalului Raman de la ARN prezintă o variație de $\sim 0.2\%$ în datele Raman achiziționate de la o celulă stem embrionară tipică și distribuția componentului în celulă este prezentată în Fig. 5.2B și E.

Comparația dintre imaginile Raman spectrale caracteristice anumitor biomolecule și imaginile de fluorescență corespunzătoare, permite o mai bună corelare între informațiile moleculare prezente în spectrele Raman și componentele celulare. Imaginile Raman corespunzatoare ariilor benzilor 788 cm^{-1} (C) și 813 cm^{-1} (F) sunt prezentate împreună cu imaginea microscopică a celulei (G) și imaginea de fluorescență ce prezintă nucleul celulei și distribuția conținutului total de ARN (H). Comparativ cu imaginea de fluorescență DAPI, regiunea celulară din imaginea Raman care arată un conținut înalt al benzii de la 788 cm^{-1} este mai mare decât nucleul celulei observat în imaginea de fluorescență. Acest fapt era de așteptat deoarece această bandă este atribuită vibrațiilor de ring ale citozinei și uracilului, dar și vibrațiilor de întindere simetrică O-P-O ale ADN-ului [69]. Astfel, se poate concluziona că imaginea Raman caracteristcă ariei benzii 788 cm^{-1} prezintă regiuni celulare bogate atât în ADN cât și în ARN. Regiunea de intensitate mare din imaginea Raman corespunzătoare componentului principal ce conține semnal Raman de la ADN se corelează mult mai bine cu imaginea de fluorescență DAPI a nucleului celulei, fapt care se datorează obținerii imaginii Raman prin reprezentarea întregului semnal corespunzător ADN-ului și nu doar a unei benzi marker ca în cazul precedent. Reprezentarea exclusivă a ariei benzii de la 788 cm^{-1} nu poate însă justifica distribuția reală a ARN-ului in interiorul celulelor. Acest lucru poate fi văzut în special în zona ce indică o intensitate mare a ariei benzii 788 cm^{-1} caracteristică nucleolilor celulei unde semnalul de la ARN și ADN se suprapune, cât și în restul nucleului unde imaginea Raman indică o concentrație mare de ARN și ADN, sau mai exact a benzii de la 788 cm^{-1}, însă imaginea de fluorescență corespunzătoare conținutului total de ARN nu indică prezența acestuia.

Imaginile Raman care prezintă distribuția intracelulară a ARN-ului, reprodusă fie prin reprezentarea ariei benzii de la 813 cm^{-1} (imaginea F), fie prin reprezentarea componentului principal ce conține semnal caracteristic ARN-ului (imaginea E din Fig 5.2), se coreleaza bine cu imaginea de fluorescență ce indică distribuția intracelulară a conținutului total de ARN. Regiuni cu conținut mare de ARN sunt observate în special în nucleoli și împrăștiate prin citoplasmă, în timp ce nucleul arată un conținut scăzut de ARN, așa cum se poate observa și în spectrele Raman achiziționate din zonele respective și prezentate în Fig. 5.2I.

Cu toate acestea, nu toate celulele hES investigate prezintă concentrații ridicate de acizi nucleici. Cele mai multe dintre ele au prezentat benzi Raman caracteristice ARN-ului la 813 cm^{-1} fie de intensitate foarte mică, fie suprapuse de semnalul Raman de la alte biomolecule. Analiza PCA a detectat în continuare semnale de la acizi nucleici, deși de cele mai multe ori acestea au fost amestecate cu semnale de la alte biomolecule, de obicei proteine. Fig. 5.3 prezintă analiza Raman a unei hESC tipice în care benzile Raman 813 cm^{-1} au fost prost rezolvate. Componentul principal (imaginea A) prezintă semnal Raman caracteristic acizilor nucleici amestecat cu semnal caracteristic proteinelor. Comparând imaginea de fluorescență DAPI cu imaginea Raman ce arată distribuția PC-ului, se poate observa cu ușurință faptul că regiunile de intensitate mare din imaginea Raman corespund cu nucleul celulei.

Metoda de grupare K-means a fost aplicată pentru spectrele Raman achiziționate pentru a grupa semnale cu conținut biochimic similar (Fig. 5.3D). În ciuda separarii componentelor celulare rezultată în urma aplicării K-means, singurele semnale Raman corespunzătoare acizilor nucleici identificate în spectrele caracteristice clusterilor sunt localizate la 788, 1090, și 1340 cm^{-1}. Pentru a ușura corespondența între imaginea Raman și cea de fluorescență, imaginea Raman K-means a fost suprapusă peste imaginea de fluorescență ce indică distribuția conținutului total de ARN (Fig. 5.3F) și spectre Raman colectate din anumite regiuni din interiorul celulei corespunzătoare fie unor zone cu conținut mare de ARN, fie din contră unor zone cu conținut foarte scăzut, care au fost anterior identificate pe baza celor două imagini suprapuse, au fost analizate în continuare în detaliu. Spectrele roșu și magenta prezentate în Fig. 5.3E corespund nucleolilor celulei. Banda caracteristică ARN de la 813 cm^{-1} prezintă o ușoară creștere în intensitate, putând fi detectată. În plus, o banda de intensitate foarte mică a fost masurată și la 1577 cm^{-1}. Urmând

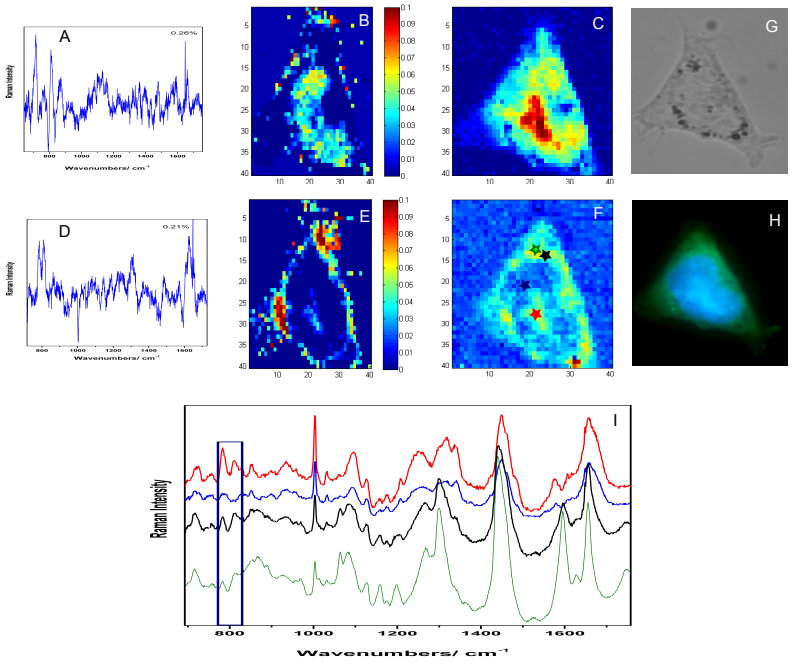


Figure 5.2: Componentele principale ce conțin semnal Raman caracteristic ADN-ului (A) și ARN-ului (D) și imaginile Raman reproduse prin reprezentarea componentelor la fiecare poziție în celulă (B și E). Imaginile Raman corespunzătoare ariei benzilor de la 788 cm^{-1} (C) și 813 cm^{-1} (F), imaginea optică a celulei (G) și imaginea de fluorescență (H) indicând nucleul celulei cu albastru și conținutul total de ARN cu verde. Spectre Raman individuale (I) colectate din pozițiile marcate cu asterisc in nucleu și citoplasmă.

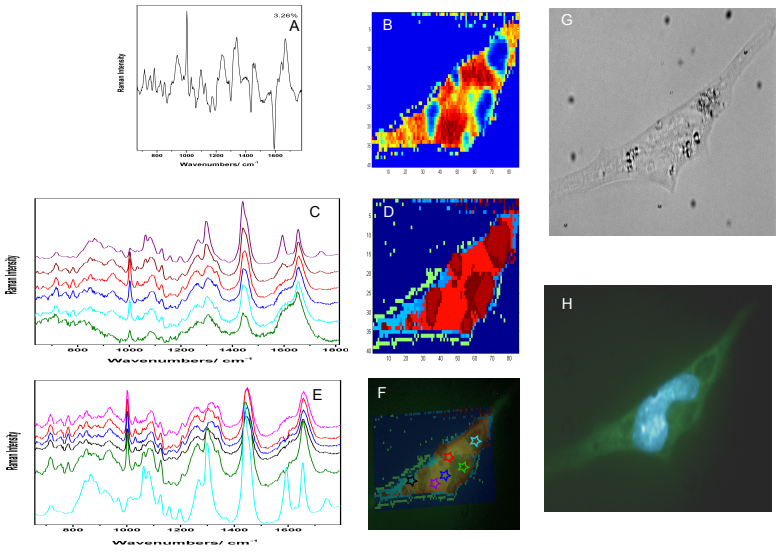


Figure 5.3: Componentul pricipal ce conține semnal Raman caracteristic acizilor nucleici (A) și imaginea Raman corespunzătoare (B), imaginea Raman rezultată din analiza K-means (D) și spectrele Raman mediate caracteristice clusterilor K-means, prezentate cu aceleași culor ca și clusterii cărora le corespund (C). Suprapunerea imaginilor Raman K-means și de fluorescență indicând distribuția intracelulalra a ARN-ului (F) și spectre Raman individuale colectate din pozițiile marcate cu asterisc (E). Imaginea optică a celulei (G) și de fluorescență (H) indicând nucleul cu albastru (DAPI) și conținutul total de ARN cu verde (SYTO RNA Select).

aceeași tendință ca și în celulele investigate anterior, banda de la 813 cm^{-1} scade drastic în spectrele Raman colectate din nucleul celulei (spectrul albastru în Fig. 5.3F). Spectrele Raman achiziționate din zonele citoplasmice care prezentau un conținut ridicat de ARN în imaginea de fluorescență (zonele verzi) au indicat un model spectral similar în regiunea 780–850 cm^{-1} cu spectrele colectate de la nucleoli și un umăr slab a fost observat la 813 cm^{-1}. Dimpotrivă, regiunile întunecate din imaginea de fluorescență au corespuns lipidelor și regiunilor cu lizozomi iar spectrele Raman corespunzătoare au arătat semnal mult scăzut caracteristic acizlor nucleici (spectrele cyan și verde).

Studiile Raman anterioare ale procesului de diferențiere a celulelor stem au concluzionat că diferențele cele mai semnificative între celulele nediferențiate și diferențiate au fost legate de acizi nucleici [66–68]. Procesul de diferențiere implică modificări biochimice care induc noi proprietăți celulelor diferențiate. În funcție de fenotipul specific în care o celulă se diferențiază, sunt produse proteinele necesare care permit funcționarea în mod corespunzător. În acest scop, ARN-ul este folosit pentru a converti informațiile genetice în secvențe de aminoacizi. Astfel, este de așteptat detectarea acestor modifcări biochimice moleculare în spectrele Raman caracteristice celulelor diferențiate. Spectroscopia Raman și imagistica de fluorescență au fost aplicate în continuare pentru a investiga celule fibroblaste derivate din hESCs. Fig. 5.4 prezintă imaginile Raman caracteristice ariei benzii de la 788 cm^{-1} (A), precum și imaginea Raman rezultă K-means (C) caracteristice unei celule fibroblaste tipice. Imaginiea Raman reprodusă prin reprezentarea benzii 788 cm^{-1} se extinde în afara regiunii corespunzătoare nucleului din imaginea de fluorescență. Spectrul albastru colectat de la nucleul celulei (imaginea B) prezintă o bandă 788 cm^{-1} bine solu?rezolvată, în timp ce spectrul Raman caracteristic citoplasmei prezintă conținut bogat de lipide și sărac de acizi nucleici (spectrul roșu). Intensitatea benzilor atribuite acizilor nucleici, 788, 1096, și 1576 cm^{-1} scade drastic. Cu toate acestea, imaginea Raman prezintă o regiune de intensitate medie localizată în citoplasmă care indică un conținut mai crescut de acizi nucleici. Spectrul negru caracteristic acestei zone din Fig. 5.4 B prezintă semnale Raman caracteristice acizilor nucleici care se datorează mai degrabă ARN-ului decât ADN-ului, care este de obicei situat în nucleu.

Analiza K-means a fost aplicată pentru gruparea regiunilor celulare ce prezintă compoziții biomoleculare similare. Scopul acestei analize a fost de a observa tendința de variație în celulă a intensității benzilor Raman caracteristice acizilor nucleici. Imaginea Raman caracteristică rezultatelor K-means și spectrele Raman caracteristice clusterilor K-means prezentate cu aceleași culori ca și clusterilor cărora le corespund sunt prezentate în Fig. 5.4 (C și D). Benzile Raman corespunzătoare acizilor nucleici de cea mai mare intensitate sunt observate în spectrul corespunzător nucleului celulei (clusterul albastru închis). În plus, benzi Raman caracteristice acizilor nucleici de intensitate relativ mare se observă și în spectrul Raman corespunzător membranei periferice (clusterul cyan). Cu toate acestea, banda 788 cm^{-1}, cât și restul benzilor atribuite acizilor nucleici scad rapid în intensitate în spectrele colectate din alte regiuni. In ciuda rezultatelor Raman, imaginile de fluorescență indică prezența ARN-ului si RPS3, ceea ce sugerează faptul că ARN-ul este încă prezent în aceste celule, însă ținând cont că nu a fost detectat în spectrele Raman caracteristice celulelor fibroblaste, este posibil ca concentrația sa să fi scăzut în celule diferențiate până la atingerea unui prag sub limita de detecție a instrumentului Raman folosit pentru aceste studii.

Scăderea conșinutului de ARN și acizi nucleici observat în celulele fibroblaste diferențiate a fost confirmată prin calcularea unui spectru diferență între spectrul Raman mediu caracteristic celulelor stem umane embrionare care prezentau un conținut ridicat de ARN și spectrul caracteristic celulelor fibroblaste(Fig. 5.5). Comparația între spectrul diferență și spectrele Raman ale ADN-ului, ARN-ului, și proteinei HSA achiziționate de la soluții apoase de concentrație 20 mg/ml, indică prezența benzilor caracteristice ARN-ului și ADN-ului în spectrul diferență. Dintre aceste benzi amintim 729 cm^{-1} (adenina), 782 și 785 cm^{-1} (uracil, citozina), și 1578 cm^{-1} (guanina și adenina), în timp ce benzile Raman atribuite vibrațiilor de întindere O-P-O observate atât în spectrul Raman caracteristic ADN-ului, precum și în spectrul Raman caracteristic ARN-ului, sunt observate la 788 și 813 cm^{-1}. Vibrațiile PO_2 sunt observate și la 1090 cm^{-1}. Benzile Raman atribuite proteinelor au fost masurate în spectrul diferență la 851 cm^{-1} (tirozina), 947 cm^{-1} (proteine coloana vertebrală), 1003 cm^{-1} (fenilalanina), 1654 cm^{-1} (amida I). În conformitate cu literatura în domeniu [64, 66], acest studiu indică prezența în catități mai mari a acizilor

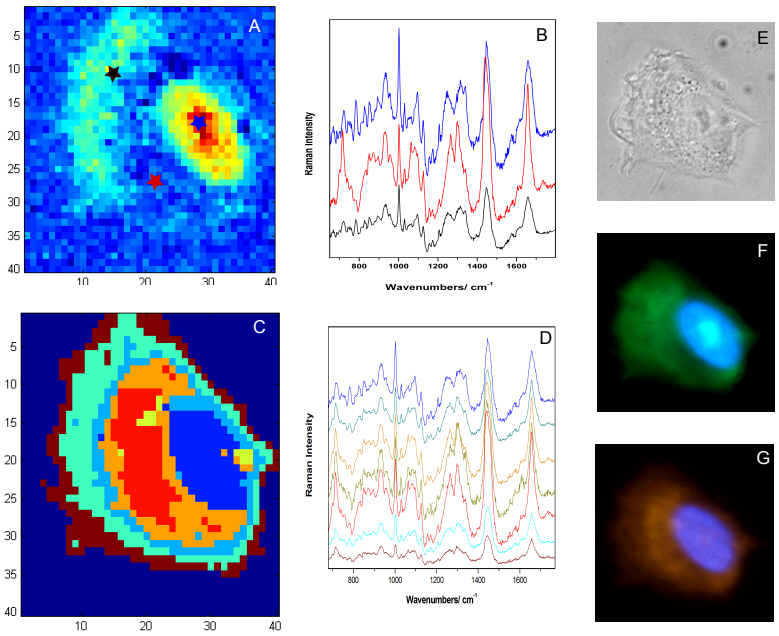


Figure 5.4: Imaginile spectrale Raman caracteristice ariei benzii localizate la 788 cm^{-1} band (A) și rezultatelor analizei K-means (C) corespunzătoare unei celule fibroblaste tipice. Spectre Raman individuale achiziționate din pozițiile marcate cu asterisc (B) din nucleu (asterisk albastru) și citoplasmă (asterisc roșu) și spectrele Raman caracteristice clusterilor K-means prezentate cu aceleași culori ca și clusterilor cărora le corespund (D). Imaginea optică (E) și imaginea de fluorescență (F) indicând nucleul cu albastru (DAPI), ARN-ul cu verde (SYTO RNA Select) și proteinele ribozomale S3 cu roșu (anticorpi marcați cu Cy3).

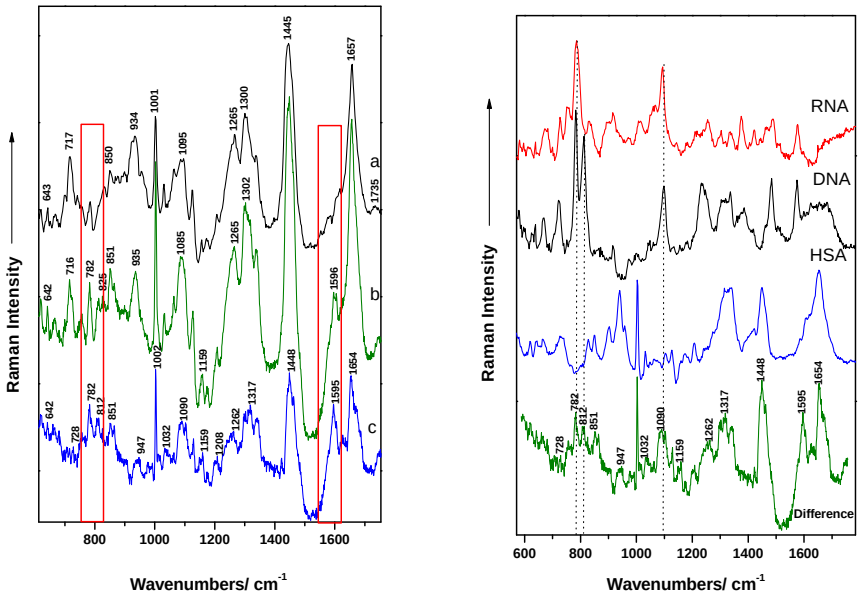


Figure 5.5: (stânga) Spectre Raman mediate caracteristice celulelor fibroblaste diferențiate (a), celulelor stem umane embrionare indicând prezența ARN-ului (b) și spectrul diferență a)-b) (c). (jos) Comparație între spectrele Raman achiziționate de la soluții apoase de ARN, ADN, proteina HSA (human serum albumin) și spectrul diferență anterior calculat.

nucleici și proteinelor în celulele stem umane embrionare nediferențiate, în comparație cu celulele fibroblaste diferențiate ?i constată că regiunile cu conținutul cel mai mare de ARN din celulele nediferențiate sunt situate în nucleoli și citoplasmă.

5.3 Concluzii

Acest studiu prezintă investigații micro-Raman ale celulelor stem embrionare umane și a fibroblaștilor lor diferențiați. Investigațiile prezentate aici au identificat biomarkeri Raman caracteristici procesului de diferențiere și aceștia au fost asociați cu acizii nucleici, în special ARN-ul și proteinele. Astfel, zonele intracelulare cu cel mai mare conținut de ARN au fost observate în nucleolii și citoplasma celulelor nediferențiate. Celule diferențiate au prezentat, în schimb, o scădere drastică a benzilor Raman caracteristice acizilor nucleici, în special ARN-ului. Distribuția ARN-ului cât și a acizilor nucleici a fost monitorizată în imaginile Raman prin reprezentarea la fiecare locație din celulă a ariei benzilor 788 și 813 cm^{-1} atribuite vibrațiilor O-P-O din ADN și respectiv ARN, precum și a componentelor principale ce prezentau semnal Raman caracteristic acizilor nucleici.

Biomarkerii acizi nucleici nu au putut fi însă identificați în toate celulele nediferențiate, fie din cauza concentrației mici din aceste celule, fie ca urmare a suprapunerii semnalului Raman mai intens atribuit altor biomolecule, cum ar fi proteinele sau lipidele, peste semnalul caracteristic ARN-ului. În aceste cazuri, analiza K-means a fost angajatăă pentru gruparea regiunilor intracelulare de compoziții și concentrații similare, cu scopul de a observa tendința de variație a intensității benzilor Raman atribuite acizilor nucleici. Spectrele Raman caracteristice celulelor diferențiate au prezentat o tendință similară cu celulele nediferențiate, semnalul Raman al acizilor nucleici fiind cel mai intens în nucleoli și citoplasmă.

Chapter 6

Concluzii

6.1 Concluzii

Scopul principal al acestei teze a fost de a arăta capacitatea spectroscopiilor vibraționale, și în special a spectroscopiei Raman, pentru aplicații farmaceutice și biomedicale. Principalele obiective atinse sunt rezumate aici.

În primă fază, spectroscopia Raman este aplicată pentru studiul unor entități chimice cu proprietăți farmaceutice promițătoare pentru tratamentul unor boli de piele, bazate pe compuși naturali extrași din scoarța de mesteacăn și dacarbazina, un medicament deja utilizat în tratamentul cancerului de piele. A doua parte a tezei prezintă studiile Raman și SERS *in vivo* și *ex vivo* de diagnosticare și monitorizare a unor țesuturi de piele de șoarece de diferite patologii, datorate tratamentului chimic și pe bază de compușii naturali anterior studiați. Monitorizarea tratamentului pe baza modificărilor la nivel molecular este aratată în ambele cazuri. Ultima parte a tezei abordează un studiu nou bazat pe utilizarea spectroscopiei micro-Raman pentru caracterizarea și identificarea biomarkerilor Raman specifici procesului de diferențiere în celule stem umane.

Primul studiu a avut ca scop caracterizarea vibrațională a compușilor naturali pe bază de scoarță de mesteacăn și a formulărilor lor farmaceutice dezvoltate cu scopul de îmbunătățire a solubilității compușilor. Triterpenele principale din scoarța de mesteacăn au fost identificate pe baza semnaturăii lor spectrale și compusul triterpenic fundamental a fost identificat ca fiind betulinul. Următoarea țintă a studiului a fost de a fundamenta o caracterizare vibrațională completă a betulinului pe baza datelor experimentale spectroscopice și calculelor de teoria funcționalei densitate (DFT). Compușii de incluziune ai betulinului și acidului betulinic cu ciclodextrine și in formulări de nanoemulsii, obținuți cu scopul de a îmbunătății solubilitatea triterpenelor, au fost mai departe caracterizați spectroscopic. Formarea complecșilor de incluziune 1:1 și 1:2 a fost identificată datorită modificărilor spectroscopice subtile observate în spectrele FT-Raman și s-a concluzionat că molecula de betulin interacționează cu cavitatea ciclodextrinei prin gruparea CH_2OH.

Al doilea studiu face este parte tot din domeniul farmaceutic al aplicațiilor spectroscopiilor vibraționale și a fost bazat pe studiile de dezvoltare pre-clinice ale dacarbazinei, un medicament folosit în prezent în chimioterapie. Scopul acestui studiu a fost de a obține mai multe informații despre proprietățile chimice și fizice ale acestei molecule extrem de importantă din punct de vedere biomedical. O caracterizare vibrațională completă a speciilor moleculare neutre, protonate, și deprotonate ale dacarbazinei este prezentată pe baza datelor IR, Raman, SERS, și a calculelor DFT. Prezența speciilor moleculare ale dacarbazinei pe suprafața nanoparticulelor de argint a fost de asemenea observată în urma studiilor SERS. Astfel, s-a concluzionat că molecula de dacarbazină a fost adsorbită la suprafața nanoparticulelor de Ag într-o orientare înclinată față de suprafață, prin gruparea NH_2.

Prima aplicație biomedicală vizată în această teză a fost caracterizarea *in vivo* și diferențierea patologiilor țesuturilor de piele ale unor șoareci tratați chimic și cu compușii naturali anterior studiați, precum și monitorizarea tratamentului la nivel local folosind spectroscopia Raman. Acest obiectiv a fost

atins cu succes și concluziile sunt sintetizate aici.

O bază de date spectrale a fost construită pe baza spectrelor Raman achiziționate *in vivo* de la patru grupuri de șoareci de laborator, unul sănătos (N), unul prezentând melanom de piele în urma tratamentului chimic aplicat (TD), unul tratat cu acetonă (A), și unul tratat cu nanoemulsia de betulin anterior studiată (BE). Analiza spectrelor a permis diagnosticarea patologiilor pielilor de șoarece, precum și monitorizarea tratamentului la nivel local. Principalele diferențe observate în spectrele caracterstice melanomului față de spectrele caracteristice pielii sănătoase au fost creșterea benzilor atribuite în special acizilor nucleici în regiunea 1240–1340 cm^{-1}, intensitatea mare a benzii amidă I relativ la banda CH_2 a proteinelor și lipidelor, și conținut foarte scăzut de carbohidrați. Pe de altă parte, spectrele caracteristice pielii tratate cu nanoemulsia de betulin au arătat un conținut ridicat de amidă III a colagenului și conținut ridicat de glucide, ceea ce sugerează un efect benefic al tratamentului cu betulin.

Următorul scop al acestui studiu a fost de a angaja efectul SERS pentru amplificarea semnalului Raman obținut de la țesuturi biologice. Semnal SERS reproductibil și de înală calitate a fost obținut atât *in vivo* cât și *ex vivo* pe baza căruia patologia țesuturilor de piele a putut fi caracterizată. Spectrele SERS au prezentat benzi amplificate caracteristice în principal acizilor nucleici și proteinelor, indicând o posibilă interacțiune între componentele bio-moleculare cu atomi de N și nanoparticulele de Ag. Principalii biomarkeri SERS pe bază cărora au fost diagnosticate țesuturile de piele a fost raportul dintre benzile acizilor nucleici de la 722 și 655 cm^{-1}. Astfel, melanomul a indicat o creșteres a raportului comparativ cu spectrele sănătoase, în acord cu studiile anterioare și investigațiile Raman *in vivo*.

De asemenea, au fost prezentate rezultatele preliminare care implică dezvoltarea de nanosenzori optici bazați pe nanoparticule metalice decorate cu reporteri Raman. Etichetele SERS au fost caracterizate din punct de vedere spectroscopic și utilizate pentru studii de monitorizare în interiorul țesuturilor de piele. Urmărirea etichetelor SERS în interiorul țesuturilor de piele a fost posibilă pe baza amprentei spectroscopice a reporterului Raman, aici cresil violet. De asemenea, nanosenzorii SERS au permis detecția de semnal SERS caracteristic tesuturilor biologice de piele, în urma adsorbției unor biomolecule pe suprafața nanoparticulelor de Ag. Acest fapt s-a datorat modului de adsorbție a speciilor de cresil violet la suprafața nanoparticulelor de Ag care a condus la obținerea unor nanoparticule amino funcționalizate. Interacția dintre biomoleculele caracteristice țesuturilor de piele și nanosezorii SERS a fost indicată de largirea și deplasarea benzilor Raman caracteristice vibrațiilor NH ale etichetei Raman de cresil violet.

Cea de-a doua aplicație biomedicală prezentată în această teză s-a axat pe investigații micro-Raman male procesului de diferențiere a celulelor stem embrionare umane în celule fibroblaste. Investigațiile prezentate aici au identificat biomarkeri Raman caracteristici procesului de diferențiere și aceștia au fost asociați cu acizii nucleici, în special ARN-ul și proteinele. Astfel, zonele intracelulare cu cel mai mare conținut de ARN au fost observate în nucleoli și citoplasma celulelor nediferențiate. Celule diferențiate au prezentat, în schimb, o scădere drastică a benzilor Raman caracteristice acizilor nucleici, în special ARN-ului. Distribuția ARN-ului cât și a acizilor nucleici a fost monitorizată în imaginile Raman prin reprezentarea la fiecare locație din celulă a ariei benzilor 788 și 813 cm^{-1} atribuite vibrațiilor O-P-O din ADN și respectiv ARN, precum și a componentelor principale ce prezentau semnal Raman caracteristic acizilor nucleici.

Biomarkerii acizi nucleici nu au putut fi însă identificați în toate celulele nediferențiate, fie din cauza concentrației mici din aceste celule, fie ca urmare a suprapunerii semnalului Raman mai intens atribuit altor biomolecule, cum ar fi proteinele sau lipidele, peste semnalul caracteristic ARN-ului. În aceste cazuri, analiza K-means a fost angajată pentru gruparea regiunilor intracelulare de compoziții și concentrații similare, cu scopul de a observa tendința de variație a intensității benzilor Raman atribuite acizilor nucleici. Spectrele Raman caracteristice celulelor diferențiate au prezentat o tendință similară cu celulele nediferențiate, semnalul Raman al acizilor nucleici fiind cel mai intens în nucleoli și citoplasmă.

6.2 Perspective de viitor

Viitoare studii sunt încă necesare pentru a îmbunătăți specificitatea tehnicii Raman pentru aplicații *in vivo*. Baza de date spectrale Raman poate fi încă îmbunătățită și aceasta ar putea servi în viitor drept ghid de referință pentru studii de diagnosticare a țesuturilor de piele. Chiar dacă aceste investigații au arătat activitatea benefică a compușilor pe bază de scoarță de mesteacăn în tratamentul pielii, viitoare studii de toxicitate, precum și cu scopul de a înțelege mecanismul de activitate al compușilor la nivel molecular, sunt necesare.

Datorită efectelor contestabile ale tratamentelor pe bază de dacarbazină, precum și a numeroaselor studii cu scop de elucidare a proprietăților fizico-chimice ale speciilor moleculare de dacarbazină, viitoare studii de detecție ale diferitelor specii de dacarbazină în diferite medii ar fi extrem de importante pentru domeniul biomedical. Un studiu preliminar efectuat în acest sens în ultima perioada a acestui doctorat cu scopul de a detecta dacarbazina în culturi celulare a arătat rezultate promițătoare. Ar fi interesant de continuat acest studiu cu scopul de a se analiza modificările induse de dacarbazină la nivel biomolecular în celule vii.

Studiul de caracterizare al procesul de diferențiere în celule stem prezintă perspective de viitor pentru caracterizarea și monitorizarea în timp real a procesului utilizând spectroscopia micro-Raman. Tehnica poate fi în continuare îmbunatățită prin utilizarea unui sistem Raman cu o rezoluție spațială mai mare. Studii suplimentare sunt necesare pentru a stabili originea exactă a concentrației mai mari de ARN în celulele nediferențiate și acest lucru ar putea fi realizat prin suprapunerea de imagini Raman și de fluorescență care arată distribuția ARN de rezolușie spașțială mai mare și analiza spectrelor Raman individuale achiziționate din regiuni anterior caracterizate din punct de vedre biomolecular.

Bibliography

[1] S. Cutler and H. Cutler, editors, *Biologically active natural products: Pharmaceuticals* (CRC Press LLC, 2000).

[2] J. Drews, Science **287**, 1960 (2000).

[3] T. Kamo, M. Asanoma, H. Shibata, and M. Hirota, Journal of natural products **66**, 1104 (2003).

[4] Y. Hua, M. D. Bentley, B. J. W. Cole, K. D. Murray, and A. R. Alford, Journal of Wood Chemistry and Technology **11**, 503 (1991).

[5] G. M. Cragg and D. J. Newman, Plants as a source of anti-cancer agents, in *Ethnopharmacology, Encyclopedia of Life Support Systems*, edited by E. Elisabetsky and N. Etkin, Eolss, Oxford, 2004.

[6] P. A. Krasutsky, Natural Product Reports **23**, 919 (2006).

[7] S. Jäger, M. N. Laszczyk, and A. Scheffler, Molecules (Basel, Switzerland) **13**, 3224 (2008).

[8] J. Patočka, Journal of Applied Biomedicine **1**, 7 (2003).

[9] A. Falamas, S. C. Pinzaru, V. Chis, and C. Dehelean, Journal of Molecular Structure **993**, 297 (2011).

[10] C. I. Peev, S. Ciurlea, R. Ambrus, and C. Dehelean, Farmacia **58**, 611 (2010).

[11] C. Soica, C. Dehelean, G. Coneac, S. Ciurlea, and Z. Aigner, Toxicology Letters **180**, S221 (2008).

[12] J. Szejtli, Chemical Reviews **98**, 1743 (1998).

[13] C. A. Dehelean, S. Feflea, S. Ganta, and M. Amiji, Journal of Biomedical Nanotechnology **7**, 317 (2011).

[14] P. Shah, D. Bhalodia, and P. Shelat, Systematic Reviews in Pharmacy **1**, 24 (2010).

[15] C. I. Peev, C. A. Dehelean, C. M. Soica, G. H. Coneac, and A. T. Gruia, Toxicology Letters **180**, S100 (2008).

[16] C. Tiulea *et al.*, Studia Universitatis "Vasile Goldis" **20**, 21 (2010).

[17] C. A. Dehelean, C. M. Soica, and C.-C. Toma, Studia Universitatis "Vasile Goldis" **20**, 55 (2010).

[18] J. Szejtli, Pure Appl Chem. **76**, 1825 (2004).

[19] T. Iliescu, M. Baia, and V. Miclaus, European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences **22**, 487 (2004).

[20] S. B. Tiwari and M. M. Amiji, Journal of Nanoscience and Nanotechnology **6**, 3215 (2006).

[21] G. Srinivas, D. Harikrishna, B. Bruce, G. Sanjay, and A. Mansoor, Journal of Biomedical Nanotechnology **4**, 165 (2008).

[22] F. Marchesi *et al.*, Pharmacological Research : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society **56**, 275 (2007).

[23] M. El Aatmani, S. Poujol, C. Astre, F. Malosse, and F. Pinguet, Official Journal of the American Society of Health-System Pharmacists **59**, 1351 (2002).

[24] B. V. Shetty, R. L. Schowen, M. Slavik, and C. M. Riley, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **10**, 675 (1992).

[25] Y. Liu, W. Zhang, and Y. Yang, Talanta **77**, 412 (2008).

[26] O. Koreich and V. Shukla, Clinical Radiology **32**, 53 (1981).

[27] A. Szeghalmi *et al.*, Journal of Molecular Structure **735-736**, 103 (2005).

[28] N. Leopold *et al.*, Vibrational Spectroscopy **39**, 169 (2005).

[29] M. D. Keller, E. M. Kanter, and A. Mahadevan-Jansen, Spectroscopy **21**, 33 (2006).

[30] D. Dhawan, S. Balasubramanian, a. J. Amonkar, and N. Singh, Carcinogenesis **20**, 997 (1999).

[31] C. W. Boone, G. J. Kelloff, and W. E. Malone, Cancer Res. **50**, 2 (1990).

[32] R. Aroca, *Surface Enhanced Vibrational Spectroscopy* (Wiley and Sons, West Sussex, UK, 2006).

[33] F. Bonnier *et al.*, Vibrational Spectroscopy **61**, 124 (2012).

[34] J. Kneipp, H. Kneipp, M. McLaughlin, D. Brown, and K. Kneipp, Nano Letters **6**, 2225 (2006).

[35] D. Ansari, *Raman-encoded nanoparticles for biomolecular detecion and cancer diagnosis*, PhD thesis, Georgia Institute of Technology, 2008.

[36] X.-M. Qian and S. M. Nie, Chemical Society Reviews **37**, 912 (2008).

[37] T. Vo-dinh, F. Yan, and M. B. Wabuyele, Surface-Enhanced Raman Scattering for Biomedical Diagnostics and Molecular, in *Surface-Enhanced Raman SCattering - Physics and Applications*, edited by K. Kneipp, M. Moskovits, and H. Kneipp Vol. 426, pp. 409–426, Berlin Heidleberg, , springer-v ed., 2006.

[38] T. Vo-Dinh, H.-N. Wang, and J. Scaffidi, Journal of Biophotonics **3**, 89 (2010).

[39] M. K. Gregas, F. Yan, J. Scaffidi, H.-N. Wang, and T. Vo-Dinh, Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine **7**, 115 (2011).

[40] W. Xie, L. Su, A. Shen, A. Materny, and J. Hu, J. Raman Spectroscopy **42**, 1248 (2011).

[41] S. Schlücker, Chem. Phys. Chem. **10**, 1344 (2009).

[42] Katrin Kneipp *et al.*, Applied Spectroscopy **56**, 150 (2002).

[43] J. Kneipp, H. Kneipp, W. L. Rice, and K. Kneipp, Analytical Chemistry **77**, 2381 (2005).

[44] K. Kneipp and H. Kneipp, Acc. Chem. Res. **39**, 443 (2006).

[45] Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. Rehman, Applied spectroscopy **42**, 493 (2007).

[46] S. Fendel, B. Schrader, B. Fendel, and S. Schrader, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry **360**, 609 (1998).

[47] H. Wang *et al.*, Journal of Raman Spectroscopy **42**, 160 (2011).

[48] A. Nijssen *et al.*, The Journal of investigative dermatology **119**, 64 (2002).

[49] N. Stone, P. Stavroulaki, C. Kendall, M. Birchall, and H. Barr, The Laryngoscope **110**, 1756 (2000).

[50] M. Gniadecka *et al.*, The Journal of Investigative Dermatology **122**, 443 (2004).

[51] X. Qian *et al.*, Nature biotechnology **26**, 83 (2008).

[52] W. Doering, M. Piotti, M. Natan, and R. Freeman, Advanced Materials **19**, 3100 (2007).

[53] J. Creighton, No Title, in *Advances in Spectroscopy, vol.16*, edited by R. Clark and R. Hester, chap. 2, Wiley, New York, 1988.

[54] S. C. Pînzaru, L. M. Andronie, I. Domsa, O. Cozar, and S. Astilean, Journal of Raman Spectroscopy **39**, 331 (2008).

[55] J. Kneipp, H. Kneipp, B. Wittig, and K. Kneipp, Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine **6**, 214 (2010).

[56] C. Otto, T. van den Tweel, F. de Mul, and J. Greve, J. Raman Spectroscopy **17**, 289 (1986).

[57] O. Aydin, M. Altas, M. Kahraman, O. F. Bayrak, and M. Culha, Applied Spectroscopy **63**, 1095 (2009).

[58] Z. Huang, Z. Li, R. Chen, G. Chen, and D. Lin, J. Physics: Conference Series **277**, 012014 (2011).

[59] J. W. Chan and D. K. Lieu, Journal of biophotonics **2**, 656 (2009).

[60] A. Downes, R. Mouras, and A. Elfick, Journal of Biomedicine & Biotechnology **2010**, 101864 (2010).

[61] I. Notingher and L. Hench, Expert Rev. Med. Devices **3**, 215 (2006).

[62] C. A. Cowan *et al.*, The New England Journal of Medicine **350**, 1353 (2004).

[63] C. Matthäus *et al.*, Proc. of SPIE **6991**, 699106 (2008).

[64] H. G. Schulze *et al.*, Analytical chemistry **82**, 5020 (2010).

[65] F. Bonnier *et al.*, The Analyst **135**, 3169 (2010).

[66] I. Notingher *et al.*, Analytical chemistry **76**, 3185 (2004).

[67] I. Notingher, I. Bisson, J. M. Polak, and L. L. Hench, Vibrational Spectroscopy **35**, 199 (2004).

[68] A. Ghita, F. C. Pascut, M. Mather, V. Sottile, and I. Notingher, Analytical Chemistry **84**, 3155 (2012).

[69] I. Notingher, Sensors **7**, 1343 (2007).