

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ

Александар Г. Савић

**ПРИМЕНА НАПРЕДНИХ
СТАТИСТИЧКИХ МЕТОДА У АНАЛИЗИ
СЛОЖЕНИХ ЕПР И
ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ СПЕКТРА
СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА**

докторска дисертација

Београд, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Aleksandar G. Savić

**APPLICATION OF ADVANCED
STATISTICAL METHODS FOR
DECOMPOSITION OF COMPLEX EPR
AND FLUORESCENCE SPECTRA OF
FREE RADICALS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Ментори:

Др Милош Мојовић, доцент, Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

Др Жељко Вучинић, научни саветник, Институт за мултидисциплинарна истраживања ИМСИ, Универзитет у Београду

Чланови комисије:

Др Ксенија Радотић, научни саветник, Институт за мултидисциплинарна истраживања, Универзитет у Београду

Др Никола Вукелић, ванредни професор, Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

Др Зорана Лужанин, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду

Експериментална истраживања за потребе овог рада изведена су у Институту за мултидисциплинарна истраживања ИМСИ, Универзитета у Београду.

Захваљујем се:

Менторима, др Милошу Мојовићу који је најзаслужији за формирање мене као истраживача. Др Жељку Вучинићу који ме је увео у свет науке.

др Ксенији Радотић, за дипломски, за бројне радове, конгресе, и за то што ми је омогућила да радим на бројним необичним научним проблемима и постанем свестран.

др Николи Вукелићу на добронамерним и стручним саветима

др Зорани Лужанин за сугестије везане за математику

Као и свима од којих сам учио математику: Милану Ратковићу, Томи Војиновићу, Душану Радуловићу, Браниславу Росићу, Аљоши Јовановићу.

Захваљујем се и својим родитељима који су ме подржавали током читавог мог образовања.

И наравно, Катарини Јовановић, за инспирацију.

Примена напредних статистичких метода у анализи сложених ЕПР и флуоресцентних спектра слободних радикала

РЕЗИМЕ

Спектри спин адуката спинског хватача *DEPMPO* омогућавају препознавање више типова слободних радикала. Са усложњавањем спектра, њихова анализа постаје све захтевнија, а класичне методе које се користе у хеометрији за анализу других типова спектра не дају резултате. У раду је описана јединствена аналитичка процедура, помоћу које је могуће разликовање чак 6 типова слободних радикала коришћењем слепо анализе, машинског учења и усмерене анализе независних компоненти.

Рад је јединствен и због методологије, која комбинује два типа спектроскопије, ЕПР спектроскопију и флуоресцентну спектроскопију. На тај начин се избегавају могуће грешке које потичу од хемије флуоресцентних и спинских проба.

Описане статистичке методе су модификоване за анализу слика и тестиране су на микрографијама, чиме се отвара ново поље истраживања слободнорадикалских процеса у живим системима.

Кључне речи: електрон парамагнетна резонанца (ЕПР), флуоресцентна спектроскопија, слободни радикали, мултиваријациона анализа

Научна област: физичка хемија

Ужа научна област: хеометрија

УДК: 543.4

Application of advanced statistical methods for decomposition of complex EPR and fluorescence spectra of free radicals

ABSTRACT

Spin-trap DEPMPO allows recognition of several types of free radicals, thanks to the fact that each DEPMPO spin-adduct has characteristic EPR signal. As more complex spectra become, spectral analysis becomes more challenging task. Since the classical chemometrics methods successfully applied in spectra analysis do not provide desirable results, unique analytical procedure is proposed in this paper. This method is able to distinguish spectral mixtures built up to 6 free radical species, by applying blind source decomposition, machine learning and constrained independent component analysis.

The methodology shown in this paper is unique, because it combines two types of spectroscopy, EPR spectroscopy and fluorescence spectroscopy. Such approach minimizes possible experimental errors originating from chemistry of fluorescence probes and spin-traps.

Described statistical methods were modified for image analysis and tested on micrographs. It opens new field for research of free radical processes in living systems.

Key words: Electron paramagnetic resonance (EPR), fluorescence spectroscopy, free radicals, multivariate analysis

Field of science: Physical Chemistry

Narrow field of science: Chemometrics

UDC: 543.4

САДРЖАЈ

САДРЖАЈ	7
1. УВОД	9
2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	15
2.1. ЕПР СПЕКТРОСКОПИЈА	15
2.1.1. Општи принцип методе спинских хватача	25
2.1.1.1. СПИНСКИ ХВАТАЧ ДЕРМО	26
2.1.1.2. ПОСТУПАК МЕРЕЊА	27
2.1.1.3. РЕАКЦИЈЕ ЗА ГЕНЕРИСАЊЕ СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА.....	28
2.1.1.4. СИМУЛАЦИЈЕ ЕПР СПЕКТРА.....	29
2.2. ФЛУОРЕСЦЕНТНА СПЕКТРОСКОПИЈА.....	31
2.2.1. МЕХАНИЗАМ НАСТАНКА ФЛУОРЕСЦЕНЦИЈЕ.....	33
2.2.1.1. КВАНТНИ ПРИНОС ФЛУОРЕСЦЕНЦИЈЕ	36
2.2.1.2. ПАРАМЕТРИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГ СПЕКТРА	37
2.2.2. ИНСТРУМЕНТАЦИЈА ЗА ФЛУОРЕСЦЕНТНУ СПЕКТРОСКОПИЈУ	41
2.2.3. ОДРЕЂИВАЊЕ ХИДРОКСИЛ РАДИКАЛА.....	46
2.2.4. ОДРЕЂИВАЊЕ СУПЕРОКСИД АНЈОН РАДИКАЛА	47
2.3. ПРИПРЕМА УЗОРАКА	47
2.3.1. ИЗОЛАЦИЈА ПЛАЗМА МЕМБРАНА ПО ЛАРСОНУ	48
2.3.1.1. ПОСТУПАК ИЗОЛАЦИЈЕ ПЛАЗМА МЕМБРАНА ИЗ КОРЕНА КУКУРУЗА.....	52
2.3.2. ИЗОЛАЦИЈА АПОПЛАСТА И ЋЕЛИЈСКОГ ЗИДА БИЉАКА	53
2.3.3. ИЗОЛАЦИЈА МИТОХОНДРИЈА ИЗ КОРЕНА БИЉАКА.....	54
2.3.4. ЕЛЕКТРОЛИЗА ВОДЕ.....	54
2.3.5. ПРИПРЕМА УЗОРАКА ЗА ОСЛИКАВАЊЕ	58
2.4. МАТЕМАТИЧКЕ МЕТОДЕ У АНАЛИЗИ СПЕКТРА.....	58
2.4.1. АНАЛИЗА ЕПР СПЕКТРА БАЗИРАНА НА МУЛТИВАРИЈАЦИОНИМ МЕТОДАМА	59
2.4.1.1. ФАКТОРСКА АНАЛИЗА – FA	60
2.4.1.2. АНАЛИЗА НЕЗАВИСНИХ КОМПОНЕНТИ – ICA.....	66
2.4.1.3. СЛЕПА ИДЕНТИФИКАЦИЈА ДРУГОГ РЕДА, SOBI	68
2.4.2. АНАЛИЗА ЕПР СПЕКТРА У ФРЕКВЕНТНОМ ДОМЕНУ.....	73
2.4.2.1. ФУРИЈЕОВА ТРАНСФОРМАЦИЈА.....	74
2.4.2.2. ТАЛАСИЋИ (WAVELETS).....	75
2.4.3. АНАЛИЗА ЕПР СПЕКТРА ПРИМЕНОМ ФРАКТАЛНЕ АНАЛИЗЕ.....	77
2.4.4. МЕТОДЕ ЗА ПРЕПОЗНАВАЊЕ И КЛАСИФИКАЦИЈУ СПЕКТРА	78
2.4.4.1. ЛИНЕАРНА ДИСКРИМИНАЦИОНА АНАЛИЗА СА ТРЕНИНГ ВЕКТОРИМА	78
2.4.4.2. МЕТОД НОСЕЋИХ ВЕКТОРА.....	79
2.5. МЕТОДЕ ЗА АНАЛИЗУ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ СПЕКТРА И СЛИКА	81
2.5.1. АНАЛИЗА СПЕКТРА ФЛУОРЕСЦЕНТНЕ ПРОБЕ APF.....	81
2.5.2. АНАЛИЗА СПЕКТРА ФЛУОРЕСЦЕНТНЕ ПРОБЕ DPBF	81

3. РЕЗУЛТАТИ	84
3.1. СИМУЛАЦИЈЕ СПЕКТАРА	84
3.2. АНАЛИЗА ЕПР СПЕКТАРА ПЛАЗМА МЕМБРАНА	109
3.3. АНАЛИЗА ПРОИЗВОДЊЕ СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА У ЋЕЛИЈСКОМ ЗИДУ БИЉАКА	122
3.4. АНАЛИЗА ПРОИЗВОДЊЕ СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА У МИТОХОНДРИЈАМА БИЉАКА.....	123
3.5. АНАЛИЗА ПРОИЗВОДЊЕ СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА У РЕАКЦИЈИ ЕЛЕКТРОЛИЗЕ ВОДЕ	124
3.6. АНАЛИЗА ПРОИЗВОДЊЕ СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА У ЛИСТОВИМА БИЉАКА, ПРАЋЕНА ФЛУОРЕСЦЕНТНОМ СПЕКТРОСКОПИЈОМ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОМ МИКРОСКОПИЈОМ.....	125
4. ДИСКУСИЈА	133
5. ЗАКЉУЧАК	138
6. ЛИТЕРАТУРА	139
7. БИОГРАФИЈА АУТОРА.....	148
8. ИЗЈАВЕ	153
ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ	153
ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА	154
ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ	155

1. УВОД

Током протекле две деценије, методе математичке анализе спектра и сигнала значајно су допринеле напретку готово свих спектроскопских метода у тој мери да је настала и нова научна грана – хеометрија. Увођење аналитичких метода нарочито се одразило на тумачење резултата инфрацрвене и FTIR спектроскопије [1-10].

Поступак анализе спектра има за циљ утврђивање броја компоненти које изграђују спектре и форме компоненти помоћу које се појединачне компоненте могу идентификовати.

У почетку су спектри анализирани деконволуцијом или фитовањем функцијама [11,15]. Два су основна недостатка таквог приступа. Да би такав приступ дао поуздане резултате неопходно је прво добро дефинисати једначине које ће бити коришћене за фитовање спектра. Чак и на примеру најједноставнијих, флуоресцентних емисионих спектра, који су облика асиметричне звонасте криве, могуће је применити више типова расподеле које готово подједнако добро описују експерименталне криве (гама са 4 параметара, бета са 4 параметара, лог-нормална...). Велики проблем настаје и због недефинисаног одабира опсега спектра, који може довести до тога да функције значајно одступају од неких делова спектра, било на крајевима или средини која одговара максимуму. Друга тешкоћа односи се на одређивање броја компоненти. Проблем постаје још сложенији ако су сигнали са неповољним односом сигнала и шума, пошто уобичајене методе базиране на смањењу грешке доводе до тога да се врло сличан резултат добија за фитовање помоћу 4 или 5 кривих као и за фитовање којим је одређено 10 или више компоненти. Резултати се делимично могу поправити ако се искористи физичка природа емисионих флуоресцентних спектра, чији емисиони максимум остаје на истој таласној дужини без обзира на таласну дужину побудне светлости. Ако се јављају одступања у положају процењених компоненти спектра у зависности од анализираног спектра, сматра се да број компоненти није правилно процењен [11,12].

Знатно је теже математички представити криве спектра чији облик не спада у функције расподеле које се дефинишу малим бројем параметара. Такав је пример *FTIR*¹ спектра. У циљу анализирања таквог типа сигнала користе се мултиваријационе технике. Предност статистичких метода огледа се у томе што није потребно дефинисати облик појединачних компоненти пре почетка анализе. Недостатак ових метода представља то што није могуће извршити разлагање појединачних спектра (вектора), већ само спектралних матрица, што подразумева варирање услова снимања спектра истог узорка, или снимање већег броја различитих узорка при истим условима. За успешну анализу, неопходно је анализирати најмање онолико сигнала који представљају линеарну комбинацију вектора компоненти са толико различитих коефицијената, колико постоји независних компоненти у систему. Како је приликом снимања биолошких узорка често неопходно мењати експерименталне услове, обично тај број спектра буде и премашен. Теоријски, како би се избегло стапање већег броја компоненти у једну, неопходно је да се коефицијенти линеарних комбинација разликују за различите компоненте у најмање једној анализираној колони спектралне матрице. Тај услов је углавном увек испуњен у реалним експериментима. Ова особина мултиваријационе анализе указује на то да, у неким случајевима, изоловане компоненте не представљају стварне појединачне хемијске врсте, већ скуп хемијских врста које су у различитим узорцима заступљене у истом односу.

У ЕПР спектроскопији математичка анализа и даље није широко коришћена. Разлог је тај, што је за успешну примену ЕПР спектроскопије у проучавању слободних радикала потребно користити спинске хватаче² који поседују могућност истовременог грађења адуката са више типова слободних радикала од којих би сваки морао давати специфичан сигнал [16,20].

¹ Фурије трансформисана инфрацрвена спектроскопија, *eng. Fourier Transformed Infra Red spectroscopy, FTIR*

² Спински хватачи, *eng. spin-traps*

Друга тешкоћа у анализи потиче од форме ЕПР сигнала који спадају у такозване спорадичне сигнале³, за чију анализу многе мултиваријационе методе постају неефикасне [21]. Спорадични сигнали су они сигнали у којима се смењују региони без присуства специфичног сигнала са регионима у којима постоје изражени пикови. Сигнали спинског хватача *DEPMPO* (5-диетоксифосфорил-5-метил-1-пиридин-N-оксид) одликују се присуством великог броја пикова који имају изглед првог извода Гаусове функције. Ако у систему постоји 5 различитих компонентних сигнала, настаје чак 15 група пикова које треба разложити и правилно повезати са осталим како би се препознали специфични спектри адуката. Ако би се таква крива фитовала неком функцијом, велика одступања од тражених компоненти би се јављала у регионима без израженог сигнала у којима доминира шум. Прецизно одређивање таквих региона би захтевало познавање позиције пикова, а то је заправо аналитички задатак.

Основни циљ овог рада је развијање процедуре којом би се сложени ЕПР спектри могли успешно разложити на компоненте. Разлагањем сложеног спектра на компоненте истовремено се добијају две комплементарне информације о анализираном систему. Сазнаје се који су типови слободних радикала заступљени у узорку и у ком међусобном односу. Како не постоји јединствена метода којом би се предложени циљ могао остварити, предложено је да се аналитички процес одвија у више корака, и да буде заснован на статистичким методама:

- У првом кораку је потребно извршити разлагање сложених сигнала на компоненте без икаквог предзнања о форми компоненти⁴.
- У наредном кораку је потребно извршити препознавање компоненти неком од метода машинског учења⁵, уз више провера које користе различите методе.

³ Спорадични сигнали, *eng. sparse signals*

⁴ Анализа без предзнања о траженом решењу, *eng. blind source*

⁵ Машинско учење, *eng. machine learning*

- Последњи корак анализе подразумева да се препознате компоненте могу искористити као улаз у статистичке технике у којима су форма и број компоненти дефинисани пре анализе. На тај начин се постиже висока прецизност, али и робусност у случајевима када постоји базна линија или висок ниво шума.

Осим мултиваријационих техника, у раду су тестиране могућности метода које врше фреквентну анализу сигнала (вектора). Резултати добијени декомпозицијом сигнала лако могу постати улазна матрица података за мултиваријационе технике или класификаторе.

Коначни циљ рада је стварање интелигентног лабораторијског система који би омогућио до данас најпрецизнију и најсвеобухватнију анализу ЕПР спектра. Рад је добра полазна тачка за развој специјализованог софтвера намењеног ЕПР спектроскопији који би се слободно дистрибуирао заинтересованим истраживачким групама.

ЕПР спектроскопија, уз коришћење одговарајућих спинских хватача, даје поуздане резултате али тешко одређује временску динамику појава. Као комплементарна спектроскопска метода, која пружа знатно прецизније праћење временске динамике, намеће се флуоресцентна емисиона спектроскопија. Осим тога, флуоресцентне пробе којима се откривају слободни радикали могу се применити и у флуоресцентној микроскопији, чиме се производња појединих типова слободних радикала може пратити и у временској и у просторној димензији.

Деривати флуоресцеина искоришћени су за синтезу једињења која имају високу специфичност и селективност за одређене типове слободних радикала. До сада су синтетисане вискоспецифичне пробе за хидроксил радикал (2-[6-(4V-амино)фенокси-3Н-ксантен-3-он-9-ил], *APF*) и за супероксид анион радикал (1,3-Дифенилизобензофуран, *DPBF*). Кључ за правилно тумачење резултата лежи у физичкој природи појаве која може бити стварање флуоресцентног продукта у реакцији са слободним радикалом или гашење флуоресценције изазвано слободним радикалима [22-28].

APF у реакцији са хидроксил радикалом постаје флуоресцентан [9]. Временом све више молекула *APF* ступа у реакцију и интензитет флуоресценције расте, све до тренутка када концентрација флуоресцентног *APF* постане толика да се јавља појава гашења флуоресценције⁶. Нагиб криве се прати за одређени број тачака емисионе кинетичке криве и одређује релативну концентрацију хидроксил радикала у узорку. Фитовање малих сегментата криве може да укаже на осцилаторне процесе или да укаже на динамику мешања супстанци, а то је посебно важно за одређивање антиоксидативних својстава супстанци, једињења и смеша које су додате у генераторски систем у коме се производе слободни радикали. Ако се пак испитују системи који спонтано производе хидроксил радикал (биљна ткива, плазма мембране) добија се монотонно растућа права са непромењеним коефицијентом правца, без обзира на опсег мерења.

DPBF у реакцији са супероксид анјон радикалом подлеже гашењу флуоресценције и експоненцијалном опадању интензитета емисије у времену [22]. Изазов за анализу представљају особине испитиваног материјала везане за апсорпцију пробе, деградацију пробе фотоизбељивањем⁷, или за мешање узорка. Последица тога је да се уместо просте експоненцијалне криве морају користити двоструке експоненцијалне криве, при чему једна показује концентрацију супероксид анјон радикала, а друга се односи на динамику процеса деловања антиоксиданса, деградацију пробе или продирања пробе у узорак, што је утврђено у већем броју огледа који смо извели.

Комбиновањем две спектроскопске технике, ЕПР и флуоресцентне спектроскопије, као и већег броја проба које на различит начин ступају у реакцију са слободним радикалима, могу се добити још поузданији резултати. Предност корићења ЕПР спектроскопије са спинским хватачем *DEPMPO* у односу на флуоресцентну спектроскопију представља чињеница да се ЕПР спектроскопијом могу детектовати врсте слободних радикала које су настале у ланцу радикалских реакција. Такав податак је нарочито важан ако се испитују антиоксидативна

⁶ Гашење флуоресценције, *eng. quenching*

⁷ Фотоизбељивање, *eng. photobleaching*

својства супстанци које се су присутне у исхрани. Ако би се открило да таква супстанца ступа у реакцију са хидроксил радикалом, а затим даје неки од органских радикала, то би заправо значило да таква супстанца има још штетније биолошко дејство.

Примена напредних статистичких метода додатно унапређује ЕПР спектроскопију, пружајући прецизан увид у квалитативне и квантитативне промене компоненти, док флуоресцентна спектроскопија пружа прецизан увид у динамику процеса. Уз мале измене улазних података, превођење слике (матрице) у сигнал (вектор), све описане математичке процедуре могу се применити и на серије слика. Тако се морфолошки иста ткива лако могу метаболички класификовати.

2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

У оквиру поглавља “Материјал и методе” детаљно ће бити описан принцип рада ЕПР спектрометра и спектрофлуориметра, као и практична употреба и подешавање апарата за испитивање слободних радикала посредством одговарајућих проба. Обе методе су директно зависне од спинских хватача и флуоресцентних проба, па је неопходно описати и хемију процеса. Заслужено, највећи део заузима опис статистичких метода које су коришћене како би се спектри анализирали и међу њима уочиле и најмање квалитативне и квантитативне промене.

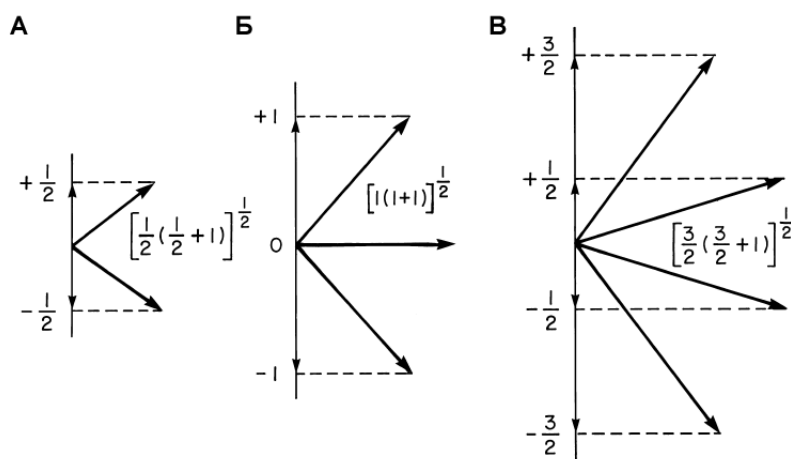
2.1. ЕПР СПЕКТРОСКОПИЈА

Електронска парамагнетна резонанца⁸ је резонантна спектроскопска метода којом се детектује процес резонантне апсорпције микроталасног зрачења у статичком магнетном пољу у системима са једним или више неспарених електрона. Хемијски системи могу бити атоми, молекули и јони. Метода се интензивно користи у физичкој хемији, хемији, физици, биологији, медицини и бројним специјализованим научним областима.

Ако атом или молекул поседује укупни електронски угаони моменат J дефинисан збиром орбиталног момента L и спинског момента S онда ће нужно поседовати и магнетни моменат μ . По уношењу узорка у магнетно поље, B_0 , долази до стварања $2J+1$ Земанових нивоа различите енергије између којих се могу догодити прелази индуковани апсорпцијом кванта енергије једнакој разлици у енергијама Земанових нивоа. У одсуству спољашњег магнетног поља, нивои су истих енергија (дегенерисани), па прелази нису могући.

⁸ Електронска парамагнетна резонанца, позната и под називима: *eng. Electron Paramagnetic Resonance, EPR, eng. Electron Spin Resonance, ESR и eng. Electron Magnetic Resonance, EMR*

Са уношењем узорка у спољашње магнетно поље, вредности укупног спинског магнетног момента μ_S постају квантоване, и одређене су укупним спинским квантним бројем M_S . Број дозвољених вредности за M_S једнак је $2S+1$, од $-S$ до $+S$. За систем са једним неспареним електроном, $S=1/2$, па су могуће вредности спинског квантног броја M_S ($1/2$ или $-1/2$). За систем са два неспарена електрона, $S=1$ а вредности спинског квантног броја M_S ($1, 0$ или -1). Аналогно претходним примерима, систем са 3 неспарена електрона, $S=3/2$, имаће 4 могуће вредности вредности спинског квантног броја M_S ($3/2, 1/2, -1/2$ или $-3/2$). Да би се догодио прелаз између спинских нивоа, неопходно је да се испоштује изборно правило $\Delta M_S = \pm 1$ (слика 1).



Слика 1. Дозвољне вредности укупног спинског угаоног момента $\sqrt{S(S+1)}$ и компоненте M_S дуж фиксираног правца. А – $S=1/2$, Б – $S=1$, В – $S=3/2$.

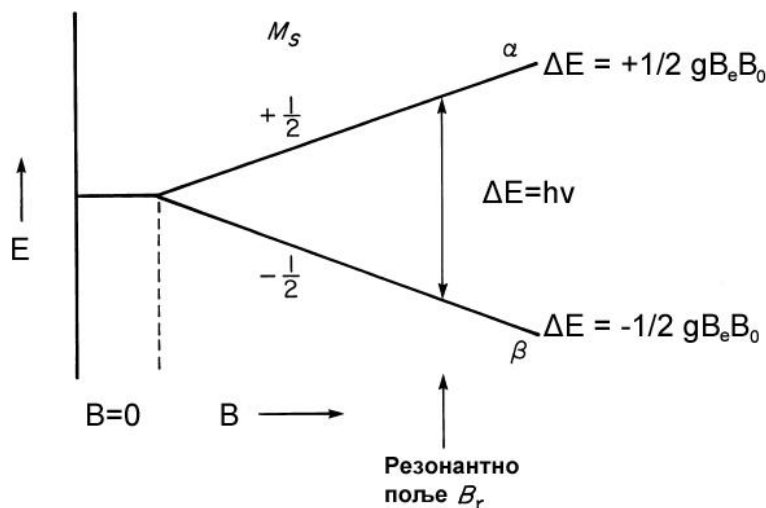
Из тог разлога, прелаз између два Земанова нивоа (слика 2) захтева енергију одређену једначином (слика 2):

$$\Delta E = h\nu = g\beta_e B_0 \quad (1)$$

g – g фактор, β_e – Боров магнетон ($9,27 \cdot 10^{-24} \text{ J/T}$), h – Планкова константа ($6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$), ν – фреквенција микроталаса и B_0 – интензитет спољашњег магнетног поља.

Из ове једначине, мерењем резонантног B_0 и познавањем ν , може се добити g – вредност за одређену ЕПР линију. Резонантни услов у ЕПР спектроскопији са

континуираним озрачивањем⁹ постиже се мењањем интензитета спољашњег магнетног поља на једној фиксној фреквенцији која може бити у областима од 1 – 2 GHz (*L* – област), 2 – 4 GHz (*S* – област), 8 – 10 GHz (*X* – област), 35 GHz (*Q* – област), 95 GHz (*W* – област). Поред *CW-EPR* спектроскопије постоји и пулсна ЕПР спектроскопија¹⁰ чији је принцип рада заснован на озрачивању узорка различитим фреквенцијама при константном магнетном пољу.



Слика 2. Графички приказ дозвољеног прелаза којим се поштује изборно правило $\Delta M_S = \pm 1$.

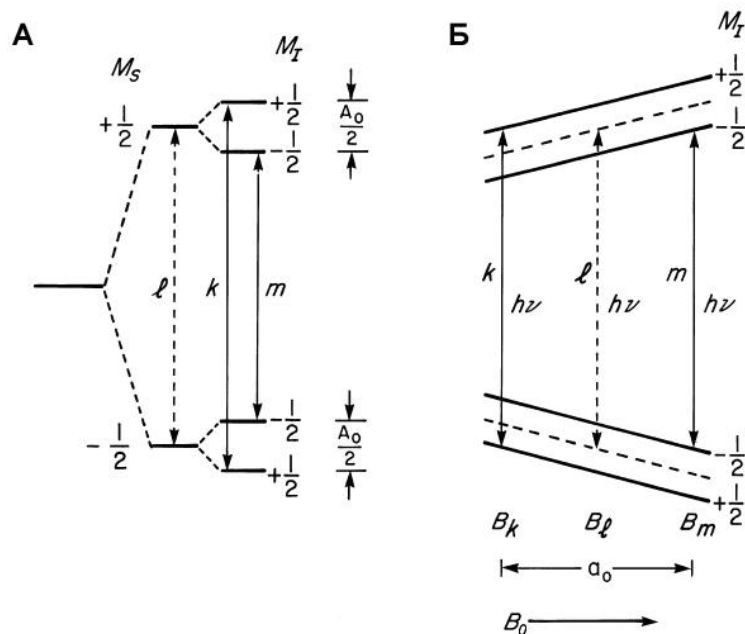
Форма ЕПР сигнала, у погледу броја пикова, осим што зависи од неспарених електрона, одређена је и карактеристикама језгра у близини неспареног електрона. Та појава је позната као хиперфина интеракција. Ако језгро поседује нуклеарни спински магнетни моменат, то ће додатно утицати на цепање енергијских нивоа електрона. Спински квантни број језгра зависи од броја протона (*Z*) и неутрона (*N*) који га изграђују, по правилима:

- Парно *Z*, парно *N*, $I = 0$
- Непарно *Z*, парно *N*, или парно *Z*, а непарно *N*, $I = 1/2, 3/2, 5/2...$
- Непарно *Z* и непарно *N*, $I = 1, 2, 3...$

⁹ ЕПР спектроскопија са континуираним озрачивањем, *eng. Continuous Wave, CW*

¹⁰ Пулсна ЕПР спектроскопија, *eng. Pulse EPR*

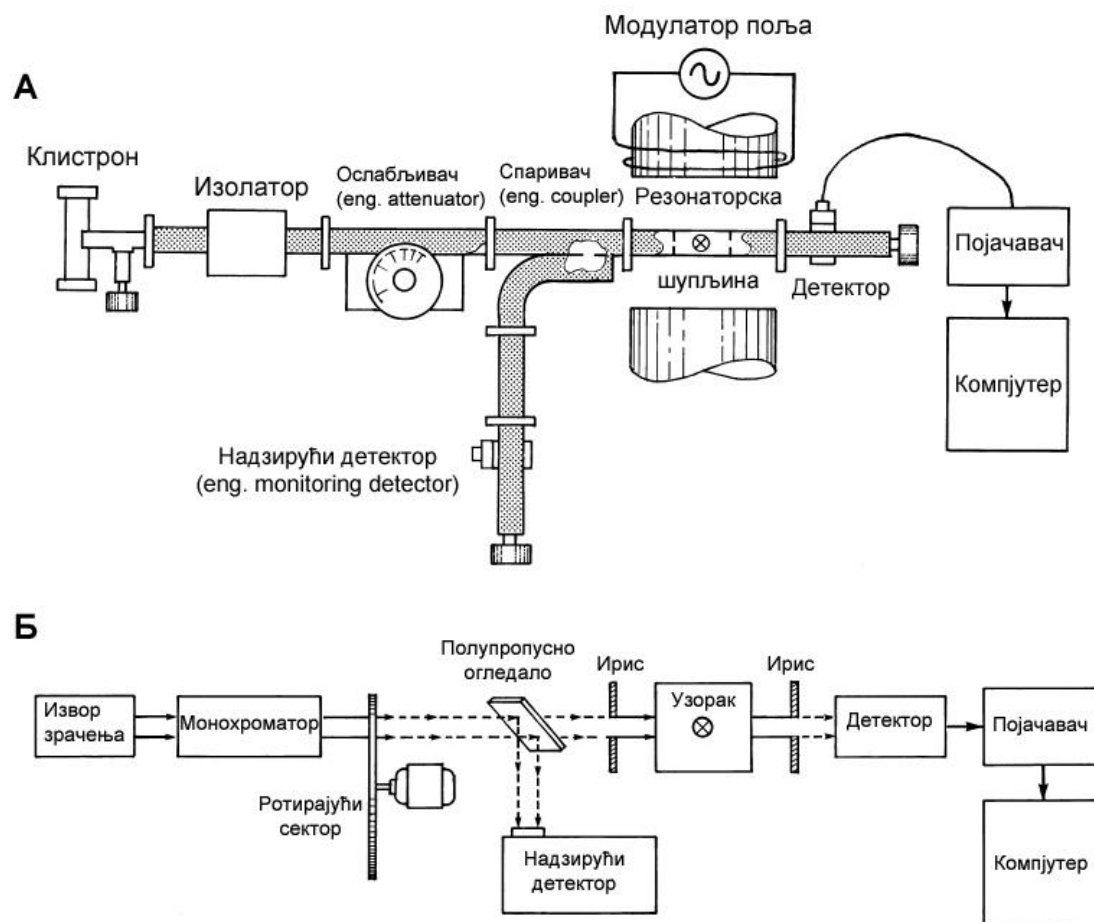
Ако језгра имају $I \neq 0$, долази до додатног цепања електронских енергијских нивоа, па ће за сваку вредност M_S , постојати $2I+1$ додатних нивоа. Ако је укупан спин језгра I , магнетни моменат језгра може имати вредности од $-I$ до $+I$. Прелаз између нивоа могућ је ако је испоштовано изборно правило да је $\Delta M_I = 0$ (слика 3).



Слика 3. А – Енергијски нивои система са једним неспареним електроном и језгром чије је $I = 1/2$ настали као последица хиперфиног цепања у статичком магнетном пољу, Б – Енергијски нивои добијени постепеном линеарном променом интензитета магнетног поља. Испрекидана линија l показује енергијски прелаз који би се одиграо да не постоји хипер-фино цепање нивоа. A_0 – изотропска константа хиперфиног спрежања. Испрекидана линија l одговара транзицији без хиперфине интеракције, док се пуне линије k и m односе на дозвољене прелазе у које су укључене хиперфине интеракције.

Упоредни шематски приказ ЕПР спектрометра са континуалним озрачивањем и класичног спектрофотометра дат је на **слици 4**.

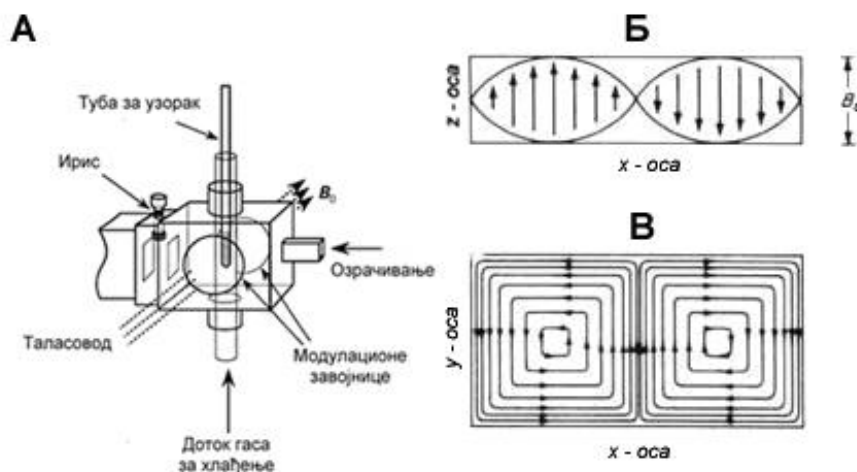
Као извор електромагнетног зрачења у ЕПР спектрометрима, користи се клистрон који емитује монохроматско микроталасно зрачење. Током озрачивања, вредност магнетног поља се линеарно мења. Након што се променом интензитета спољашњег магнетног поља успостави услов за резонанцију, долази до апсорпције енергије микроталаса што се бележи као промена детекторске струје. Спектрометри поседују и систем за модулацију који помоћу наизменичног магнетног поља мале амплитуде једносмерни сигнал преводи у наизменични. Наизменични сигнал се може додатно појачати фазно осетљивим појачавачем. Фреквенција микроталаса која се користи у ЕПР снимањима износи око $9,5 \text{ GHz}$.



Слика 4. А – Шематски приказ *EPR* спектрометра са континуираним озрачивањем (eng. *continuous-wave, cw*). Б – Поређење са оптичким спектрометром.

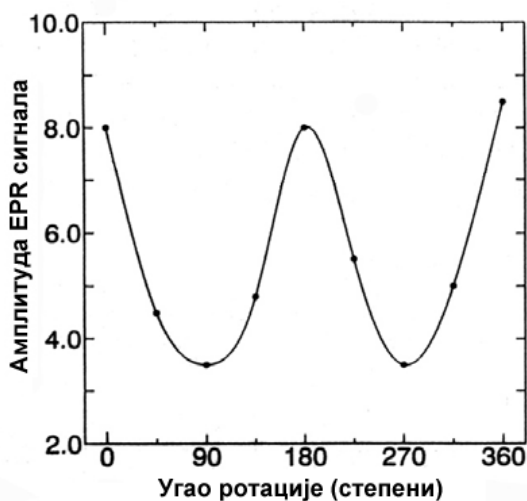
Узорак се смешта у резонаторски простор¹¹. Резонаторски простор је тако конструисан да омогућава излагање узорка максималном интензитету вектора магнетног поља миктораласног зрачења (B_I) таквог да је B_I перпендикуларно оријентисано у односу на спољашње магнетно поље B_0 (слика 5).

¹¹ Резонаторски простор, eng. *cavity*



Слика 5. Резонаторски простор облика паралелопипеда. А – Пресек резонаторског простора. Ирисом се регулише доток микроталасне енергије. Б – Контуре линија електричног поља у xz -равни. В – Контуре линија магнетног поља у xy -равни.

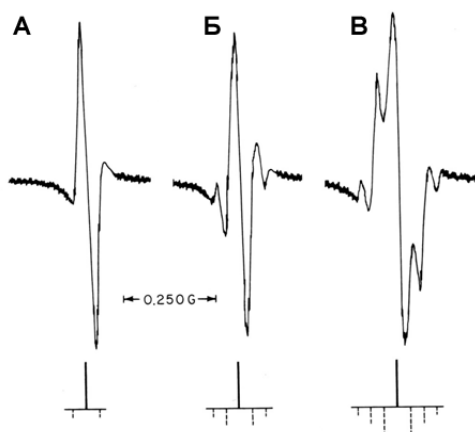
На интензитет линија ЕПР спектра значајно утиче положај узорка у резонаторском простору који се подешава ирисом (слика 6).



Слика 6. Зависност амплитуде ЕПР сигнала од угла ротације филм-дозиметра сниманог у резонатору TE_{102} .

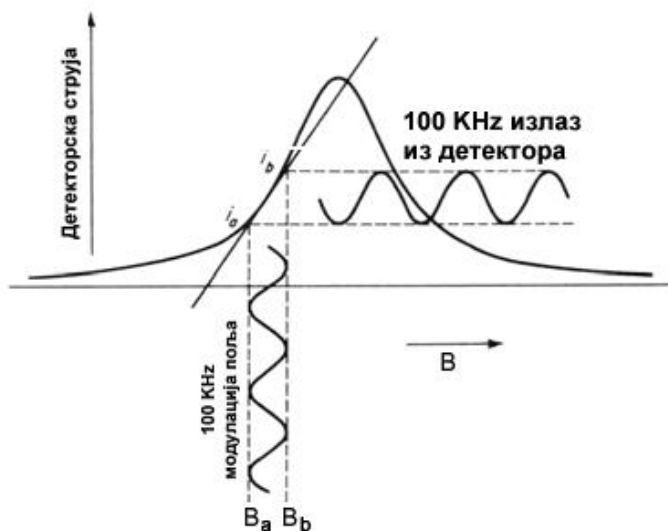
На карактеристичан облик пикова ЕПР спектра значајно утиче и избор модулационе фреквенције. Најчешће се користи модулациона фреквенција од 100 kHz. Мана таквог система огледа се у томе што може узроковати појаву модулационих линија са обе стране апсорпционе линије (± 35 mG). Појава нарочито долази до изражаја приликом снимања врло уских апсорпционих линија реда величине < 50 mG. Интензитет апсорпционих линија се повећава са порастом модулационе амплитуде. Фаза модулационих линија је супротна у односу на апсорпционе линије. Ако се примењују ниске модулационе амплитуде, артефакти

у виду модулационих линија се смањују али се то одражава на смањену осетљивост (слика 7).



Слика 7. Зависност величине модулационих линија које се јављају са обе стране апсорпционе линије F центра у CaO у зависности од модулационе амплитуде. А – Модулациона амплитуда од 4 mG, Б – Модулациона амплитуда од 20 mG, В – Модулациона амплитуда од 50 mG.

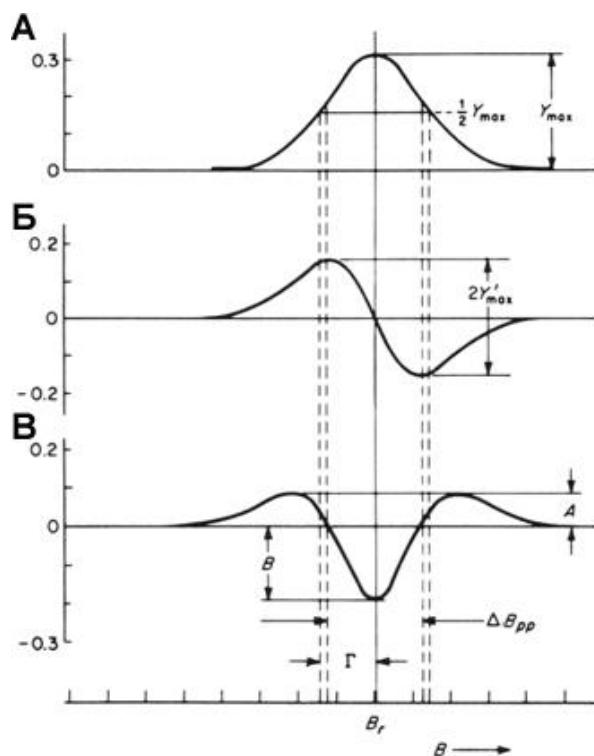
Ако је модулациона амплитуда мала у односу на ширину линије, добија се синусоидна зависност струје детектора која прати облик апсорпционе линије по закону промене модулационе фреквенције магнетног поља (слика 8).



Слика 8. Ефекат модулације магнетног поља малом модулационом амплитудом фреквенције 100 kHz на излазну струју кристалног детектора. Статично магнетно поље се модулира у опсегу од B_a до B_b , при чему се одговарајућа струја детектора мења у опсегу од i_a до i_b .

Апсорпциона линија ЕПР спектра најчешће се приказује као њен први извод, а постоји и могућност приказивања другог извода. Ширина линије се показује или као ширина полувисине апсорпционе линије (Γ) или као ширина између екстремума првог извода (ΔB_{pp}). Интензитет спектралне линије дефинисан

је као укупна амплитуда сигнала између екстремума првог извода апсорпционе линије ($2Y'_{max}$ или A_{pp}) (слика 9).



Слика 9. А – Апсорпциони спектар, Б – Први извод апсорпционог спектра, В – Други извод апсорпционог спектра.

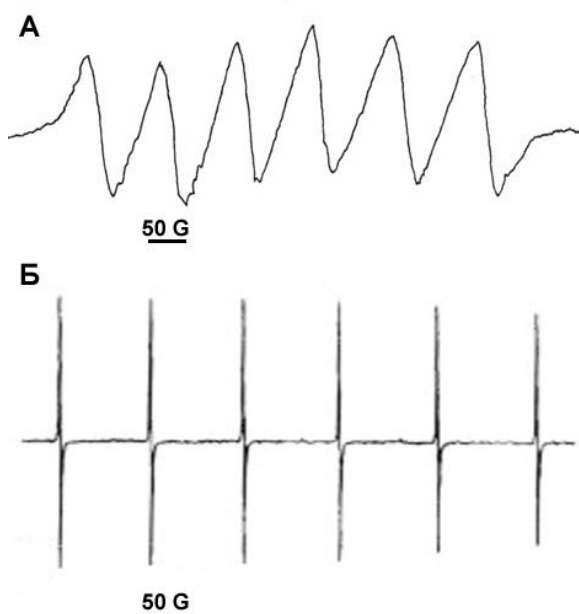
Модулациона амплитуда (MA) је одређена према амплитуди сигнала, при чему се задовољава услов да је $MA \leq 0,2 \Delta B_{pp}$.

Ширина ЕПР линија зависна је од више фактора. Један од фактора је релаксационо време спин-решетка (T_1) које представља дужину живота одређеног спинског стања. Друга појава се назива нехомогено ширење линија, до кога долази када сви спинови нису истовремено у резонанцији, па на њих делује различита вредност спољашњег магнетног поља. Суперпозицијом вредности добија се Гаусовска дистрибуција вредности. До појаве овог ефекта могу довести и нехомогености спољашњег магнетног поља и анизотропност узорка. У веома разблаженим системима, на неспарени електрон делује суседни неспарени електрон који својим магнетним пољем мења флукутирајуће магнетно поље око посматраног електрона. Као резултат долази до ширења ЕПР линија у складу са Лоренцовом дистрибуцијом. Спин-спин релаксација дефинисана је једначином:

$$1/T_2 = \text{const } \Delta H_{pp} \quad \text{односно} \quad 1/T_2 = 1/T_2' + 1/T_1 \quad (2)$$

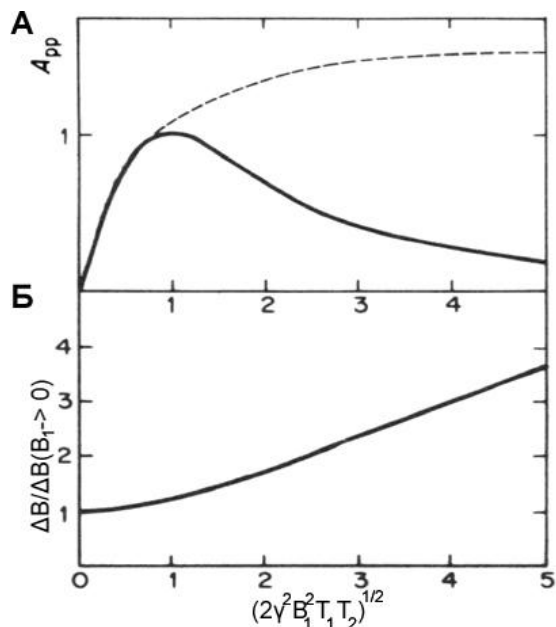
При чему T_2' означава трансверзно спин-спин релаксационо време, T_1 се односи на релаксационо време спин-решетка, а T_2 означава спин-спин релаксационо време.

С обзиром на то да је код већине испитиваних система $T_1 \gg T_2$, може се сматрати да је $T_2 \approx T_2'$. Као пример описане појаве, могу се навести ЕПР спектри мангана у концентрованом раствору MnCl_2 и мангана у смеси $\text{Mn}^{+2}/\text{MgO}$ у којој магнетно разблаживање узрокује сужавање линија (слика 10).



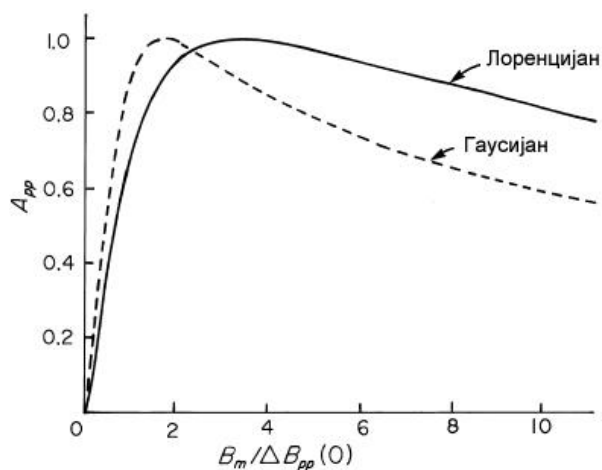
Слика 10. А – Проширене линије спектра услед спин-спин интеракција у концентрованом раствору MnCl_2 , Б – Спектар $\text{Mn}^{+2}/\text{MgO}$.

Снага микроталасног зрачења (P) утиче како на амплитуду ЕПР спектра тако и на ширину спектралних линија. Снага микроталаса одређује интензитет пика и повећање односа сигнала и шума. У областима снаге микроталаса преко 10^{-4} W , амплитуда излазног сигнала пропорционална је корену микроталасне снаге, после чега интензитет опада (слика 11).



Слика 11. А – зависност нормализоване амплитуде првог извода ЕПР сигнала (A_{pp}) од микроталасног магнетног поља (B_1) која је пропорционална снази микроталасног поља ($P^{1/2}$) за ЕПР линију која је хомогено проширена (пуна линија) или нехомогено проширена (испрекидана линија). Б – Зависност ширине ЕПР линије од B_1 за хомогено проширене линије. T_1 – лонгитудинално релаксационо време, T_2 – трансверзално релаксационо време.

Зависност интензитета нормализоване амплитуде првог извода ЕПР сигнала (A_{pp}) од модулационе амплитуде приказана је на **слици 11**. Повећањем МА линеарно се повећава A_{pp} . Како се МА приближава вредности B_{pp} интензитет сигнала почиње да одступа од линеарне зависности. За вредности $MA > B_{pp}$ долази до максимума па затим опада (**слика 12**).



Слика 12. Нормализоване амплитуде пикова (A_{pp}) за прве изводе Лоренцове функције и Гаусове функције у функцији модулационе амплитуде (B_m).

2.1.1. Општи принцип методе спинских хватача

Испитивање метаболизма слободних радикала је од изузетне важности за разумевање бројних биолошких феномена који су везани како за одржавање живота тако и за молекуларни механизам болести.

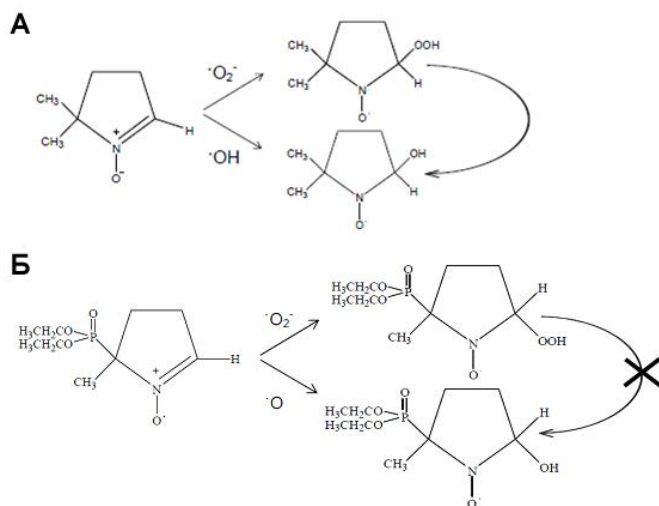
Најтежи задатак у детекцији слободних радикала представља врло кратко време живота, реда величине ns за биолошки заступљен и значајан хидроксил радика. Како би се такав радикал детектовао, неопходно је да ступи у реакцију са неким другим молекулом, који након тога постаје дугоживећи радикал који се може детектовати спектроскопским методама.

Додатни проблем се јавља у системима у којима је истовремено присутно више типова слободних радикала, а таква је већина биолошких система. Идеалан спински хватач мора да испољи или високу специфичност према одређеном слободном радикалу (што је делимично исуњено за флуоресцентне пробе) или да за сваки од радикала обезбеди посебан тип сигнала који би омогућио њихово препознавање, што омогућава искључиво ЕПР спектроскопија. Предност ЕПР спектроскопије лежи и у високој осетљивости у поређењу са спектрофотометријом као и могућности за *in vivo* истраживања, нарочито на ћелијским културама, танким пресецима и листовима биљака. Уз мале измене интруктуријације, аналогно техници *MRI* могу се пратити *in vivo* процеси у све три просторне димензије.

Техника спинских хватача заснива се на реакцији слободних радикала са специфичним нитронским или нитрозо спинским хватачима и детекцијом на *CW-EPR* или пулсним ЕПР спектрометрима, обично у X – области микроталаса. Узорци се смештају у стаклене капиаре, или у тефлонска гас-пропусна цревца ако се током снимања мора одржавати стална атмосфера.

2.1.1.1. СПИНСКИ ХВАТАЧ DEPMPO

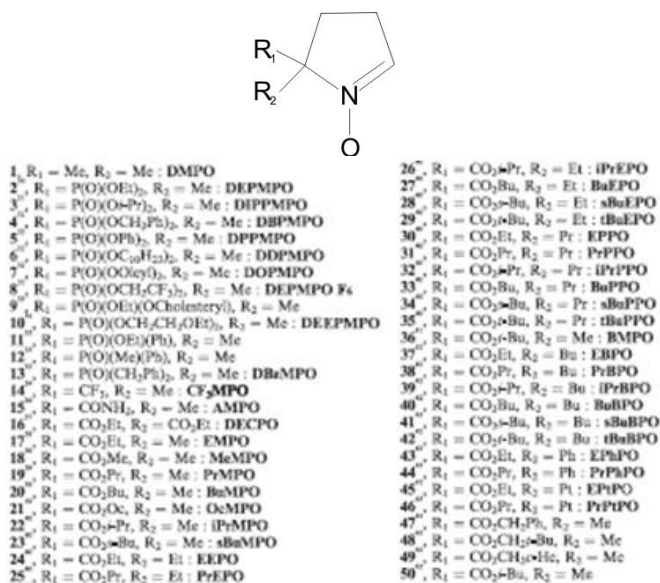
Спински хватач 5-диетоксифосфорил-5-метил-1-пиролин-N-оксид (*DEPMPO*) представља побољшани дериват старијег спинског хватача 5,5-диметил-1-пиролин-N-оксид (*DMPO*). Главни недостатак спинског хватача *DMPO* представљала нестабилност супероксидног спин-адукта који се лако конвертује у хидроксилни адукт. За разлику од *DMPO*, спински хватач *DEPMPO* гради знатно стабилније адукте (слика 13). Пошто *DEPMPO* у својој структури садржи ^{31}P , може се користити и у нуклеарној магнетној резонанци (NMR)¹² спектроскопији и осликавању нуклеарном магнетном резонанцом (MRI)¹³. ^{31}P омогућава и појаву хиперфиног цепања спектралних линија. Захваљујући томе, спинских хватач *DEPMPO* истовремено може да гради више адуката од којих ће сваки имати специфичан сигнал. У нашим тестовима, ово својство је искоришћено како би се истовремено проучавало 6 типова слободних радикала: хидроксил радикал ($\bullet\text{OH}$), супероксид анјон радикал ($\bullet\text{O}_2^-$), метил радикал ($\bullet\text{CH}_3$), метокси радикал ($\bullet\text{CH}_2\text{OH}$) угљен диоксид анјон радикал ($\bullet\text{CO}_2^-$) и водонични радикал [28-35].



¹² eng. Nuclear Magnetic Resonance, NMR

¹³ eng. Magnetic Resonance Imaging, MRI

Захваљујући својој структури, основа молекула спинских хватача *DEPMPO* и *DMPO* дозвољава синтезу бројних других спинских хватача уз промену две функционалне групе (слика 14).



Слика 14. Спински хватачи сродни *DEPMPO* и *DMPO* спинским хватачима, добијени изменама на две функционалне групе основног молекула.

2.1.1.2. ПОСТУПАК МЕРЕЊА

Снимања су обављена спектрометром *Varian E-104A* који ради у *X*-области. Центар поља у свим мерењима био је подешен на 3.410 G, а фреквенција микроталаса у области од $9,3 \pm 0,2$ GHz, прилагођена сваком снимању понаособ. Модулациона фреквенција је износила 100 kHz. Опсег скенирања је подешен у складу са ширином спектра сниманог узорка, а вредност појачања је одређивана по потреби. Модулациона амплитуда и снага микроталаса су подешавани за сваки од узорака понаособ. У оквиру серије мерења, неопходно је задржати параметре снимања којима се обезбеђује очување облика спектра у сваком мерењу. Ако би на пример дошло до ширења спектралних линија, или промене ширине скенираног магнетног поља, такво мерење би било препознато као једна независна компонента. Снимања су вршена на собној температури. Аквиизиција и примарна анализа ЕПР спектра обављена је софтвером *EW software (Scientific Software)*.

Током снимања, узорци су били смештени у 10 cm дуге, гас пропусне, тефлонске капиларе (*Zeus industries, Raritan, NJ*). Унутрашњи пречник цевчица је износио 0,6 mm, са зидом дебљине 0,025 mm. Цевчице су смештане у кварцне капиларе дужине 8 cm, унутрашњег пречника 1,5 mm и зида дебљине 0,7 mm.

2.1.1.3. РЕАКЦИЈЕ ЗА ГЕНЕРИСАЊЕ СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА

Хидроксил радикал ($\bullet\text{OH}$) генерисан је стандардном Фентоновом реакцијом, 0,2 mM FeSO_4 и 0,2 mM H_2O_2 у присуству 0,1 M *DEPMPO* (у свим реакцијама коришћена је иста концентрација *DEPMPO*).

Метил радикал ($\bullet\text{CH}_3$) генерисан је у реакцији 20 mM *DTPA*¹⁴, 0,2 mM FeSO_4 и 0,2 mM H_2O_2 и 10% v/v *DMSO*¹⁵ у пуферу (pH=7,1).

Метокси радикал ($\bullet\text{CH}_2\text{OH}$) је генерисан у реакцији 20 mM *DTPA*, 0,2 mM FeSO_4 , 0,2 mM H_2O_2 и 10% v/v метанола у пуферу (pH=7,1).

Угљен диоксид анион радикал ($\bullet\text{CO}_2^-$) генерисан је у реакционој смеси сачињеној од 20 mM *DTPA*, 0,2 mM FeSO_4 , 0,2 mM H_2O_2 и 15 mM натријум формата у пуферу (pH=7,1).

Супероксид анион радикал ($\bullet\text{O}_2^-$) је генерисан у реакцији рибофлавина под дејством светлости. Реакциона смеша је садржала 0,05 mM рибофлавина, 4 mM *DTPA* и спински хватач *DEPMPO*. Кроз смешу је непрекидно протицао гасовити кисеоник. Смеша је затим осветљавана UV лампом снаге 130 W у трајању од 30 s.

Све хемикалије су аналитичког степена чистоће, произвођача *Sigma-Aldrich*, коришћене су без пречишћавања, осим спинског хватача *DEPMPO*

¹⁴ *DTPA* – диетилен триамин пентасирћетна киселина

¹⁵ *DMSO* – диметилсулфоксид

пречишћеног процедуром по *Jackson*-у, произвођача *Enzo Life Sciences*. Сви раствори су припремљени са дејонизованом водом чија кондуктивност нија мања од 18,2 $M\Omega\ cm$. [37].

2.1.1.4. СИМУЛАЦИЈЕ ЕПР СПЕКТАРА

За симулације спектра спин-адуката спинског хватача *DEPMPO*, коришћен је софтвер *EasySpin*. До решења симулационих проблема, долази се преко формуле спинског Хамилтонијана:

$$\hat{H} = \sum_i \left[H_{EZI}(i) + H_{EFI}(i) \right] + \sum_k \left[H_{NZI}(i) + H_{NQI}(i) \right] + \sum_{i>j} H_{EEI}(i) + \sum_{i,k} H_{HFI}(i,k) \quad (3)$$

H_{EZI} – електрон Земан интеракција, H_{EFI} – *zero-field* интеракција, H_{NZI} – нуклеарна Земанова интеракција, H_{NQI} – нуклеарна квадруполна интеракција, H_{EEI} – електрон-електрон интеракција, H_{HFI} – хиперфина интеракција.

Симулације спектра су биле кључне за успех анализе, пошто је тешко пронаћи системе у којима би сви типови адуката били заступљени. Осим тога, потребно је имати и различите односе заступљености појединих радикалских врста, што се може постићи једино рачунарским симулацијама. Мада је могуће у реакционим системима генерисати појединачне типове слободних радикала, немогуће је једноставно помешати све наведене реакције, пошто би се на тај начин искључиле неке радикалске врсте [38]. Параметри симулација су приказани у **Табели 1**.

Табела 1. Параметри (константе хиперфиног купловања) коришћени у симулацијама ЕПР спектра спин адуката спинског хватача *DEPMPO*.

Спин адукт	<i>aP</i>	<i>aN</i>	<i>aH β</i>		<i>aH</i>		
<i>DEPMPO/OH</i>	46,70	13,64	12,78				
<i>DEPMPO/OOH</i>	50,15	13,00	11,30		0,85		0,35
	48,68	13,80	0,88		10,2	0,41	0,34
	40,8	13,30	1,50		10,00		
<i>DEPMPO/H</i>	45,32	13,97	17,47	3,36			
<i>DEPMPO/CH₃</i>	46,26	14,35	21,48				
<i>DEPMPO/CH₂OH</i>	46,95	14,56	21,8				
<i>DEPMPO/CO₂</i>	51,6	15,7	18,8				
		14,5	17,3				

2.2. ФЛУОРЕСЦЕНТНА СПЕКТРОСКОПИЈА

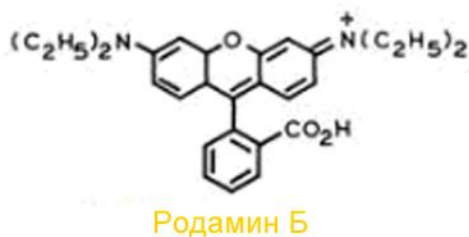
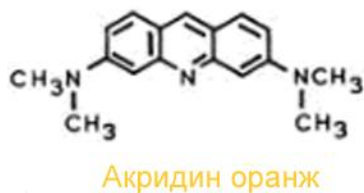
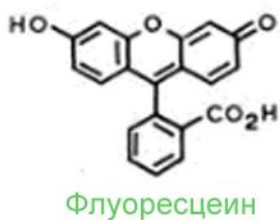
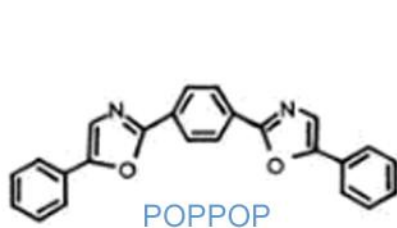
Луминесценција је емисија светлости са било које супстанце, која се појављује услед повратка електрона из побуђеног стања у основно електронско стање. Луминесценција се јавља кроз две појаве – флуоресценцију и фосфоресценцију [38-45].

Флуоресценцију обично испољавају ароматични молекули. Типични молекули који показују флуоресценцију представљени су на **слици 15**.

Флуоресценцију је први опазио Сер Џонатан Фредерик Вилиам Харшел¹⁶ 1845. године [37]. Флуоресценција је уочена тако што је посматрао флашу тоник-воде под правим углом у односу на сунчеву светлост која је обасјавала боцу. Око боце се стварао специфичан, плавичасти ореол. Испоставило се да флуоресценција потиче од кинина. Убрзо су откривене и друге флуоресцентне супстанце. 1855. Стоукс¹⁷ открива да се емисија у односу на побуду помера ка већим таласним дужинама. Као филтере, користио је обојене растворе. Флуоресценција, због своје велике сензитивности, често се употребљава у квалитативним и квантитативним анализама. Висока сензитивност је први пут у пракси примењена 1877. године како би се доказало да су Дунав и Рајна повезане подземним каналом. Флуоресцин је сипан у Дунав, а 60 сати касније, Рајна је почела да флуоресцира.

¹⁶ eng. *Sir John Frederick William Herschel*, енглески математичар, астроном и хемичар, учесовао у открићу фотографије

¹⁷ eng. *Sir George Gabriel Stokes*, ирски математичар и физичар



Слика 15. Типичне флуорофоре, боја одговара емисионим спектрима: *ROPPOR*, квинин, флуоресцеин, акридин оранж, родамин Б, пиридин I [38, модификовано].

2.2.1. Механизам настанка флуоресценције

Већину молекула (нарочито органских) одликује основна електронска конфигурација са спареним електронима. Укупан спин основног стања стога ће бити једнак нули. Такво стање назива се синглетно стање. Синглетна стања се обележавају словом S , са одговарајућим индексом, па ће се основно синглетно стање обележавати са S_0 .

По апсорпцији фотона UV или видљиве светлости (10^{-15} s) индукује се прелаз електрона из највише попуњене орбитале у празну молекулску орбиталу. Прелаз (диполне природе) настаје интеракцијом електричног диполног момента молекула и електричне компоненте апсорбованог зрачења. Приликом прелаза оријентација спина електрона бива или иста почетној или се мења.

Ако при прелазу збир спинова остане једнак нули, побуђено стање је синглетно, S_1 . Ако су спинови побуђеног електрона и електрона који је остао у основном стању истог знака, укупан спин ће имати вредност 1, па се настало побуђено стање назива триплетно стање, T_1 . Сваком синглетном стању одговара триплетно стање. Триплетна стања одликује мања енергија у односу на синглетна.

Апсорпцијом фотона, спински дозвољеним прелазом, молекул се преводи из основног синглетног стања S_0 у побуђено синглетно стање S_1 . Након тога долази до брзе релаксације одавањем вишка енергије емисијом или нерадијативном процесима, чиме се молекул враћа у основно синглетно стање.

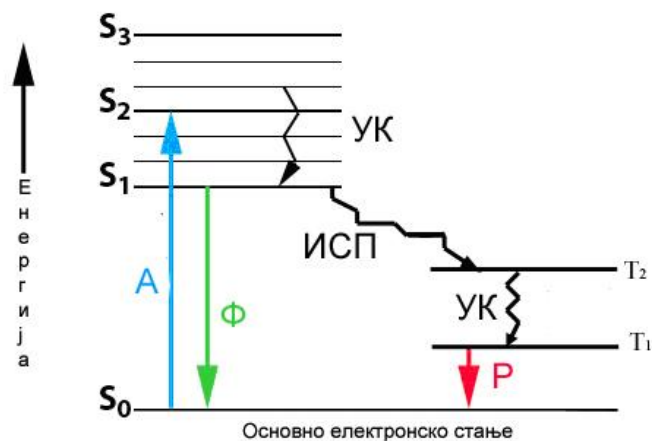
Свако електронско стање садржи низ вибрационих нивоа. На собној температури већина молекула се налази у основном вибрационом нивоу ($v''=0$) основног синглетног електронског стања S_0 . Апсорпцијом фотона одговарајуће енергије електрон се преводи у побуђено S_1 стање, а вибрациони ниво тог новог стања може бити било који. Време побуђеног стања је реда величине $10^{-9} - 10^{-7}$ s, након чега се молекул враћа у S_0 стање. Време реда ns делује кратко ако се мисли на кретање, али према Ајнштајновој једначини $\Delta x^2 = 2D\tau$, D – дифузиони коефицијент, τ – време које одговара трајању побуђеног стања, прерачунато за воду на 25 °C, долази се до податка да молекул у побуђеном стању може прећи

око $70 \text{ \AA}$, а то је даљина која одговара дебљини мембрана ћелије. Флуорофоре које у побуђеном стању проведу 400 ns прелазе $450 \text{ \AA}$.

Како ће се процес релаксације одвијати, зависи од стања система посматраног система. Ако се ради о гасу, под ниским притиском, вероватноћа судара молекула (а тиме и нерадијативних процеса) биће мала. Ре-емисија апсорбованих фотона одвијаће се процесом који се назива резонантна флуоресценција (РФ).

У систему молекула који су у гасу под високим притиском или у течности, молекули се сударају међусобно у времену које је реда величине $10^{-13} - 10^{-11} \text{ s}$ што је знатно краће у односу на време побуђеног стања молекула. Апсорбована енергија се углавном преводи у топлоту, и молекули се на тај начин враћа у основни вибрациони ниво S_1 стања. Овај процес се назива вибрациона релаксација (ВР).

Даља релаксација електрона до S_0 стања, може се догодити нерадијативно, одавањем топлоте и назива се унутрашња конверзија (УК) или нормалном флуоресценцијом (НФ). Процеси су међусобно конкурентни, а који ће преовладати зависи од разлике у енергијама S_0 и S_1 стања. Ако више вибрационе нивое S_0 стања одликује енергија слична S_1 , вероватније је да ће релаксација наступити нерадијативним процесима (сударима), **слика 16**.



Слика 16. Шематски приказ енергијских нивоа у молекулу, и повратак електрона у основно енергијско стање. А – апсорпција фотона, Ф – флуоресценција, S – синглетно стање, Т – триплетно стање, УК – унутрашња конверзија, ИСП – интерсистемски прелаз. Јаблонски [39], модификовано.

Дакле, нормална флуоресценција (флуоресценција) јесте емисија која настаје прелазом електрона из основног вибрационог нивоа побуђеног S₁, или у случају азулена и његових деривата, S₂ побуђеног стања у основно S₀ стање. Последица описаног настанка флуоресценције је да фреквенција флуоресцентног зрачења не зависи од фреквенције побудног зрачења, осим ако се ради о резонантној флуоресценцији. По аналогији са хромофорама, молекули или групе атома у молекулу које одликује појава флуоресценције називају се флуорофоре.

Већина молекула не поседује способност флуоресценције. Код органских молекула S₁ → S₀ прелази укључују $\pi^* - \pi$ и $\pi^* - n$ прелази, при чему су $\pi^* - \pi$ прелази вероватнији. Интензивна флуоресценција се запажа код хетероцикличних молекула (триптофан), који имају $\pi^* - \pi$ стања и код планарних молекула са прстенастом структуром (родамин Б, флуоресцин, акридинске боје). Неорганска једињења, органометална, комплекси хром, уранил јона, лантаноида (еуропиум и тербиум) могу да имају $f - f$ прелази. Лантаноиде одликује слаба апсорпција, па се због тога обично не побуђују као самостални, већ хелирани са органским молекулима. Спектри показују линије, пошто су атомски. У биолошким системима могу бити замена за Са па се употребљавају за имуноесеје.

2.2.1.1. КВАНТНИ ПРИНОС ФЛУОРЕСЦЕНЦИЈЕ

Ефикасност флуоресценције дефинише се квантним приносом, количником броја емитованих и апсорбованих фотона [17].

$$\Phi_F = \frac{\text{број емитованих фотона}}{\text{број апсорбованих фотона}} \quad 0 \leq \Phi_F \leq 1 \quad (4)$$

Вредност Φ_F , квантног приноса зависи од конкурентних радијативних и нерадијативних процеса.

Укупна константа брзине смањивања броја побуђених молекула k може се добити сабирањем константи брзина свих конкурентних процеса који доприносе релаксацији.

$$k = k_F + \sum_i k_i \quad (5)$$

k – константа брзине флуоресценције, $k_u = \sum_i k_i$ – константе брзина свих нерадијативних процеса.

Тако дефинисан, флуоресцентни принос се може представити преко константи k_F и k_u .

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + \sum_i k_i} \quad (6)$$

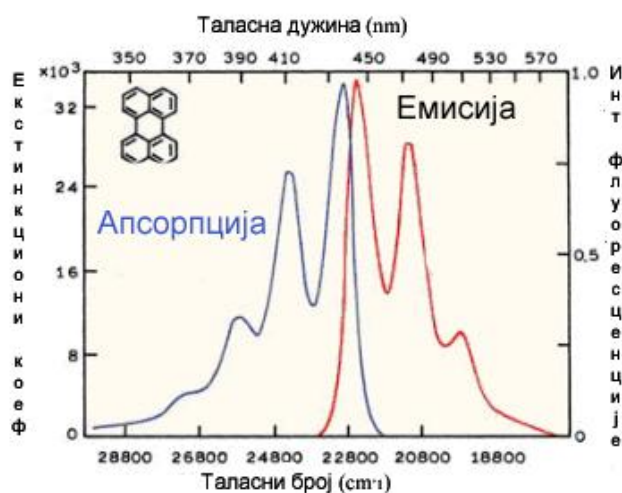
Реципрочну вредност константе k представља време релаксације τ (време живота) побуђеног стања, а реципрочна вредност k_F – време трајања флуоресценције τ_F . Квантни принос флуоресценције се може приказати обрасцем:

$$\Phi_F = \frac{\tau}{\tau_F} \quad (7)$$

За дату супстанцију Φ_F је карактеристична, и значајан је податак који служи за квалитативну анализу датог једињења.

2.2.1.2. ПАРАМЕТРИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГ СПЕКТРА

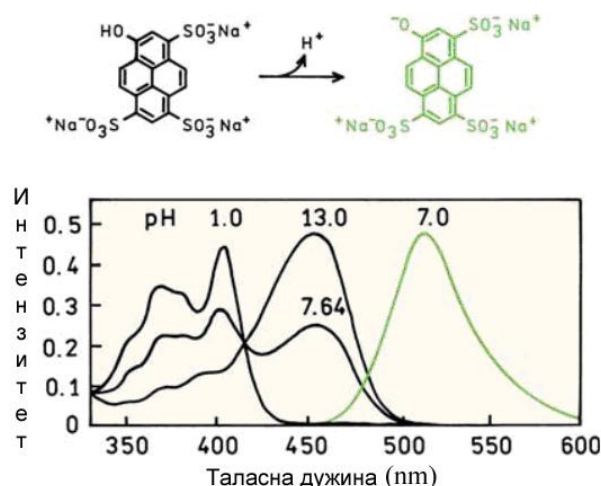
У односу на апсорпционе спектре, флуоресцентни спектри су померени ка већим таласним дужинама услед тога што се прелази дешавају са првог вибрационог нивоа S_1 стања на неки од вибрационих нивоа S_0 стања. Зато ће флуоресцентни спектри давати податке о вибрационим нивоима основног стања, док апсорпциони спектри дају информације о вибрационим нивоима побуђеног стања. Ротациони нивои, због своје мале енергије, немају утицаја на флуоресцентне спектре. Пример спектра перилена у бензену приказан је на **слици 17**.



Слика 17. Апсорпциони (плаво) и емисиони (црвено) спектар перилена у бензену [19, модификовано].

Изузетак од правила да су апсорпциони и емисиони спектри један другом одраз у огледалу јесте спектар $HPTS^{18}$. На ниском pH хидроксилна група $HPTS$ се протонује и апсорпциони спектар показује вибрациону структуру типичну за ароматичне угловодонике. Емисиони спектар показује велико Стоксово померање и нема вибрациону структуру. Фенол у тирозину показује две врсте емисије у зависности од pH . Спектар $HPTS$ приказан је на **слици 18**.

¹⁸ $HPTS$ – 1-хидроксипирен-3,6,8-тиосулфонат



Слика 18. Формула *HPTS*-а (горе), апсорпциони спектар *HPTS* раствореног у води на *pH* 1, 7,64 и 13 (црно) и емисиони спектар на *pH* 7 (зелено) [39, модификовано].

Интензитет флуоресценције одређен је природом супстанце, а не таласном дужином побудног зрачења (неопходном минималном енергијом за побуђивање). У томе се флуоресцентни спектри разликују од Раманских, који се могу јавити приликом регистравања флуоресценције и откривају се тако што се примети померај њиховог максимума са променом побудне таласне дужине.

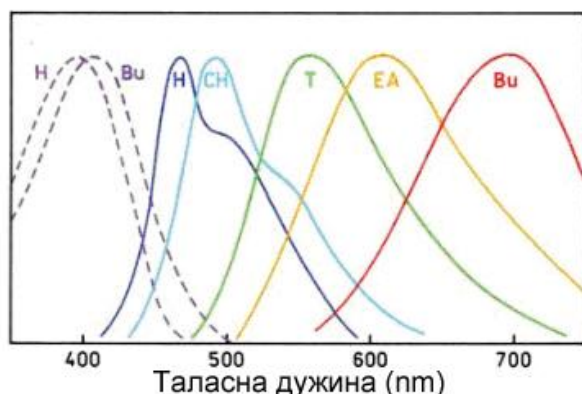
Према једначини $I_F = \Phi_F I_a = \Phi_F (I_0 - I_p)$, интензитет флуоресценције I_F зависи од квантног приноса Φ_F као и од интензитета апсорбованог зрачења I_a , односно разлике интензитета упадног зрачења I_0 и интензитета пропуштеног зрачења I_p . Једначина се може приказати и у облику Ламберт-Беровог закона:

$$I_F = \Phi_F I_0 \left(1 - \frac{I_p}{I_0} \right) = \Phi_F I_0 \left(1 - e^{-\epsilon c b} \right) \quad (8)$$

ϵ – моларна апсорптивност ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), c – концентрација ($\text{mol}^1 \text{dm}^{-3}$), b – дебљина слоја (cm).

Растварач има велики утицај на параметре флуоресцентног спектра (λ_{max} , интензитет). Како молекул (флуорофора) има различиту расподелу електрона у основном и у побуђеном стању, његова поларност ће се разликовати у та два стања, а самим тим и његова интеракција са молекулима растварача. У ексцитативном стању молекули имају већи диполни моменат.

У зависности од поларности растварача, таласна дужина на којој се јавља максимум емисије драстично варира, **слика 19**.



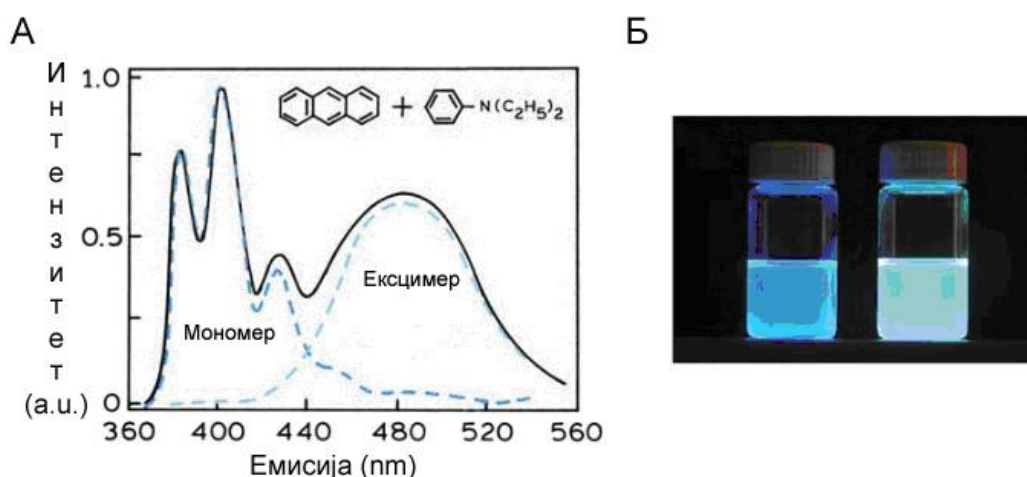
Слика 19. Апсорпциони (испрекидана линија) и емисиони (пуна линија) спектри L-диметиламинонафтаген-5-сулфонил хлорида (*DNS*), који се користи као флуоресцентни обележивач, у растворима са растућом поларношћу: *H* – хексан, *CH* – циклохексан, *T* – толуен, *EA* – етилацетат, *Bu* – н-бутанол [39, модификовано].

Одабир поларног или неполарног растварача може довести до тога да супстанца уопште не флуоресцира или мало флуоресцира. Ако се молекул чија је флуоресценција узрокована $\pi^* - n$ прелазом раствори у неполарном растварачу, вероватоћа за тај прелаз ће бити мала, а самим тим и флуоресценција. Растварањем у јако поларном растварачу, редослед побуђених стања би се могао пореметити, па би се јавили $\pi^* - \pi$ прелази који су знатно вероватнији, што за последицу има флуоресцентни спектар који је интензиван. Ова особина нарочито је применљива за проучавање транзитних стања мембрана, у којима су јасно дефинисане поларна (водена) страна и неполарна (липидна). До гашења флуоресценције може доћи ако растварач гради водоничне везе са флуорофорама и повећава вероватноћу нерадијативних процеса. Ако су растварачи вискозни, смањиће вероватноћу судара између молекула и тиме проузроковати повећање интензитета флуоресценције.

При високим концентрацијама (ароматични угљоводоници) долази до појаве ексцимера¹⁹, побуђених димера. Последица формирања ексцимера је смањење интензитета флуоресценције мономера. Спектри ексцимера померени су ка већим таласним дужинама, а одликује их и шири максимум. Појавом

¹⁹ Ексцимер, *eng. excitation dimer*

ексцимера, престаје да важи правило симетрије апсорпционих и флуоресцентних спектра. Пример спектра мономера и ексцимера приказан је на **слици 20**.



Слика 20. А – Емисиони спектри антрацена у толуену који садржи 0,2 М диетилаланина. Испрекиданом линијом су означени емисиони спектри антрацена и његовог ексцимера. Б – разлика у боји емитоване светлости раствора у којима су присутни само мономер антрацена и смеша мономера и димера антрацена. [39, модификовано].

Смањењу флуоресценције доприносе и гасиоци који апсорбују побудно зрачење, апсорбују емитовано зрачење или повећавају вероватноћу нерадијативних процеса. Од неорганских гасиоца познати су O_2 , јони халогена, амини, јони прелазних метала (Fe , Ni , Mn). Органски гасиоци су угљентетрахлорид и карбонилна једињења. Механизам гашења је различит. Тако на пример, гашење индола акриламидом вероватно потиче од трансфера електрона са индола на акриламид када је он у побуђеном стању. Гашење халогенима (Br и I) или тешким атомима (Au и Ag) настаје услед спин-орбитала спрезања и интерсистемског прелаза у триплетно стање. У ретким случајевима постојање страних молекула или јона доводи до повећања флуоресценције (сензибилизована флуоресценција). Коализионо гашење се јавља када се флуорофоре у ексцитованом стању деактивирају контактом са молекулима растварача (гасиоцима). Појаву описује Штерн-Волмерова²⁰ једначина:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (9)$$

²⁰ Штерн-Волмерова једначина, *eng. Stern-Volmer equation*

K – Штерн-Волмерова константа гашења, k_q – бимолекулска константа гашења, τ_0 је време живота, $|Q|$ је концентрација гасиоца. Осим коализионог гашења, постоји и могућност да флуорофоре награде нефлуоресценте комплексе са гасиоцем.

Околина, осим што утиче на флуорофору, исто тако може утицати и на гасиоце, тако да штити флуорофору од њих. Нарочито добра заштита флуорофора се постиже стерним сметњама. Тако се етидијум бромид везан за ДНК ефикасно штити од молекулског кисеоника. Могућност кисеоника да гаси флуоресценцију употребљава се за одређивање пермеабилности мембрана за кисеоник.

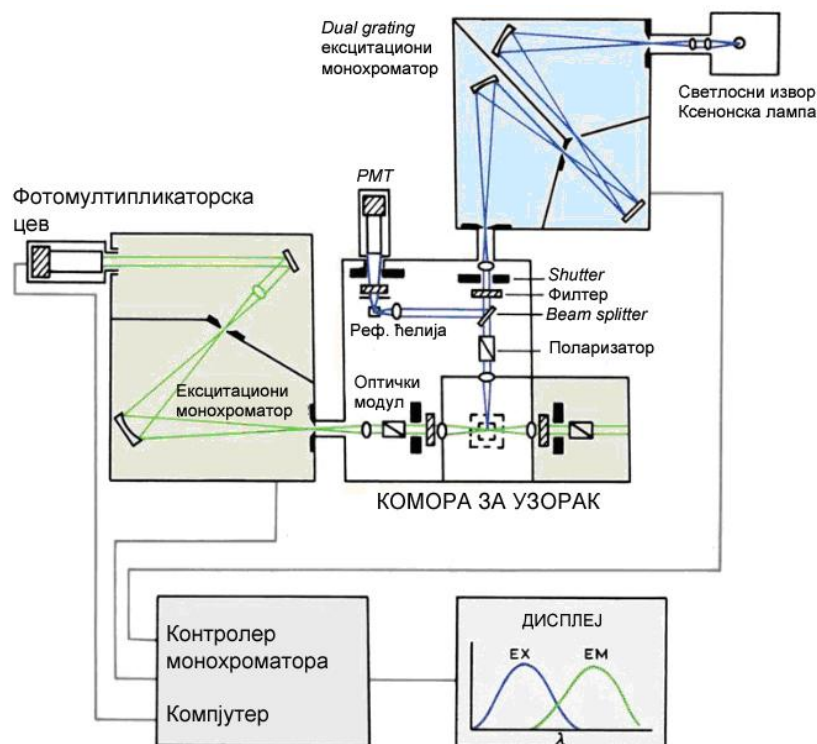
Ефикасност флуоресценције опада са порастом температуре, због повећања вероватноће судара, као и због смањења вискозности растварача. pH не утиче једнозначно на параметре флуоресценције. Често се промене одигравају нагло, у уском опсегу вредности pH .

2.2.2. Инструментација за флуоресцентну спектроскопију

Спектрофлуориметар је сложен уређај са бројним оптичким компонентама које имају и физичка и техничка ограничења, а морају да обезбеде високу осетљивост и прецизност мерења. Лампа, извор светлости мора да обезбеди светлост сталног интензитета, монохроматори да је рашчлане на таласне дужине. Детектори морају да у кратком периоду региструју фотоне и да сигнал не контаминирају због присуства других електронских компоненти у уређају.

Већина спектрофлуориметара има могућност снимања и ексцитационих и емисионих спектара. Емисиони спектар је расподела по таласним дужинама мерена на једној, константној побудној таласној дужини. Ексцитациони спектар је зависност интензитета емисије мерен на једној емисионој таласној дужини док се таласна дужина ексцитације мења. Спектри се приказују у функцији таласних дужина (nm) или таласних бројева (cm^{-1}).

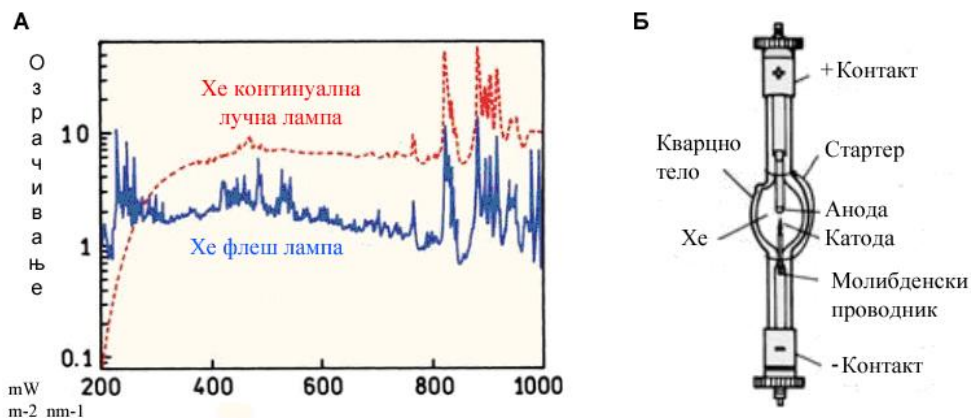
На **слици 21**, шематски су приказани најважнији делови спектрофлуориметра.



Слика 21. Шематски приказ делова спектрофлуориметра [2, модификовано].

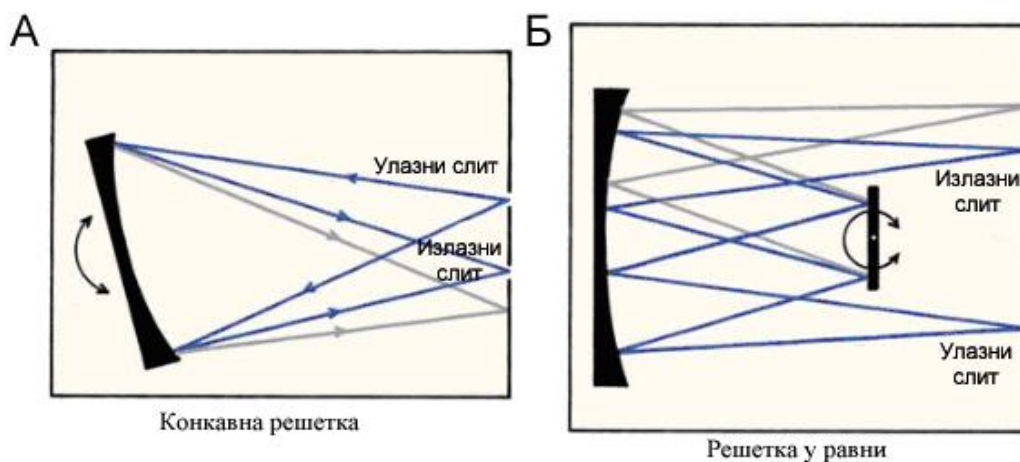
Извори побудног зрачења су најчешће ксенонске (*Xe*) лампе које дају спектар таласних дужина од 200 – 800 nm. За *steady-state* спектрофлуориметрију обично се користе *Xe* лучне лампе под високим притиском од око 10 atm²¹. Пик интензитета емитоване светлости налази се око 450 nm. Интензитет нагло опада испод 280 nm. Како лампе не би производиле озон, обавијене су кварцом који не пропушта светлост таласне дужине мање од 250 nm. Спектри континуиране и флеш ксенонске лампе приказани су на **слици 22**.

²¹ Ксенонска лампо под високим притиском, *eng. high-pressure xenon arc lamp*



Слика 22. А – Спектри континуалне и флеш Хе лампе. Б – Шема Хе – arc лампе

Зрачење се разлаже монохроматором на тражене таласне дужине. Монохроматор поседује једну или две решетке, како би се селековале одређене таласне дужине. Огледала могу бити конкавног облика како би додатно побољшале побудни сектар у односу на решење са планарним (слика 23).

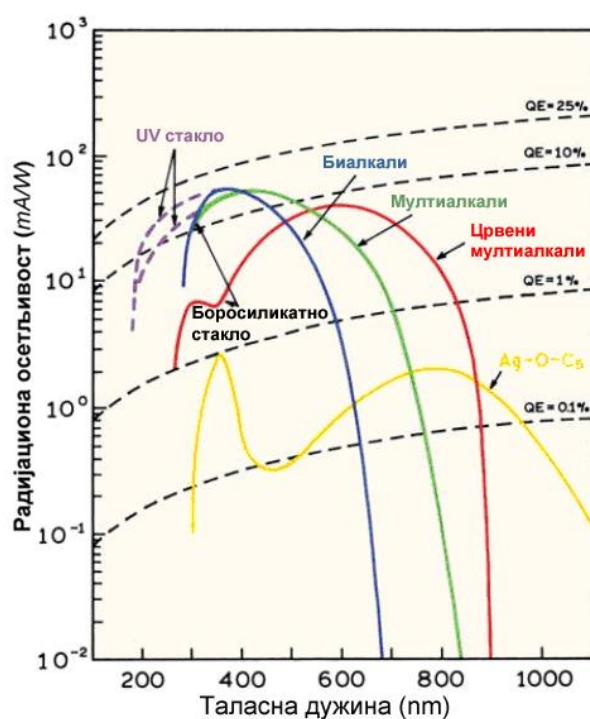


Слика 23. Шематски приказ огледала монохроматора конкавног (*eng. concave*) и раванског (*eng. plate*) типа [38, модификовано].

После проласка кроз монохроматор, светлост се пропушта кроз филтере како би се још прецизније добиле тражене таласне дужине или уклонили Рамански спектри. До пре десетак година коришћени су филтери од обојеног стакла док се новијим уређајима уграђују филтери од танких филмова. За пригушивање свих таласних дужина подједнако се користе стаклене или кварцне плоче обложене металом. Монохроматори доводе до појаве дифракције другог реда, па емисиони спектар може да се снима највише до две побудне таласне дужине, обично 20 nm мање.

Узорак може бити у течном, чврстом или гасовитом агрегатном стању. Мерење интензитета емисије са узорка мери се под углом од 90° у односу на побудно зрачење, осим за непрозирне узорке, или узорке који јако апсорбују побудно зрачење, побудно зрачење долази под косим углом, а флуоресценција се мери са површине. Пре доласка на фотодетектор, емитовано зрачење пролази кроз још један монохроматор, обично бољих особина од монохроматора који се користи за побудну светлост. Квалитет тог монохроматора одређује резолуцију уређаја.

Фотомултипликаторске цеви²² (PMT) се користе као детектори у готово свим спектрофлуориметрима. PMT вакуум цев састоји се од фотокатоде и серије динода које чине амплификационе кораке (обично 10^6 појачање). Улазни фотони узрокују да се електрони избацују са површине фотокатоде. Генерисање фотоелектрона зависи од таласне дужине побудних електрона. Различити типови фотокатода дају различиту осетљивост (слика 24).



Слика 24. Осетљивост различитих типова фотокатоде на светлост одређене таласне дужине [38, модификовано].

²² Фотомултипликаторска цев, eng. *photomultiplier tube*, PMT

Фотокатода је на негативном потенцијалу (-1000 до -2000 V). Треба избежавати високе вредности флуоресценције која се бележи како се детектор не би оштетио. Транзитно време, време које протекне од доласка побудног фотона на фотокатоду, до појаве сигнала на аноди износи 20 – 50 ns.

Са напретком дигиталне фотографије, *PMT* полако замењују *CCD*²³ детектори, нарочито у компактним уређајима. Како се сваки *CCD* састоји од преко 10⁶ појединачних сензора (пиксела) овај тип сензора је погодан и за флуоресцентну микроскопију.

За мерење поларизације, апаратура мора бити опремљена са два поларизатора. Први поларизатор је постављен између првог монохроматора и узорка, док се други налази између узорка и другог монохроматора.

Мерење фосфоресценције могуће је коришћењем фосфороскопа. Улога фосфороскопа је да наизменично отвара пут светлости ка детектору док затвара пут побудној светлости. Одређивање средњег времена живота одређује се разичитим временом отварања оптичког пута ка детектору.

Добијени сигнал са детектора се може приказати у апсолутним јединицама (броју фотона приспелих на детектор) или у бездимензионим, релативним јединицама.

Флуоресцентне микрографије су направљене коришћењем микроскопа *Axio Observer Z1*, опремљеног камером *AxioCamMR3* са 8-bit по каналу. Најприближнији сет филтера за одређивање хидроксил радикала и супероксид анјон радикала је 38 GFP, побуда 488 nm, емисија 510 nm.

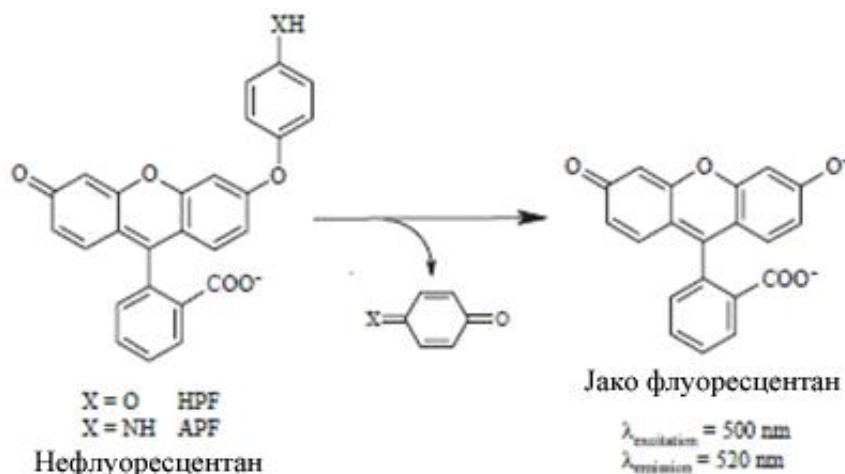
Флуоресцентни спектри су снимљени спектрофлуориметром *Fluorolog-3*, *Jobin-Yvon Horiba, Paris, France*, који је опремљен ксенонском лампом снаге 450 W и *PMT* детектором. Температура је одржавана константном, 25 °C помоћу *Peltier* елемента. Истим додатком је омогућено и стално мешање узорка у кивети. Слитови су подешени на 5 nm и за побуду и за емисију како би се смањио шум.

²³ *CCD* детектори, (eng. charge-coupled device)

Интеграционо време је износило 1 s, а укупно време трајања снимања 300 – 500 s. Тип експеримента је праћење кинетике, односно интензитета емисије на фиксној побудној таласној дужини.

2.2.3. Одређивање хидроксил радикала

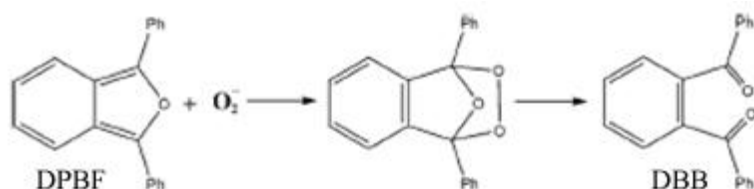
За флуоресцентну детекцију хидроксил радикала, користи се 2-[6-(4V-амино)фенокси-3Н-ксантен-3-он-9-ил] бензоева киселина (*APF*), која је нефлуоресцентни дериват флуоресцеина (слика 25). Флуоресценција настаје као последица раскидања једне –O– везе молекула *APF* која је посредована хидроксил радикалом. Процес се прати уз коришћење параметара за побудну таласну дужину, $\lambda_{exc}=500\text{ nm}$, и емисиону таласну дужину, $\lambda_{em}=520\text{ nm}$. Истраживања су показала да реактивне врсте H_2O_2 , $\bullet NO$, $\bullet O_2^-$, 1O_2 , $\bullet ROO$ нису у стању да деградују *APF*. *APF* је такође тестиран у системима у којима су присутни ензими пероксидаза рена/ H_2O_2 , а реакција продукције хидроксил радикала није била нарушена. Осим за флуоресцентну спектроскопију, *APF* се може користити и за флуоресцентну микроскопију, а у раду је описана процедура којом је одређивана производња хидроксил радикала у листовима биљака. *APF* се додаје узорцима директно, пошто се деградује у води. Чува се на тамном и хладном месту. Приликом снимања узорака, *DMSO* не сме бити присутан ни у траговима, пошто реагује са хидроксил радикалом пре *APF*.



Слика 25. Шематски приказ О-деградације нефлуоресцентног *APF* и конверзија у флуоресцентни продукт под утицајем хидроксил радикала.

2.2.4. Одређивање супероксид анјон радикала

Као флуоресцентна проба за детекцију супероксид анјон радикала коришћен је 1,3-Дифенилизобензофуран (*DPBF*) (слика 26). Интензитет емитоване флуоресценције *DPBF* опада са временом у присуству $\bullet\text{O}_2^-$ радикала, док у системима са $^1\text{O}_2$ и $\bullet\text{OH}$ радикалима интензитет флуоресценције остаје непромењен. *DPBF* није растворан у води, па га је потребно растворити у чистом метанолу, или у *DMSO*-у. Након растварања у наведеним растварачима, раствара се у води до коначне концентрације метанола или *DMSO*-у од најмање 2 %. Може се користити на истом узорку са *APF* и тада се раствара у метанолу. Услед мање поларности у поређењу са *APF*, није толико погодан за флуоресцентну микроскопију.



Слика 26. Шематски приказ деградације флуоресцентног 3-дифенилизобензофурана (*DPBF*) до нефлуоресцентног 2,2 о - дибензоилбензена *DBB*.

2.3. ПРИПРЕМА УЗОРАКА

Примарни избор експерименталног система била је његова могућност истовремене продукције више типова слободних радикала. Такав систем може бити биолошки (плазма мембране, изоловане митохондрије или апопласт), или небиолошки (пример електролизе воде). За успешну анализу потребно је варирати релативне доприносе различитих слободнорадикалских врста, што се у систему плазма мембрана једноставно постиже регулацијом гасова (додавање кисеоника, азота и раствора метаболита и интермедијера у биохемијском путу, као што су *NADH* или малат), или једноставно узети већи број несродних експерименталних или симулацијских примера уз услов да сваки тип адуката од којих потиче спектар буде заступљен у најмање једном анализираном спектру.

Како би се у потпуности искористиле могућности флуоресцентних проба у осликовању, листови папрати *Asplenium ceterach* су употребљени као експериментални објекат. Микрографије листова су анализирани описаним мултиваријационим методама.

2.3.1. Изолација плазма мембрана по Ларсону

Плазма мембрана представља активну физичку и физиолошку баријеру између ћелије и њене спољашње средине. Ћелије размењују материју и енергију преко своје ћелијске мембране, па је с тога проучавање физиологије и биохемије мембрана кључ за разумевање бројних комплексних поремећаја код биљака.

Изолација плазма мембрана се заснива на методама које потичу из 70-тих година двадесетог века. Методе бисмо могли поделити у две групе: методе раздвајања мембрана на двофазном систему [46-53] и методе које се заснивају на модификованим електрофоретским техникама [53]. Заједничко за обе методе је да се раздвајање фракција мембрана врши на основу густине површинског наелектрисања.

Први корак у процесу изолације плазма мембрана је хомогенизација одговарајућег биљног ткива, у овом случају корена кукуруза (*Zea Mays*), у пуферу. Хомогенизација се мора вршити пажљиво, како се плазма мембране не би контаминирале другим мембранама ћелије и како се узорак не би загрејао и тиме се повећала активност присутних ензима. Механичко уситњавање се зато најчешће обавља аванима са тучком, или блендерима на малим брзинама. Као пуфер се користе $EDTA^{24}$, којом се редукује активност фосфолипазе путем хелације двовалентних катјона Ca^{2+} и Mg^{2+} . Како би се постигао pH у опсегу од 7 – 9 јединица, што одговара физиолошком pH , користе се $Tris^{25}$, $MOPS^{26}$ или фосфатни

²⁴ $EDTA$ – етилендиамин тетрасирћетна киселина

²⁵ $TRIS$ – трис(хидроксиметил)аминометан

²⁶ $MOPS$ – 3-(N-морфолино)пропансулфонска киселина

пуфер. Осим вредности pH , потребно је водити рачуна и о осмоларитету, чиме се спречава лизирање органела. За ту сврху се употребљавају соли, K_2HPO_4 , KCl , $MgCl_2$. Приликом изолације плазма мембрана долази до стварања везикула, које могу бити правилне оријентације²⁷ или супротне оријентације²⁸. Додавањем детерџента *Brij58* повећава се заступљеност везикула правилне оријентације. Фенолна оксидације се успорава и спречава додатком редокс агенаса, *MCE*, *DTT*²⁹ или цистеина. Како би се обезбедили услови за раздвајање фракција засновано на специфичној густини ($1,14 - 1,17 \text{ g/cm}^3$), у раствор се додаје сахароза.

Центрифугирањем хомогената на малим брзинама, (реда величине око 1.000 g^{30} , различити подаци се налазе у литератури) раздваја се супернатант у коме се налазе плазма мембране и остале компоненте сличне флотационе густине од крупног остатка хомогената у коме се налазе целе митохондрије и крупне честице.

Следећа фаза пречишћавања захтева центрифугирање у градијенту сахарозе како би се мембране раздвојиле на основу густине. Градијент сахарозе може бити линеаран (континуиран) или нелинеаран (дисконтинуиран). Уместо сахарозе, може се користити и ренографин. Подешавањем брзине центрифугирања постиже се раздвајање различитих мембранских органела. При брзини од $600 - 1.000 \text{ g}$ издвајају се нуклеуси, брзином од 2.000 g долази до таложења хлоропласта, мембране митохондрија и пероксизома остају у талогу при брзинама од $3.000 - 15.000 \text{ g}$. За добијање плазма мембрана потребно је користити ултрацентрифугу и центрифугалну силу од $20.000 - 100.000 \text{ g}$ [50].

Након раздвајања фракција хомогената на основу величине честица и флотационе густине, врши се раздвајање према површинским особинама. За раздвајање се користи двофазни систем (*ABS*³¹) који се састоји од раствора *PEG*³²,

²⁷ Правилна оријентација, *eng. right side out*

²⁸ Супротна оријентација, *eng. inside out*

²⁹ *DTT* – дитиотреитол

³⁰ g – константа убрзања силе Земљине теже

³¹ *ABS* – *eng. aqueous biphasic system*

³² *PEG* – полиетиленгликол

који је мање густине и хидрофобан, и декстрана којег одликује већа густина и хидрофилност.

Двофазни систем се карактерише партиционим коефицијентом (K) дефинисаним једначином:

$$K = \frac{C_u}{C_l} \quad (10)$$

у којој C_u представља концентрацију горње фазе, а C_l концентрацију доње фазе.

Други параметар, партициони однос (G), описује афинитет честица раствора за одговарајућу фазу и описан је једначином :

$$G = \frac{A_u}{A_t - A_u} \quad (11)$$

A_u – количина материјала задржана у горњој фази, A_t – укупна количина материјала.

У циљу бољег пречишћавања, процедура се може поновити више пута. Степен пречишћености (r_{max}) дефинисан је изразом, а зивисан од партиционог односа (G) и броја повљања n :

$$r_{max} = \frac{nG}{1 + G} \quad (12)$$

Ако у систему постоји више компонената, производ њихових партиционих коефицијената требало би да буде једнак јединици. У случају већих одступања, двофазни систем није довољно добро подешен. На партициони однос утичу концентрација соли и концентрација полимера који чине двофазни систем. Повећање концентрације соли по правилу доводи до већег удела мембранског материјала у горњој фази која има афинитет за позитивне јоне. На физиолошком pH плазма мембране су негативно наелектрисане. Додавањем K_2HPO_4 , поспешује се груписање мембрана у горњој фази. Превелика концентрација полимера, PEG -а и декстрана доводи до тога да се мембране уместо у горњој фази групишу у међуфазном простору.

Након описане процедуре, издвојене су плазма мембране. Проблем је у томе што добијене плазма мембране нису хомогене по својим својствима.

Неке мембране добијају форму исправно оријентисаних везикула, друге се оријентишу супротно (унутрашњом страном ка споља), док неке мембране уопште не добијају форму везикула. Како би се раздвојиле исправно оријентисане мембране од супротно оријентисаних, примењује се практично иста процедура са двофазним системом. Након што се смеша везикула нанесе на двофазни систем, после центрифугирања доводи до тога да се исправно оријентисане везикуле нађу у горњој фази, а супротно оријентисане везикуле у доњој фази.

Као нова метода која значајно скраћује процес изолације мембранских фракција употребљава се електрофореза слободног протока (*FFE*³³). Предности *FFE* огледају се и у томе што није потребно користити скупу ултрацентрифугу, а све фракције се добијају у једном кораку. Слично класичним електрофоретским техникама, постоје модификације електрофорезе слободног протока: *FFZE*³⁴, *IEF*³⁵ и *ITP*³⁶. Применом *FFE* на микрозомалну фракцију може се раздвојити 5 група мембрана (**слика 27**).

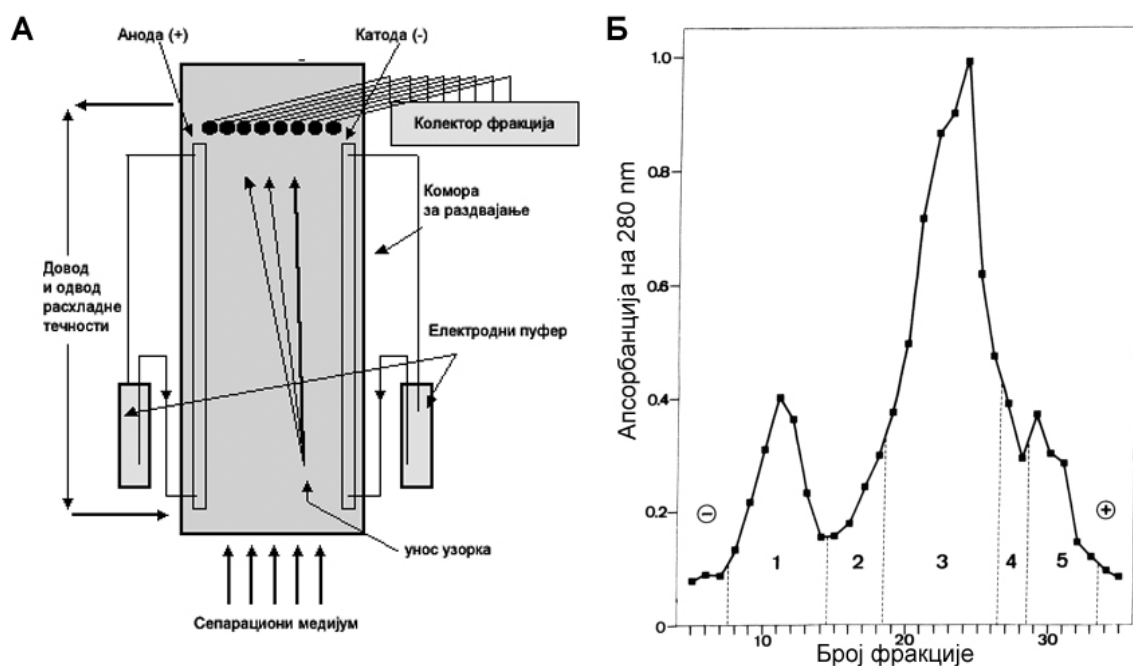
Понављањем поступка са фракцијом плазма мембрана постиже се раздвајање на исправно оријентисане везикуле, супротно оријентисане везикуле и фракцију мембране које нису образовале везикуле.

³³ *FFE* – eng. free flow electrophoresis,

³⁴ *FFZE* – eng. free flow zone electrophoresis

³⁵ *IEF* – isoelectric focusing electrophoresis

³⁶ *ITP* – isotachophoresis



Слика 27. А – Шематски приказ уређаја за елетрофорезу слободног протока. Б – Фракционисање микрозомалне фракције мембрана. У зони 1 налазе се плазма мембране. Мембране ендоплазматичног ретикулума, митохондрија и голџијевог апарата налазе се у зони 3. Мембране тонопласта се срећу у зони 5. У зонама 2 и 4 долази до делимичног мешања фракција.

2.3.1.1. ПОСТУПАК ИЗОЛАЦИЈЕ ПЛАЗМА МЕМБРАНА ИЗ КОРЕНА КУКУРУЗА

У експериментима је коришћена линија кукуруза VA35 (*Zea mays*).

Семе исклијало у влажном папиру пренето је после 3 дана у пластичне посуде за гајење. У посудама се налазио Кнопов раствор са модификованим садржајем азота, NO_3^- 10,9 mM и NH_4^+ 7,2 mM. Биљке су гајене у контролисаним условима, са 12 сати светла, на температури од 22 °C и релативном влажношћу ваздуха од 70%.

50 g ситно исецканих коренова је хомохенизовано у охлађеном авану са тучком уз додавање 120 ml охлађеног пуфера. Пуфер се састојао од 250 mM сахарозе, 3 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT и 10 % w/v глицерола. Добијени хомогенат је филтриран кроз четворослојну газу, а затим центрифугиран на 12.000 g у трајању од 10 минута. Супернатант је

центрифугиран ултрацентрифугом на 100.000 g у трајању од 30 минута. Испрана микрозомална фракција је суспендована са 3 ml фазног пуфера. Фазни пуфер се састоји од 5 mM K-фосфатног пуфера, pH 7.8, 330 mM сахарозе и 3 mM KCl. За фазно одвајање 3 g суспендованих микрозома направљено је 12 g двофазног система који садржи 6,5 % w/v декстрана Т 500, 6,5 % w/v PEG 335, 330 mM сахарозе, 3 mM KCl, 5 mM K₂HPO₄, pH 7.8. Кивете се потом мешају инверзијом, 30 – 40 пута и центрифугирају на 1.500 g током 5 минута. Око 90 % горње фазе се сакупља и наноси на свежу доњу фазу. Потом се долива изгубљена запремина горње фазе и процес центрифугирања се понавља. Након 3 пречишћавања, коначна горња фаза се разблажује пуфером у односу 10:1 и центрифугира на ултрацентрифуги, 100.000 g током 30 минута. Добијени пелет који садржи пречишћене плазма мембране суспендује се како би се добиле мембране чија је концентрација протеина 2 – 3 mg/ml. Тако добијене мембране се чувају на температури од -80 °C.

2.3.2. Изолација апопласта и ћелијског зида биљака

Апопластом се назива ванћелијски компартмент код биљака. Апопласт садржи полисахариде, укључујући пектин, хемицелулозу и целулозу који су везани нековалентним и ковалентним везама, и на тај начин изграђују сложену просторну структуру која је нерастворна у води – ћелијски зид. Осим улоге у одржавању структуре ћелије, ова структура има значајну улогу у ћелијском одговору на стрес и раст.

Семе *Pisum Sativum* испира се 5 h водом, а затим увија у влажан папир у коме клија на температури од 25 °C током 4 дана. Изданци настављају да расту у води током још 14 дана, у комори, на 22 °C, и режиму светлости у односу 16/8 h светлост/мрак. Замрзнути листови (50 g) су уситњени у авану у екстракционом пуферу (50 mM Tris-HCl, pH=7,2 који садржи 0,5% детергента Tween 80, 2% поливинил пиролитон, 50 mM NaCl, 1 mM фенилметилсулфонил флуорид) у односу 1:5 w/v. Хомогенат се затим меша 30 минута на леду, филтрира кроз газу и центрифугира на 1.000 g, 20 минута. Талог се онда два пута испира 50 mM

Tris-HCl пуфером и 6 пута пуфером без детерџента. Тако добијени ћелијски зид се раствара у 1 M *NaCl*, инкубира 30 минута на 4 °C и на крају центрифугира на 1.000 g 15 минута. талог који садржи ћелијски зид и изолате се испира и центрифугира у 50 mM *Tris-HCl*, pH=7,2 неколико пута. Тако пречишћен талог, растворен у 50 mM *Tris-HCl*, коришћен је за ЕПР мерења.

2.3.3. Изолација митохондрија из корена биљака

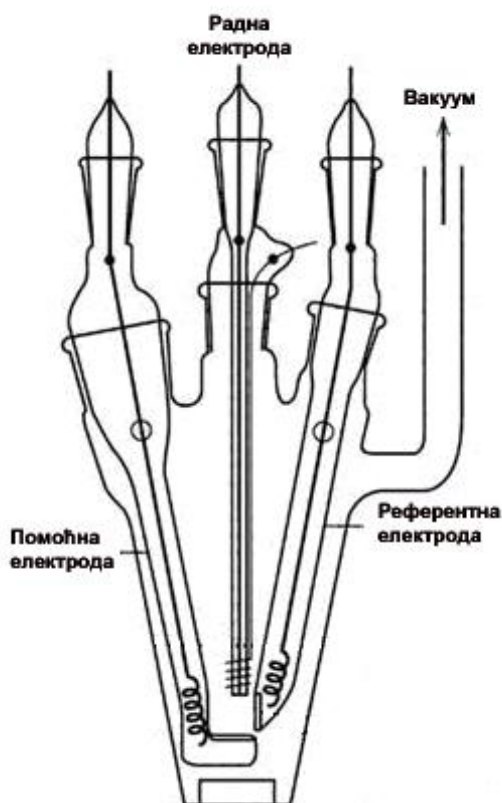
Изолација митохондрија је врло слична изолацији плазма мембрана, а почиње механичким ситњењем биљног ткива, које услед присуства ћелијског зида има већу чврстину у односу на животињска ткива, па је потребно вршити хомогенизацију у хомогенизационом пуферу, (pH=7,2, 0,3 M *EDTA*, 0,1% *BSA*, 0,05% цистеина, 1 mM *EDTA*, на леду). Након филтрирања кроз вишеслојну газу, хомогенат је центрифугиран на 1.000 g, 15 минута како би се уклониле нечистоће и делови биљног ткива. Супернатант се потом центрифугира на 10.000 g, 15 минута. Талог са митохондријама се испира медијумом који садржи 0,3 M манитол, 0,1% *BSA* и 0,1 mM *EDTA* и центрифугира на 6.000 g, 15 минута. Супернатант се паживо извлачи пипетом како се не би реметио талог.

2.3.4. Електролиза воде

Електролиза означава принудан процес у електрохемијској ћелији, под утицајем спољашњег извора струје. Електролиза се изводи тако што се електрично коло ћелије затвара редним везивањем спољашњег извора електричне струје насупрот напону ћелије, при чему је спољњи напон већи од електромоторне силе ћелије. Електродне реакције у електролитичкој ћелији се одигравају супротно од смера свог сопственог тока.

Троелектродна ћелија се састоји од радне, референтне и помоћне електроде (контра електрода). Предност троелектродне ћелије у односу на ћелије које имају само радну и референтну электроду огледа се у томе што је код троелектродне ћелије функција референтне електроде одвојена од функције помоћне електроде. Струја која поларизује радну электроду тече између радне и помоћне електроде, а

потенцијал радне електроде се мери у односу на референтну электроду у засебном електричном колу методом компензације, па је стога референтна електрода у беструјном режиму и не излаже се поларизацији (слика 28).

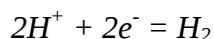


Слика 28. Шематски приказ троелектродног уређаја

Површина помоћне електроде по правилу је знатно већа у односу на површину радне електроде, како би њен отпор био занемарљив у поређењу са отпором радне електроде. Врх референтне електроде се поставља што ближе површини радне електроде, како би фракција пада напона између радне и референтне електроде била што мања. Електролитички раствор у ћелији за испитивање електродне кинетике, осим компоненти које учествују у електродној реакцији радне електроде садрже и инертан електролит, који је обично са високог напона разлагања (Na_2SO_4 , K_2SO_4 , KNO_3 , KCl).

Електролиза водених раствора у циљу добијања водоника један је од најзаступљенијих електрохемијских процеса, нарочито у индустрији.

Сумарна електродна реакција производње водоника је:



У реакцији не учествују оба електрона истовремено, већ се реакција одвија у неколико корака:

1. $H^{+} + e^{-} \leftrightarrow H_{ads}$ разелектрисање електронског пара – Фолмерова реакција.

Адсорбовани атоми водоника се на два начина уклањају и формирају молекул гаса:

2.1. $2H_{ads} \leftrightarrow H_2$ рекомбинација адсорбованих атома – Тафелова реакција

или

2.2. $H^{+} + H_{ads} + e^{-} \leftrightarrow H_2$ електрохемијска десорпција – реакција Хејровског

Кисеонична електрода је, као и водонична, од великог практичног значаја у процесима индустријског добијања кисеоника електролизом воде, када кључну улогу има анодно издвајање кисеоника. Издвајање кисеоника се никада не дешава на чистом металу, па се на потенцијалу на коме се издваја кисеоник, метал прекрива слојем оксида (оксиди платине, иридијума или рубидијума).

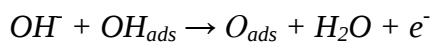
Бруто реакција кисеоничне електроде гласи:



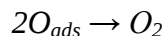
У реакцији долази до преноса 4 електрона. Први ступањ може бити једноелектронска оксидација адсорбованог интермедијерног радикала



Други ступањ реакције може бити вид електрохемијске десорпције:



, а трећи ступањ, рекомбинација адсорбованих атома:



Електрохемијска ћелија коришћена за потребе експеримента који ће бити описан у овом раду, конструисана је као троелектродна ћелија. Радна и помоћна електрода су направљене од платине, док се као референтна електрода користи формирана водонична електрода Pd/H_2 на паладијумској жици. Један крај Pd жице је сферног облика, направљен топљењем, па наглим хлађењем капи Pd која се том приликом формира. Већа површина Pd жице омогућава бољу адсорпцију молекула водоника који се издваја у електролизи воде на аноди. Пре сваког мерења, све три електроде се испирају дејонизованом водом (18 $M\Omega$).

У првом делу експеримента, Pd жица везана је за негативни пол извора (катода) и једна Pt жица везана за позитиван пол (анода), уроњене су у 60 μl бидестиловане воде. Као инертан електролит, користи се KCl . На Pt и Pd жицу се доводи напон од 4 V чиме отпочиње електролиза воде са издвајањем водоника на паладијуму и издвајање кисеоника на платини. После 2 минута, електролиза се зауставља. Pd жица се у следећих неколико минута може користити као референтна електрода услед остварене равнотеже адсорбованог водоника и водоничних јона. Продувавањем азота, инертног гаса, спречава се формирање кисеоничне електроде на платини.

По формирању троелектродне ћелије и референтне водоничне електроде, негативни пол извора се премешта са радне електроде на контра электроду. Волтметром се одређује напон између радне и контра електроде која је у беструјном режиму. Затим се на различитим напонима врши електролиза наредних 30 s, а онда се додаје 4 μl спинског хватача $DEPMPO$. Садржај из електрохемијске ћелије се увлачи микропипетом у тefлонску капилару, смешта у ЕПР спектрометар и његов спектар се снима.

2.3.5. Припрема узорака за осликавање

Припрема биљног материјала за осликавање је једноставно. Листићи папрати *Asplenium ceterach* и њен гаметофит су постављани на стандардну микроскопску плочицу. 1 μ l концентроване флуоресцентне пробе *APF* додаван је директно на лист. Снимања су вршена са константном вредношћу експозиције, и константним линеарним појачањем контраста. Филтер који по својим карактеристикама највише одговара проби *APF* за филтер 38 *GFP*, побуда на 488 nm, емисија на 510 nm. Серија фотографија је снимана у временским интервалима од 5 s.

2.4. МАТЕМАТИЧКЕ МЕТОДЕ У АНАЛИЗИ СПЕКТАРА

Циљ рада је дефинисање аутоматизоване и поуздане процедуре којом се са високом тачношћу може одредити које су компоненте присутне у сложеним спектрима, и у коликом проценту доприносе интензитету сложеног спектра.

Описане су методе које се базирају на мултиваријационој анализи (факторска анализа³⁷, анализа независних компоненти³⁸, слепа идентификација другог реда³⁹), методе за препознавање и проверу (линеарна дискриминациона анализа⁴⁰, и метода носећих вектора⁴¹, одређивање фракталне димензије⁴²),

³⁷ Факторска анализа, *eng. Factor Analysis, FA*

³⁸ Анализа независних компоненти, *eng. Independent Component Analysis, ICA*

³⁹ Слепа анализа другог реда, *eng. Second Order Blind Identification with Robust Orthogonalization, SOBI-RO*

⁴⁰ Линеарна дискриминациона анализа, *eng. Linear Discriminant Analysis, LDA*

⁴¹ Метода носећих вектора, *eng. Support Vector Machine, SVM*

⁴² Фрактална димензија, *eng. Fractal Dimension, FD*

методе за анализу у фреквентном домену (таласићи⁴³ и фуријеова анализа⁴⁴), као и помоћне методе за уклањање базне линије и шума (сплајн⁴⁵).

Премда су флуоресцентни спектри значајно једноставније форме (линеарна и експоненцијална зависност), било је неопходно прилагодити и модификовати постојеће методе, чиме је добијена још боља временска резолуција, отворена могућност проучавања осцилаторних процеса и корекција процеса који се догађају током снимања.

2.4.1. Анализа ЕПР спектра базирана на мултиваријационим методама

У раду је коришћено више техника које се могу сврстати у мултиваријационе методе. У наведену групу метода убрајају се *FA*, *ICA*, као и друге технике у којима се користе другачији алгоритми као што је *SOBI-RO* али општа идеја методе остаје непромењена.

За све наведене методе заједничко је то што као улазни сет података захтевају спектралну матрицу сачињену од појединачних спектра (вектори).

⁴³ Таласићи, *eng. wavelets*

⁴⁴ Фуријеова анализа, *eng. Fast Fourier Analysis, FFT*

⁴⁵ Сплајн, подтип полиномалних кривих, *eng. Smoothing Spline*

2.4.1.1. ФАКТОРСКА АНАЛИЗА – FA

Факторску анализу могуће је дефинисати на више начина, у зависности од области у којој се примењује. У друштвеним наукама се сматра да је факторска анализа метод који се користи за описивање међузависности великог броја променљивих мањим бројем основних променљивих који се називају фактори. У природним наукама, факторска анализа се дефинише као метод мултиваријационе анализе који се примењује над матрицама експерименталних података како би се утврдио број линеарно независних променљивих у датом сету података [54-59].

Развој факторске анализе отпочео је још почетком двадесетог века, а првобитно се користила у психологији. Услед комплексности прорачуна и великих димензија матрица, шира употреба факторске анализе везана је за развој информатике.

Да би се обезбедила поузданост анализе неопходно је да корелациона матрица израчуната на основу матрице анализираних података испуњава улове дефинисане неким од тестова:

- *Barlett-овим* тестом
- *Kaiser-Meyer-Olkin-овим* тестом.

Барлетов тест је базиран на χ^2 расподели. Нулта хипотеза у овом тесту гласи да подаци долазе из популације чија је корелациона матрица једнака јединичној матрици:

$$H_0 : \mathbf{R} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & 1 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & 1 \end{pmatrix} \quad (13)$$

Ако се нулта хипотеза покаже тачном, број фактора једнак је броју променљивих, па нема смисла вршити факторску анализу.

Kaiser-Meyer-Olkin-ov тест утврђује погодност матрице за факторску анализу. У овом тесту се израчунава количник K :

$$K = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1, j \neq i}^p r_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1, j \neq i}^p r_{ij}^2 + \sum_{i=1}^p \sum_{j=1, j \neq i}^p q_{ij}^2} \quad (14)$$

r_{ij}^2 – квадрати вандијагоналних елемената корелационе матрице,
 q_{ij}^2 – квадрати вандијагоналних елемената *anti-image* корелационе матрице.
 Велике вредности параметра K значе да постоје велике корелације између парова променљивих које су могући фактори. За вредности K испод 0,5 факторска анализа вероватно неће дати поуздане резултате.

Ваља напоменути да је факторска анализа осетљива на шум, па однос сигнала и шума мора бити висок.

Ако означимо оригиналне променљиве са $X_1, X_2, \dots, X_p$, онда се модел факторске анализе у развијеном облику може записати једначинама:

$$\begin{aligned} X_1 - \mu_1 &= \beta_{11}S_1 + \beta_{12}S_2 + \dots + \beta_{1m}S_m + \varepsilon_1 \\ X_2 - \mu_2 &= \beta_{21}S_1 + \beta_{22}S_2 + \dots + \beta_{2m}S_m + \varepsilon_2 \\ &\dots\dots\dots \\ X_p - \mu_p &= \beta_{p1}S_1 + \beta_{p2}S_2 + \dots + \beta_{pm}S_m + \varepsilon_p \end{aligned} \quad (15)$$

β_{ij} , $i = 1, \dots, p$, $j = 1, \dots, m$ – коефицијент линеарне комбинације,
 S_j , $j = 1, \dots, p$ – вредност факторског скорa, μ_j , $j = 1, \dots, p$ – процењена вредност,
 ε_p – грешка.

Како у моделу факторске анализе фигурира велик број једначина, практичније је увести матричну нотацију:

$$\mathbf{X} - \boldsymbol{\mu} = \mathbf{S} \mathbf{C} + \boldsymbol{\varepsilon} \quad (16)$$

При чему је:

$$\mathbf{X} - \boldsymbol{\mu} = \begin{pmatrix} X_1 - \mu_1 \\ X_2 - \mu_2 \\ \vdots \\ X_p - \mu_p \end{pmatrix} \quad (17)$$

$$\mathbf{S} = \begin{pmatrix} S_1 \\ S_2 \\ \vdots \\ S_m \end{pmatrix} \quad (18)$$

$$\mathbf{C} = \begin{pmatrix} \beta_{11} & \beta_{12} & \cdots & \beta_{1m} \\ \beta_{21} & \beta_{22} & \cdots & \beta_{2m} \\ \cdots & \cdots & \ddots & \cdots \\ \beta_{p1} & \beta_{p2} & \cdots & \beta_{pm} \end{pmatrix} \quad (19)$$

$$\boldsymbol{\varepsilon} = \begin{pmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \vdots \\ \varepsilon_p \end{pmatrix} \quad (20)$$

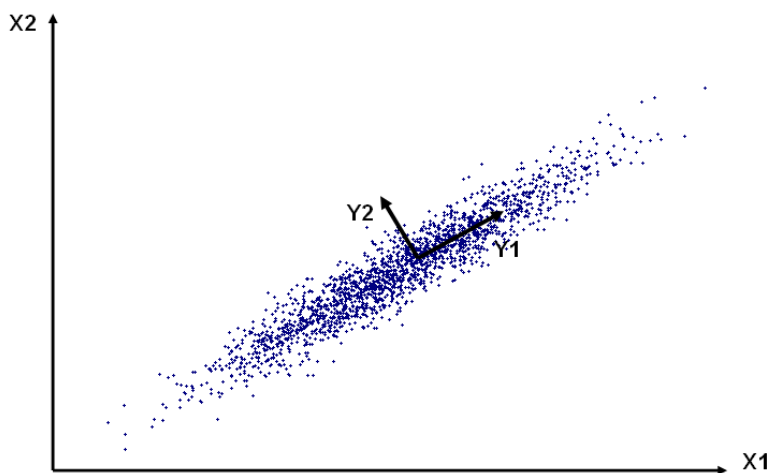
Матрица $\mathbf{S}$ представља матрицу факторских оптерећења⁴⁶, матрица $\mathbf{C}$ линеарне комбинације фактора док елементи матрице $\boldsymbol{\varepsilon}$ представљају шум који се јавља у спектрима.

За издвајање фактора може се употребити више метода:

- Метода главних компоненти
- Дијагонална метода екстракције фактора
- Центроидна метода екстракције фактора

За анализу ЕПР спектра, као најпогодија метода показала се метода главних компоненти. Циљ методе је проналажење главних компонената (спектра појединачних радикала), које међусобно остају некорелисане. Некорелисаност главних компоненти постиже се приказивањем експерименталих података у новој, ортонормираној бази векторског простора. Геометријски представљено, то би значило да се координатни систем ротира (**слика 29**).

⁴⁶ Факторско оптерећење, *eng. factor loading*



Слика 30. Ротација координатног система $X1X2$ у систем $Y1Y2$, којом се обезбеђује некорелисаност главних компоненти. Ротацијом се редукује минимални број димензија потребних за описивање система са 2 ($X1, X2$) на 1 ($Y1$), пошто је расипање тачака по $Y2$ знатно мање.

На форму добијених фактора првенствено утиче тип ротације који се примењује. Ротације се могу поделити на ортогоналне⁴⁷ и неортогоналне⁴⁸.

У ортогонални тип ротације спадају *Varimax*, *Kvartimax*, *Transvarimax*, а представници неортогоналних ротација су *Oblimaks*, *Oblimin*, *Promaks* [30].

За анализу ЕПР спектра могу бити погодне како ортогоналне тако и неортогоналне методе ротације у зависности од ширине анализираних делова сигнала. Ако се читава дужина сигнала (400 G) користи као сет улазних података примерено је користити ортогоналну ротацију *Varimax*, док је за анализу делова сигнала (појединачна места груписања пикова) боље резултате давала неортогонална анализа *Promax*. Такав резултат је и очекиван с обзиром на то да се у регионима са великим бројем преклопљених сигнала јавља већа корелисаност, што погодује неортогоналним ротацијама, док се у случајевима анализе сигнала пуне дужине траже компоненте које су више независне (мање корелисане), а то је погодно за правоугле ротације. Неортогонална ротација би у том случају вештачки повећала број компоненти тежећи да их учини више корелисаним, придружујући шум основним сигнаlima.

⁴⁷ Ортогонална ротација, *eng. orthogonal rotation*

⁴⁸ Неортогонална ротација, *eng. oblique rotation*

Алгоритми за различите ротације факторских скорова деле основу од које се полази, а у даљим корацима се показују разлике међу алгоритмима.

Матрица факторске структуре⁴⁹ нормализована је квадратним кореном суме квадрираних факторских оптерећења⁵⁰.

$$\Lambda_m^* = \sqrt{H} \Lambda_m \quad (21)$$

Λ_m^* – нормализована матрица факторске структуре, Λ_m – представља матрицу факторског шаблона), а H – дијагонала матрице суме квадрираних факторских оптерећења.

На основу појединачних елемената добијене матрице факторске структуре (λ_{kj}^*), итеративном методом⁵¹, одређује се критеријум конвергенције $SV_{(i)}$ који се дефинише једначином:

$$SV_{(i)} = \sum_{j=1}^m \left(n \sum_{k=1}^n \lambda_{kj(i)}^{*4} - \left(\sum_{k=1}^n \lambda_{kj(i)}^{*2} \right)^2 \right) / n^2 \quad (22)$$

За све парове фактора рачунат је угао ротације:

$$P = 1/4 \tan^{-1}(X/Y) \quad (23)$$

Параметрима X и Y одређен је тип ротације (25-27):

$$X = D - 2AB/n \quad \text{Varimax} \quad Y = C - \sqrt{A^2 - B^2} / n \quad (24)$$

$$X = D - mAB/n \quad \text{Equimax} \quad Y = C - m \sqrt{A^2 - B^2} / 2n \quad (25)$$

$$X = D \quad \text{Quartimax} \quad Y = C \quad (26)$$

⁴⁹ Матрица факторске структуре, *eng. factor pattern matrix*

⁵⁰ *Eng. communality* – сума квадрата факторских оптерећења за све факторе дате променљиве

⁵¹ *Eng. iteration*, основа нумеричких метода, при чему се рачунски процес понавља до постизања жељеног циља

Док су вредности параметара A, B, C и D дефинисане једначинама:

$$u_{p(i)} = f_{pj(i)}^{*2} - f_{pk(i)}^{*2} \quad v_{p(i)} = 2f_{pj(i)}^* - f_{pk(i)}^* \quad (27)$$

$$A = \sum_{p=1}^n u_{p(i)} \quad B = \sum_{p=1}^n v_{p(i)} \quad C = \sum_{p=1}^n (2u_{p(i)}^2 - v_{p(i)}^2) \quad D = \sum_{p=1}^n 2u_{p(i)}v_{p(i)} \quad (28)$$

f_{pj} – вредности факторских скорова пројектоване на нове осе, након ротације.

Promax ротација је изузетно погодна за рачунарско извршење. Брзина израчунавања омогућена је тиме што се прво врши ортогонална *Varimax* ротација, а затим се ортогоналност релаксира, мењањем вредности угла између оса до проналажења фактора којима се постиже боље фитовање резултата.

Varimax ротацијом се добија ортогонално ротирана матрица $\Lambda_R = \lambda_{ij}$.

Затим се рачуна матрица $\mathbf{P} = (p_{ij})_{p \times m}$, чијом даљом трансформацијом се долази до решења за ротацију *Promax*:

$$p_{ij} = \left| \frac{\lambda_{ij}}{\left(\sum_{j=1}^m \lambda_{ij}^2 \right)^{\frac{1}{2}}} \right|^{k+1} \left(\sum_{j=1}^m \lambda_{ij}^2 \right)^{\frac{1}{2\lambda_{ij}}} \quad (29)$$

Вредност параметра k је веома битна за анализу, а вредност би требало да му буде око 4 за ЕПР спектре како би се направио оптимални компромис између осетљивости и робусности. За мале вредности параметра k , решење у многоструко задржава мане ортогоналних ротација. За вредности параметра k преко 10, најмање разлике између спектра доводе до раздвајања пикова са јединственим физичким смислом.

2.4.1.2. АНАЛИЗА НЕЗАВИСНИХ КОМПОНЕНТИ – ICA

ICA⁵² је статистичка метода која за циљ има описивање сета мултидимензионалних података који је настао комбиновањем непознатих, скривених променљивих⁵³. Постоје две верзије ICA анализе у односу на то да ли су форме компоненти познате⁵⁴ или нису пре почетка анализе.

У првој варијанти, која се назива слепо раздвајање компоненти⁵⁵, сет података се састоји од комбинације вектора непознате форме. Метод је првобитно развијен за решавање проблема издвајања појединачних гласова из бучног окружења⁵⁶. За анализу ЕПР спектра примереније је користити векторе познате форме, који одговарају спектрима адуката слободних радикала за које се оправдано сумња да су присутни у експериментално добијеном сигналу. ICA се успешно може употребити и за редукцију димензионалности сета података. Решавањем сваке наредне компоненте, остаци постају све сличнији белом шуму⁵⁷ [60-65].

Полазна основа методе независних компоненти у многоне подсећа на факторску анализу. Разлика међу наведеним методама огледа се у начину процене независности компоненти које сачињавају спектралну матрицу. У факторској анализи се користи некорелисаност као мера независности, док у анализи независних компоненти негаусичност компоненти представља основу за утврђивање независности.

⁵² Анализа независних компоненти, *eng. Independent Component Analysis, ICA*

⁵³ Скривена променљива, *eng. latent variable*

⁵⁴ Усмерена анализа независних компоненти, *eng. Constrained Independent Component Analysis, CICA*

⁵⁵ Слепо раздвајање компоненти, *eng. Blind Source Separation, BSS*

⁵⁶ Проблем издвајања гласова из бучног окружења, *eng. cocktail party problem*

⁵⁷ Бели шум, *eng. white noise*

Независне случајне променљиве испуњавају својство:

$$E[g(x)h(y)] = E[g(x)]E[h(y)] \quad (30)^{58}$$

Функције $g(x)$ и $h(y)$ су интеграбилне функције. Наведено својство показује да некорелисаност представља само специјалну врсту независности која испуњава услов да су функције $g(x)$ и $h(y)$ линеарне. Ако променљиве одликује Гаусовска дистрибуција, независност и корелисаност ће бити једнака својства.

Основа за утврђивање независности компоненти је негаусичност компоненти. Гаусова дистрибуција може се представити у матричној нотацији као:

$$p_{\mathbf{x}}(\mathbf{x}) = \frac{1}{(2\pi)^{n/2} (\det \mathbf{C}_{\mathbf{x}})^{1/2}} \exp\left(-\frac{1}{2}(\mathbf{x} - \mathbf{m}_{\mathbf{x}})^T \mathbf{C}_{\mathbf{x}}^{-1}(\mathbf{x} - \mathbf{m}_{\mathbf{x}})\right) \quad (31)^{59}$$

Ако су познати вектор средње вредности⁶⁰ ($\mathbf{m}_{\mathbf{x}}$) и коваријациона матрица $\mathbf{C}_{\mathbf{x}}$, одређена је мултиваријациона Гаусова густина вероватноће. Стога су и сви централни моменти вишег реда⁶¹ одређени и не носе никакве нове информације о Гаусовој расподели.

Ако је $\mathbf{X}$ гаусијански вектор, а $\mathbf{y} = \mathbf{A}\mathbf{x}$ линеарна трансформација тог вектора, вектор средње вредности и коваријациона матрица су дефинисани као:

$$\mathbf{m}_{\mathbf{y}} = \mathbf{A}\mathbf{m}_{\mathbf{x}} \quad \mathbf{C}_{\mathbf{y}} = \mathbf{A}\mathbf{C}_{\mathbf{x}}\mathbf{A}^T \quad (32)$$

Једно од решења релације указује на то да линеарна комбинација гаусијанских случајних променљивих сама по себи представља гаусијан, те је стога немогуће раздвојити гаусијанске векторе поступком следеће идентификације.

⁵⁸ E – оператор математичког очекивања, *eng. expectance*

⁵⁹ $\det$ – детерминанта, *exp* – експонент

⁶⁰ Вектор средње вредности, *eng. mean vector*

⁶¹ Централни моменти представљају параметре којима се карактерише функција расподеле. Други централни момент је девијација, трећи *skewness* је а четврти *kurtosis*. Централни моменти вишег реда се ретко употребљавају због превелике осетљивости.

Трећи централни моменат назива се *skewness*, којим се описује асиметричност дистрибуције:

$$\mu_3 = E \left[(x - m_x)^3 \right] \quad (33)$$

Четврти централни моменат назива се *kurtosiss*:

$$\mu_4 = E \left[(x - m_x)^4 \right] \quad (34)$$

Ако је вредност *kurtosiss-a* једнака 0, дистрибуција је Гаусова, за вредности >0 је супер-гаусовска, а за вредности <0 суб-гаусовска. Суб-гаусовске функције су “равније” у поређењу са Гаусовом или их одликује мултимодалност⁶². Супер-гаусовске функције одликује оштрији пик, налик на Лоренцијан. У пракси треба бити обазрив са употребом *kurtosiss-a* као мере негаусичности пошто мали број вредности које значајно одступају од расподеле знатно доприносе вредности *kurtosiss-a*.

2.4.1.3. СЛЕПА ИДЕНТИФИКАЦИЈА ДРУГОГ РЕДА, *SOBI*

Почетна једначина која се користи за *SOBI* алгоритам по својој форми одговара почетним једначинама у другим мултиваријационим техникама [66-69]:

$$x(t) = Cs(t) + \varepsilon(t) \quad (35)$$

$C \in R^{m \times n}$ – непозната матрица мешања⁶³, $s(t)$ – n -димензионални почетни вектор, $\varepsilon(t)$ – шум.

За разлику од *ICA* алгоритма, код *SOBI* алгоритма не постоји почетна претпоставка о типу дистрибуције променљивих, што је чини супериорном у случајевима када је у узорку присутно више компоненти чија је дистрибуција гаусијанска.

⁶² Мултимодалност, присуство већег броја пикова код функције расподеле

⁶³ Матрица мешања, *eng. mixing matrix*

Циљ анализе је да се процени матрица мешања ($\mathbf{C}$) или њена псеудоинверзна матрица⁶⁴ ($\mathbf{W} = \mathbf{C}^\#$). Обе непознате не могу бити решене *a priori*. Претходна сазнања се односе на скалирање и пермутационе нејасноће⁶⁵. Ако процењена матрица мешања $\hat{\mathbf{A}}$ испуњава услов да је:

$$\mathbf{G} = \mathbf{W}\mathbf{C} = \hat{\mathbf{C}}^\# \mathbf{C} = \mathbf{P}\mathbf{A} \quad (36)$$

$\mathbf{G}$ – глобална трансформација која комбинује миксинг и демиксинг систем, $\mathbf{P}$ – пермутациона матрица, $\mathbf{A}$ – несингуларна дијагонална матрица, онда се за процењене вредности парова $\hat{\mathbf{C}}_s$ и парова $\mathbf{C}_s$ може рећи да су повезане на начин да се задржава форма почетних спектралних компоненти.

Ако су изворне компоненте просторно некорелисане, што је мање рестриктиван услов у односу на статистичку независност, али су временски корелисане онда се статистиком другог реда може проценити мешајућа матрица⁶⁶.

Размотримо стационарне изворне сигнале који су просторно некорелисани, и временски корелисани, и претпоставимо да је шум Гаусовски процес и да је коваријациона матрица вектора шума $\varepsilon(t)$ облика:

$$\mathbf{R}_v(0) = E \left\{ \varepsilon(t) \varepsilon^T(t) \right\} = \sigma_\varepsilon^2 \mathbf{I}_m \quad (37)$$

$\mathbf{I}_m$ – матрица идентитета, σ_ε^2 – варијанса шума. Корелационе матрице посматраног вектора $x(t)$ испуњавају услов:

⁶⁴ Псеудоинверзија, *eng. pseudoinverse*, оператор обележен симболом #

⁶⁵ Пермутациона нејасноћа, *eng. permutation ambiguities*

⁶⁶ Изрази “просторна корелисаност” и “временска корелисаност” потичу из периода анализе сигнала електроенцефалограма, који су по својој природи нестационарни, па ICA алгоритам није у стању да правилно раздвоји компоненте. Одредница “временска корелисаност” се односи на временски след догађаја забележених једном електродом (ишчитавање спектралне матрице по колонама). У ЕПР спектрима, то одговара вредности дуж осе магнетног поља. Одредница “просторна корелисаност” се односи на сигнале који су регистровани различитим електродама, што у контексту ЕПР спектра означава вредности сигнала различитих узорака регистрованих за исту вредност магнетног поља (ишчитавање спектралне матрице по редовима)

$$\mathbf{R}_x(0) - \sigma_\varepsilon^2 \mathbf{I}_m = \mathbf{C} \mathbf{R}_s(0) \mathbf{C}^T \quad (38)$$

$$\mathbf{R}_x(\tau) = \mathbf{C} \mathbf{R}_s(\tau) \mathbf{C}^T \quad (39)$$

Како се претпоставља да су и $\mathbf{R}_s(0)$ и $\mathbf{R}_s(\tau)$ дијагоналне матрице, пошто су изворне компоненте просторно некорелисане⁶⁷.

Ако је мешавина спектра превише дефинисана⁶⁸, $m > n$, варијанса шума $\sigma_\varepsilon^2 \mathbf{I}_m$ се може проценити као најмања сингуларна вредност $\mathbf{R}_x(0)$.

Теорема: Нека су Λ_1 , $\mathbf{D}_1 \in \mathbf{R}^{n \times n}$ дијагоналне матрице са позитивним елементима на дијагонали, и Λ_2 , $\mathbf{D}_2 \in \mathbf{R}^{n \times n}$ дијагоналне матрице уносима на дијагонали различитим од нуле. Претпоставимо и да је $\mathbf{G} \in \mathbf{R}^{n \times n}$ таква да задовољава декомпозицију:

$$\mathbf{D}_1 = \mathbf{G} \Lambda_1 \mathbf{G}^T \quad (40)$$

$$\mathbf{D}_2 = \mathbf{G} \Lambda_2 \mathbf{G}^T \quad (41)$$

Онда је матрица $\mathbf{G}$ генерализована пермутациона матрица. $\mathbf{G} = \mathbf{P} \Lambda$ ако је $\mathbf{D}_1^{-1} \mathbf{D}_2$ и $\Lambda_1^{-1} \Lambda_2$.

Уопштено, може се пронаћи линеарна трансформација која симултано дијагонализује две симетричне матрице. Симултана дијагонализација се врши у два корака, трансформација бељења⁶⁹, после кога следи унитарна трансформација

У првом кораку, матрица $\mathbf{R}_x(0)$ је подвргнута трансформацији бељења:

$$\mathbf{z}(t) = \mathbf{D}_1^{-\frac{1}{2}} \mathbf{U}_1^T \mathbf{x}(t) \quad (42)$$

⁶⁷ Положај компоненти ЕПР сигнала остаје на непромењеној позицији без обзира на снимани узорак.

⁶⁸ Факторска анализа захтева најмање $2x$ више елемената спектралне матрице у односу на број компоненти. *ICA* и *SOBI* алгоритми користе најмање онојимко елемената спектралне матрице колико компоненти систем садржи. Стога је већи број елемената спектралне матрице сувишан.

⁶⁹ Трансформација бељења, *eng. whitening*

$\mathbf{D}_1$ – сопствена вредност (*eng. eigenvalue*) матрице $\mathbf{R}_x(0)$,
 $\mathbf{U}_1$ – сопствени вектор (*eng. eigenvector*) матрице $\mathbf{R}_x(0)$, из чега следи:

$$\mathbf{R}_x(0) = \mathbf{U}_1 \mathbf{D}_1 \mathbf{U}_1^T \quad (43)$$

Онда имамо да је:

$$\mathbf{R}_z(0) = \mathbf{D}_1^{-\frac{1}{2}} \mathbf{U}_1^T \mathbf{R}_x(0) \mathbf{U}_1 \mathbf{D}_1^{-\frac{1}{2}} = \mathbf{I}_m \quad (44)$$

$$\mathbf{R}_z(\tau) = \mathbf{D}_1^{-\frac{1}{2}} \mathbf{U}_1^T \mathbf{R}_x(\tau) \mathbf{U}_1 \mathbf{D}_1^{-\frac{1}{2}} \quad (45)$$

У другом кораку, унитарна трансформација је примењена како би се дијагонализовала матрица $\mathbf{R}_z(\tau)$. Синдуларна декомпозиција матрица $\mathbf{R}_z(\tau)$ има облик:

$$\mathbf{R}_z(\tau) = \mathbf{U}_2 \mathbf{D}_2 \mathbf{U}_2^T \quad (46)$$

Онда $\mathbf{y}(t) = \mathbf{U}_2^T \mathbf{z}(t)$ задовољава:

$$\mathbf{R}_y(0) = \mathbf{U}_2^T \mathbf{R}_z(0) \mathbf{U}_2 = \mathbf{I}_m \quad (47)$$

$$\mathbf{R}_y(\tau) = \mathbf{U}_2^T \mathbf{R}_z(\tau) \mathbf{U}_2 = \mathbf{D}_2 \quad (48)$$

Последично, обе матрице, и $\mathbf{R}_x(0)$ и $\mathbf{R}_x(\tau)$ су истовремено дијагонализоване линеарном трансформацијом:

$$\mathbf{W} = \mathbf{U}_2^T \mathbf{D}_1^{-\frac{1}{2}} \mathbf{U}_1^T \quad (49)$$

До овог корака алгорима *SOBI* алгоритма, иста је процедура извођења *AMUSE* и *matrix pencil method*. Разлика коју уводи *SOBI* алгоритм састоји се у томе да се дијагонализује већи број корелационих матрица са временским кашњењем, уместо две.

Подсетимо се вектора трансформације белјења $z(t)$. Размотримо сет временски одложених корелационих матрица $z(t)$, $\mathbf{R}_z(\mathbf{e}_i) = 1, \dots, K$. *SOBI* проналази унитарну трансформацију $\mathbf{V}$:

$$\mathbf{V}^T \mathbf{R}_z(\mathbf{e}_i) \mathbf{V} = \Lambda_i \text{ за } i = 1, \dots, K \quad (50)$$

Λ_i – сет дијагоналних матрица. Како *SOBI* користи више корелационих матрица, редукује се могућност лошег избора временског кашњења.

Трансформација белјења података је важан припремни корак у свакој методи следе анализе. Класична трансформација белјења користи корелациону матрицу са једнаким временским помацима над матрицом података $x(t)$, па присутни шум не може бити отклоњен. Идеја која лежи иза новог поступка трансформације белјења је искоришћење временски одложених корелационих матрица које нису осетљиве на бели шум. Метод је назван *robust whitening*.

Временски одложена корелациона матрица $\mathbf{R}_x(\tau)$ посматраног сета података $x(t)$ има форму:

$$\mathbf{R}_x(\tau) = E \{x(t)x^T(t-\tau)\} = \mathbf{C} \mathbf{R}_s(\mathbf{e}_\tau)^T \quad \tau \neq 0 \quad (51)$$

Лако је уочити да трансформација белјења $\mathbf{R}_x^{-\frac{1}{2}}(\tau)$ над подацима $x(t)$, нема ефекта на вектор $\varepsilon(t)$. Тако се редукује ефекат шума у односу на трансформацију $\mathbf{R}_x^{-\frac{1}{2}}(0)$. Ипак, за неке вредности τ , $\mathbf{R}_x^{-\frac{1}{2}}(\tau)$ неће бити позитивно дефинисано. Робустна трансформација белјења разматра комбинацију неколико временски одложених корелационих матрица:

$$\mathbf{K}_x = \sum_{i=1}^K \alpha_i \mathbf{M}_x(\mathbf{e}_i) \quad (52)$$

Правилан избор α_i резултује позитивним дефинисањем матрице $\mathbf{K}_x$ која се у даљем поступку разлаже на сопствене вредности.

Као коначни закључак, показују се предности *SOBI-RO* алгоритма у смислу најмање величине спектралне матрице, могућности раздвајања компоненти које су гаусијанске и функционисања са сигнаlima у којима постоји шум.

2.4.2. Анализа ЕПР спектра у фреквентном домену

Анализе спектра у фреквентном домену су есенцијалне за уклањање шума. Помоћу филтера са лимитом фреквенције могуће је уклонити и базну линију сигнала. Осим тога, превођењем сигнала у фреквентни домен сваком иницијалном вектору, придружује се спектрограм који може послужити у препознавању сигнала. Предности у односу на мултиваријационе технике огледају се и у томе што се као улазни подаци користе појединачни ЕПР сигнали (вектори), уместо спектралних матрица.

Описане методе се могу употребити и за припрему података који ће касније бити анализирани мултиваријационим методама. У првој фази се филтрирају сигнали, а затим би се компоненте високе и ниске фреквенције независно анализирале.

У раду су коришћене две методе, метода Фуријеове трансформације⁷⁰ на целом сигналу или на помичним прозорима сталне дужине⁷¹ као и метод таласића⁷².

⁷⁰ Фуријеова трансформација, *eng. Fast Fourier Transform, FFT*

⁷¹ Помични прозор сталне дужине, *eng. Fixed Size Window, FSW*

⁷² Таласићи, *eng. Wavelets*, историјски исправан назив зато што су функције које се користе таласасте форме, али за разлику од синуса ("великог таласа"), нису дефинисане од $-\infty$ до $+\infty$, већ на малом интервалу

2.4.2.1. ФУРИЈЕОВА ТРАНСФОРМАЦИЈА

На идеју да се свака периодична, интеграбилна функција може представити редом функција које су ортонормиране дошао је Фурије⁷³ 1804. године. За систем функција одабране су тригонометријске функције синуса и косинуса [70-75]:

$$f(x) = \frac{a_0}{2} + \sum_{k=1}^{\infty} [a_k \cos(kx) + b_k \sin(kx)] \quad (53)$$

$$a_k = \frac{1}{\pi} \int_{-\pi}^{\pi} f(x) \cos(kx) dx \quad b_k = \frac{1}{\pi} \int_{-\pi}^{\pi} f(x) \sin(kx) dx \quad (54)$$

$\frac{a_0}{2}$ – константа, средња вредност функције $f(x)$ на интервалу од $-\pi$ до $+\pi$,
 a_k , b_k – коефицијенти развоја Фуријеовог реда, k – коефицијент који одређује фреквенцију синусоида.

Прави напредак и масовна примена Фуријеове трансформације уследила је са развојем рачунарске технике и *FFT* алгоритама.

FFT алгоритам представља ефикасан алгоритам за рачунање дискретне Фуријеове трансформације⁷⁴ и њене инверзне функције:

$$X_k = \sum_{n=0}^{N-1} e^{-2\pi i k(n/N)} x_n \quad (55)$$

Бројни су алгоритми којима се врши *FFT*, а неки од њих су: *Cooley-Turkey algorithm*, *Prime-factor FFT algorithm*, *Bruun's FFT algorithm*, *Rader's FFT algorithm*, *Bluestain's FFT algorithm*, *Butterfly diagram* и бројни други којима се процес рачунања убрзава.

Недостатак методе се огледа у томе што се анализом вектора одговарајуће дужине не може судити о спорадичним⁷⁵ променама сигнала. Све фреквентне

⁷³ Фурије, fra. *Jean-Baptiste Joen Fourier*

⁷⁴ Дискретна Фуријеова трансформација, eng. *Discrete Fourier Transformation, DFT*

⁷⁵ Спорадичне промене сигнала, eng. *sparse signals*

компоненте имају искључиво фазни помак, али не и могућност увођења или уклањања неке од компонената у дефинисаном временском интервалу. Овај недостатак се једноставно превазилази методом помичног прозора фиксне дужине трајања (*FSW-FFT*) који се представља као спектрограм.

2.4.2.2. ТАЛАСИЋИ (*WAVELETS*)

Метода анализе сигнала коришћењем таласића датира са почетка двадесетог века и радова Хара (*eng. Haar*) [76]. Хар је покушао да дефинише ортонормирани систем функција на интервалу $[0,1]$ такав да за било коју функцију $f(x)$ непрекидну на датом интервалу ред:

$$(f, h_0)h_0(x) + (f, h_1)h_1(x) + \dots + (f, h_n)h_n(x) \quad (56)$$

униформно конвергира ка $f(x)$ на интервалу $[0,1]$ при чему је скаларни производ функција (f, h) дефинисана норма. Постављени проблем има бесконачно много решења. Хар је одабрао као базу функција⁷⁶ $h_n(x)$, одабрао функцију која на датом интервалу има вредност 1, а у осталим интервалима 0.

Даљи напредак долази радовима Фабера и Шнаудера (*Faber, Schnauder*) који су за базну функцију одабрали “кров функцију”⁷⁷. Од великих имена која су обележила историју проучавања таласића ваља навести *Ingrid Daubechies*, *Yves Meyer*, *Denis Gabor* (добитник Нобелове награде), *Stephane Mallat* [77-83].

Ingrid Daubechies дефинисала је за сваки цео број ($r \in \mathbb{Z}$) ортонормирани базис одређен функцијом $\psi_r(x)$:

$$2^{1/2} \psi_r(2^j x - k) \quad j, k \in \mathbb{Z} \quad (57)$$

⁷⁶ База функција, *eng. basis function*

⁷⁷ “Кров функција” је функција која има форму једнакокраког троугла

Функција $\psi_r(x)$ мора да испуњава следеће особине:

- Компактни носач функције $\psi_r(x)$ је интервал $[0, 2r-1]$
- Функција $\psi_r(x)$ има r момената једнаких нули:

$$\int_{-\infty}^{\infty} \psi_r(x) dx = \dots = \int_{-\infty}^{\infty} x^{r-1} \psi_r(x) dx = 0 \quad (58)$$

- Функција $\psi_r(x)$ има r непрекидних извода, при чему је $r \approx 0,2$

Вредношћу параметра r постиже се фина промена облика функције, која за вредности око 4 има готово идеалан облик првог извода Гаусове функције. За вредност параметра $r = 1$, *Daubechies* таласић постаје *Haar* таласић, док за веће вредности r , *Daubechies* таласић постаје погоднији за анализирање глатких функција.

Опсежна употреба таласића, како за анализу једнодимензионих сигнала тако и слика почиње са радовима Дениса Габора. Алгоритми развијени за потребе *FFT* анализе инспирисали су и развој дискретне трансформације таласићима⁷⁸.

$$(W\psi x)(b, a) = \sqrt{|a|} \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) \bar{\psi}\left(\frac{t-b}{a}\right) dt \quad (59)$$

ψ означава базични таласић, а $\bar{\psi}$ је комплексни конјугат ψ , a представља фактор скалирања за фреквенцију $x(t)$ и параметар b карактерише позицију $x(t)$ у временском и просторном домену.

⁷⁸ Дискретна трансформација таласићима, *eng. Discrete Wavelet Transform, DWT*

2.4.3. Анализа ЕПР спектра применом фракталне анализе

Фрактална димензија⁷⁹ (FD) преставља нелинеарну меру комплексности сигнала у [84-88]. Сигнали се анализирају у секвенцама $x(1), x(2), \dots, x(N)$ а затим се конструише нова серија X_k^m дефинисана као:

$$X_k^m : x(m), x(m+k), x(m+2k), \dots, x(m + \text{int} \left[\frac{N-m}{k} \right] k) \quad (60)$$

за $m=1, 2, \dots, k$, m – почетно време, $k=2, \dots, k_{\max}$, k – временски интервал, int – целобројни део реалног броја. Дужина криве, $L_m(k)$ рачуната је за сваку од укупно k временских серија за криве X_k^m :

$$L_m(k) = \frac{1}{k} \left[\sum_{i=1}^{\text{int} \left[\frac{N-m}{k} \right]} |x(m+ik) - x(m+(i-1)k)| \right] \frac{N-1}{\text{int} \left[\frac{N-m}{k} \right] k} \quad (61)$$

N – дужина оригиналане временске серије X ,
 $\frac{N-1}{\text{int} \left[\frac{N-m}{k} \right] k}$ – нормализациони фактор

$L_m(k)$ је усредњено за свако m дајући средњу вредност дужине криве $L(k)$ за свако $k=2, \dots, k_{\max}$:

$$L(k) = \frac{\sum_{m=1}^k L_m(k)}{k} \quad (62)$$

Затим је фрактална димензија одређена као нагиб најмањих квадрата најбољег линеарног фита плота $\ln(L(k))$ наспрам $\ln(1/k)$:

$$FD = \ln(L(k)) / \ln(1/k) \quad (63)$$

⁷⁹ Фрактална димензија, *eng. fractal dimension, FD*

2.4.4. Методе за препознавање и класификацију спектра

Један од најважнијих корака у стварању интелигентног аналитичког система представља процес препознавања чистих спектралних компоненти. Препознавање компоненти има за циљ да повеже методе које за раздвајање компоненти не захтевају улазне податке о форми компоненти (*eng. blind source separation, BSS*) са методама које захтевају улазне векторе који се прилагођавају чиме се обезбеђује значајно већа прецизност анализе.

2.4.4.1. ЛИНЕАРНА ДИСКРИМИНАЦИОНА АЛАЛИЗА СА ТРЕНИНГ ВЕКТОРИМА

Нека је $T(x_i, y_i)$ матрица тренинг вектора. Матрица расипања унутар једне класе S_w и између различитих класа S_B може се описати као [89-95]:

$$S_w = \sum S_y \quad (64)$$

$$S_y = \sum (\mathbf{x}_i - \boldsymbol{\mu}_i)(\mathbf{x}_i - \boldsymbol{\mu}_i)^T \quad (65)$$

$$S_B = \sum |I_y|(\boldsymbol{\mu}_y - \boldsymbol{\mu})(\boldsymbol{\mu}_y - \boldsymbol{\mu})^T \quad (66)$$

$\boldsymbol{\mu}$ – означава вектор укупне средње вредности, а $\boldsymbol{\mu}_y$ означава вектор средње вредности класе. Вектори $\boldsymbol{\mu}$ и $\boldsymbol{\mu}_y$ су дефинисани једначинама:

$$\boldsymbol{\mu} = \frac{1}{l} \sum \mathbf{x}_i \quad (67)$$

$$\boldsymbol{\mu}_y = \frac{1}{|I_y|} \sum \mathbf{x}_i \quad (68)$$

Главни циљ LDA је да тренира линеарну пројекцију података:

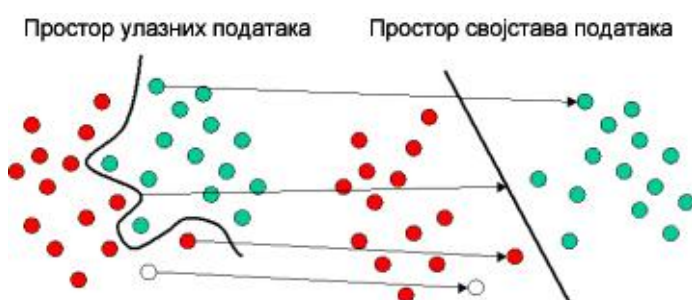
$$z = \mathbf{W}^T \mathbf{x} \quad (69)$$

На тај начин је максимизирана раздвојеност класа. Критеријум раздвајања је дефинисан једначином:

$$F(\mathbf{W}) = \frac{\det \mathbf{\Phi}_B}{\det \mathbf{\Phi}_W} \quad (70)$$

2.4.4.2. МЕТОД НОСЕЋИХ ВЕКТОРА

Метода SVM^{80} базирана је на концепту равни одлучивања. Равни одлучивања деле сет објеката које припадају различитим класама. Класификатор може бити линеаран или нелинеаран. Као сет података који се анализира, SVM користи нове објекте које класификује на основу претходно познатих⁸¹. На **слици 31**, шематски је приказан принцип SVM класификације. Оригинални сет података је мапиран (трансформисан) употребом математичких формула познатих као језгра⁸² [91-95].



Слика 31. Мапирање оригиналног сета података употребом функција језгра чиме се обезбеђује да су тако добијени објекти линеарно сепарабилни.

SVM је примарно развијен као метод за класификацију, а може се користити и као метод регресије. Класификациони проблем се решава конструкцијом хипер-равни у мултидимензионалном простору који одваја различите класе.

⁸⁰ Метод носећих вектора, *eng. Support Vector Machines, SVM*

⁸¹ У страној литератури, нови објекти се називају *eng. test cases*, а познати објекти су *eng. train cases*

⁸² Језгро, *eng. kernel*

Класификациони SVM типа 1 дефинисан је следећим релацијама:

$$\frac{1}{2} w^T w + C \sum_{i=1}^N \xi_i \quad (71)$$

$$y_i (w^T \phi(x_i) + b) \geq 1 - \xi_i \quad \xi_i \geq 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (72)$$

Релација представља функцију грешке чију вредност је потребно минимизовати. C означава константу капацитивности, w – вектор коефицијената, b је константа, ξ – параметри за податке који се не могу раздвојити, ϕ означава кернел функцију.

Класификација типа 2 разликује се у односу на класификацију типа 1 по функцији грешке која се рачуна минимизовањем функције грешке дефинисане релацијом:

$$\frac{1}{2} w^T w - \nu \rho + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \xi_i \quad (73)$$

$$y_i (w^T \phi(x_i) + b) \geq \rho - \xi_i \quad \xi_i \geq 0 \quad \rho \geq 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (74)$$

Функције језгра, ϕ , дефинисане су једначинама:

$$\phi = x_i x_l \quad \text{линеарни} \quad (75)$$

$$\phi = (x_i x_j + \text{coefficient})^{\text{degree}} \quad \text{полиномални} \quad (76)$$

$$\phi = \exp\left(-\gamma |x_i - x_j|^2\right) \quad \text{RBF} \quad (77)$$

$$\phi = \tanh(x_i x_j + \text{coefficient}) \quad \text{сигмоидан} \quad (78)$$

2.5. МЕТОДЕ ЗА АНАЛИЗУ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ СПЕКТРА И СЛИКА

2.5.1. Анализа спектра флуоресцентне пробе APF

Кинетички профил *APF* може се представити као линеарна функција дефинисана у временском домену:

$$A(t) = at + A_0 \quad (79)$$

$A(t)$ – амплитуда емисије флуоресценције у датом временском тренутку t , a – параметар који одређује нагиб функције, A_0 – почетни интензитет емисије флуоресценције.

У присуству ($\bullet OH$) радикала интензитет емисије флуоресценције се повећава са временом услед раскидања $-O-$ везе и одвајања дела молекула. Коефицијент (C_{OH}) којим се одређује релативна продукција ($\bullet OH$) радикала рачуна се по једначини:

$$C_{OH} = \frac{a}{A_0} \quad (80)$$

2.5.2. Анализа спектра флуоресцентне пробе DPBF

Кинетички профил пробе *DPBF* по форми је експоненцијалан:

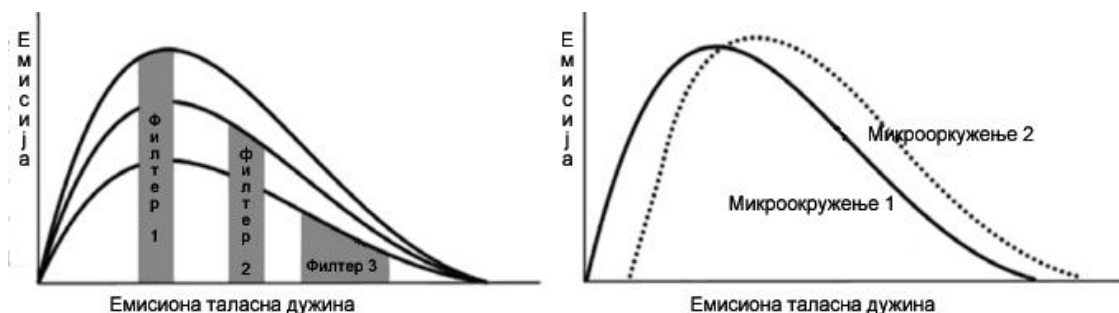
$$A(t) = A_0 e^{-at} \quad (81)$$

$A(t)$ – амплитуда емитоване флуоресценције у датом временском тренутку t која опада, A_0 – почетни интензитет емисије, a – експоненцијални коефицијент (C_{OOH}).

Коефицијент (C_{OON}) којим се одређује продукција ($\bullet O_2^-$) радикала одговара вредности параметра a .

Како би се стекао увид у стабилност продукције или уклањања слободних радикала, коришћени су временски прозори дужине 20 – 30 тачака, који пружају оптималан однос прецизности одређивања параметара једначина и временске осетљивости.

Поступак анализе слика у многеме подсећа на класични поступак анализе екситационо-емисионе матрице, при чему се узорак побуђује серијом светлости различитих таласних дужина, при чему се за сваку од њих региструје емисиони спектар. Флуоресцентни микроскоп ради по сличном принципу, уз разлику да се уместо емисионог спектра бележи интеграл емисионог интензитета који је одређен својствима филтера (слика 32) [96-98].

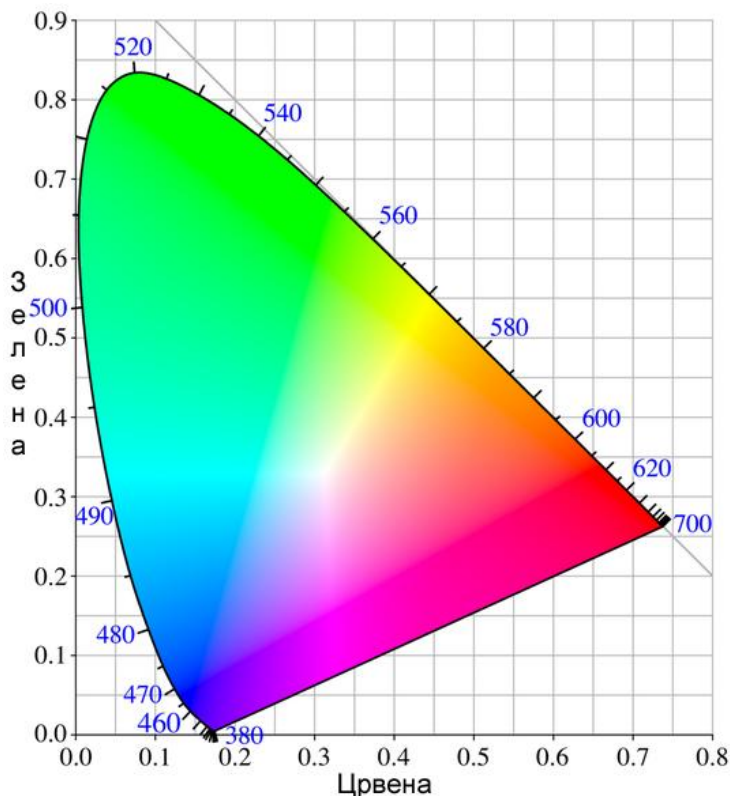


Слика 32. А – шематски приказ испитивања узорка на флуоресцентном микроскопу, уз коришћење више сетова екситационо-емисионих филтера. Б – утицај микроокружења на емисиони спектар флуорофора узрокује померање спектра који се различито одражава на различите сетове филтера [98].

Серија слика симулира кинетику, а односи канала у RGB^{83} , искоришћени су за кориговање ефекта фотоизбељивања и карактеризацију микроокружења флуорофора. Осим тога, налажењем количника сваког пара канала могуће је делимично реконструисати и микроокружење које утиче на промену форме емисионог спектра. Како су снимана биљна ткива, уочена је и аутофлуоресценција, а описани метод проналажења количника вредности по каналима на сликама додатно карактерише грађу и функцију ћелија.

⁸³ Систем за приказивање боја мешањем 3 основне боје, црвене, зелене и плаве, *eng. Red Green Blue*

За постизање реалистиче боје слика употребљен је програм *BioCIE*⁸⁴. Задавањем граница емисионог филтера, из *CIE* простора боја⁸⁵ прелази се на *RGB*. (слика 33).



Слика 33. *CIE* дијаграм којим се светлост одређене таласне дужине може добити комбиновањем црвеног, зеленог и плавог канала. Вредност заступљености плаве боје добија се по формули $плава = 1 - црвена - зелена$.

Како би се боље уочиле сличности у биљним ткивима, и окарактерисали типови ћелија и ткива, искоришћене су мултиваријационе технике прилагођене раду са сликама. У основи, једина разлика између анализе слика и анализе сигнала огледа се у томе што је пре саме анализе неопходно превести слику (матрицу) у сигнал (вектор). Анализа је вршена у програму *Matlab*, а један од већ постојећих алата је програм *MACMIA*.

⁸⁴ *BioCIE*, је самостални, бесплатни софтвер развијен у програмском језику *Java*

⁸⁵ Међународна комисија о светлости, *fra. Commission Internationale d'Eclairage, CIE*

3. РЕЗУЛТАТИ

Секција о резултатима подељена је у шест целина; (1) резултати разлагања симулираних спектра, чиме се доказује делотворност аналитичког приступа, (2) разлагање сложених спектра плазма мембрана, које су пример сложеног биолошког система у коме се производе слободни радикали, (3) разлагање сложеног спектра биљних митохондрија, (4) разлагање сложеног спектра ћелијског зида биљака, (5) разлагање сложеног електрохемијског сигнала и (6) резултати анализе слика биљног материјала у коме се производе слободни радикали, а које су анализирани мултиваријационим техникама прилагођеним за анализу слика.

3.1. Симулације спектра

Након што су ЕПР спектри *DEPMPO* адуката симулирани у складу са једначином (3), приступило се разлагању спектра⁸⁶. Процес анализе се може поделити у неколико основних корака (**слика 34**):

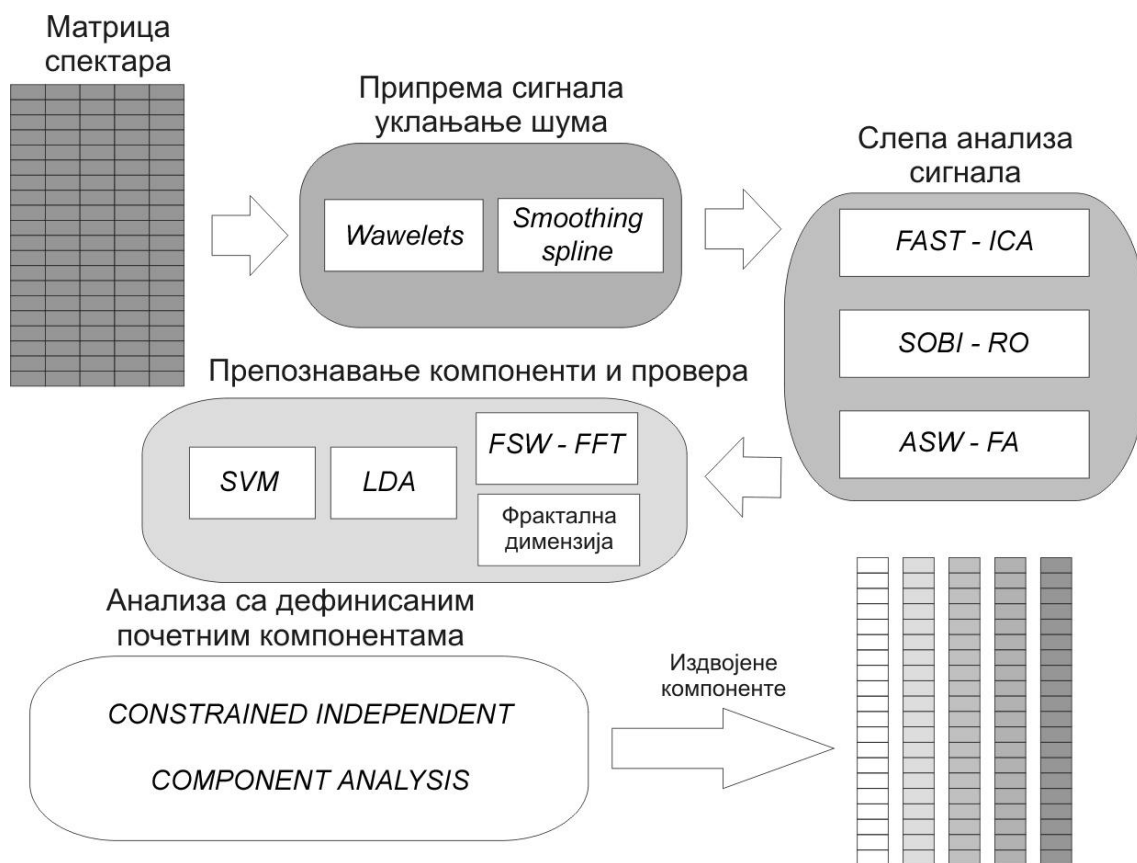
- Припрема сигнала, декомпозиција таласића, након кога следи уклањање шума базне линије помоћу методе сплајна⁸⁷.
- Слепа анализа спектралне матрице, у којој се примењује *SOBI-RO* алгоритам, а као помоћне методе *FastICA* (погодна за сетове података са малим бројем компоненти), као и *ASW-FA* која захтева да се спектри прво интегралне⁸⁸.

⁸⁶ За симулације је коришћен програм *WINEPR SimFonia (Bruker Biospin)*

⁸⁷ Сплајн, *eng. smoothing spline*, крива из класе полинома. Коришћен је софтвер *MathWorks Matlab R2007a*

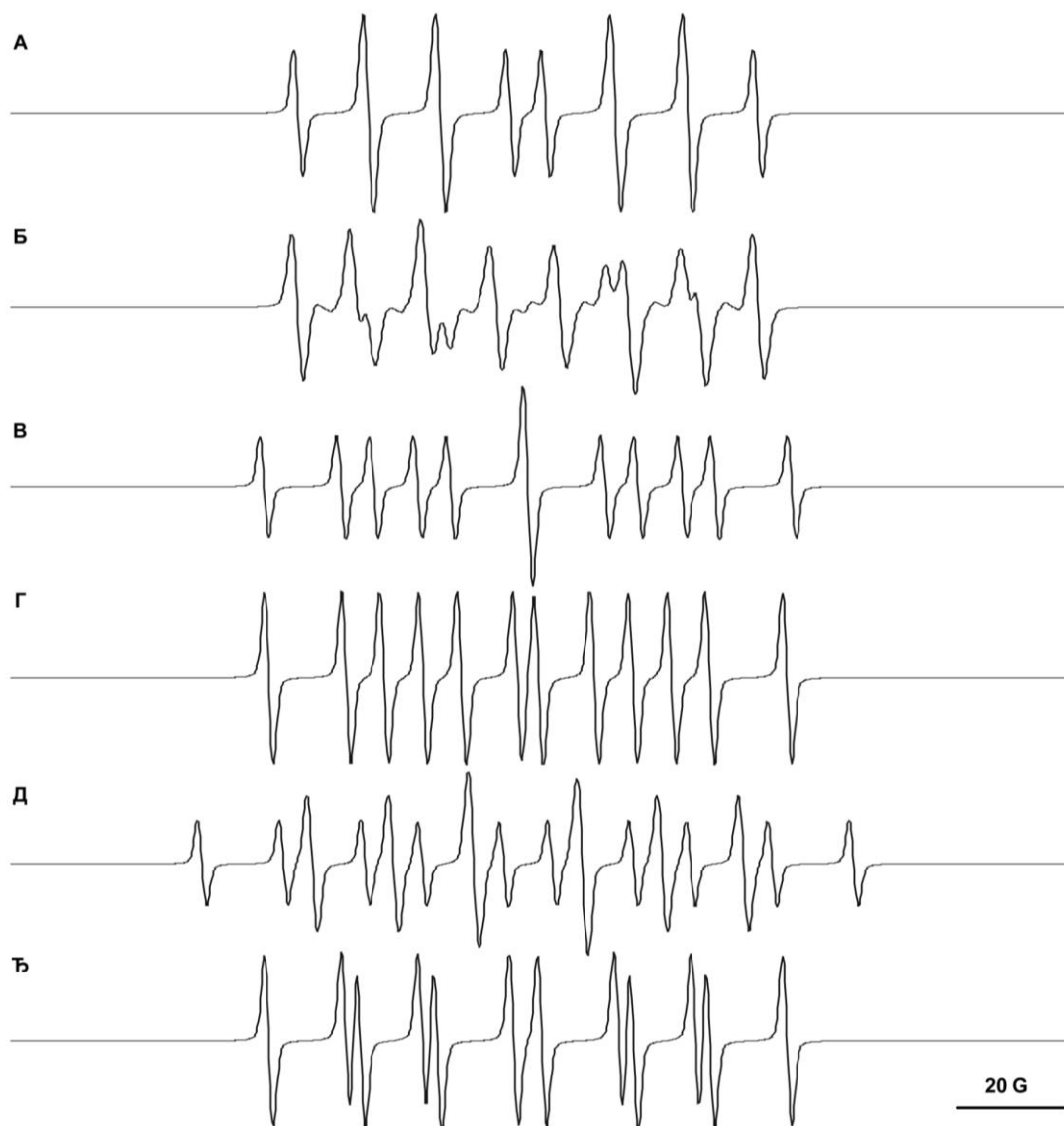
⁸⁸ Сви алгоритми су тестирани алатима развијеним за *MathWorks Matlab*. За *SOBI-RO* и *CICA* метод коришћен је пакет *ICALab*, за *ICA* анализу коришћен је пакет *FastICA*, док је *ASW-FA* је урађена сопственом скриптом, такође развијеној за *MathWorks Matlab*

- Препознавање компоненти спектра помоћу више комплементарних метода и то *LDA*, *SVM*, одређивања фракталне димензије и конструкција спектрограма. У кораку препознавања коришћено је више метода како би се избегле грешке првог и другог реда.
- Последњи корак у анализи чини разлагање спектралне матрице на компоненте, с тим да су спектралне компоненте од старта анализе познате. Као идеална метода намеће се усмерена анализа независних компоненти *CICA*



Слика 34. Шематски приказ предложене аналитичке процедуре.

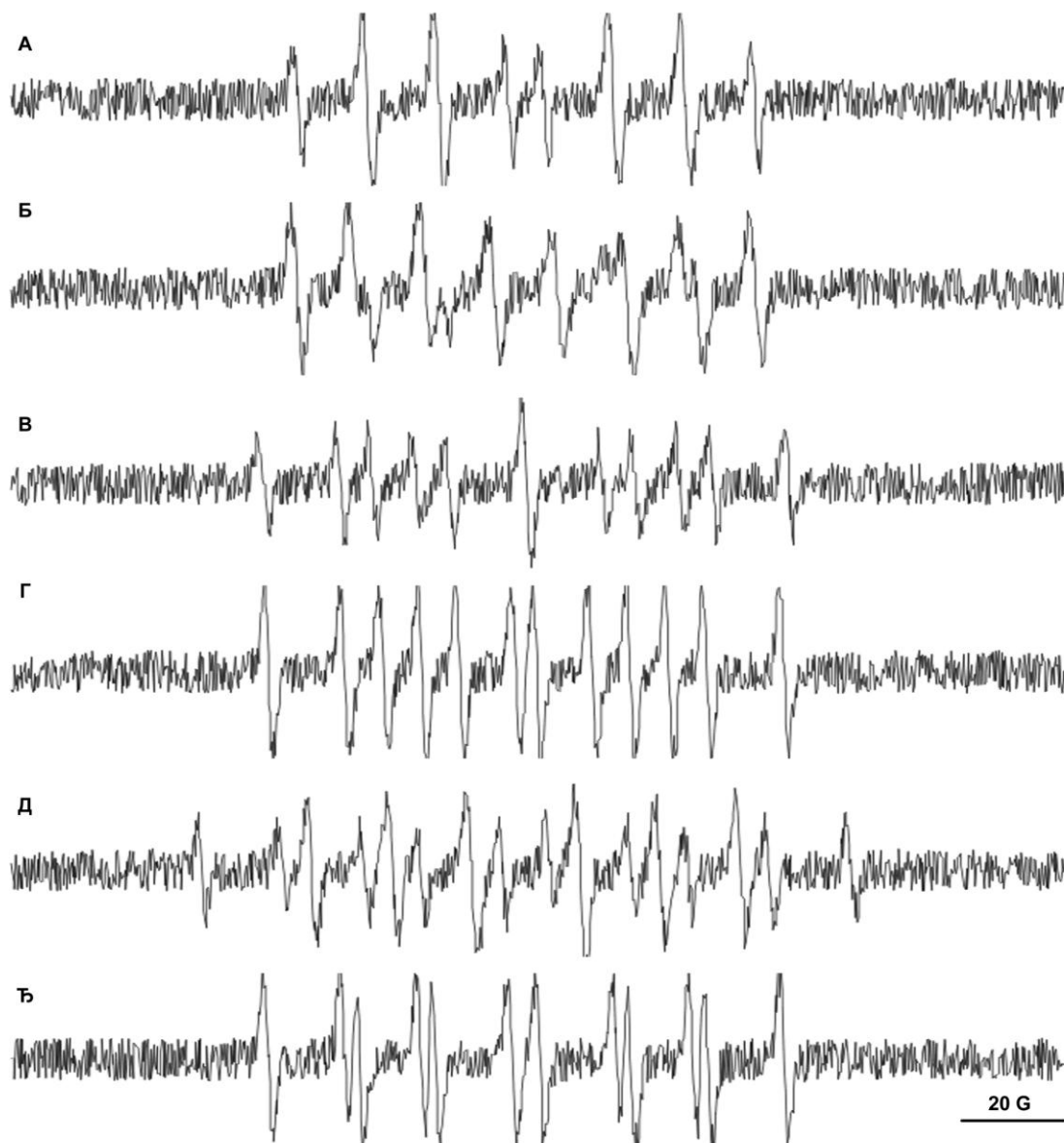
Анализа ефикасности предвиђеног интелигентног система започиње симулацијама спин адуката спинског хватача *DEPMPO* (слика 35).



Слика 35. EPR спектри DEPMPO спин адуката. А – Хидроксил радикала ($\bullet\text{OH}$), Б – Супероксид анјон радикала ($\bullet\text{O}_2^-$), В – Метокси радикала ($\bullet\text{CH}_2\text{OH}$), Г – Метил радикала ($\bullet\text{CH}_3$), Д – Водоничног радикала ($\bullet\text{H}$), Ѓ – Угљен диоксид анјон радикала ($\bullet\text{CO}_2^-$).

Током снимања биолошких система, честа је појава белог шума⁸⁹, који се једноставно симулира суперпозицијом симулираних спектра са матрицом генерисаних случајних бројева (слика 36).

⁸⁹ Бели шум, *eng. white noise*, у анализи сигнала означава сигнал случајних променљивих које се одликују нормалном дистрибуцијом



Слика 36. Симулирани EPR спектри DEPMPPO адуката са присутним белим шумом. А – Хидроксил радикала ($\bullet\text{OH}$), Б – Супероксид анјон радикала ($\bullet\text{O}_2^-$), В – Метокси радикала ($\bullet\text{CH}_2\text{OH}$), Г – Метил радикала ($\bullet\text{CH}_3$), Д – Водоничног радикала ($\bullet\text{H}$), Ђ – Угљен диоксид анјон радикала ($\bullet\text{CO}_2^-$). Спектри су нормализовани у опсегу од -1 до +1, а вредности белог шума варирају у опсегу од -0,25 до +0,25.

У првом кораку анализе извршена је декомпозиција сигнала употребом таласића, *discrete Meyer* и *Daubechies*, а затим је уклоњен шум уз поштовање правила *rigorous SURE*⁹⁰. Обе класе примењених таласића дају готово истоветне

⁹⁰ *SURE* – eng. *Stein's Unbiased Estimate of Risk*, метода за одређивање прага који раздваја сигнал и шум

результате, а на слици су приказани резултати уклањања шума коришћењем *Daubechies* таласића (слика 37).



Слика 37. Уклањање шума из симулираних сигнала након декомпозиције *Daubechies* таласићом и примене правила *rigorous SURE*. Подједнаку ефикасност је показао и *discrete Meyer* таласић. А – Хидроксил радикал ($\bullet\text{OH}$), Б – Супер оксид анјон радикал ($\bullet\text{O}_2^-$), В – Метокси радикал ($\bullet\text{CH}_2\text{OH}$), Г – Метил радикал ($\bullet\text{CH}_3$), Д – Водонични радикал ($\bullet\text{H}$), Ђ – Угљен диоксид анјон радикал ($\bullet\text{CO}_2^-$).

Применом таласића за отклањање шума остварује се могућност очувања могућих пикова слабо заступљених компоненти. Додатно уклањање шума и базне линије је извршено коришћењем сплајна којим је фитован спектар након примене таласића. Приликом уклањања шума описаном техником, јављају се два супротстављена циља. Потребно је знатно уклонити шум из делова сигнала који

не носе значајну информацију, а сачувати сегменте на којима се јављају пикови. Задатак је могуће извршити на два начина, могу се дефинисати опсези у којима се очекује појава пикова, или се може задати праг којим се дефинишу границе примене *smoothing spline* са одговарајућим фактором специфичности (слика 39).



Слика 38. Финално уклањање шума из симулираних спектра применом *smoothing spline* фитовања. А – Хидроксил радикал ($\bullet OH$), Б – Супер оксид анјон радикал ($\bullet O_2^-$), В – Метокси радикал ($\bullet CH_2OH$), Г – Метил радикал ($\bullet CH_3$), Д – Водонични радикал ($\bullet H$), Ђ – Угљен диоксид анјон радикал ($\bullet CO_2^-$).

Пре примене мултиваријационих техника за анализу композитних спектра добро је упознати се са статистичким особинама спектра спин адуката спинског хватача *DEPMPO*.

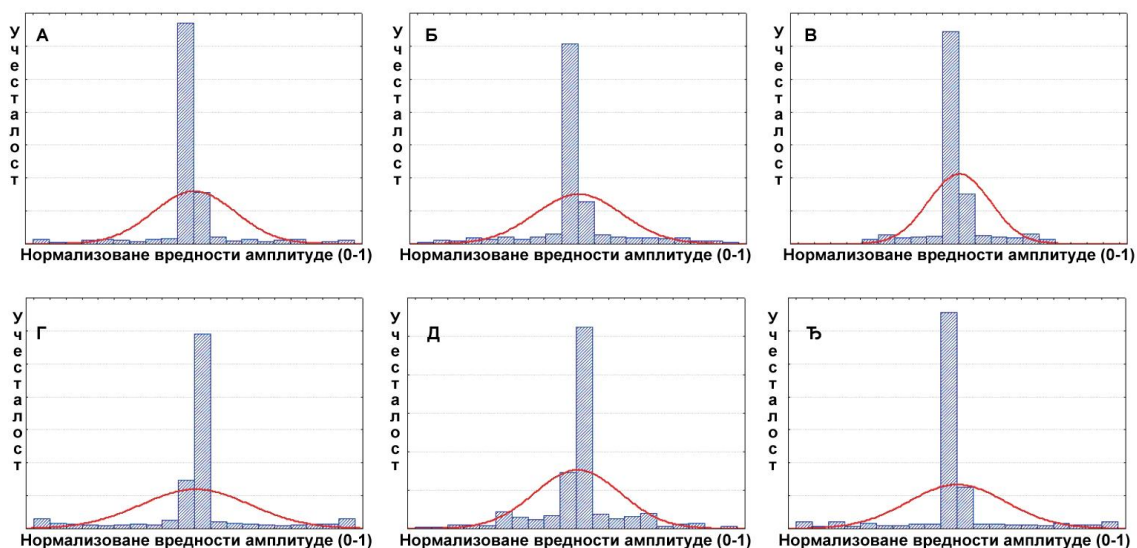
У техникама базираним на факторској анализи, пресудну улогу за успех анализе игра корелисаност спектра. У **табели 2** приказане су корелације симулираних спектра без шума и са присутним белим шумом.

Табела 2. Корелациона матрица симулираних спектра спин адуката спинског хватача *DEPMPO*. Нормализовани сигнали [-1; +1] (горе), нормализовани сигнали [-1; +1] са белим шумом [-0,25; +0,25] (доле)

	•ОН	•O ₂ ⁻	•CH ₂ ОН	•CH ₃	•Н	•CO ₂ ⁻
•ОН	1.000000	0.225741	-0.083746	-0.179986	-0.021124	0.183535
•O ₂ ⁻	0.225741	1.000000	-0.140468	-0.066109	-0.117743	0.055177
•CH ₂ ОН	-0.083746	-0.140468	1.000000	-0.122808	-0.058109	-0.071369
•CH ₃	-0.179986	-0.066109	-0.122808	1.000000	-0.151408	0.531319
•Н	-0.021124	-0.117743	-0.058109	-0.151408	1.000000	0.017904
•CO ₂ ⁻	0.183535	0.055177	-0.071369	0.531319	0.017904	1.000000

	•ОН	•O ₂ ⁻	•CH ₂ ОН	•CH ₃	•Н	•CO ₂ ⁻
•ОН	1.000000	0.173219	-0.076810	-0.102320	0.009495	0.186388
•O ₂ ⁻	0.173219	1.000000	-0.053503	-0.034667	-0.076902	0.022685
•CH ₂ ОН	-0.076810	-0.053503	1.000000	-0.088660	-0.040780	-0.042236
•CH ₃	-0.102320	-0.034667	-0.088660	1.000000	-0.122915	0.448244
•Н	0.009495	-0.076902	-0.040780	-0.122915	1.000000	0.005105
•CO ₂ ⁻	0.186388	0.022685	-0.042236	0.448244	0.005105	1.000000

На основу вредности из **табеле 2**, можемо претпоставити које ће технике базиране на мултиваријационој анализи бити ефикасне. Како су корелације ниске, *FA* са ортогоналним ротација би требало да буде ефикаснија у поређењу са *FA* у којој су примењене неортогоналне ротације. Да би се извеле претпоставке о ефикасности *ICA* алгоритма, потребно је утврдити да ли симулирани спектри имају Гаусову дистрибуцију. Ограничење *ICA* алгоритма је раздвајање већег броја компоненти које се одликују Гаусовом дистрибуцијом, пошто у том случају постоји бесконачно решења која одговарају линеарној комбинацији независних компоненти (**слика 39**).



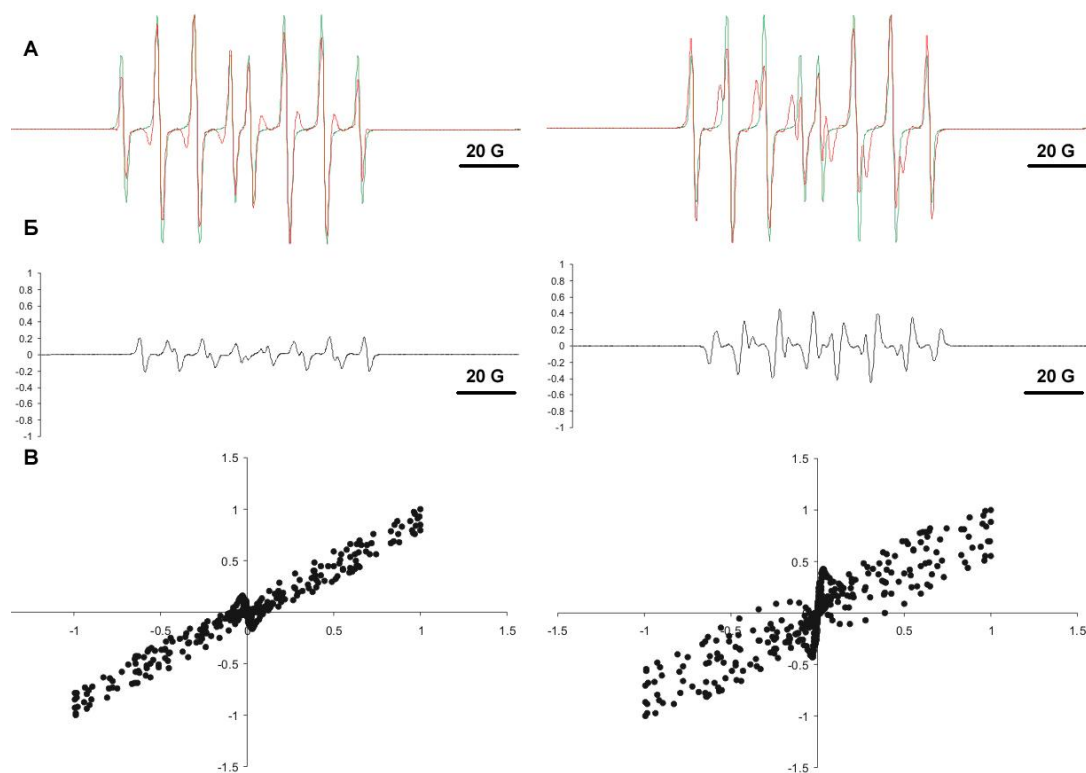
Слика 39. Хистограми симулитаних спектра (плави барови) фитовани нормалном дистрибуцијом (црвена линија). А – Хидроксил радикал ($\bullet\text{OH}$), Б – Супер оксид анјон радикал ($\bullet\text{O}_2^-$), В – Метокси радикал ($\bullet\text{CH}_2\text{OH}$), Г – Метил радикал ($\bullet\text{CH}_3$), Д – Водонични радикал ($\bullet\text{H}$), Ђ – Угљен диоксид анјон радикал ($\bullet\text{CO}_2^-$).

Како ниједан од анализираних спектра у основи нема Гаусову дистрибуцију на целој дужини сигнала, *ICA* алгоритам има услова да се покаже ефикасним у раздвајању сложених спектра. У случају да је сложени спектар начињен од великог броја компоненти (више од 3), ефикасност би вероватно опала услед чињенице да су ЕПР сигнали спорадични и да ће региони у којима је преклопљено више пикова показивати Гаусову расподелу.

Пре анализирања композитних спектра који се састоје из 5 или 6 адуката, испитивана је ефикасност аналитичких метода за раздвајање једноставних композитних спектра састављених линеарном комбинацијом спеката 2 адуката. На основу података из **табеле 2**, и заступљености у биолошким системима, тестирани су сложени спектри чије су компоненте спектри хидроксил радикала ($\bullet\text{OH}$) и супер оксид анјон радикала ($\bullet\text{O}_2^-$).

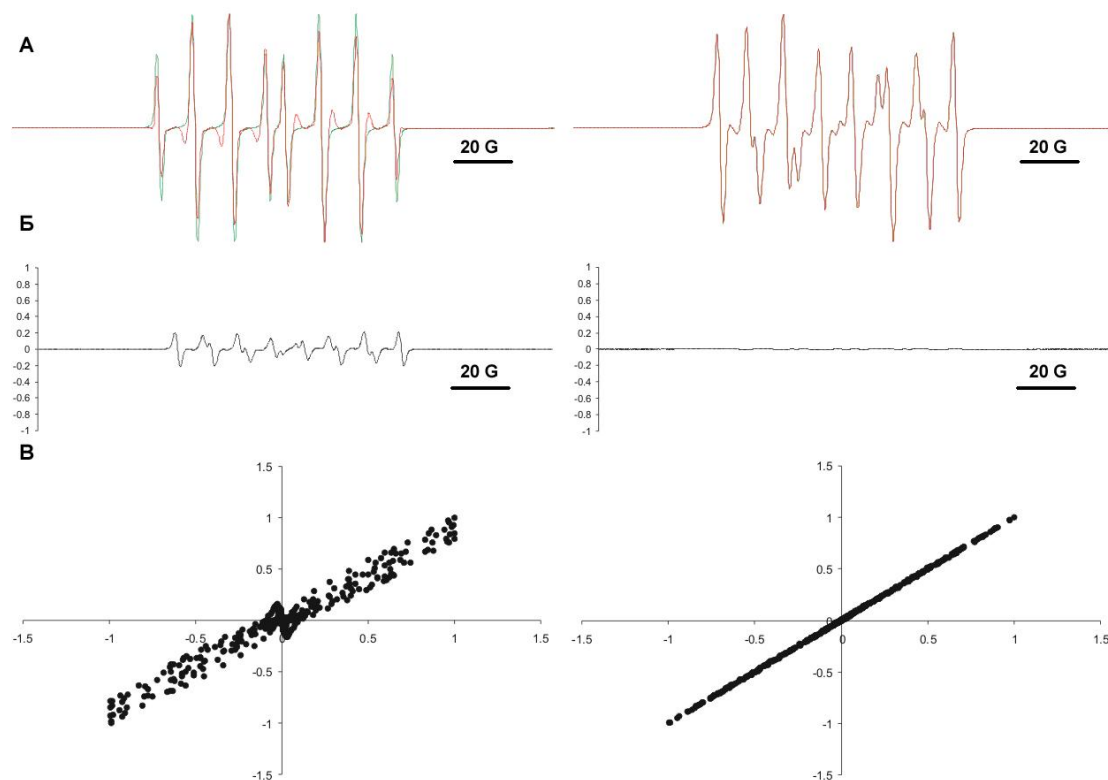
Спектри (без шума), прво су анализирани применом *FA* анализе. *FA* је могуће применити са 3 различита начина ротације факторских скорова: без ротације (**слика 40**), применом ортогоналне ротације *Varimax* (**слика 41**), применом неортогоналне ротације *Promax* (**слика 42**).

Показало се да факторска анализа постиже знатно слабије резултате раздвајања компоненти ако је у сигнаlima присутан и шум. У таквим условима једино анализа у којој се користи *Varimax* метод за ротацију факторских скорова даје задовољавајуће резултате. Ови резултати нису приазани у тексту.

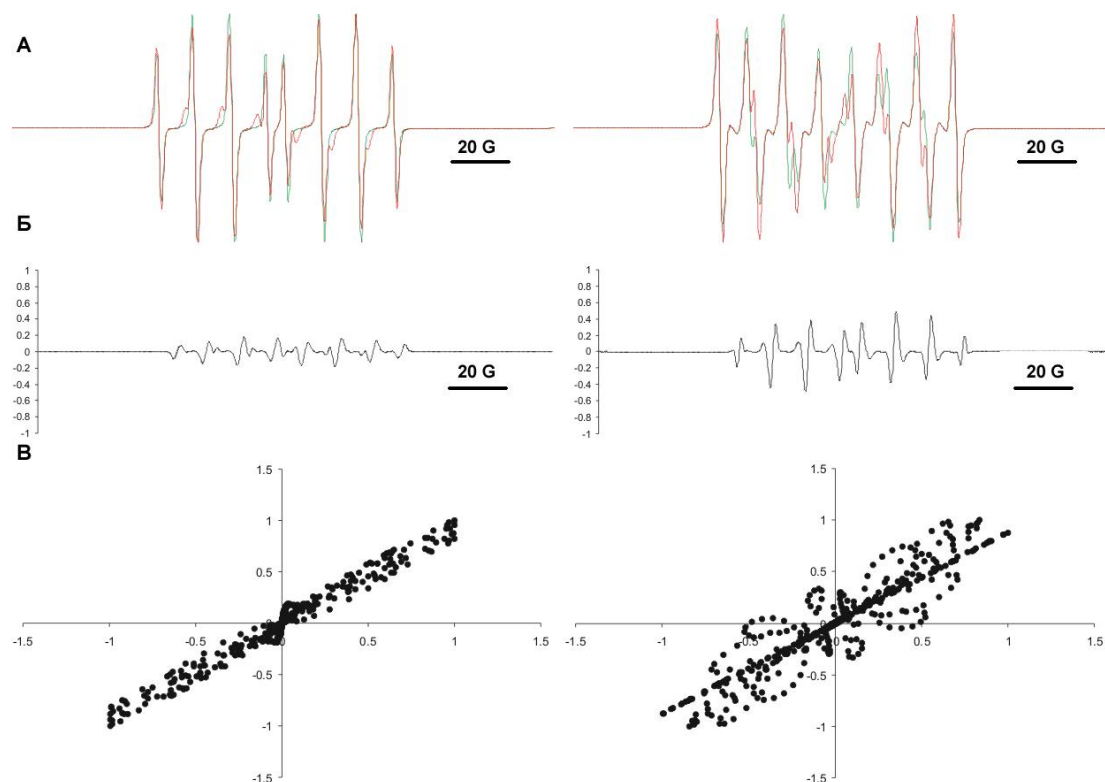


Слика 40. Примена факторске анализе без ротације факторских скорова у анализи симулираних сигнала насталих линеарном комбинацијом спектра адуката $\bullet\text{OH}$ радикала и $\bullet\text{O}_2^-$ радикала. Лево – $\bullet\text{OH}$ радикал, Десно – $\bullet\text{O}_2^-$ радикал. А – оригинални спектар (плава линија) и спектар добијен факторском анализом (црвена линија). Б – приказ разлике траженог и процењеног спектра $\bullet\text{OH}$ радикала и $\bullet\text{O}_2^-$ радикала. В – дијаграм распршености⁹¹ (*eng. scatter plot*) оригиналног спектра и спектра процењеног факторском анализом.

⁹¹ Дијаграм распршености, *eng. scatter plot*

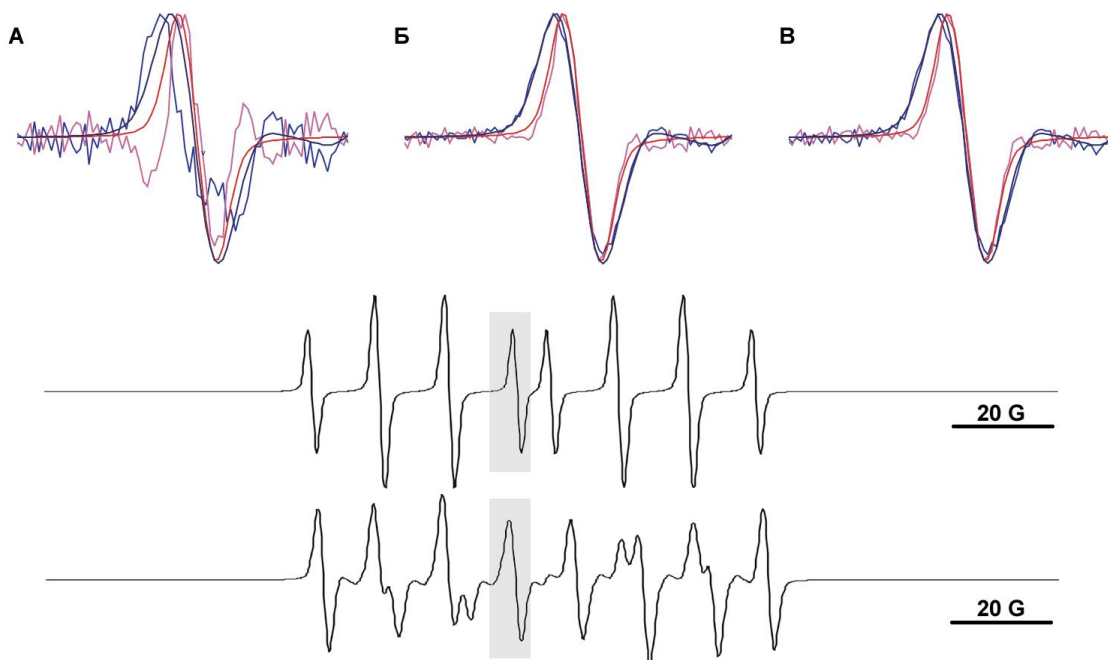


Слика 41. Примена факторске анализе са *Varimax* ортогоналном ротацијом факторских скорова у анализи симулираних сигнала насталих линеарном комбинацијом спектра адуката $\bullet\text{OH}$ радикала и $\bullet\text{O}_2^-$ радикала. Лево – $\bullet\text{OH}$ радикал, Десно – $\bullet\text{O}_2^-$ радикал. А – оригинални спектар (плава линија) и спектар добијен факторском анализом (црвена линија). Б – приказ разлике траженог и процењеног спектра $\bullet\text{OH}$ радикала и $\bullet\text{O}_2^-$ радикала. В – дијаграм распршености оригиналног спектра и спектра процењеног факторском анализом.



Слика 42. Примена факторске анализе са *Promax* неортогоналном ротацијом факторских скорова у анализи симулираних сигнала насталих линеарном комбинацијом спектра адуката $\bullet\text{OH}$ радикала и $\bullet\text{O}_2^-$ радикала. Лево – $\bullet\text{OH}$ радикал, Десно – $\bullet\text{O}_2^-$ радикал. А – оригинални спектар (плава линија) и спектар добијен факторском анализом (црвена линија). Б – приказ разлике траженог и процењеног спектра $\bullet\text{OH}$ радикала и $\bullet\text{O}_2^-$ радикала. В – дијаграм распршености оригиналног спектра и спектра процењеног факторском анализом.

Као улазна матрица података, могу се искористити и спектри добијени интегралењем. На тај начин, подаци постају примеренији за факторску анализу са *Promax* ротацијом факторских скорова. Поређење процењених спектра добијених *Varimax* ротацијом факторских скорова на неизмењеним спектрима и интегралних спектра добијених *Promax* ротацијом факторских скорова интегралних спектра приказано је на **слици 43**.



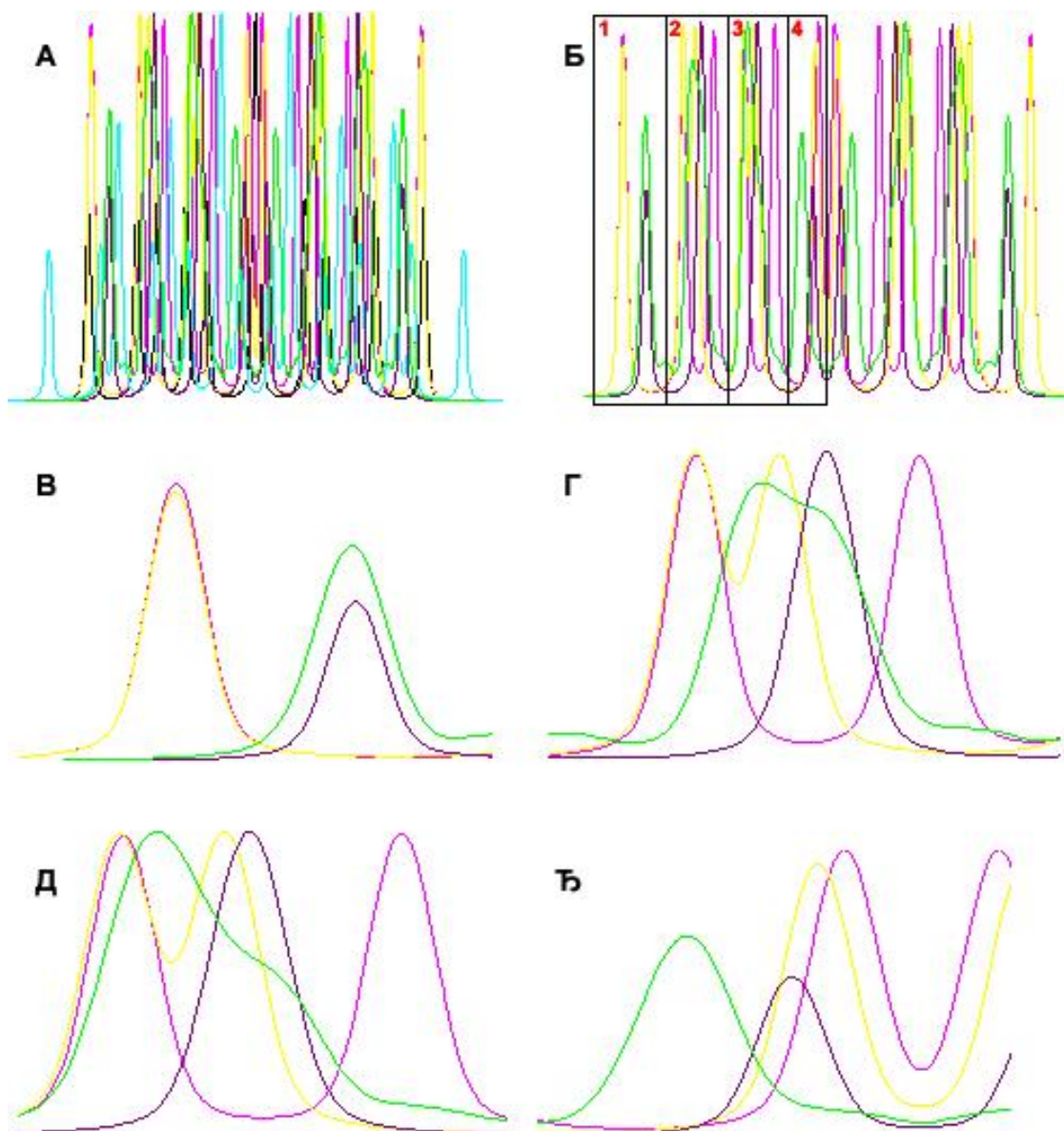
Слика 43. Симулирани и процењени спектри $\bullet\text{OH}$ радикала (црвена и бордо линија) и $\bullet\text{O}_2^-$ радикала (тегет и светло плава линија), анализиран је регион првог пика обележен сивом бојом на примазу целих спектра. А – *Promax* ротација примењена на спектру читаве дужине, Б – *Varimax* ротација примењена на сигналу читаве дужине, В – *Promax* ротација примењена на интеграленом сегменту сигнала у региону првог пика.

Предност *Promax* ротације над ортогоналним ротацијама долази до изражаја у анализи у којој је већи број фактора веома корелисан (између 0,90 и 0,95, емпиријски показано). Такав проблем се среће у анализи појединачних пикова. Мана *Promax* ротације постаје очигледна ако су фактори премало корелисани, а то је случај анализе ЕПР спектра пуне дужине. У решењима тих проблема приметно је битно расипање добијених вредности.

Применом факторске анализе са *Promax* ротацијом факторских скорова интегралних спектра на појединим сегментима на поуздан начин уз примену логичких правила могуће је утврдити присуство различитих адуката⁹². Шематски приказ анализе са помичним прозором променљиве ширине⁹³ приказан је на **слици 44**.

⁹² У раду нису приказани резултати овакве анализе, пошто је урађена додатна припрема података методом *FSW-FFT*, која се показала поузданијом на примерима одрађених спектра.

⁹³ Помични прозор променљиве ширине, *eng. Adaptive size window, ASW*



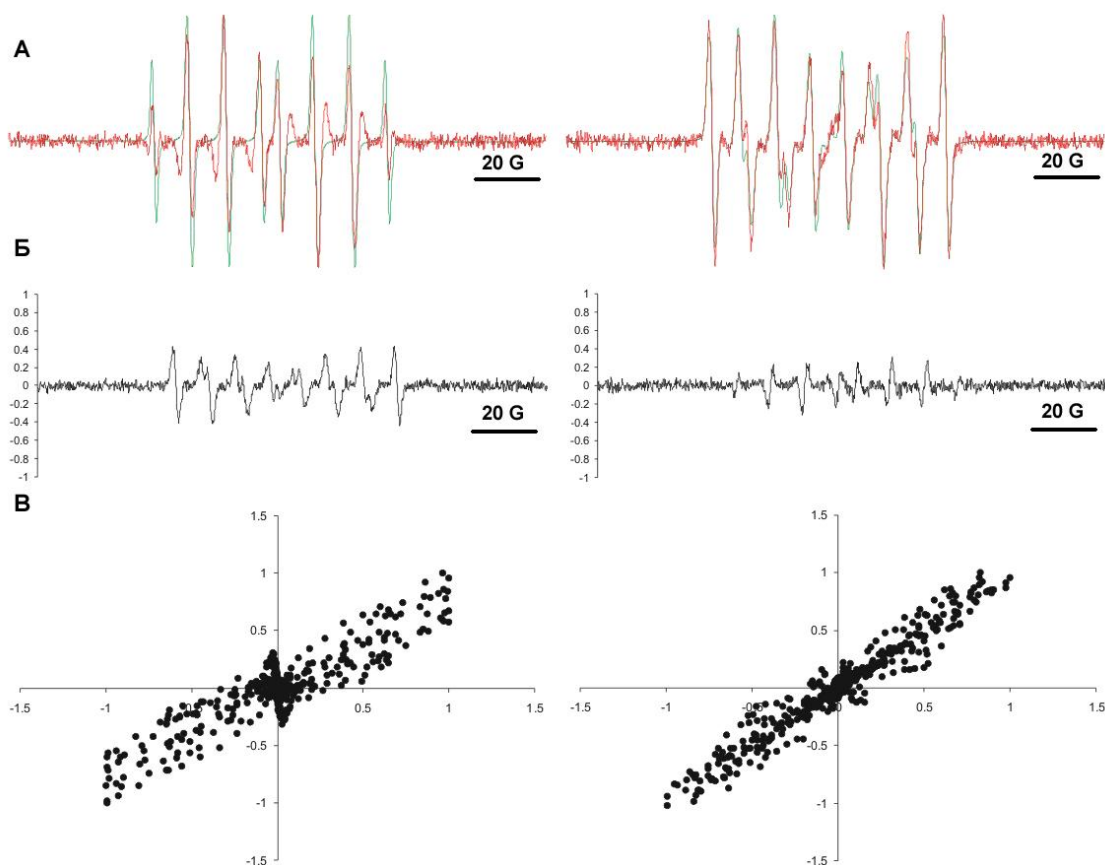
Слика 44. Шематски приказ поступка анализе интегралних симулираних спектра спин адуката спинског хватача *DEPMPO*. А – интегрални свих симулираних спектра адуката: $\bullet H$ (светло плава), $\bullet CH_2OH$ (црна), $\bullet CH_3$ (роза), $\bullet CO_2^-$ (жута), $\bullet OH$ (љубичаста), $\bullet O_2^-$ (зелена). Б – са слике А, искључени су лако уочљиви $\bullet H$ и $\bullet CH_2OH$ спектар. В – приказ сектора 1, Г – приказ сектора 2, Д – приказ сектора 3, Ъ – приказ сектора 4.

Најједноставније је елиминисати сигнал водоничног адукта (светло плава линија) и метокси радикала ($\bullet CH_2OH$) (црна линија). Спектри преостала четири адукта могу се поделити у 4 сектора. Анализом првог сектора могу се раздвојити збирни сигнал метил радикала и угљен диоксид анјон радикала (пунк и жута линија) и збирни сигнал хидроксил радикала и супероксид анјон радикала (љубичаста и зелена линија). Анализом другог сектора јасно се издваја метил радикал, чиме се решава и угљен диоксид анјон радикал. Као потврда, могу

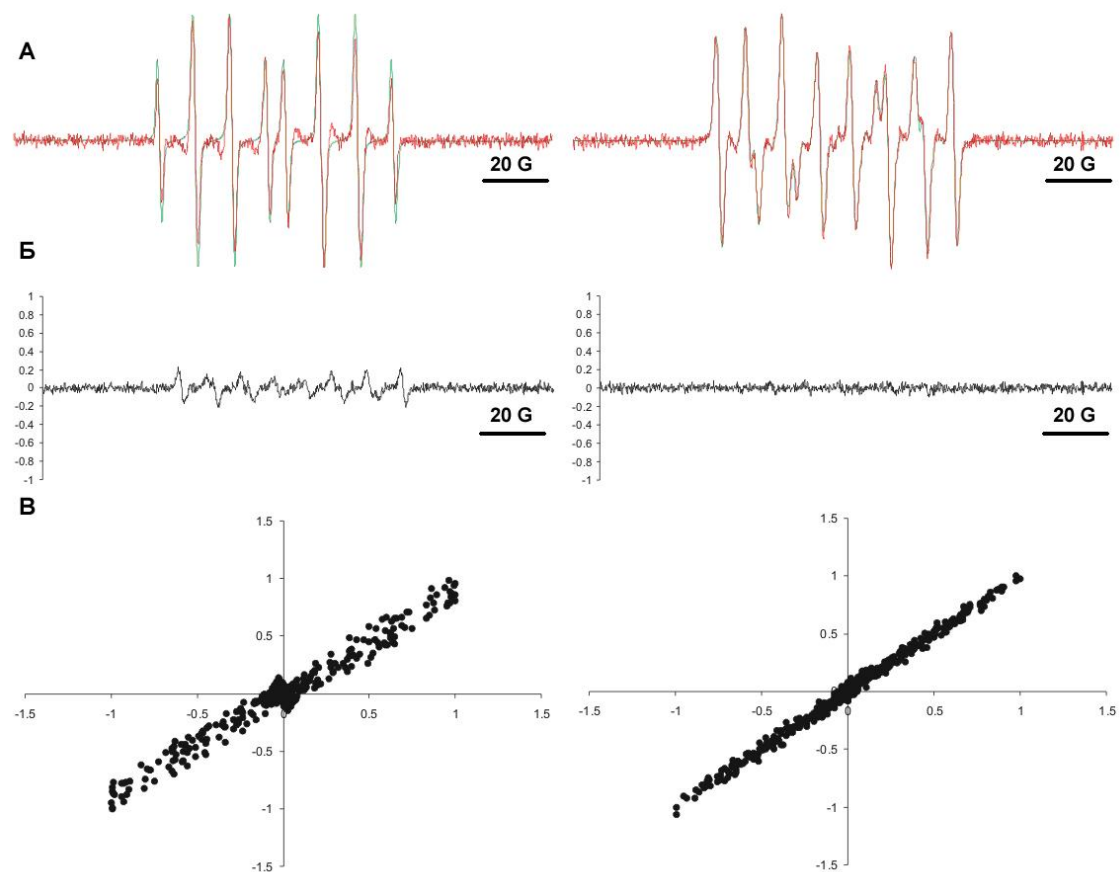
се искористити анализе трећег сектора, а том приликом се раздвајају и сигнали супероксид анјон радикала и хидроксил радикала. Централни сектор носи највише несродних информација о компонентама, па се може користити за истовремену екстракцију све четири компоненте.

Након што је тестирана метода *FA*, утврђене су могућности методе *ICA*. Подешавања *ICA* алгоритма односе се на примену различитих момената вишег реда за утврђивање критеријума независности процењених компоненти.

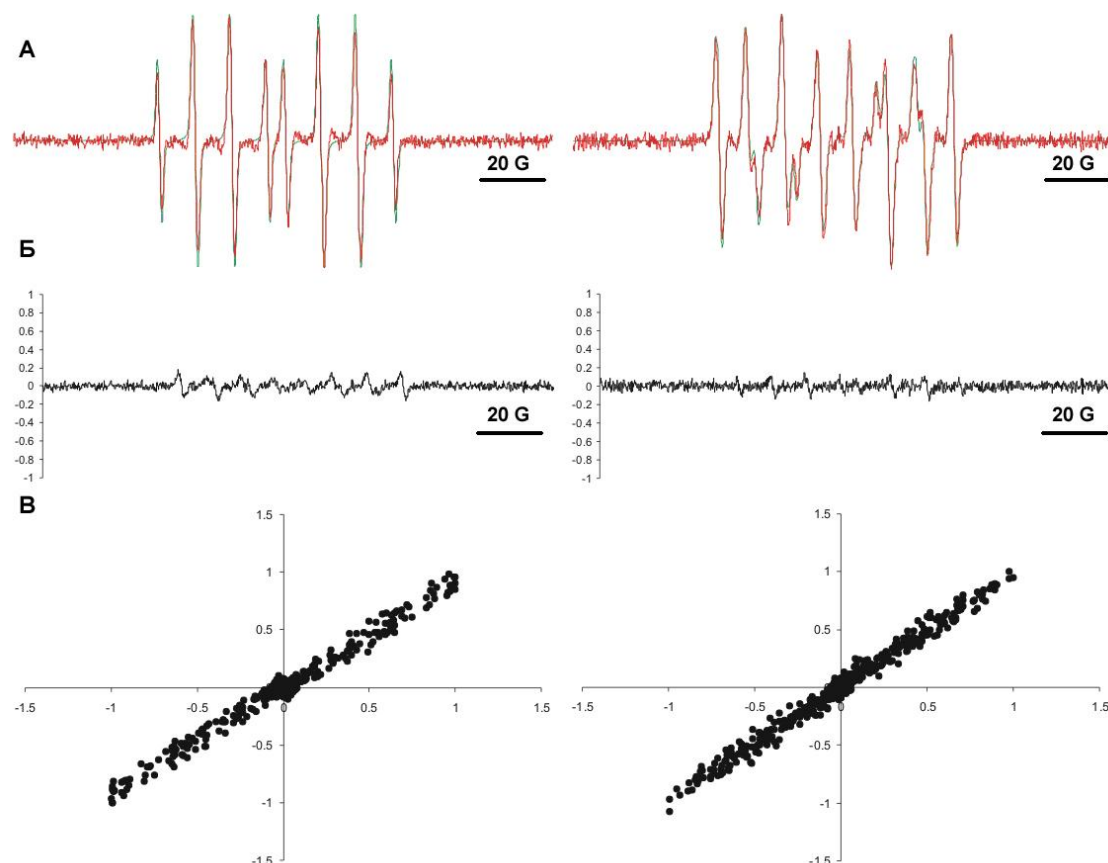
Анализа независних компоненти, *ICA*, даје врло квалитетно раздвајање сигнала састављених из компоненти које се слабо преклапају. Процена независности компоненти може се извршити на више различитих начина, који су тестирани на слици 45, слици 46 и слици 47.



Слика 45. Примена анализе независних компоненти, *ICA*, сигнала насталих линеарном комбинацијом симулираних спектра адуката $\bullet\text{OH}$ радикала и $\bullet\text{O}_2^-$ радикала. Као критеријум независности компоненти коришћена је гаусичност. Лево – $\bullet\text{OH}$ радикал, Десно – $\bullet\text{O}_2^-$ радикал. А – оригинални спектар (плава линија) и спектар добијен факторском анализом (црвена линија). Б – приказ разлике траженог и процењеног спектра $\bullet\text{OH}$ радикала и $\bullet\text{O}_2^-$ радикала. В – дијаграм распршености оригиналног спектра и спектра процењеног *ICA* анализом.



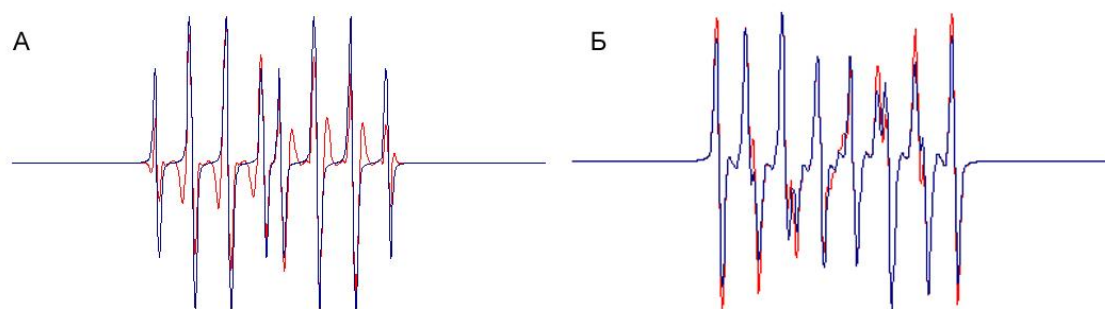
Слика 46. Примена анализе независних компоненти, *ICA*, сигнала насталих линеарном комбинацијом симулираних спектра адуката $\bullet\text{OH}$ радикала и $\bullet\text{O}_2\bullet$ радикала. Као критеријум независности компоненти коришћен је *skewness*. Лево – $\bullet\text{OH}$ радикал, Десно – $\bullet\text{O}_2\bullet$ радикал. А – оригинални спектар (плава линија) и спектар добијен факторском анализом (црвена линија). Б – приказ разлике траженог и процењеног спектра $\bullet\text{OH}$ радикала и $\bullet\text{O}_2\bullet$ радикала. В – дијаграм распршености оригиналног спектра и спектра процењеног *ICA* анализом.



Слика 47. Примена анализе независних компоненти, *ICA*, сигнала насталих линеарном комбинацијом симулираних спектра адуката $\bullet\text{OH}$ радикала и $\bullet\text{O}_2\cdot$ радикала. Као критеријум независности компоненти коришћен је *kurtosis*. Лево – $\bullet\text{OH}$ радикал, Десно – $\bullet\text{O}_2\cdot$ радикал. А – оригинални спектар (плава линија) и спектар добијен факторском анализом (црвена линија). Б – приказ разлике траженог и процењеног спектра $\bullet\text{OH}$ радикала и $\bullet\text{O}_2\cdot$ радикала. В – дијаграм распршености оригиналног спектра и спектра процењеног *ICA* анализом.

Као најефикаснија метода за утврђивање независности компоненти ЕПР спектра адуката показали су се *skewness* и *kurtosis*.

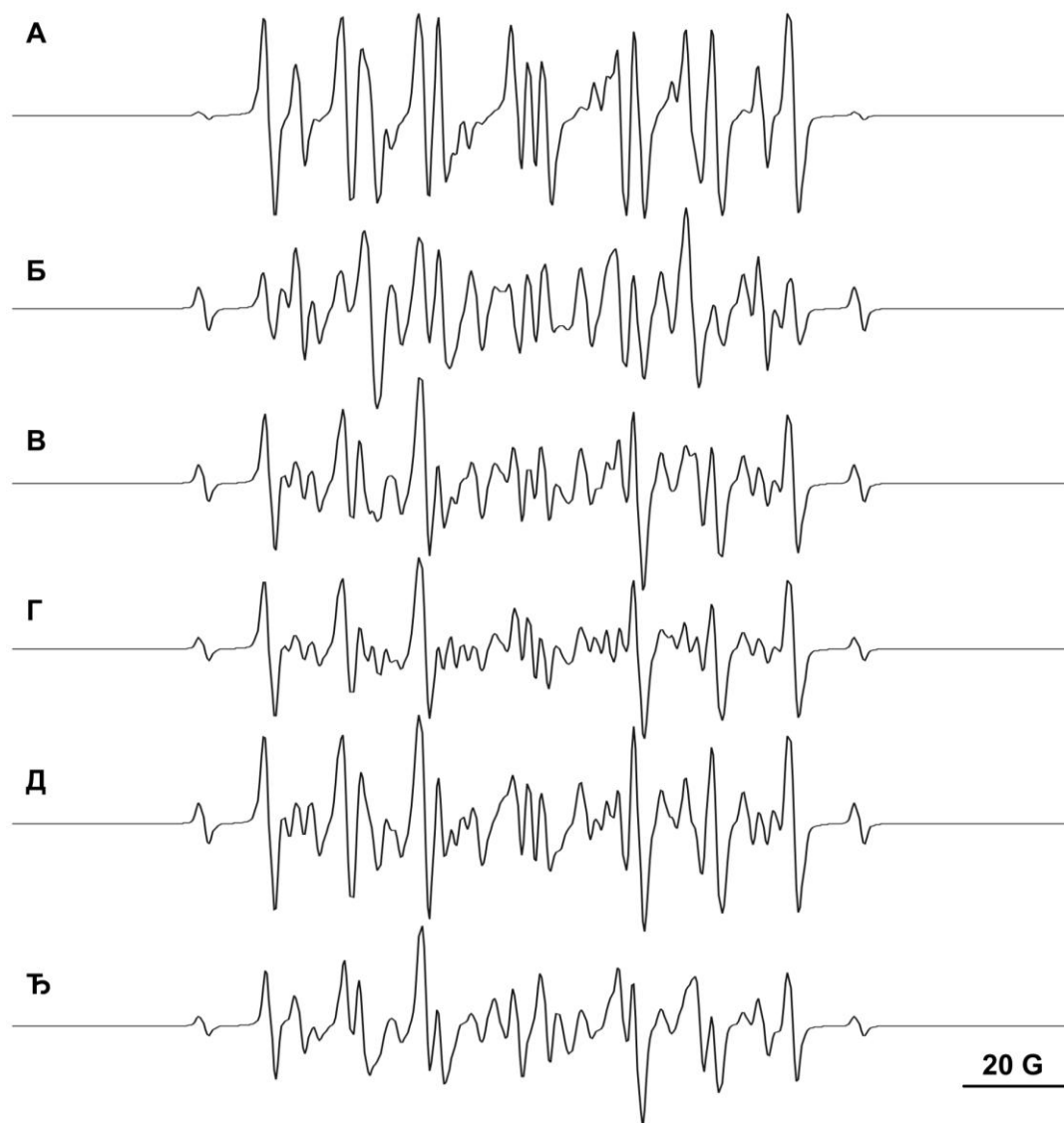
SOBI-RO алгоритам се показао врло ефикасним у анализи спектра композитних сигнала насталих линеарном комбинацијом сигнала који су веома преклопљени и који деле више пикова. За анализу спектра који показују релативно велике међусобне разлике, ефикасност алгоритма је изненађујуће ниска у поређењу са описаним алгоритмима (слика 48).



Слика 48. Примена *SOBI-RO* сигнала насталих линеарном комбинацијом спектра $\bullet\text{OH}$ радикала и $\bullet\text{O}_2\bullet$ радикала. А – $\bullet\text{OH}$ радикал, Б – $\bullet\text{O}_2\bullet$ радикал. Оригинални спектар (плава линија) и спектар добијен анализом (црвена линија).

Према централној граничној теореме, линеарном комбинацијом већег броја расподела чија је дистрибуција различита од Гаусове, збирни спектар ће имати форму Гаусове расподеле, што ће је учинити непогодном за *ICA* анализу. Идеално решење је употреба *ICA* алгоритма за разлагање спектра које изграђује мали број компоненти, а *SOBI-RO* алгоритам за разлагање спектра који су изграђени од великог броја компоненти (више од 4).

Након што су алгоритми показали своју ефикасност на једноставном систему, потребно је тестирати их на најкомпликованијим случајевима који се могу јавити у биолошким системима. Како би се избегла субјективност, и како би тест био најтежи могућ, коефицијенти линеарне комбинације били су насумично генерисани бројеви. Матрица експерименталних спектра приказана је на **слици 49**.

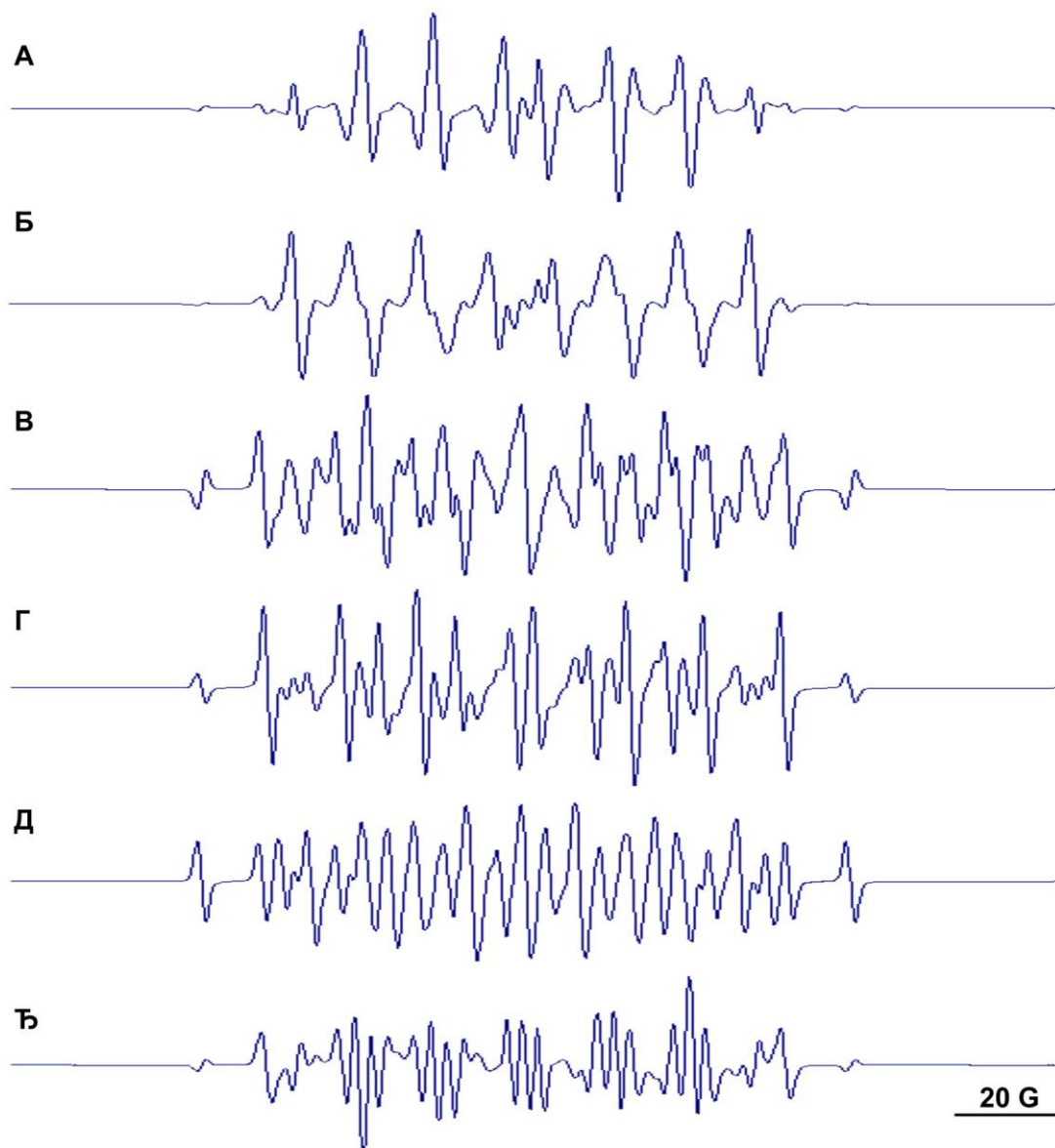


Слика 49. Симулирани сложени спектари који су коришћени у даљим анализама. Коефицијенти линеарне комбинације су различити за сваки од спектара од А до Ђ. Сваки од њих се састоји од 6 симулираних компоненти и то хидроксил радикала ($\bullet OH$), супер оксид анјон радикала ($\bullet O_2^-$), метокси радикала ($\bullet CH_2OH$), метил радикала ($\bullet CH_3$), водоничног радикала ($\bullet H$) и угљен диоксид анјон радикал ($\bullet CO_2^-$).

Сходно принципу анализе приказаном на **слици 34**, у првом кораку се приступа слепој анализи (*blind source*) спектралне матрице употребом алгоритама који су се показали најефикаснијим на тестирањима са једноставнијим примерима:

- *SOBI-RO* алгоритам
- *FastICA* алгоритам са параметром којим се одређује независност компоненти
- *ASW-FA* урађена у складу са шемом приказаној на **слици 44**

Симулације су урађене 10 пута, са независно генерисаним матрицама са коефицијентима линеарне комбинације, како би добијени резултати били недвосмислено потврђени. Резултати једне од насумично одабраних симулација приказани су на **слици 50**.



Слика 50. Процењене спектралне компоненте коришћењем алгоритма *SOBI-RO* из композитних сигнала сачињених од линеарне комбинације хидроксил радикала ($\bullet\text{OH}$), супер оксид анјон радикала ($\bullet\text{O}_2^-$), метокси радикала ($\bullet\text{CH}_2\text{OH}$), метил радикала ($\bullet\text{CH}_3$), водоничног радикала ($\bullet\text{H}$) и угљен диоксид анјон радикал ($\bullet\text{CO}_2^-$).

Искусни познавалац ЕПР спектроскопије би могао да претпостави којим типовима адуката процењене компоненте одговарају. Једноставним методама за процену ваљаности добијених резултата, као што је сума квадрата резидуала, добиле би се изразито лоше вредности на основу којих препознавање не би било

могуће⁹⁴. Из тог разлога се поново морају употребити специфичне методе машинског учења, с тим да се резултати припреме пре анализе. Тренутна форма проценјених спектра значајно одступа од тражене форме спектра и тешко их је препознати.

У складу са другим кораком анализе приступило се препознавању компоненти применом аналитичких техника за препознавање компоненти:

- *LDA*⁹⁵ са тренинг векторима
- *SVM*⁹⁶ са тренинг векторима
- *FSW-FFT*⁹⁷ за визуелизацију и даљу анализу
- испитивање сложености сигнала применом *Higuchi*-јеве фракталне анализе

Ако се спектрални микс састоји од линеарне комбинације спектра адуката хидроксил радикала, супер оксид анјон радикала, метокси радикала, метил радикала и угљен диоксид анјон радикал, могуће је са 75% сигурности препознати компоненте методом *SVM*. Ако су сложени спектри састављени од још мањег броја компоненти, 3 компоненте изузимајући угљен диоксид анјон радикал и водонични радикал, препознавање је 100%. Такви резултати ни приближно не задовољавају потребе које се јављају у анализи сложених биолошких система.

У најсложенијем испитиваном случају, са свих 6 компоненти, изузетне резултате у побољшању вероватноће препознавања пружила је *FSW-FFT* метода.

Идеја се састоји у томе да су пикови спектра адуката на фиксираним позицијама, и да имају специфичан однос висине и ширине. Стога ће *FSW-FFT* бити у стању да пронађе те специфичне тачке, и да истовремено филтрира

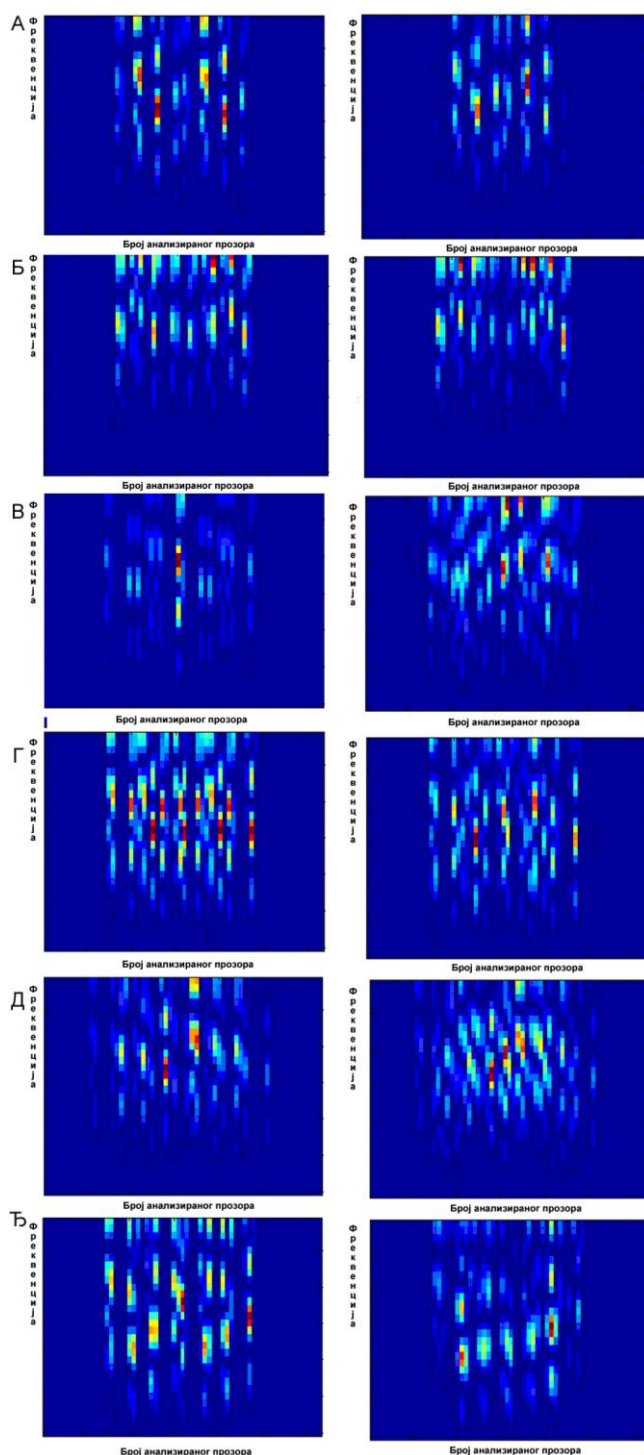
⁹⁴ Анализа је урађена, али није приказана због обимности

⁹⁵ Линеарна дискриминациона анализа са тренинг векторима, *eng. Linear Discriminant Analysis, LDA*

⁹⁶ Метода носећих вектора, *eng. Support Vector Machine, SVM*

⁹⁷ Фуриеова анализа у покретном прозору сталне дужине, *eng. Fixed-Size Window Fast Fourier Analysis, FSW-FFT*

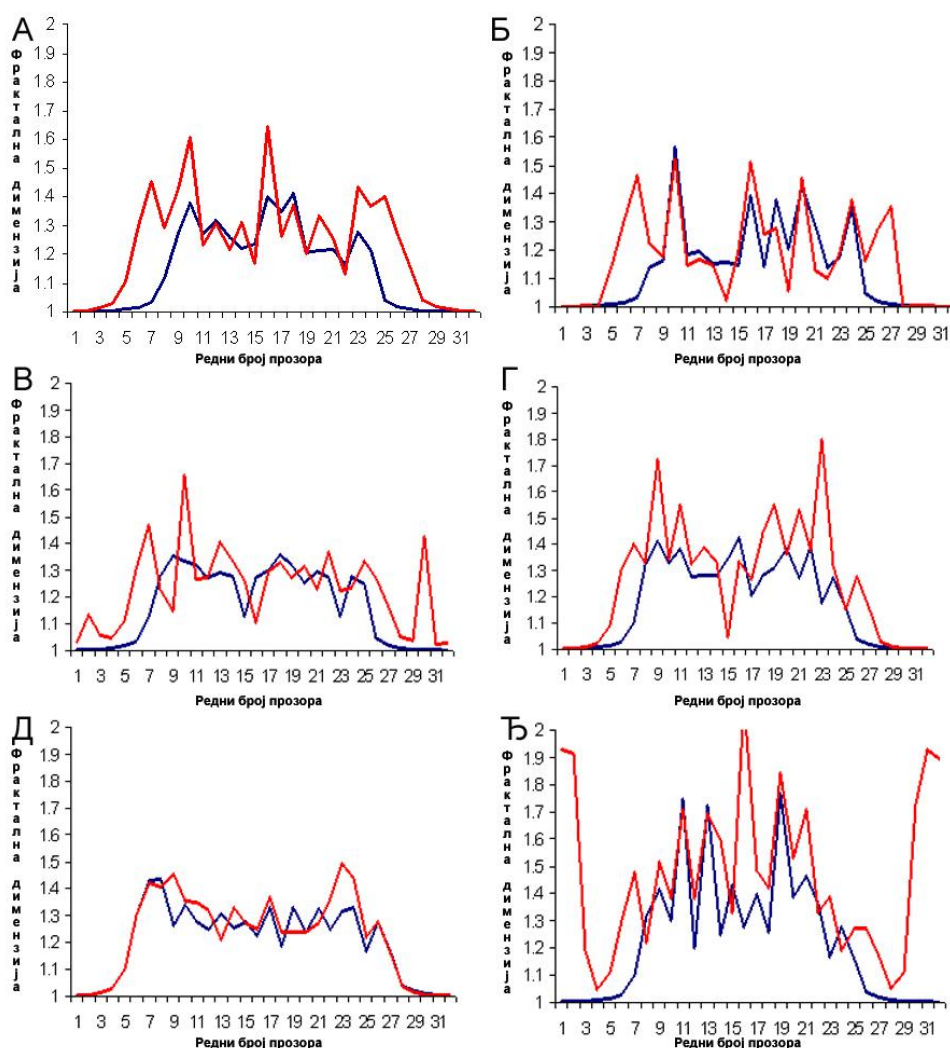
артефакте који могу бити бели шум или фрагменти неког другог пика који је настао непрецизним препознавањем (слика 51).



Слика 51. Лева колона, спектрограм изворних компоненти ЕПР спектра. Десна колона, спектрограм процењених компоненти ЕПР спектра. Одозго на доле, спектрограм хидроксил радикала ($\bullet OH$), супер оксид анјон радикала ($\bullet O_2^-$), метокси радикала ($\bullet CH_2OH$), метил радикала ($\bullet CH_3$), водоничног радикала ($\bullet H$) и угљен диоксид анјон радикал ($\bullet CO_2^-$). Плава боја одговара мало заступљеним фреквенцијама, црвена јако заступљеним фреквенцијама. Сваки спектрограм је нормализован на себе.

Након обраде процењених компоненти спектра коришћењем *FSW-FFT*, показано је да карактеристичне позиције пикова могу лако бити раздвојене од лажно препознатих пратећих пикова (који припадају другој компоненти). Тиме је омогућено да сваки од спектра има карактеристичне фреквенције у дефинисаним прозорима. Без обраде, на резултате значајно утичу грешке у процени компоненти, док се обрадом анулирају.

У основи слична метода је и метода одређивања фракталне димензије на прозору фиксне ширине. Ако је компонента правилно процењена, фрактална димензија у прозорима у којима се налазе пикови биће блиска вредности 1. Ако је у прозору забележен бели шум, вредност ће бити блиска 2 (слика 52).



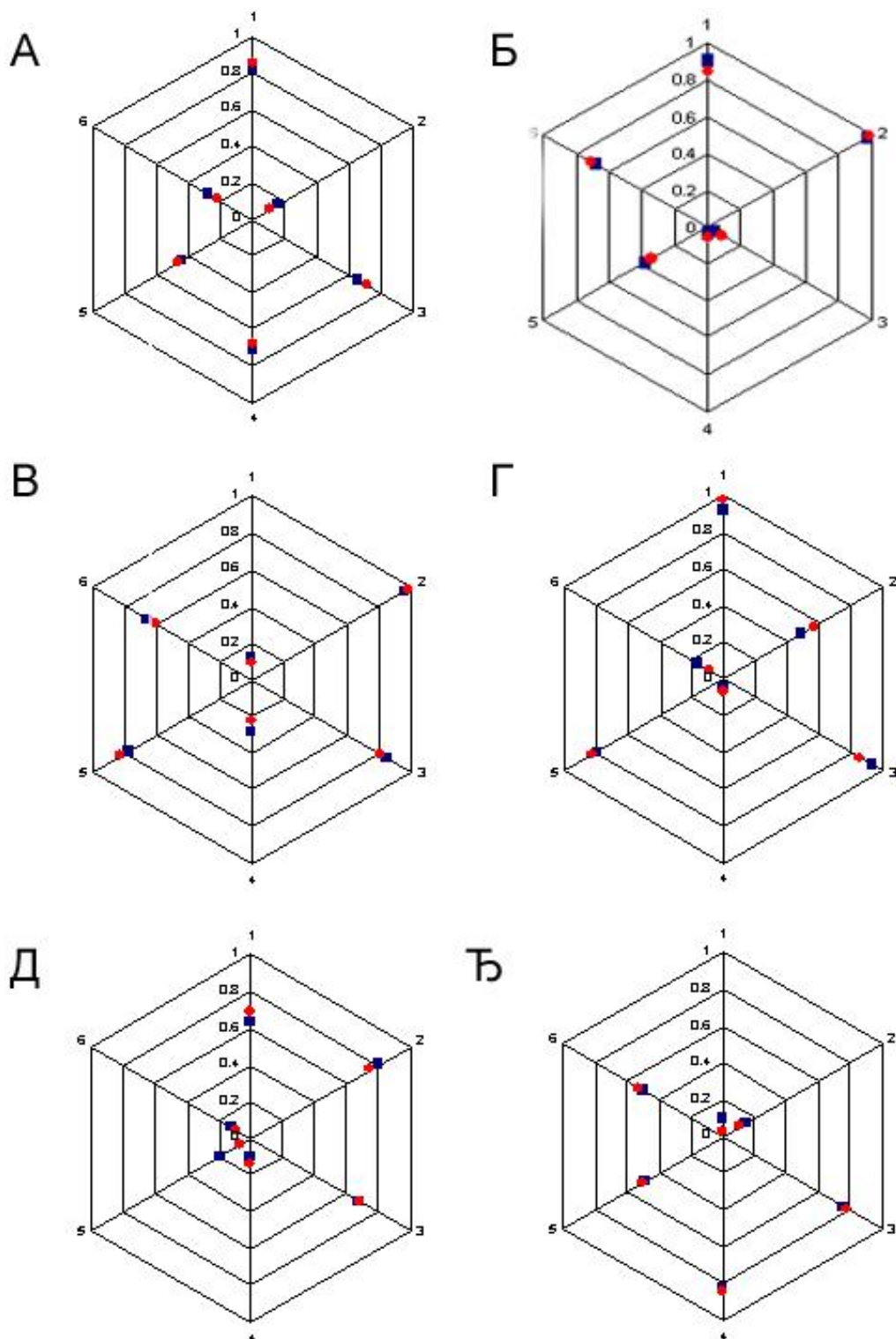
Слика 52 Плава линија, спектрограм Хигучијеве фракталне димензије изворних компоненти адуката. Црвена линија, спектрограм Хигучијеве фракталне димензије процењених компоненти адуката. А – хидроксил радикала ($\bullet\text{OH}$), Б – супер оксид анјон радикала ($\bullet\text{O}_2^-$), В – метокси радикала ($\bullet\text{CH}_2\text{OH}$), Г – метил радикала ($\bullet\text{CH}_3$), Д – водоничног радикала ($\bullet\text{H}$) и Ђ – угљен диоксид анјон радикал ($\bullet\text{CO}_2^-$).

Поред већ описаних резултата који су добијени методом *SVM*, као помоћна метода употребљена је и *LDA*. Показало се да су позиције специфичних фреквенција компоненти добијени у *FSW-FFT* анализи најпогоднији за *LDA*. Као мана методе *LDA* у поређењу са *SVM* могла би се навести могућа недовољна робусност, па је најбоље комбиновати ове методе.

Трећи и завршни корак аналитичке процедуре обухвата анализу експерименталне матрице композитних спектра коришћењем метода који се ослањају на предзнање о анализираним сигнаlima, до кога се дошло у претходним корацима. Коришћен је алгоритам:

- *CICA, constrained independent component analysis*

На **слици 53** приказани су коефицијенти линеарне комбинације за сваку од процењених спектралних компоненти.



Слика 53. Приказ коначних резултата разлагања спектралне матрице композитних спектра. Коефицијенти линеарне комбинације су нормализовани на скали од 0 до 1. Плави квадрати – вредности коефицијената линеарне комбинације коришћених у симулацији. Црвени кругови, процењени коефицијенти линеарне комбинације након SICA анализе. А – хидроксил радикала ($\bullet OH$), Б – супер оксид анјон радикала ($\bullet O_2^-$), В – метокси радикала ($\bullet CH_2OH$), Г – метил радикала ($\bullet CH_3$), Д – водоничног радикала ($\bullet H$) и Ъ – угљен диоксид анјон радикала ($\bullet CO_2^-$).

CICA алгоритам са изузетно високом тачношћу обезбеђује процену спектралних компоненти и као комплементарну информацију даје релативне доприносе компоненти збирном сигналу.

3.2. Анализа ЕПР спектра плазма мембрана

Како би се испитао утицај слабо-везаних протеина плазма мембрана на производњу слободних радикала, направљене су две серије огледа. У првој серији су испитиване неиспиране плазма мембране. Другу серију сачињавају снимци плазма мембрана које су испиране 150 mM раствором *KCl*, којим се уклањају слабо везани протеини.

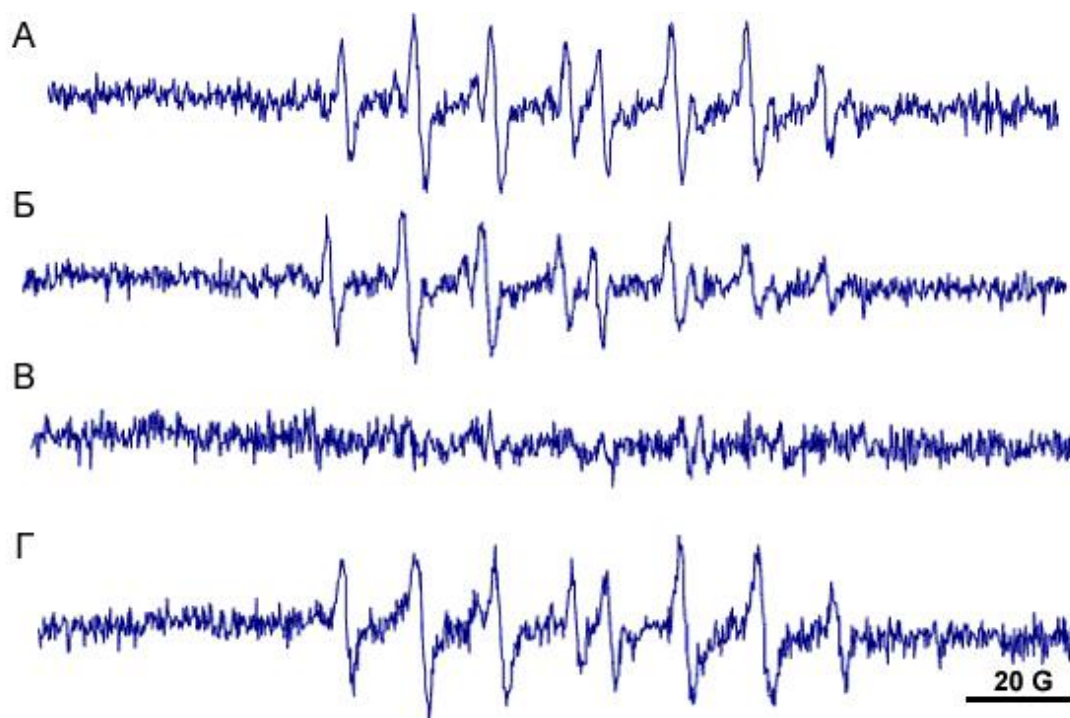
Експеримент је организован на следећи начин, по редоследу снимања:

- плазма мембране, на собној температури, атмосфери и без додавања икаквих супстанци
- испитиване су плазма мембране у атмосфери азота, како би се утврдила зависност производње слободних радикала од доступног кисеоника
- азот се замењује кисеоником, са циљем да се утврди зависност продукције супероксид анјон радикала од доступног кисеоника
- *NADH* се додаје систему, пошто је интермедијер у бројним биохемијским процесима
- поново се мења атмосфера додавањем азота, а затим кисеоника
- малат је додат узорку, како би се утврдила повезаност ензима малат дехидрогеназе са производњом слободних радикала

Прво ће се показати производња слободних радикала на уобичајен начин, праћањем форме спектра и упоређивањем са стандардним спектрима. Након тога, примениће се описана аналитичка процедура и на крају ће резултати бити упоређени. Као последица обимности процедуре, у раду је приказан један пример комплетне анализе, као и графички приказ коначних резултата анализе.

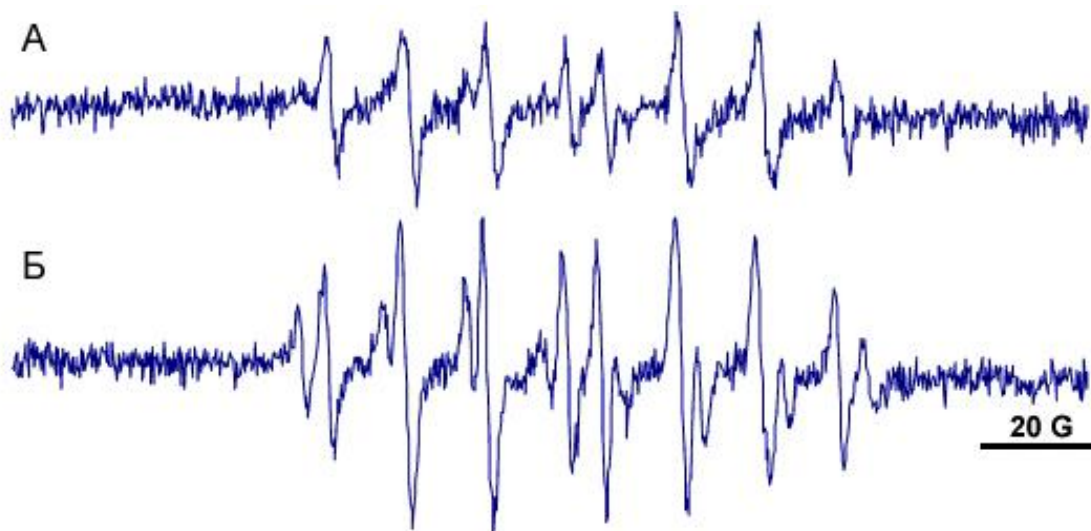
Неиспиране мембране, на собној температури и у неизмењеној атмосфери производе хидроксил радикал. Са увођењем азота, сигнал слаби, и на крају

нестаје. Са додатком кисеоника, враћа се производња хидроксил радикала која је праћена супероксид анјон радикалом (слика 54).



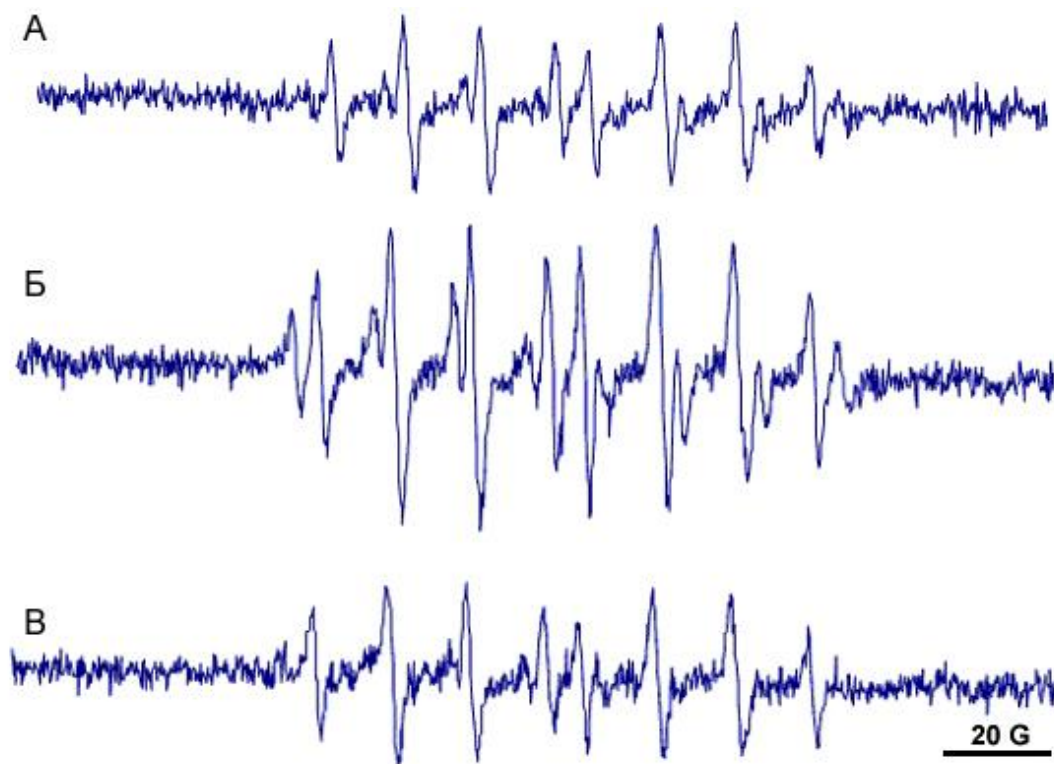
Слика 54. А – спектар неиспираних плазма мембрана, Б – спектар у атмосфери азота, опадање интензитета сигнала у времену (4 минута), В – сигнал у атмосфери азота, потпуно угашен након 5 минута, Г – сигнал у атмосфери кисеоника, оисм хидроксил радикала, примећује се и супероксид анјон радикал.

Са додавањем *NADH*, интензитет производње редикала расте, како хидроксил радикала, тако и супероксид анјон радикала, с тим да је процентуално већи пораст продукције супероксид анјон радикала (слика 55).



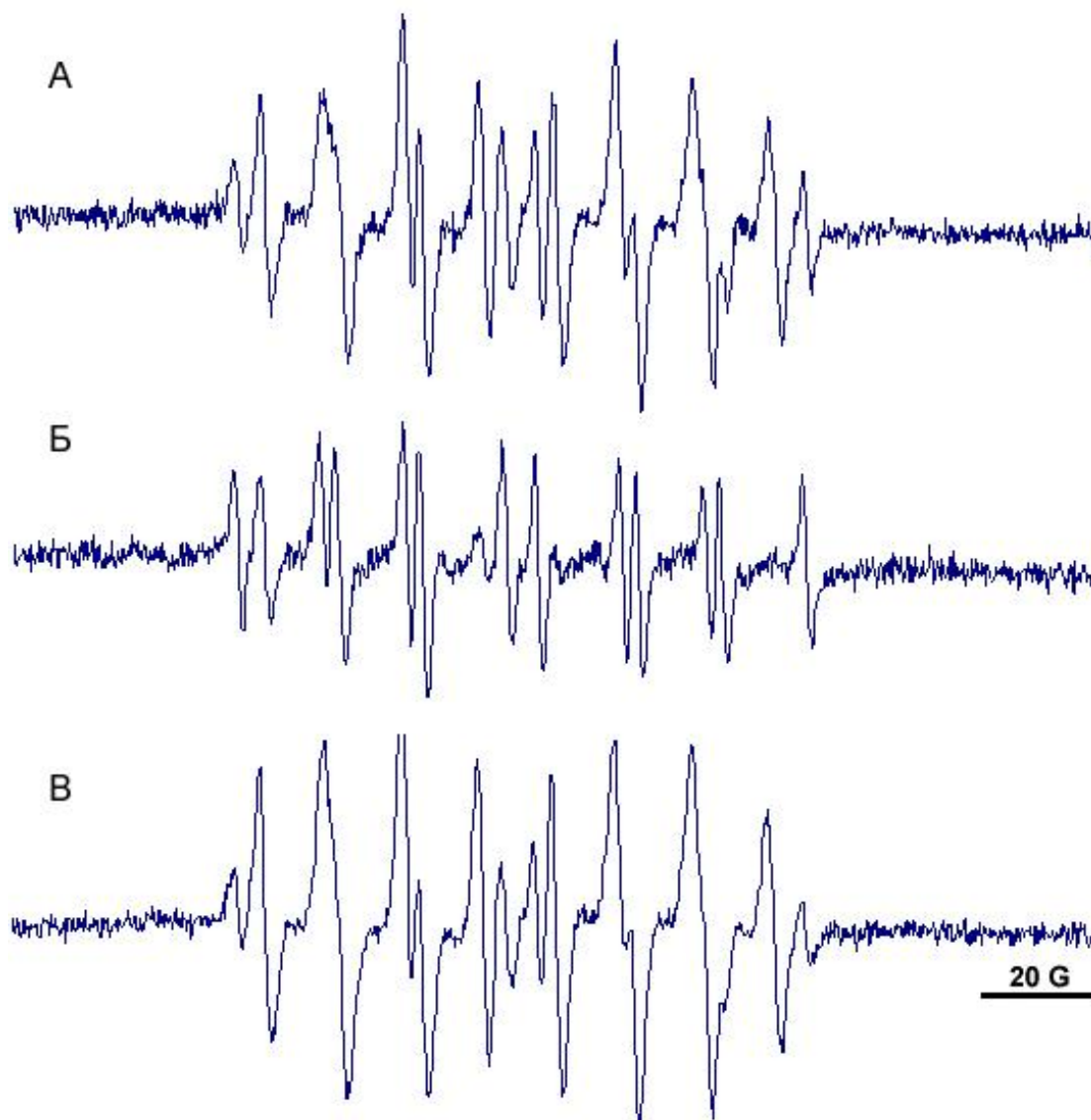
Слика 55. А – спектар неиспираних плазма мембрана пре додавања $NADH$, Б – спектар неиспираних плазма мембрана после додавања $NADH$. Опажа се пораст производње хидроксил радикала и супероксид анјон радикала. Већи релативни пораст се бележи за супероксид анјон радикал.

Додавањем малата, сигнал се враћа на вредности пре додавања $NADH$ (слика 56).



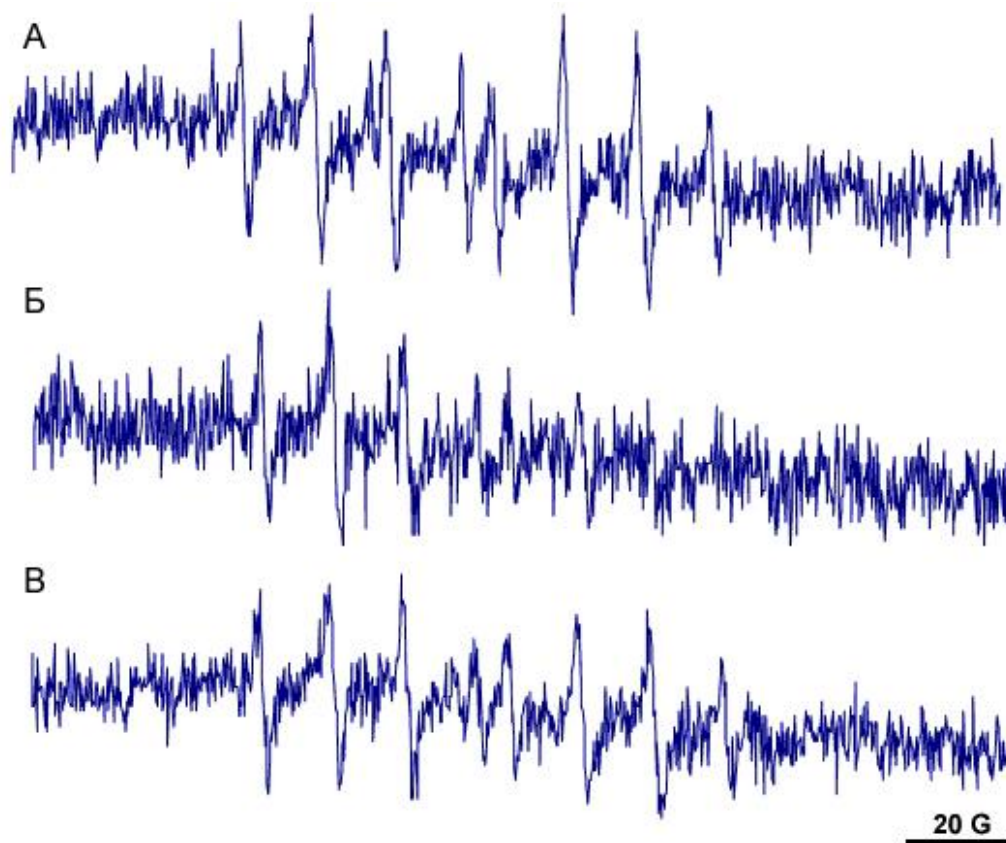
Слика 56. А – спектар неиспираних плазма мембрана, без додатка $NADH$, Б – спектар неиспираних плазма мембрана након додавања $NADH$, В – спектар неиспираних плазма мембрана по додавању $NADH$ и малата.

Након додавања $NADH$ у атмосфери азота уочен је готово чист адукт угљен диоксид радикала. У атмосфери кисеоника која затим следи, супероксид анјон радикал преовлађује над хидроксил радикалом, што је супротно од огледа у коме је замењена атмосфера без додавања $NADH$. Том приликом је забележено да је производња хидроксил радикала била израженија (слика 57).



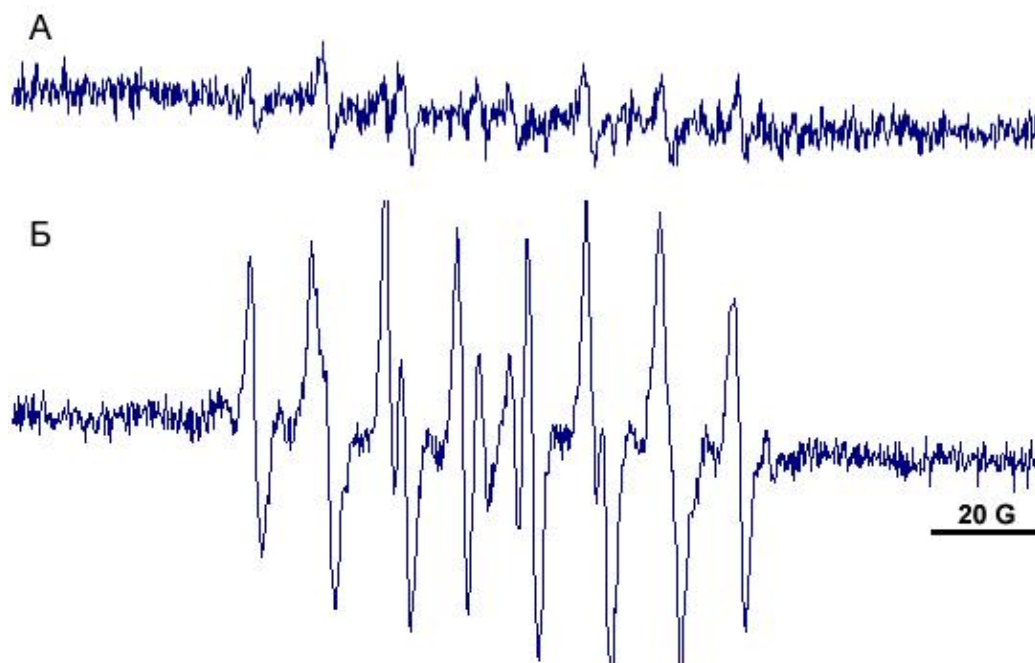
Слика 57. А – спектри неиспираних палзма мембрана након додавања $NADH$ у нормалној атмосфери, Б – спектри неиспираних палзма мембрана након додавања $NADH$ у атмосфери азота, В – спектри у атмосфери кисеоника.

Спектри плазма мембрана испраних 150 mM раствором KCl производе исте врсте слободних радикала, али у мањој мери. У атмосфери азота и кисеоника опажају се сличне промене спектра виђене код неиспираних мембрана (слика 58).



Слика 58. А – спектар мембрана испраних 150 *mM* раствором *KCl* у неизмењеној атмосфери, Б – спектар у атмосфери азота, ишчезавање сигнала, В – спектар у атмосфери кисеоника, опоравак сигнала и враћање на почетни ниво.

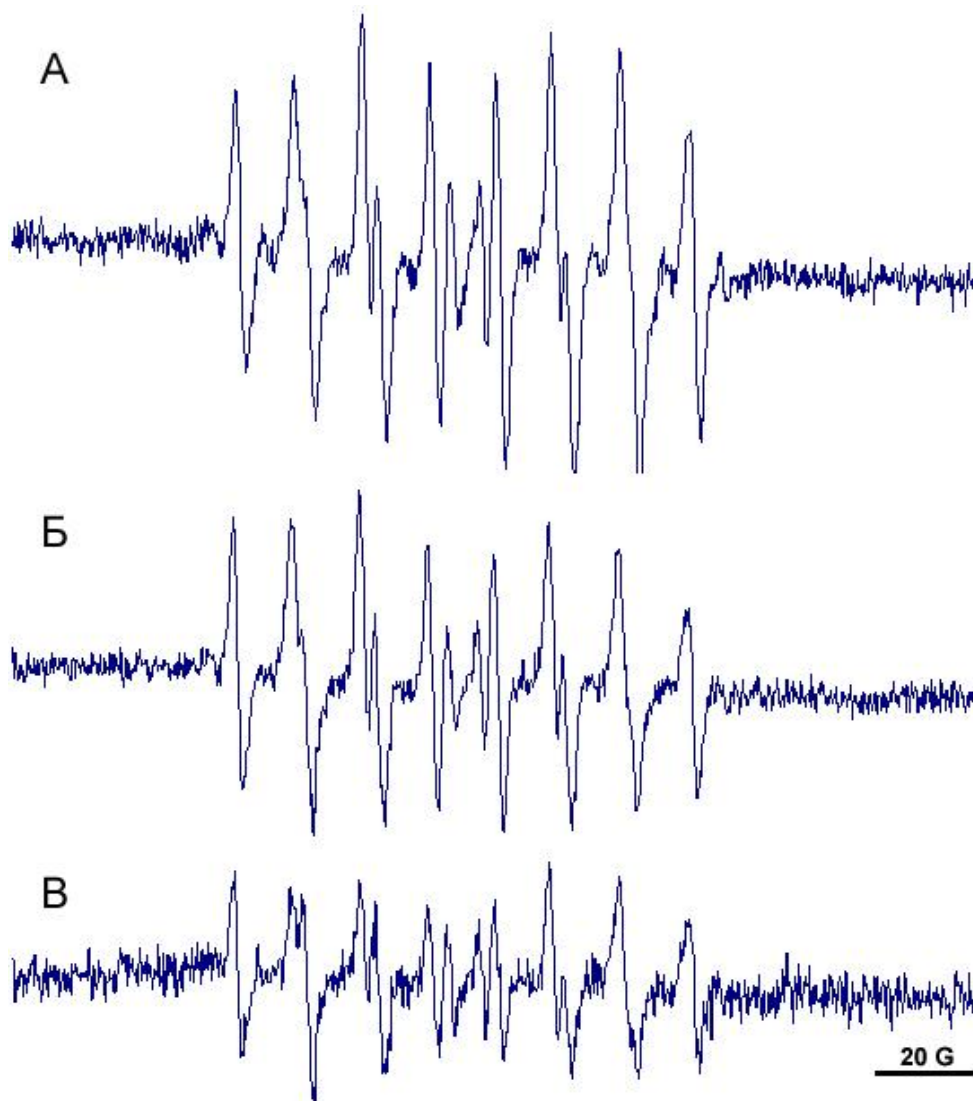
Са додавањем *NADH* долази до израженог повећања производње слободних радикала, и то значајно вишег код испраних плазма мембрана у поређењу са неиспираним плазма мембранама. Још једна разлика се односи на релативну заступљеност хидроксил радикала и супероксид анјон радикала. По додавању *NADH*, у неиспираним мембранама и даље преовлађује хидроксил радикал, док код мембрана које су испране 150 *mM* раствором *KCl* преовладава супероксид анјон радикал (**слика 59**).



Слика 59. А – спектар плазма мембрана испраних 150 *mM* раствором *KCl*, без додатка *NADH*. Б – спектар након додавања *NADH*. Уочава се велико повећање производње хидроксил радикала, и нарочито повећање производње супероксид анјон радикала, која премашује вредност за хидроксил радикал.

У атмосфери азота није уочена појава угљен диоксид радикала која је изражена код неиспираних палзма мамбрана.

Додавање малата, након *NADH* доводи до опадања производње оба радикала, с тим да се у времену бележи значајније опадање производње супероксид анјон радикала која се враћа на ниво нижи од хидроксил радикала (слика 60).

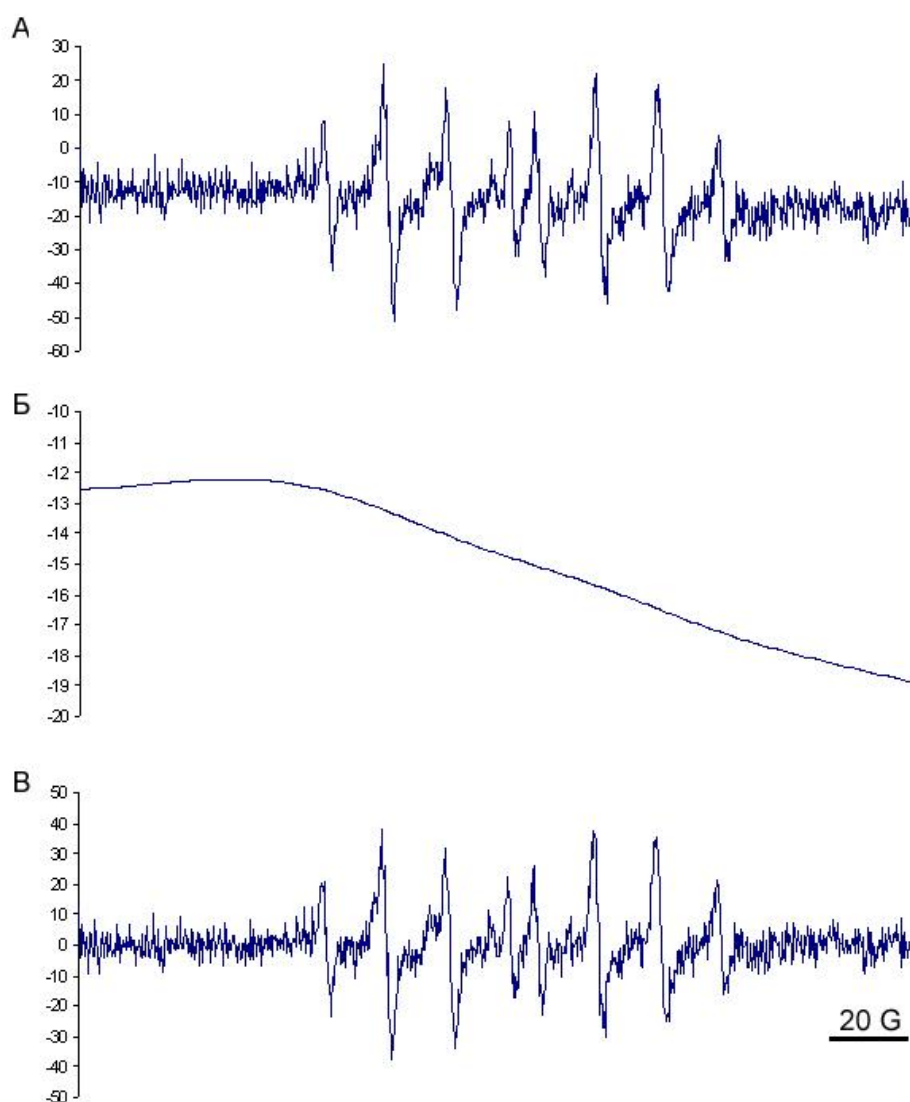


Слика 60. А – спектар плазма мембрана испраних 150 *mM* раствором *KCl*, са додатком *NADH*, Б – спектар након што су додати *NADH* и малат (од 0 – 4 минута), В – спектар сниман од 5. до 9. минута после додавања малата. Уочва се смањење производње супероксид анјон радикала која се враћа на ниво нижи од хидроксил радикала који се бележи пре додавања *NADH*.

Упоредни приказ производње слободних радикала у неиспираним плазма мембранама и мембранама које су испране 150 *mM* раствором *KCl* приказан је у **табели 3**. На приказане сигнале примењене су уобичајене процедуре, којима се висина пикова упоређује са висином пикова симулираних спектра адуката. Поменути приступ носи са собом неколико недостатака. Први је тај што многи сигнали имају изражену базну линију, а готово сви сигнали неповољан однос сигнала и шума. Поред тога, сигнал током времена показује неку динамику (смењење, пораст, осцилација...) која остаје неопажена.

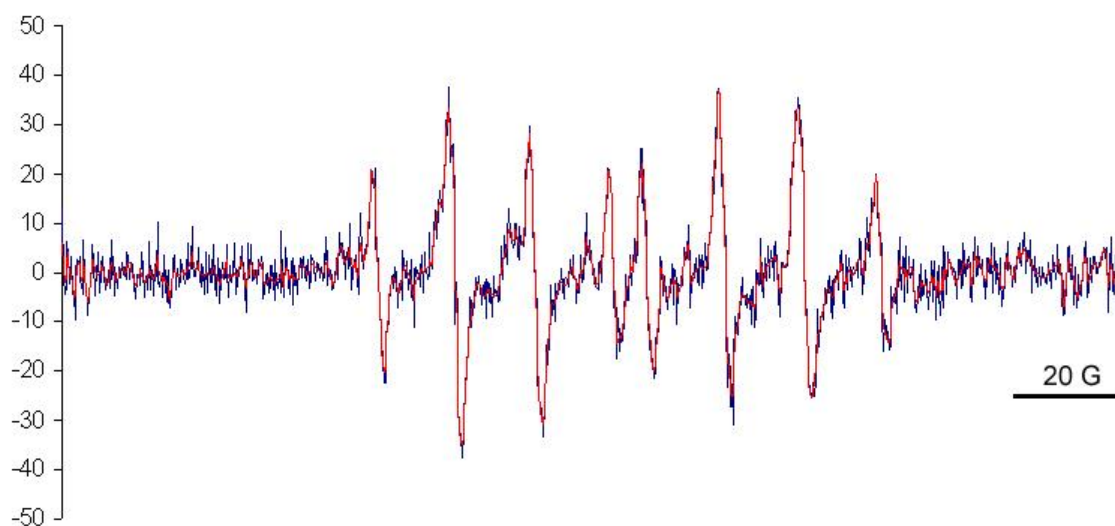
Процедура описана у раду исправља наведене недостатке. Методом сплајна са малим фактором специфичности успешно се уклања базна линија. Методом таласића се уклања део шума уз очување компоненти чија је заступљеност толика да се готово стапа са шумом. Такви сигнали се могу додатно истаћи и препознати коришћењем фреквентне анализе. Применом мултиваријационих метода, спектри који показују динамику у времену се препознају као посебне компоненте, чиме се постиже стандардизација форме компоненти (тиме и заступљености као комплементарне информације) и уједно истиче динамика процеса. Показало се да се коришћењем описаног аналитичког поступка знатно боље тумаче спектри како у квантитативном смислу (боља процена релативне заступљености компоненти) тако и у квалитативном смислу проналажењем слабо заступљених компоненти спектра, која је пресудна за тумачење добијених резултата.

Узмимо за пример спектар неиспираних плазма мембрана у атмосфери кисеоника која је заменила атмосферу азота. Лако је уочити постојање хидроксил радикала и супероксид анјон радикала. Најпре се уклања базна линија методом сплајна (**слика 61**).



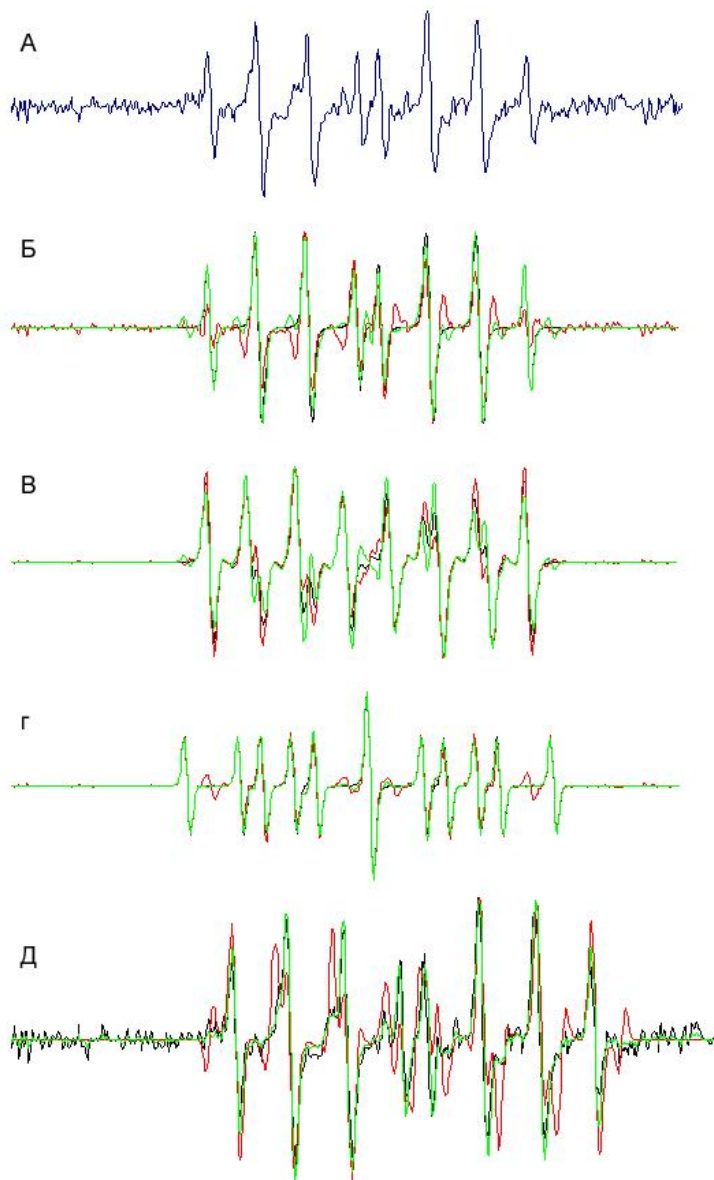
Слика 61 А – спектар неиспираних плазма мембрана у атмосфери кисеоника, којој је претходила атмосфера азота. Б – базна линија, В – спектар након корекције за базну линију.

Следећи корак у припреми података за разлагање је уклањање шума коришћењем таласића (слика 62).



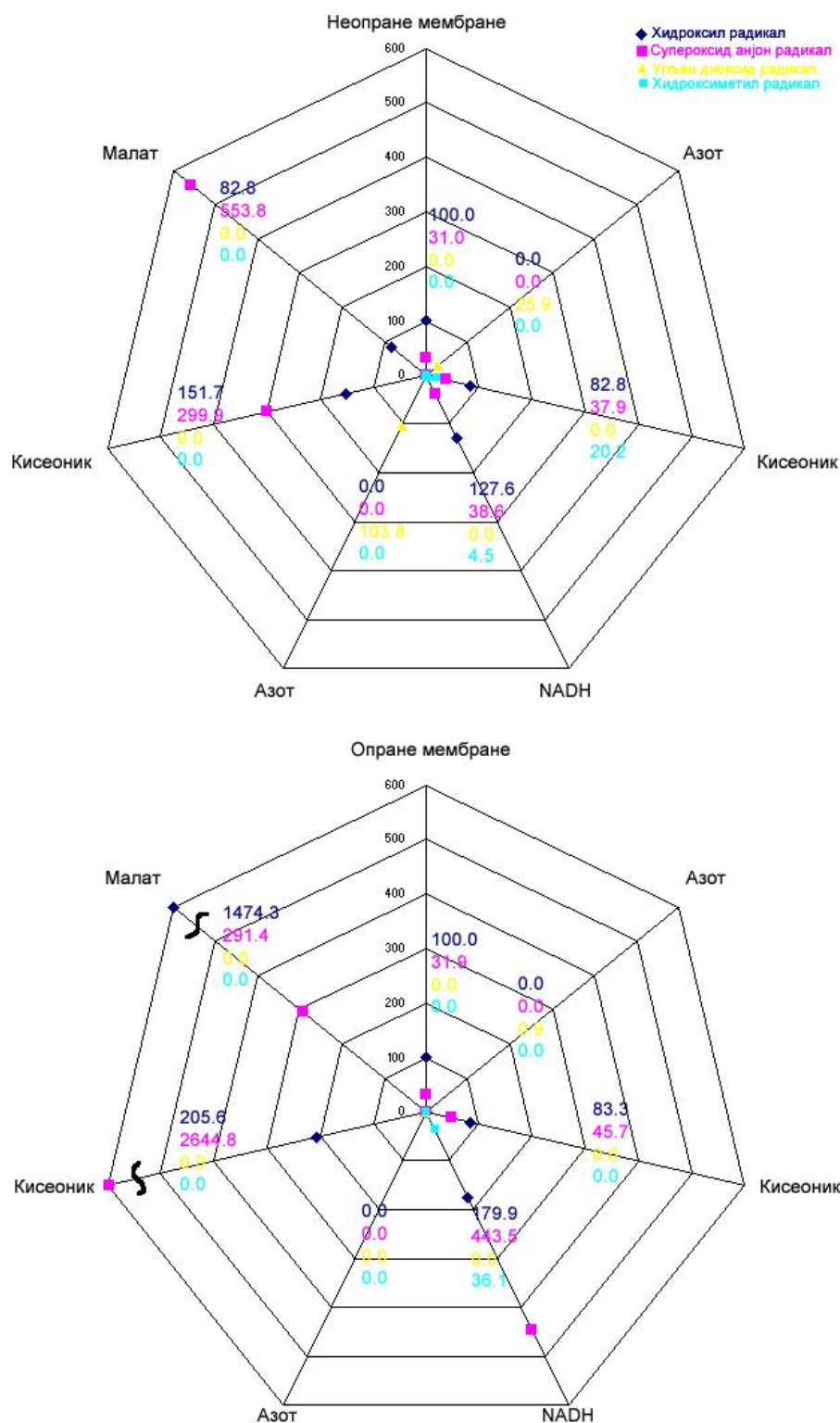
Слика 62 Плава линија – оригинални спектар пре уклањања шума. Црвена линија – спектар након уклањања шума (дискретни Мејеров таласић, други ниво декомпозиције)

Након што су сигнали припремљени за коначну анализу, приступа се двостепеном процесу, примени алгоритма *SOBI-RO* а затим и алгоритма *CICA*. Добијени резултати приказани су на **слици 63**.



Слика 63 А – оригинални спектар мембрана. Од Б до Д: црна линија – оригинална тражена компонента или оригиналан спектар. Црвена линија – резултат *SOBI-RO* алгоритма. Зелена линија – резултат добијен *CICA* алгоритмом. Б – спектар адукта хидроксила радикала. В – спектар адукта супероксида анјон радикала. Г – спектар адукта метокси радикала. Д – поређење траженог спектра (црна линија), са процењеним спектрима коришћењем *SOBI-RO* алгоритма (црвена линија) и *CICA* алгоритма (зелена линија).

Након што је процедура примењена на све снимљене спектре неиспираних и испираних мембрана, добијени су резултати који су упоређени са резултатима који се могу добити једноставним процењивањем спектра (слика 64, табела 3).



Слика 64. Коефицијенти линеарне комбинације пронађених спектра адуката који су присутни у ЕПР спектрима плазма мембрана скалирани на иницијалну продукцију хидроксил радикала

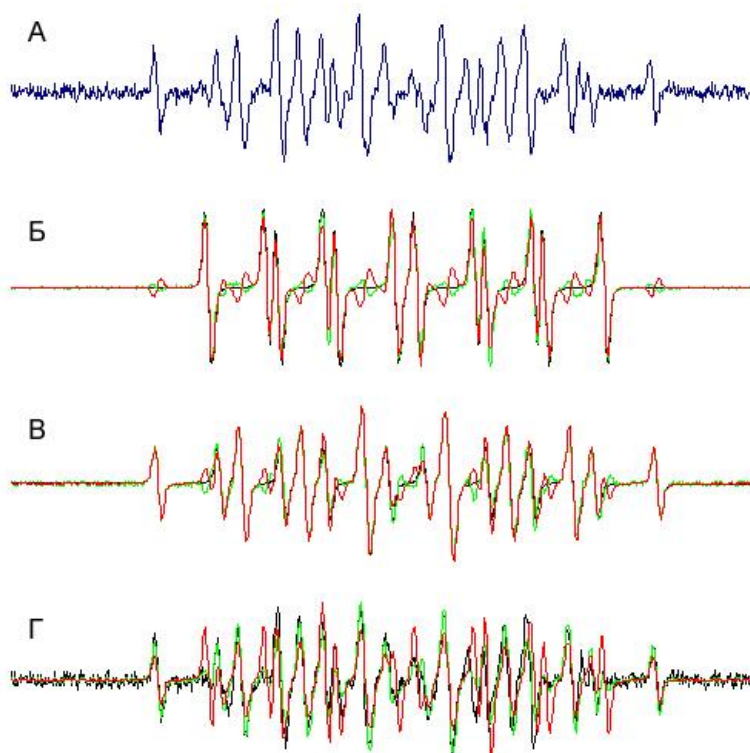
Табела 3. Упоредни приказ ефекта састава атмосфере, малата и *NADH* на неиспиране плазма мембране и плазма мембране испиране 150 mM KCl, без примене напредних аналитичких метода.

Тип огледа Тип мембрана	Стандардни услови	Атмосфера азота	Атмосфера кисеоника
Неиспиране плазма мембране	•OH радикал, •OOH радикал 20%	Потпуно ишчењавање сигнала након 5 минута	Спектар који одговара стандардним условима
Плазма мембране испиране 150 mM раствором KCl	•OH радикал, •OOH радикал 20%	Потпуно ишчењавање сигнала након 5 минута	Спектар који одговара стандардним условима

Тип огледа Тип мембрана	Додавање <i>NADH</i>	Атмосфера азота	Атмосфера кисеоника	Додавање малата
Неиспиране плазма мембране	Пораст производње •OH радикала и •OOH радикала при чему преовлађује •OH радикал	Угљен диоксид радикал	Угљен диоксид радикал и •OOH радикал	Поништавање ефекта <i>NADH</i>
Плазма мембране испиране 150 mM раствором KCl	Пораст производње •OH радикала и •OOH радикала при чему преовлађује •OOH радикал	Нема појаве угљен диоксид радикал	Враћање на стандардне услове	Опадање •OOH радикала до нивоа •OH радикала

3.3. АНАЛИЗА ПРОИЗВОДЊЕ СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА У ЋЕЛИЈСКОМ ЗИДУ БИЉАКА

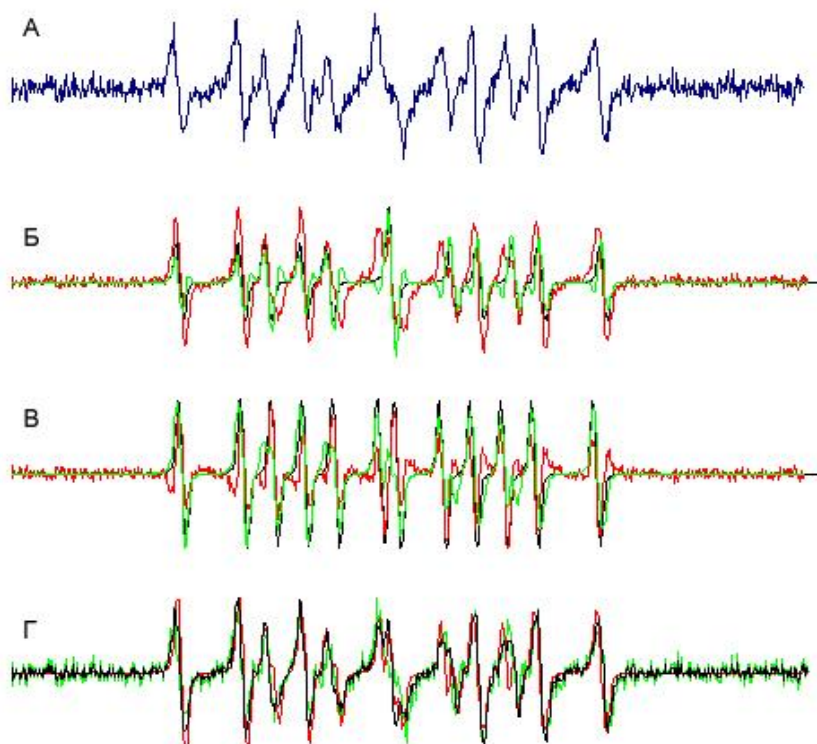
Сложени спектар је преузет из рада Bogdanovic Prisotv J., Veljovic Jovanovic S., Mitrovic A. and Spasojevic I., *UV-irradiation provokes generation of superoxide on cell wall polygalacturonic acid*. Редокс активност апопласта одређена је трима компонентама: високом концентрацијом аскорбата, генерисањем реактивних кисеоничних врста посредованом *NADH* оксидазом и сетом пероксидаза, и великим бројем молекула са тиолним групама. Са друге стране, неке реактивне кисеоничне врсте су сигнални молекули. Стога је било важно испратити одговор ћелијског зида и апопласта у условима *UV* стреса и водоник пероксида као сигналног молекула. Напредна анализа ЕПР спектра показала је постојање два типа радикала у наведеним условима (слика 65) [99-101].



Слика 65. Разлагање сложеног спектра производње слободних радикала у ћелијском зиду биљака под дејством *UV* светлости и пероксида. Од Б – Г, црна линија означава тражену компоненту или спектар. Црвена линија означава резултат добијен применом *SBI-RO* алгоритма, а зелена линија резултат добијен применом *CICA* алгоритма. А – експериментално добијен спектар. Компонентна анализа је показала да експериментални спектар изграђују водонични радикал и угљен диоксид анјон радикал. Б – процењена компонента која одговара угљен диоксид анјон радикалу. В – процењена компонента која одговара водоничном радикалу. Г – упоређивање експериментално добијеног спектра и процењених спектра.

3.4. АНАЛИЗА ПРОИЗВОДЊЕ СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА У МИТОХОНДРИЈАМА БИЉАКА

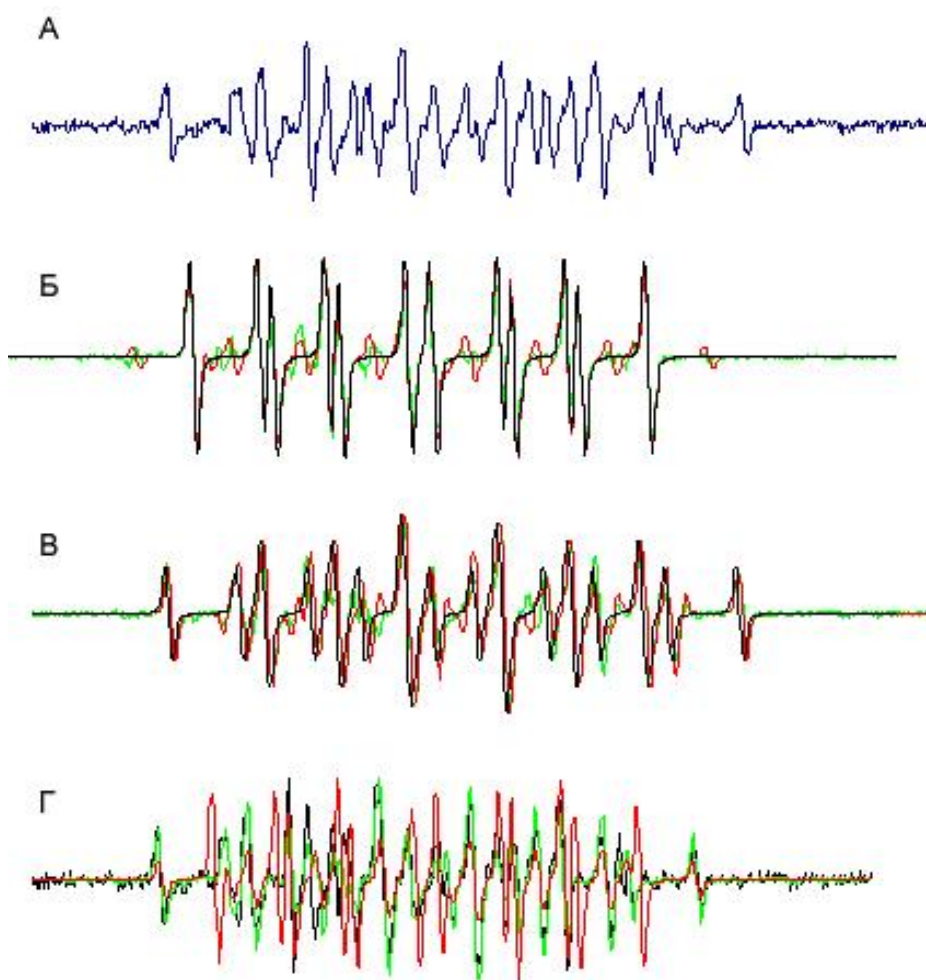
У оквиру рада: Morina F., Veljovic-Jovanovic S., Vidovic M., Mojovic M., *Excess zinc impaired mitochondrial metabolism and induced ascorbate biosynthesis in Verbascum Thapsus L.*, испитиван је допринос цинка у производњи реактивних оксидативних врста. Један од спектра је имао форму која одговара метокси радикалу уз необично широк централни пик (слика 66). Такав спектар би се могао добити комбиновањем метокси радикала са угљен диоксид анјон радикалом или са метил радикалом. Применом описаних аналитичких метода, утврђено је да се сложени спектар састоји од метокси радикала и метил радикала [102-104].



Слика 66. Разлагање сложеног спектра производње слободних радикала у митохондријама биљака. Од Б – Г, црна линија означава тражену компоненту или спектар. Црвена линија означава резултат добијен применом *SOBI-RO* алгоритма, а зелена линија резултат добијен применом *CICA* алгоритма. А – експериментално добијен спектар. Компонентна анализа је показала да експериментални спектар изграђују метокси радикал и метил радикал. Б – процењена компонента која одговара метокси радикалу. В – процењена компонента која одговара метил радикалу. Г – упоређивање експериментално добијеног спектра и процењених спектра.

3.5. АНАЛИЗА ПРОИЗВОДЊЕ СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА У РЕАКЦИЈИ ЕЛЕКТРОЛИЗЕ ВОДЕ

Током израде дипломског рада Тине Камчеве, у којој је водонични радикал генерисан у реакцији електролизе воде, требало је испитати да ли се осим водоничног радикала јавља још неки од адуката. Резултати анализе приказани су на **слици 67**. Испоставило се да се осим водоничног радикала, у траговима јавља и угљен диоксид анјон радикал [105].



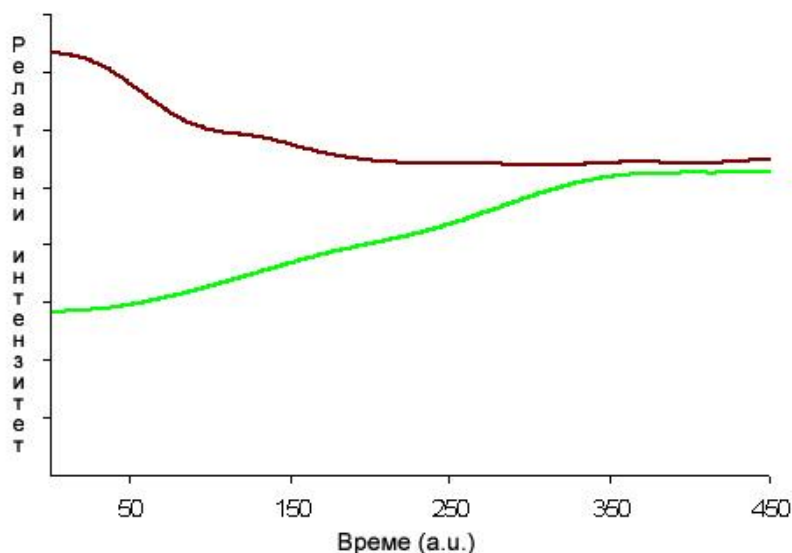
Слика 67. Разлагање сложеног спектра производње слободних радикала у електрохемијској реакцији електролизе воде. Од Б – Г, црна линија означава тражену компоненту или спектар. Црвена линија означава резултат добијен применом *SOBI-RO* алгоритма, а зелена линија резултат добијен применом *SICA* алгоритма. А – експериментално добијен спектар. Компонентна анализа је показала да експериментални спектар изграђују водонични радикал и угљен диоксид анјон радикал. Б – процењена компонента која одговара угљен диоксид анјон радикалу. В – процењена компонента која одговара водоничном радикалу. Г – упоређивање експериментално добијеног спектра и процењених спектра.

3.6. АНАЛИЗА ПРОИЗВОДЊЕ СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА У ЛИСТОВИМА БИЉАКА, ПРАЋЕНА ФЛУОРЕСЦЕНТНОМ СПЕКТРОСКОПИЈОМ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОМ МИКРОСКОПИЈОМ

Производња слободних радикала у листовима биљака одређивана је флуоресцентном спектроскопијом и флуоресцентном микроскопијом. Технике су комплементарне. Флуоресцентна спектроскопија пружа бољи увид у временску динамику процеса и већу осетљивост, док се флуоресцентном микроскопијом може стећи увид у просторну димензију листова са могућношћу разликовања различитих типова ткива.

Производња хидроксил радикала, праћена преко појачања интензитета флуоресценције пробе *APF*, одређена је једначином (слика 68). Како би се избегла појава лажне периодичности и синусоидних вредности параметра *C*, спектри се морају фитовати методом сплајна. У супротном, бели шум би као последица аутокорејелације лако дао резултате без стварног биолошког упоришта.

Резултати су показали да се код дехидратисаних листова, непосредно након хидратације јавља изузетно велика производња хидроксил радикала, што се може објаснити наглим појачањем метаболизма. Осим тога, пермеабилност сувих листова за воду (а последично и флуоресцентну пробу) је већа у поређењу са свежим листовима. Након периода од око 6 – 7 минута, производња хидроксил радикала је једнака у оба типа листова (слика 68).

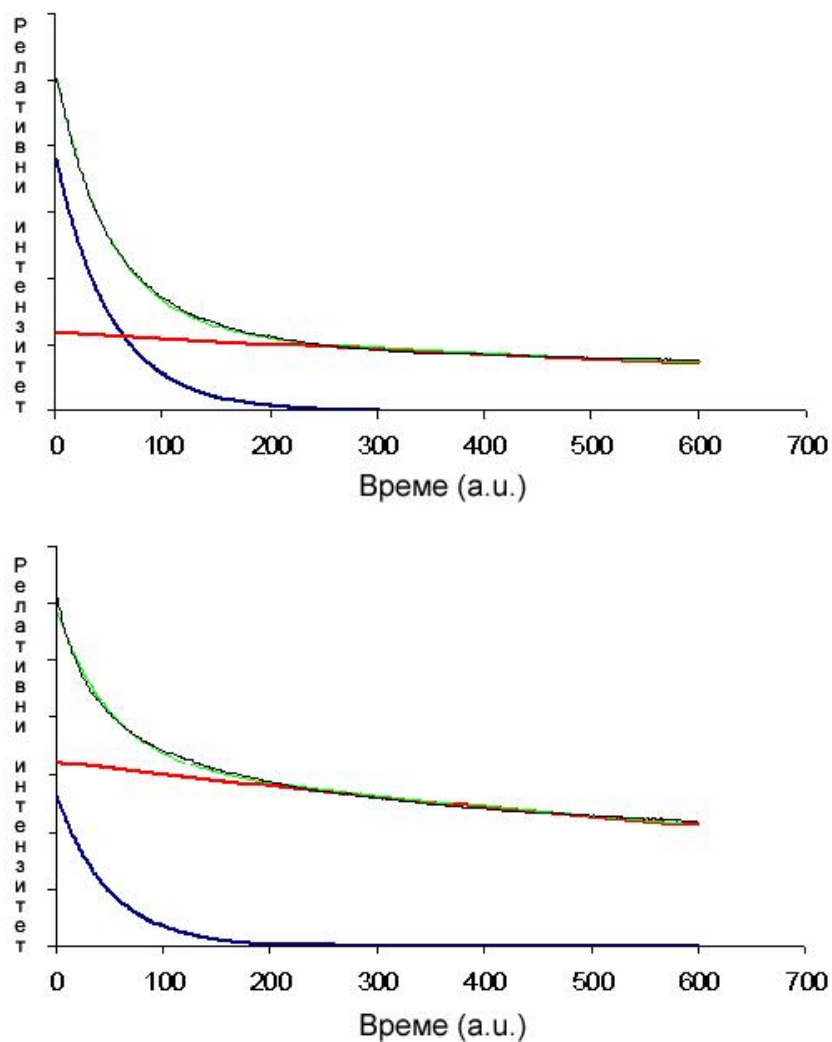


Слика 68. Производња хидроксил радикала у свежим и сувим листовима након додатне хидратације.

Мада је у радовима показано да је опадање интензитета флуоресценције флуоресцентне пробе за супероксид анјон радикал експоненцијалан процес, показало се да је немогуће на тај начин представити податке у реалним експериментима које смо извели. Према предложеној једначини 84, кинетичке криве се могу раздвојити на две експоненцијале. Тако би се могле истовремено објаснити две појаве. Прва појава је праћење динамике усвајања флуоресцентне пробе, које не мора нужно бити тренутно. Друга појава је кориговање фотоизбељивања које се може јавити ако су флуоресцентни узорци дуже времена изложени побудној светлости.

Огледи у којима је праћења производња супероксид анјон радикала у сувим и свежим листовима, показују јасно раздвајање две физичке појаве, експоненцијалног опадања интензитета флуоресценције пробе *DPBF*, и линеарног (експоненцијалног са вредношћу експонента блиској нули) опадања аутофлуоресценције узорка услед фотоизбељивања (**слика 69**).

Показано је да је брзина нестајања пробе мања у сувим листовима, што потврђује да се у метаболички мање активним листовима непосредно након хидратације ствара мање супероксид анјон радикала у поређењу са метаболички активним свежим листовима (Табела 5).



Слика 69. Упоредни приказ производње супероксид анјон радикала након рехидратације сувих и свежих листова. Кинетичке криве су разлагане на две експоненцијалне криве. Црна линија – експериментално одређена крива, зелна крива – фитована крива, црвена линија – фотоизбељивање, плава линија – експоненцијално опадање флуоресценције боје DPBF.

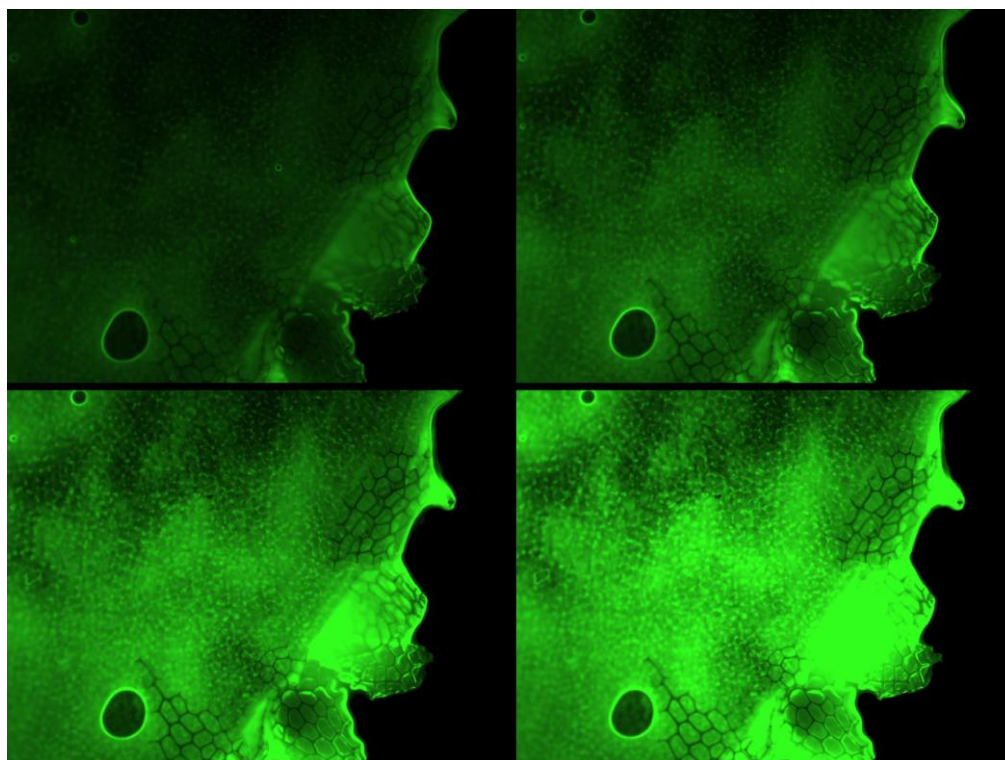
Табела 5. Вредности параметара експоненцијалних кривих којима су фитоване кинетичке криве.

$$y = ae^{(bx)} + ce^{(dx)}$$

	a	b	c	d
Суви лист	1.936e+006	-0.0187	5.906e+005	-0.0008097
Свежи лист	5.339e+005	-0.01973	6.458e+005	-0.0007046

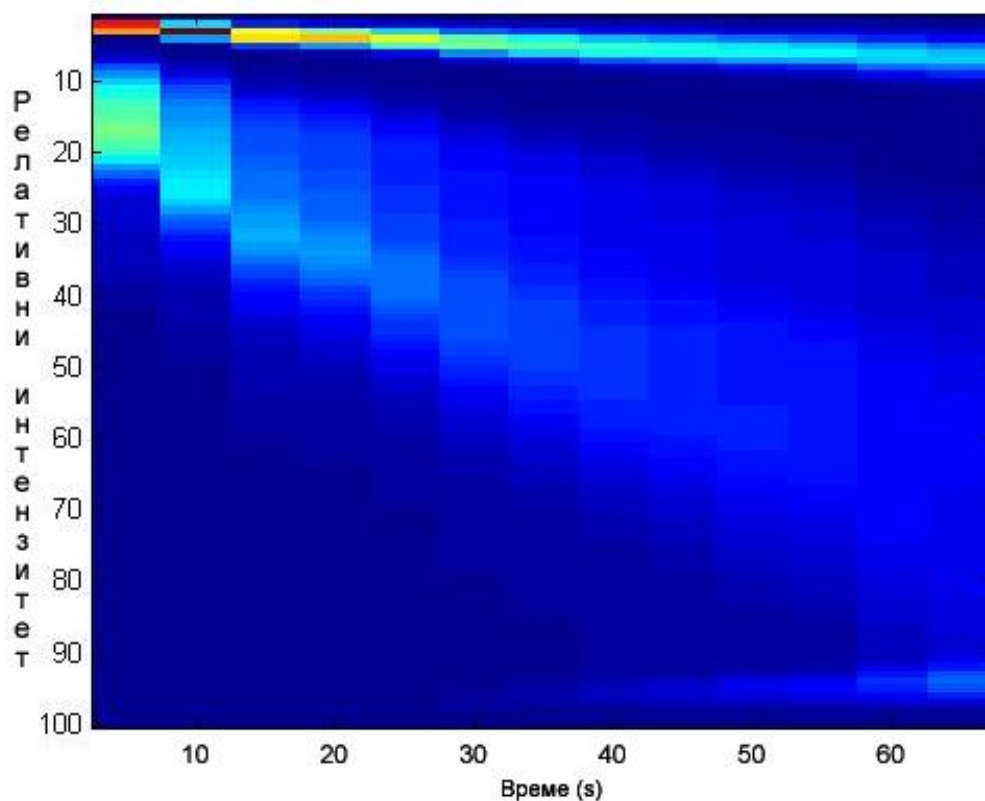
Мада изразито прецизна у описивању временске динамике процеса, анализа емисије флуоресценције у временском домену не даје увид у грађу листа, нити у биолошку активност различитих биљних ткива или региона листа.

Како би се стекао увид у биолошку активност испитиваних листова, снимљене су серије флуоресцентних микрографија листова у једнаким временским интервалима којима је додата флуоресцентна проба. У циљу веродостојног приказивања боје флуоресцентне пробе, фотографије су обрађене у програму *BioCIE* (слика 70, слика 71).



Слика 70. Серија флуоресцентних микрографија свежег листа коме је додата флуоресцентна проба *APF*. Већа производња хидроксил радикала одговара јачем осветљењу на слици.

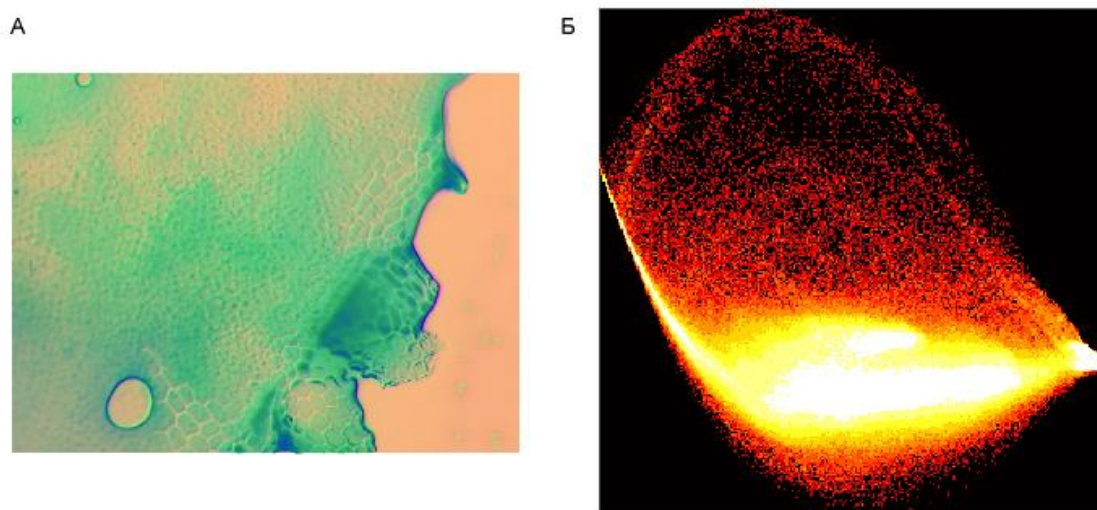
Анализа колокације ткива у којима се производи слична количина хидроксил радикала одређивана је на два начина. Први начин је процена густине вероватноће налажења пиксела одређене светлости, што је директно пропорцијално количини хидроксил радикала која је произведена. Ако се на графику опажа један јасан линеарни гребен, можемо са сигурношћу тврдити да је узорак хомоген, у супротном постоји више типова ткива (**слика 71**).



Слика 71. Густина вероватноће појављивања пиксела одређене светлости која је директно пропорцијална количини произведених хидроксил радикала. Уочавају се 3 гребена који се могу линеарно фитовати, од чега један представља позадину, а друга два се односе на ткива чија се активност разликује.

Последње питање које тражи одговор је лоцирање и препознавање ткива која показују различиту метаболичку активност. То се постиже мултиваријационом анализом слика. Матрице се лако могу превести у векторе, над којима се може извршити било која од наведених мултиваријационих техника. Матрице се могу превести у векторе на више начина, при чему се елементи ишчитавају под различитим угловима, од којих сви дају сличне резултате осим у када је изражена усмереност текстуре узорка. Како је број компонената мали у односу на број снимљених фотографија, најпогоднија је уједно и најједноставија

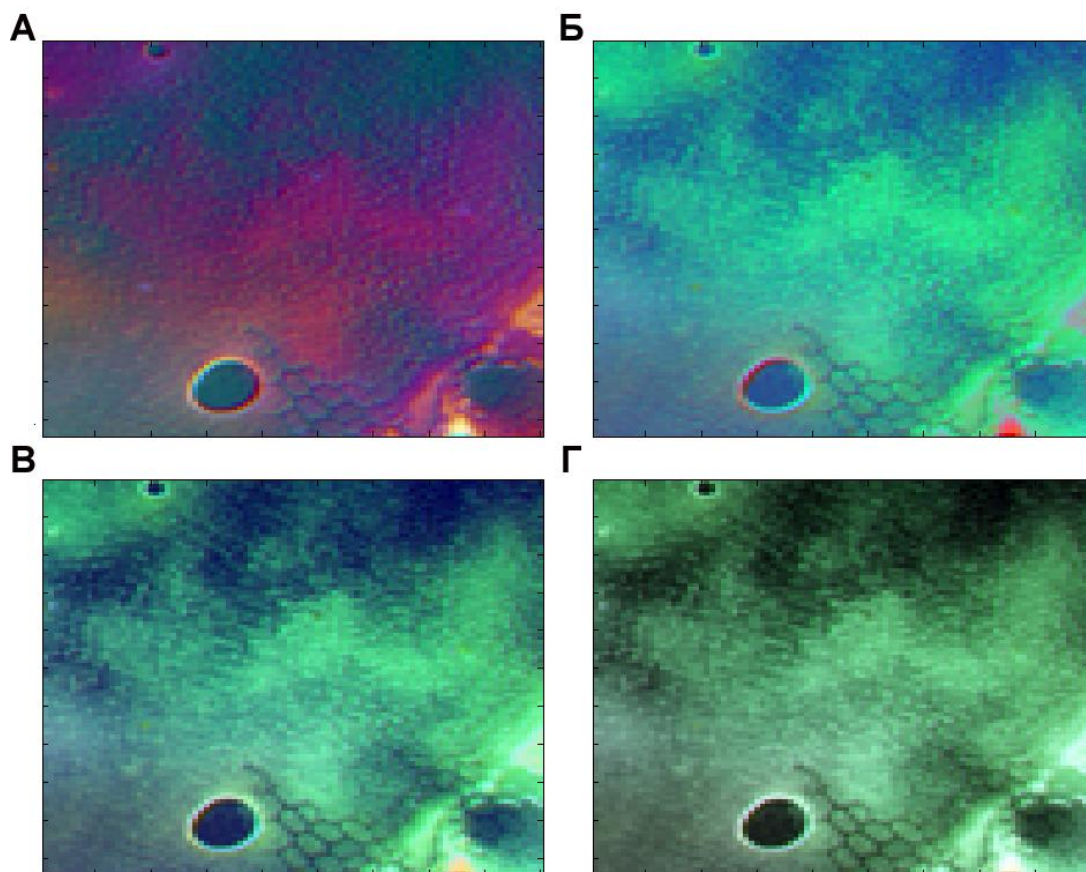
метода, метода главних компоненти *PCA*. За анализу слика употребљен је алат *MASSMIA* развијен у програмском окружењу *Matlab* (слика 72).



Слика 72. А – слика сачињена од 3 главне компонентне. Црвени канал одговара првој главној компоненти, зелени канал другој, а плави трећој. Б – припадност пиксела *PCA* графику у односу на вредности за прву главну компоненту (*x*-оса) и другу главну компоненту (*y*-оса).

Као што је већ показано на примерима сигнала, различите аналитичке методе значајно утичу на коначни резултат. Када се ради о сликама, тешко је одредити тачан облик компоненти које задовољавају физичке и физиолошке законитости – а према томе и методу која је најпогоднија. Из тог разлога треба тестирати већи број метода, упоредити их и пронаћи најбољи однос између робусности и осетљивости. Као и на примеру сигнала, прво су тестиране методе факторске анализе, без ротације факторских скорова, са *Varimax* ортогоналном ротацијом, *Promax* неортогоналном ротацијом са вредношћу параметра $k=4$ и *Promax* неортогоналном ротацијом са вредношћу параметра $k=10$.

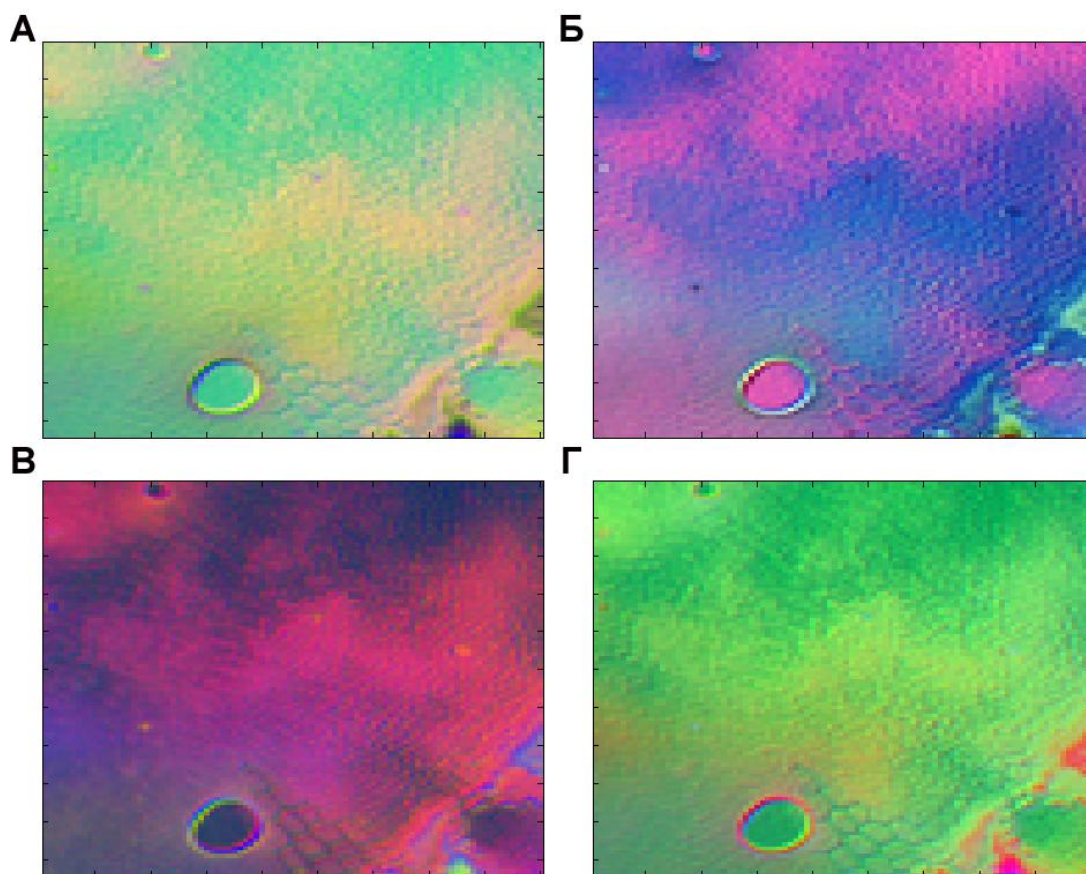
Добијене вредности фактора нормализоване су на интервал од 0 до 1. За серију микрографија, одређена су 3 фактора. Црвени, зелени и плави канал *RGB* слике одговарају првој, другој и трећој главној компоненти (фактору) (Слика 73).



Слика 73. Серија микрографија разложена на 3 главне компоненте (3 фактора). Први фактор одговара црвеном каналу, други фактор зеленом каналу, а трећи фактор црвеном каналу збирне RGB слике. Сваки од канала нормализован на интервал од 0 – 1. А – без ротације факторских скорова, Б – употребљена је ортогонална ротација *Varimax*, В – употребљена је неортогонална ротација *Promax* са вредношћу параметра $k=4$, Г – употребљена је неортогонална ротација *Promax* са вредношћу параметра $k=10$.

Разлагањем серије микрографија факторском анализом, независно од примене ротације факторских скорова, успешно се могу раздвојити 3 компоненте. Предност примене ротације факторских скорова огледа се у појачаном контрасту и израженијим ивицама објеката на слици (различитих ткива у смислу продукције хидроксил радикала) (Слика 73а, у поређењу са Сликама 73б,в,г). Разлика између слика добијених применом факторске анализе са ортогоналном и неортогоналном ротацијом факторских скорова односи се на очуваност детаља (Слике 73б и 73в). Како је независност између компоненти добијених факторском анализом са ортогоналном ротацијом већа, постиже се већи контраст између сличних ткива, а мањи контраст између ткива са израженим разликама у поређењу са компонентама проистеклим из анализе у којој је употребљена неортогонална

ротација факторских скорова. Са повишењем вредности параметра k , наведена својства неортогоналне ротације постају још израженија.



Слика 74. Серија микрографија разложена на 3 независне компоненте. Прва независна компонента одговара црвеном каналу, независна компонента зеленом каналу, а независна компонента црвеном каналу збирне *RGB* слике. Сваки од канала нормализован на интервал од 0 – 1. А – *ICA* (гаусичност као критеријум независности), Б – *ICA* (*skewness* као критеријум независности), В – *ICA* (*kurtosis* као критеријум независности), Г – *SOBI-RO* алгоритам.

Показало се да анализа независних компоненти представља напреднију анализу у поређењу са факторском анализом, без обзира на то који се тип ротације факторских скорова или критеријума за утврђивање независности компоненти употребљава. Контрастирање и истицање ивица између метаболички различитих ткива (изражене разлике) је на нивоу резултата факторске анализе са неортогоналном ротацијом факторских скорова. Контраст у метаболички сличним ткивима је чак и израженији него приликом употребе факторске анализе са ортогоналном ротацијом. Једном речју, анализа независних компоненти обједињује најбоље особине оба типа факторске анализе. При томе, у анализи слика важи исто правило установљено и у анализи спектра, а то је да за број жељених фактора (n), број слика које улазе у факторску анализу мора бити

најмање $2n+1$. Са друге стране, анализа независних компоненти захтева најмање онолико слика колико је независних компоненти. Исто важи и за *SOBI-RO* алгоритам. Метод за утврђивање независности компонената не игра значајну улогу у коначном резултату анализе. Предности и мане *ICA* алгоритма и *SOBI-RO* алгоритма дошле би до изражаја тек онда када би било потребно раздвојити већи број независних компоненти.

4. ДИСКУСИЈА

Описана аналитичка процедура се показала врло ефикасном чак и на примерима који су сложенији од очекиваних примера у биолошким системима.

У случају да је у анализираним спектрима присутан шум, знатно је теже раздвојити компоненте, пошто шум повећава корелисаност и гаусичност делова сигнала који се разликују, а смањује наведене параметре на деловима сигнала који су истоветни. Као последица тога, специфични шумови постају важна основа за препознавање компоненти које у том случају није ни мало ефикасно.

Као ефикасан алат за уклањање шума могу се искористити таласићи. Предности употребе таласића над каласичном Фуријеовом анализом огледају се у томе што су таласићи нелинеарна метода, и што нису условљени непрекидним трајањем. Друга важна предност, огледа се у томе што форма таласића знатно више наликује спектрима од синусоида из Фуријеове анализе. Два типа таласића су се показалча изразито погодним, *Daubechies* таласићи вишег реда (коришћен 10. ред) и дискретни *Meyer* таласићи. Декомпозиција је у оба случаја била до другог нивоа. Такав степен декомпозиције чува форму сигнала (декомпозиција на више нивоа доводи до дисторзије сигнала) и ефикасно препознаје шум (декомпозицијом првог реда добија се шум који по својим карактеристикама не спада у бели шум). Како би се постигла егзакност методе, за препознавање шума искоришћено је изборно правило *rigorous SURE*. Ефикасност оба приступа била је готово подједнака, уз благу предност *Daubechies* таласића који боље чувају структуру пикова. Енергија резидуала шума (суме квадрата разлике спектра са

шумом и без шума) по једном елементу сигнала пре примене таласића износила је око 0,02 да би након уклањања шума таласићима пала на 0,005.

Шум уклоњен таласићима представља добру полазну основу за даље уклањање шума и базне линије коришћењем методе сплајна. Подешавањем вредности фактора специфичности могуће је врло прецизно пратити оригиналну линију (вредности блиске 1) или у потпуности игнорисати облик података апроксимирајући их готово правом линијом (вредности блиске 0). Како се пикови јављају у дефинисаним регионима, лако је дефинисати опсеге на којима се примењује сплајн и одговарајуће факторе специфичности. Осим за уклањање шума, сплајн са ниском вредношћу фактора специфичности веома успешно уклања базну линију, која се може савити ако је у узорку присутан, на пример, манган или постији нека неправилност магнетног поља.

Описани поступак за уклањање шума, показао се толико делотворим, да су даље анализе вршене на спектрима којима није додаван шум.

Главни поступак за процену присуства компоненти и релативну квантификацију састоји се из 3 корака.

У првом аналитичком кораку, слепој анализи спектралне матрице, фактарска анализа без примене ротације факторских скорова није дала задовољавајуће резултате. Приликом употребе неортогоналне ротације типа *Promax* постојала је тенденција недовољног раздвајања компоненти која узрокује велику непрецизност. Као најефикаснија метода базирана на факторској анализи, показала се факторска анализа са ортогоналном ротацијом факторских скорова *Varimax* која је најсроднија методи независних компоненти.

Модификација факторске анализе у којој се анализирају одређени сегменти сигнала давала је одличне резултате али захтева припрему сигнала. Сигнал је потребно интегралити, чиме се добијају пикови облика Гаусових кривих. Факторска анализа са *Promax* ротацијом је идеална за такве, високо корелисане спектре који наликују флуоресцентним спектрима који се деценијама анализирају на тај начин.

Пошто је утврђено да спектри немају особине гаусичности, анализа независних компоненти је тестирана. Показало се да је *FastICA* алгоритам са *skewness* параметром као мером којом се утврђује независност компоненти ефикасан код композитних смеша са малим бројем компоненти које су међусобно у значјној мери различите. Ако је композитни сигнал сачињен од већег броја компоненти, или од сродних сигнала, као што су сигнали метил радикала и хидроксиметил радикала, *SOBI-RO* алгоритам би био успешнији. Занимљиво је поменути да *SOBI-RO* алгоритам није био довољно ефикасан на примерима који су били најједноставнији за *FastICA* алгоритам, анализу сложених спектра сачињених од хидроксил радикала и супероксид анјон радикала. Такав резултат није изненађујућ, будући да наведена два спектра немају пикове који се преклапају у различитој мери. Стога грешка *SOBI-RO* алгоритма потиче од тежње да се независност компоненти у смислу гаусичности умањи.

Слепа анализа компоненти је од изузетне важности и директно утиче на даљи ток анализа. Из тог разлога је добро применити већи број метода које мада имају исти циљ, раздвајање нкомпоненти, у основи показују знатне разлике.

Као веома користан метод за визуелизацију квалитета препознавања наметнуо се график у коме је на X оси представљен тражени сигнал, а на Y оси процењени сигнал. Ако процењени сигнал не одступа од траженог сигнала, добиће се врло правилна линеарна зависност. У случају да је присутан шум, а да су пикови на правилан начин интерпретирани, тачке ће се ширити за мале вредности, а сужаваће се за вредности које одговарају релативном интензитету пикова. Ако су пак пикови погрешно процењени, расипање тачака ће бити изражено за велике вредности, и биће слично или чак и веће у поређењу са регионом који одговара шуму.

Наредни корак у анализи је аутоматско препознавање компоненти које сачињавају спектар. И у овом аналитичком блоку искоришћено је више метода како би се са што је могуће већим степеном поверења судило о исправности препознавања спектралних компоненти. Могуће је радити са необрађеним, издвојеним компонентама, или са компонентама над којима је примењена Фуријеова анализа са прозорима променљиве ширине. Из спектрограма је могуће

издвојити неке од пикова, или регионе у којима се пикови јављају. Тиме је дефинисан опсег у коме се налазе пикови, што се може искористити за идентификацију. Најкомпликованији спектри за препознавање су адукти водоничног радикала и угљен диоксид радикала, које карактерише мноштво пикова у оквиру истог региона. Током слепо анализе, неки од њих могу бити изгубљени, чиме се отежава прецизно лоцирање пикова. Применом спектрограма, такви региони се знатно лакше препознају. Метода је такође била успешна у отклањању и препознавању резидуалних пикова који припадају некој другој компоненти, а који су у слепој анализи погрешно приписани.

Као комплементарна метода користи се и метода одређивања фракталне димензије сигнала у прозорима дефинисане ширине. Математичка логика која стоји иза анализе фракталне димензије у многоне подсећа на Фуријеову анализу. Ако су добијене чисте компоненте, по фрми изводи Гаусове функције фрактална димензија би била једнака вредности 1. У регионима у којима доминира шум, фрактална димензија има вредност 2. Како спектри различитих адуката имају пикове на различитим растојањима, правилним подешавањем ширине прозора могуће се пратити само један од пикова, или већи број пикова, за које ће фрактална димензија бити различита. Показало се да је одређивање фракталне димензије мање ефикасно у поређењу са Фуријеовом анализом. Ипак, увек је боље користити већи број метода, у специфичним случајевима у којима фаворизована метода не може да пружи одговарајуће резултате.

Резултати добијени одређивањем фракталне димензије, и конструисањем спектрограма, послужили су као основ за *SVM* и *LDA*. *SVM* на основу тренинг вектора, који су добијени додавањем шума чистим, симулираним компонентама, као и компонентама које су свесно лоше процењене методом *FastICA* процењује проценат успешности препознавања. Исти улазни подаци су употребљени као тренинг сет и за *LDA*. Припадност групи скорова *LDA* анализи лако се може утврдити кластеровањем. Комбинација *SVM* и *LDA* даје потпуно разлагање компоненти у свим симулацијама које су тестиране.

Као финални корак аналитичког поступка употребљава се усмерена анализа независних компоненти *CICA*. Која као полазне компоненте узима симулиране

компоненте које су препознате. Претпоставило би се да се фитовање дефинисаним компонентама може употребити и да би резултат анализе био подједнако добар као и приликом коришћења методе *CICA*. Ипак, метода *CICA* је знатно ефикаснија. Ефикасност долази из тога да се свака тачка компоненте посебно утврђује, чиме се знатно поопштава робустност методе, у погледу ефикасности када се ради са спектрима у којима је присутан шум, или спектрима у којима базна линија није у потпуности правилно отклоњена.

Након што је ефикасност предложене процедуре потврђена на симулираним сетовима података, приступило се анализи реалних хемијских и биолошких система.

Управо се у анализи реалних система показује пуна моћ описаног аналитичког поступка. На бројим примерима спектра плазма мембрана, разлика је осим прецизне квантификације била и квалитативна, у смислу препознавања компоненти које су мало заступљене.

Предложен скуп метода, дао је одговоре на нека од питања која су постављена од стране других аутора, у примерима анализе сложених спектра ћелијског зида под условима *UV* стреса, производње слободних радикала у митохондријама или у електрохемијској реакцији електролизе воде.

Описане мултиваријационе технике могу се уз мале измене употребити и за анализу слика.

Пре снимања микрографија, продукција слободних радикала у листовима биљака праћена је на спектрофлуориметру. Осим апсолутне вредности брзине продуковања слободних радикала, може се пратити и брзина којом боја продире у свеже, делимично суве и суве листове. Анализом слика у смислу одређивања густине вероватноће интензитета флуоресценције добија се увид у састав ткива у метаболичком смислу. Компатибилна метода је мултиваријационо разлагање слика, захваљујући којој је могуће да се визуелизују разлике у ткивима.

Најбоље резултате су дали алгоритми базирани *ICA* и *SObI-RO* алгоритам, пошто су пружали оптимално раздвајање региона ткива (контрастирање).

5. ЗАКЉУЧАК

Овај рад уводи нову парадигму у хеометријску анализу. Показало се да је разлагање сложених ЕПР спектра спин-адуката спинског хватача *DEPMPO* немогуће ако се примене клаичне методе већ присутне у хеометрији. Изазов је решен на тај начин што се створена нова процедура која обједињује мноштво техника базираних на мултиваријационој анализи, машинском учењу и класичној анализи сигнала.

Још једна од специфичности овог рада огледа се у томе што су резултати добијени применом две различите спектроскопске технике засноване на потпуно другачијим физикохемијским поцесима.

Описане процедуре погодне су и за анализу слика, уз минималне измене улазних података, што је следећи корак у истраживању.

6. ЛИТЕРАТУРА

1. Jackson M., Mantsch H.H., The use and misuse of FTIR spectroscopy in determination of protein structure, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(2): 95-120, 1995
2. Wi S., Pancoska P., Keiderling T.A., Predictions of protein secondary structures using factor analysis on Fourier transform infrared spectra: Effect of Fourier self-deconvolution of the amide I and amide II bands, *Biospectroscopy*, 4(2): 93-106, 1998
3. Lee D.C., Haris P.I., Chapman D, Mitchell R.C., Determination of protein secondary structure using factor analysis of infrared spectra, *Biochemistry*, 29(39): 9185-9193, 1990
4. Fredericks P.M., Lee J.B., Osborn P.R., Swinkels D.A., Materials characterization using factor analysis of FT-IR spectra. Part 1: Results. *Applied spectroscopy*, 39(2): 303-310, 1985
5. Sukuta S., Bruch R., Factor analysis of cancer Fourier transform infrared evanescent wave fiberoptical (FTIR-FEW) spectra. *Lasers in surgery and medicine*, 24(5): 382-388, 1999
6. Hamilton J. C., Gemperline P.J., Mixture analysis using factor analysis. II: Self-modeling curve resolution. *Journal of chemometrics*, 4(1): 1-13, 1990
7. Maeder M., Zuberbuehler A.D., The resolution of overlapping chromatographic peaks by evolving factor analysis. *Analytica Chimica Acta*, 181: 287-291, 1986
8. Keller H.R., Massart D.L., Peak purity control in liquid chromatography with photodiode-array detection by a fixed size moving window evolving factor analysis. *Analytica chimica acta*, 246(2): 379-390, 1991
9. Gemperline P.J. A priori estimates of the elution profiles of the pure components in overlapped liquid chromatography peaks using target factor analysis. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 24(4): 206-212, 1984
10. Keller H.R., Massart D.L., De Beer J.O. Window evolving factor analysis for assessment of peak homogeneity in liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 65(4), 471-475, 1993
11. Radotić K., Kalauzi A., Djikanović D., Jeremić M., Leblanc R.M., Cerović Z.G., Component analysis of the fluorescence spectra of lignin model compound, *Journal of photochemistry and Photobiology B: Biology*, 83: 1-10, 2006

12. Djikanović D., Kalauzi A., Jeremić M., Mičić M., Radotić K., Deconvolution of fluorescence spectra: Contribution to the structural analysis of complex molecules, *Colloides and Surfaces B: Biointerfaces*, 54(2): 188-192, 2007
13. Birch D.J., Imhof R.E. Time-domain fluorescence spectroscopy using time-correlated single-photon counting. In *Topics in fluorescence spectroscopy*, Springer US, 1-95, 2002
14. Iovine G.A., Chaffotte A.F., Roder H., Goldberg M.E. Early steps in cytochrome c folding probed by time-resolved circular dichroism and fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*, 31(30), 6876-6883, 1992
15. Cubeddu R., Docchio F., Liu W.Q., Ramponi R., Taroni, P., A system for time- resolved laser fluorescence spectroscopy with multiple picosecond gating. *Review of scientific instruments*, 59(10), 2254-2259, 1988
16. Mojović M.D., Spasojević I.B., Vuletić M.M., Vucinić Z.B., Bacić G.G., An EPR spin-probe and spin-trap study of the free radicals produced by plant plasma membranes, *Journal of Serbian Chemical Society*, 70: 177-186, 2005
17. Bacić G.G., Mojović M.D., EPR spin trapping of oxygen radicals in plants - A methodological overview, *Biophysics from Molecules to Brain: In Memory of Radoslav K. Andjus*, 1048: 230-243, 2005
18. Stolze K., Udilova N., Nohl H., Spin trapping of lipid radicals with DEPMPO-derived spin traps: detection of superoxide, alkyl and alkoxy radicals in aqueous and lipid phase. *Free radical biology & medicine*, 29(10): 1005, 2000
19. Liu K.J., Miyake M., Panz T., Swartz H., Evaluation of DEPMPO as a spin trapping agent in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(5): 714-721, 1999
20. Dambrova M., Baumann L., Kalvinsh I., Wikberg J.E.S., Improved method for EPR detection of DEPMPO-superoxide radicals by liquid nitrogen freezing. *Biochemical and biophysical research communications*, 275(3): 895-898, 2000
21. Chang C., Ren J., Fung F.C.W., Hung Y.S., Chan F.H.Y., Novel sparse component analysis approach to free radical EPR spectra decomposition, *Journal of Magnetic Resonance*, 175(2): 242-255, 2005
22. Gomes A., Fernandes E., Lima J.L.F.C., Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 65(2-3): 45-80, 2005
23. Price M., Reiners J.J., Santiago A.M., Kessel D. Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology*, 85(5): 1177-1181, 2009

24. Choung Y.H., Taura A., Pak K., Choi S.J., Masuda M., Ryan A.F., Generation of highly-reactive oxygen species is closely related to hair cell damage in rat organ of Corti treated with gentamicin. *Neuroscience*, 161(1): 214-226, 2009
25. Urano Y., Kamiya M., Kanda K., Ueno T., Hirose K., Nagano T., Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes. *Journal of the American Chemical Society*, 127(13): 4888-4894, 2005
26. Kirsch M., Groot H., Detection of N-nitrosomelatonin and other N-nitrosotryptophan derivatives by transnitrosation of APF and DAF-2. *Journal of pineal research*, 40(1): 10-17, 2006
27. Ueno T., Urano Y., Setsukinai K.I., Takakusa H., Kojima H., Kikuchi K., Nagano, T., Rational principles for modulating fluorescence properties of fluorescein. *Journal of the American Chemical Society*, 126(43), 14079-14085, 2004
28. Villamena AF, Merle KJ, Hadad MC, Zweier LJ, Superoxide radical anion adduct of 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO). The thermodynamics of formation and its acidity, *Journal of Physical Chemistry A*, 109: 6083-6088, 2005
29. Khramtsov V., Berliner JL., Clanton LT, NMR spin trapping: detection of free radical reactions using a phosphorous-containing nitron spin trap, *Magnetic Resonance in Medicine*, 42: 228-234, 1999
30. Berliner JL, Khramtsov V, Clanton LT, Fujii H, NMR and MRI spin trapping: using NMR to learn about free radical reactions, *Current Topics in Biophysics*, 26(1): 21-27, 2002
31. Nohl H., Jordan W., Hegner D., Identification of free hydroxyl radicals in respiring rat heart mitochondria by spin trapping with the nitron DMPO. *FEBS letters*, 123(2): 241, 1981
32. Zhao H., Joseph J., Zhang H., Karoui H., Kalyanaraman B., Synthesis and biochemical applications of a solid cyclic nitron spin trap: a relatively superior trap for detecting superoxide anions and glutathionyl radicals. *Free radical biology & medicine*, 31(5): 599, 2001
33. Weaver J., Kang T.J., Raines K.W., Cao G.L., Hibbs S., Tsai P., Cross A.S., Protective role of *Bacillus anthracis* exosporium in macrophage-mediated killing by nitric oxide. *Infection and immunity*, 75(8): 3894-3901, 2007
34. Elias R.J., Andersen M.L., Skibsted L.H., Waterhouse A.L., Identification of free radical intermediates in oxidized wine using electron paramagnetic resonance spin trapping. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(10), 4359-4365, 2009

35. Samuni A., Samuni A., Swartz H.M., The cellular-induced decay of DMPO spin adducts of $\cdot\text{OH}$ and $\cdot\text{O}_2$, *Free Radical Biology and Medicine*, 6(2): 179-183, 2002
36. Savić A.G., Mojović M., Free radicals identification from the complex EPR signals by applying higher order statistics, *Analytical Chemistry*, 84(7): 3398-3402, 2012
37. Herschel, Sir JFW., On a case of superficial colour presentet by a homogenous liquid internally colourless. *Philosophical Tranasactions of the Royal Society (London)*, 135: 143-145, 1845
38. Undenfriend S., Development of the spectrofluorimeter and its comercialisation, *Protein Science*, 4: 542-551, 1995
39. Jablonski A., Uber den Mechanisms des Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren, *Zeieschrift fur Physik*, 94: 38-46, 1935
40. Jovanović A. A., Molekulska spektroskopija – spektrohemijski aspekt, 319-339, 2002
41. Lakowicz J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, University of Maryland School of Medicine Baltimore, Maryland, USA, third edition
42. Hof M., Hutterer R., Fidler V. (Eds.), *Fluorescence spectroscopy in biology: advanced methods and their applications to membranes, proteins, DNA, and cells* (Vol. 3). Springer. 2005
43. Lakowicz, J. R. (Ed.), *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Volume 1: Techniques* (Vol. 1). Springer. 1992
44. Svanberg, S., *Atomic and molecular spectroscopy: basic aspects and practical applications*. Springer Verlag. 2004
45. Periasamy, A. (Ed.), *Methods in cellular imaging* (pp. 295-308). New York:: Oxford University Press. 2001
46. Larsson C., Kjellbom P., Widell S., Lundborg T., Sideness of plant plasma membrane vesicles purified by partitioning in aqueous two-phase system, *FEBS*, 7(2): 271-276, 1984
47. Spangfort M., Larsson U.K., Anderson J.M., Andersson B., Isolation of two different subpopulations of the light-harvesting chlorophyll a/b complex of photosystem II (LHCII), *FEBS letters*, 224(2): 343-347, 1987
48. Berglund A.H., Larsson K.E., Liljenberg C.S., Permeability behaviour of lipid vesicles prepared from plant plasma membranes – impact of compositional changes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1682: 11-17, 2004

49. Larsson C., Widell S., Sommarin M., Inside-out plant plasma membrane vesicles of high purity obtained by aqueous two-phase partitioning, *FEBS Letters*, 229(2): 289-292, 1988
50. Wang G., Moore D.J., Shewfelt R.L., Isolation of plasma membrane from *Capsicum annum* fruit tissue: prevention of acid phosphatase contamination, *Postharvest Biology and Technology*, 6: 81-90, 1995
51. Morre D.J., Moore D.M., Applications of aqueous two-phase partition to isolation of membranes from plants: A periodic NADH oxidase activity as a marker for right side-out plasma membrane vesicles, *Journal of Chromatography B*, 743: 369-376, 2000
52. Abas L., Luschnig C., Maximum yields of microsomal-type membranes from small amounts of plant material without requiring ultracentrifugation, *Analytical Biochemistry*, 403: 217-227, 2010
53. Canut H., Bauer J., Weber G., Separation of plant membranes by electromigration techniques, *Journal of Chromatography B*, 722: 121-139, 1999
54. Ford J.K., MacCallum R.C., Tait M., The application of exploratory factor analysis applied in psychology: a critical review and analysis, *Personnel Psychology*, 39(2): 291-314, 1986
55. Molinowski E., Factor analysis in Chemistry, Third edition, Wiley-Interscience New York, 2000
56. Kaiser H.F., The Varimax criterion for analytic rotation in factor analysis, *Psychometrika*, 23(3), 187-200, 1958
57. Thompson B., *Exploratory and confirmatory factor analysis: Understanding concepts and applications*. American Psychological Association. 2004
58. Lawley D.N., Maxwell A.E., *Factor analysis as a statistical method* (Vol. 18). London: Butterworths., 1971
59. Cattell R.B., *The scientific use of factor analysis in behavioral and life sciences* (p. 618). New York: Plenum press., 1978
60. Oja E., Hyvärinen A., Karhunen J., Independent component analysis, 2001
61. Hyvärinen, A., Hurri J., Hoyer P.O., Independent component analysis. *Natural Image Statistics*, 39: 151-175, 2009
62. Comon, P. Independent component analysis, a new concept?, *Signal processing*, 36(3): 287-314, 1994

63. Hyvärinen A., Oja E., A fast fixed-point algorithm for independent component analysis. *Neural computation*, 9(7): 1483-1492, 1997
64. Lee T.W., Girolami M., Sejnowski T.J., Independent component analysis using an extended infomax algorithm for mixed subgaussian and supergaussian sources. *Neural computation*, 11(2): 417-441, 1999
65. Bingham E., Hyvärinen A., A fast fixed-point algorithm for independent component analysis of complex valued signals. *International journal of neural systems*, 10(01): 1-8. 2000
66. Belouchrani A., A blind source separation technique using second-order statistics, *Signal Processing, IEEE Transactions on*, 45(2): 434-444, 1997
67. Yeredor A., Blind separation of Gaussian sources via second-order statistics with asymptotically optimal weighting, *Signal Processing Letters, IEEE*, 7(7): 197-200, 2000
68. Belouchrani A., Amin M.A., Blind source separation based on time-frequency signal representations, *Signal Processing, IEEE Transactions on*, 46(11): 2888-2897, 1998
69. Seungjin C., Cichocki A., Beloucharni A., Second order nonstationary source separation, *The Journal of VLSI Signal Processing*, 32(1): 93-104, 2002
70. Welch P., The use of fast Fourier transform for the estimation of power spectra: a method based on time averaging over short, modified periodograms, *Audio and Electroacoustics, IEEE Transactions on*, 15(2): 70-73, 1967
71. Nussbaumer, Henri J. "Fast Fourier transform and convolution algorithms" Berlin and New York, Springer-Verlag, Springer Series in Information Sciences, 2, 1982
72. Nussbaumer H.J., Fast Fourier transform and convolution algorithms."Berlin and New York, Springer-Verlag(Springer Series in Information Sciences.2 (1982).
73. Frigo M., Johnson S.G., FFTW: An adaptive software architecture for the FFT. In *Acoustics, Speech and Signal Processing, 1998. Proceedings of the 1998 IEEE International Conference on* (Vol. 3, pp. 1381-1384). IEEE., 1993
74. Marple Jr, L., Computing the discrete-time "analytic" signal via FFT. *Signal Processing, IEEE Transactions on*, 47(9): 2600-2603, 1999
75. Vetterli M., Nussbaumer, H.J., Simple FFT and DCT algorithms with reduced number of operations. *Signal processing*, 6(4): 267-278, 1984
76. Zbigniew S., Siebes A., The Haar wavelet transform in the time series similarity paradigm, *Principles of Data Mining and Knowledge Discovery*, 1704: 12-22, 1999

77. Daubechies I., The wavelet transform, time-frequency localization and signal analysis, *Information Theory, IEEE Transactions on*, 36(5): 961-1005, 1990
78. Meyer Y., Wavelets-Algorithms and applications, Wavelets-Algorithms and applications Society for Industrial and Applied Mathematics Translation., 142, 1993
79. Dunn D., Higgins W.E., Optimal Gabor filters for texture segmentation, *Image Processing, IEEE Transactions on*, 4(7): 947-964, 1995
80. Mallat S.G., A theory for multiresolution signal decomposition: the wavelet representation, *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on*, 11(7): 674-693, 1989
81. Matz V., Smid R., Starman S., Kreidl M., Signal-to-noise ratio enhancement based on wavelet filtering in ultrasonic testing. *Ultrasonics*, 49(8): 752-759, 2009
82. Morsi W.G., El-Hawary M.E., Suitable mother wavelet for harmonics and interharmonics measurements using wavelet packet transform. In *Electrical and Computer Engineering, 2007. CCECE 2007. Canadian Conference on* (pp. 748-752). IEEE., 2007
83. Hussain M.S., Reaz M.B.I., Mohd-Yasin F., Ibrahimy, M. I., Electromyography signal analysis using wavelet transform and higher order statistics to determine muscle contraction. *Expert Systems*, 26(1): 35-48. 2009
84. Higuchi T., Approach to an irregular time series on the basis of the fractal theory, *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 31(2): 277-283, 1988
85. Anier, A., Higuchi fractal dimension and spectral entropy as measures of depth of sedation in intensive care unit, *Engineering in Medicine and Biology Society, 2004. IEMBS'04. 26th Annual International Conference of the IEEE. Vol. 1. IEEE*, 2004
86. Gómez C., et al., Use of the Higuchi's fractal dimension for the analysis of MEG recordings from Alzheimer's disease patients, *Medical engineering & physics*, 31(3): 306-313, 2009
87. Higuchi T., Relationship between the fractal dimension and the power law index for a time series: a numerical investigation. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 46(2): 254-264, 1990
88. Klonowski W., Olejarczyk E., Stepień R., Jalowiecki P., Rudner R., Monitoring the depth of anaesthesia using fractal complexity method. *Complexus mundi. Emergent patterns in nature*, 333-342, 2006
89. Hagberg G., From magnetic resonance spectroscopy to classification of tumors. A review of pattern recognition methods, *NMR in Biomedicine*, 11(4-5): 148-156, 1998

90. Baudat G., Anouar F., Generalized discriminant analysis using a kernel approach, *Neural computation*, 12(10): 2385-2404, 2000
91. Furey T.S., et al., Support vector machine classification and validation of cancer tissue samples using microarray expression data, *Bioinformatics*, 16(10): 906-914, 2000
92. Simon T., Chang E., Support vector machine active learning for image retrieval, *Proceedings of the ninth ACM international conference on Multimedia. ACM*, 2001
93. Sujun H., Sun Z., Support vector machine approach for protein subcellular localization prediction, *Bioinformatics*, 17(8): 721 – 728, 2001
94. Shun-ichi A., Wu S., Improving support vector machine classifiers by modifying kernel functions, *Neural Networks*, 12(6): 783 – 789, 1999
95. Thorsten J., Text categorization with support vector machines: Learning with many relevant features, *Machine learning: ECML-98*, 137 – 142, 1998
96. Price M., et al. Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy, *Photochemistry and photobiology*, 85(5): 1177 – 1181, 2009
97. Setsukinai Ken-Ichi, et al., Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species, *Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 3170 – 3175, 2003
98. Jovanović, K. K., Savić, A. G., Janković, R., Radulović, S., Spasić, S. Z., & Radotić, K., Detection of DNA mutations based on analysis of multiple wavelength excitation/emission fluorescence kinetics curves in real-time PCR, *Medical hypotheses*, 2012
99. Batinić-Haberle I., Spasojević I., Stevens R.D., Bondurant B., Okado-Matsumoto A., Fridovich I., Dewhirst M.W., New PEG-ylated Mn (III) porphyrins approaching catalytic activity of SOD enzyme. *Dalton Transactions*, (4): 617-624, 2006
100. Spasojević I., Pristov J.B., The potential physiological implications of polygalacturonic acid-mediated production of superoxide. *Plant signaling & behavior*, 5(12), 1525-1529, 2010
101. Fry S.C., Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemical Journal*, 332(Pt 2), 507, 1998
102. Passardi F., Penel C., Dunand C., Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in plant science*, 9(11), 534-540, 2004

103. Sutherland M.W., The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39(2): 79-93, 1991
104. Apel K., Hirt H., Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399. 2004
105. Kasai P.H., McLeod Jr,D., Detection by spin trapping of hydrogen and hydroxyl radicals generated during electrolysis of water. *The Journal of Physical Chemistry*, 82(5): 619-621, 1978

7. БИОГРАФИЈА АУТОРА

Кандидат Александар Савић рођен је 20. јуна 1986. године у Прокупљу. У родном граду је завршио основно и средње образовање са одличним успехом (5,00/5,00) током свих година школовања.

2005. године уписан је на студије на Биолошком факултету, Универзитета у Београду, смер молекуларна биологија и физиологија. Од треће године студија, похађао је студијску групу биофизика. 2010. године завршио је основне студије са просеком 9,15/10,00. На предметима са студијске групе остварио је просек 10,00/10,00 и дипломирао у најкраћем року у својој генерацији.

Од 2010 је запослен на Институту за мултидисциплинарске студије, Универзитета у Београду. Исте године постаје студент докторских студија на Факултету за физичку хемију, Универзитета у Београду.

Научна интересовања кандидата обухватају примену спектроскопских метода у биолошким истраживањима (ЕПР, флуоресценцна, Раманска и инфра црвена) и примену одговарајућих математичких метода анализе спектроскопских података. Осим спектроскопским методама, А.Савић се бавио и микроскопијом (флуоресцентна, флуоресцентно индуковани линеарни дихроизам, флуоресценција Х-зрака) и анализом слика. Математичке методе анализе спектра успешно је примењивао и на електрофизиолошким сигнаlima.

M21 Врхунски међународни часопис, у својој дисциплини је сврстан међу првих 30% (2)

1. Savić A.G., Mojović M., (2012) Free radicals identification from the complex EPR signals by applying higher order statistics, *Analytical Chemistry*, 84, 3398 – 3402.
2. Ducic T., Borchet M., Savić A., Kalauzi A., Mitrovic A., Radotic K., (2013) Enhancement in statistical and image analysis for in situ μ SXRF studies of elemental distribution and co-localization, using *Dioscorea balcanica*, *Journal of Synchrotron Radiation*, doi:10.1107/S0909049512050170

M22 Истакнути међународни часопис, у својој дисциплини је сврстан између првих 30% и 50% (2)

1. Djikanović D., Simonović J., Savić A., Ristić I., Bajuk-Bogdanović D., Kalauzi A., Cakić S., Budinski J., (2012) Structural differences between lignin model polymers synthesized from various monomers, *Journal of polymers and the environment*, 20, 607 – 617.
2. Savić A., Kardos R., Nytrai M., Radotić K., (2013) Decomposition of Complex Fluorescence Spectra Containing Components with Close Emission Maxima Positions and Similar Quantum Yields. Application to Fluorescence Spectra of Proteins, *Journal of fluorescence*, 23, 605 – 610

M23 Међународни часопис, има ИФ али није сврстан између првих 50% у својој дисциплини (1)

1. Jovanovic K.K., Savić A.G., Jankovic R., Radulovic S., Spasic S.Z., Radotic K., (2013) Detection of DNA mutations based on analysis of multiple wavelength excitation/emission fluorescence kinetics curves in real-time PCR, *Medical Hypotheses*, 80, 376 – 379

M33 Рад саопштен на скупу међународног значаја штампан у целини (15)

1. Mutavdžić D., Savić A., Nytrai M., Radotić K., (2010) Statistical models in analysis of steady-state fluorescence spectra of a protein. A new approach in following conformation transitions, 10th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, September 21-24, Beograd, Serbia, Vol. 1, 313-315.

2. Mihailović J., **Savić A.**, Bogdanović Pristov J., Radotić K., (2011) MRI brain tumors images by using independent component analysis, 9th IEEE International Symposium on Intelligent Systems and Informatics SISY, September 8-10, Subotica, Serbia, Vol. 1, 433-435.
3. Bogdanović Pristov J., Mitrović A., **Savić A.**, Prokopijević M., Radotić K., Spasojević I., (2011) Antioxidative Activity Of Cell Wall Isolated From *Picea Omorika* Shows Seasonal Changes. Naučni skup sa međunarodnim učešćem Zaštita prirode u 21 vijeku, Septembar 20-23, Žabljak, Crna Gora, Proceedings Vol. 2, 415-418.
4. **Savić A.**, Jovanović K., Mihailović J., Radotić K., (2011) Fuzzy logic point of view applied to diseases caused by dynamic mutations, 12th IEEE International Symposium on Computational Intelligence and Informatics November 21-22, Budapest, Hungary, Proceedings Vol. 1, 319-321.
5. **Savić A.G.**, Križak S., Živić M., Vučinić Ž., (2012) Noise analysis of ion channel patch-clamp records – statistical, and wavelet based approach, 56. Konferencija za elektroniku, računarstvo, automatiku i nuklearnu tehniku ETRAN, June 11-14, Zlatibor, Serbia, VI1.3 1-4.
6. Mihailović J., **Savić A.G.**, Križak S., Živić M., Vučinić Ž., (2012) A novel method for MRI images segmentation and coloring based on fuzzy c-means clustering algorithm, 56. Konferencija za elektroniku, računarstvo, automatiku i nuklearnu tehniku ETRAN, June 11-14, Zlatibor, Serbia, VI1.4 1-3.
7. Pejčin B., Conić P., **Savić A.**, Kien-Thai Y., Hegediš A., Karaman I., Horvatić M., Radotić K., (2012) Application of fixed size window factor analysis (FSW-FA) in processing fluorescence spectra of bioactive extracts, 5th Regional Biophysics Conference RBC2012, September 3-7, Kladovo – Belgrade, Serbia, Proceedings, 14-16.
8. **Savić G.A.**, Jovanović K., Janković R., Radulović S., Spasić S., Radotić K., (2012) Analysis of real-time PCR kinetics based on single channel florescence and factor analysis, 5th Regional Biophysics Conference RBC2012, September 3-7, Kladovo – Belgrade, Serbia, Proceedings, 57-59.
9. Jovanović K.K., **Savić G.A.**, Janković R., Radulović S., Spasić S., Radotić K., (2012) Advanced analysis of multi channel real-time PCR kinetics, 5th Regional Biophysics Conference RBC2012, September 3-7, Kladovo – Belgrade, Serbia, Proceedings, 60-62.
10. **Savić A.**, Mitrović A., Radotić K., Dučić T., (2012) X-Ray fluorescence microscopy and ,ultivariate analysis of elements distribution in poplar stem, 10th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, September 24-28, Belgrade, Serbia, 349-351.

11. Pejin B., Matović B., Nikolić M., Hegediš A., Karaman I., Mutavdžić D., **Savić A.**, Horvatović M., Radotić K., (2012) Structure and mineral element composition of the lyophylised freshwater bryozoan *Hyallinea Punctata*, 10th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, September 24-28, Belgrade, Serbia, 403-405.
12. Djikanović Golubović D., **Savić A.**, Simonović J., Steinbach G., Jeremić M., Garab G., Radotić K., (2012) Cellulose orientation and purity assessment after two different procedures of cell wall isolation from maize stems. A combined microscopic fluorescence detected linear dichroism and image analysis study, 10th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, September 24-28, Belgrade, Serbia, 547-549.
13. Mihailović J., **Savić A.**, G. Bacic, V. Vuković, M. Daković, (2012) Texture analyzing of benign and malignant vertebral fractures based on entropy histograms and PARAFAC analysis of MR images, Program & Abstract Book, 29th Annual Scientific Meeting, European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology, October 4-6, Lisbon, Portugal.
14. Spasić S., **Savić A.**, Nikolić Lj., Budimir S., Janošević D., Mitrović A., (2012) Application of Higuchi's fractal dimension in the analysis of biological signals, 20th Telecommunications forum TELFOR 2012, Belgrade, Serbia, November 20-22, 639-641 978-1-4673-2984-2/12/\$31.00 ©2012 IEEE
15. **Savić A.G.**, Jovanović K.K., Janković R., Radotić K., Spasić S.Z., (2012) Determination of gene point mutations by application of higher order central moments – Preliminary research, 20th Telecommunications forum TELFOR 2012, November 20-22, Serbia, Belgrade, 863-866, 978-1-4673-2984-2/12/\$31.00 ©2012 IEEE

M34 Рад саопштен на скупу међународног значаја штампан у изводу (10)

1. **Savić A.**, (2011) Multivarijaciona analiza slika kao alat za prepoznavanje ćelijskih struktura bazirana na klasičnoj i fluorescentnoj mikroskopiji, 55. Konferencija za elektroniku, računarstvo, automatiku i nuklearnu tehniku ETRAN, June 6-9, Banja Vrućica, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina, 72.
2. Cvetić T., Mojović M., **Savić A.**, Vuletić M., Vučunić Ž., (2011) The effect of organic acids on free radical production by maize root plasma membranes, 19th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, June 13-15, Banja Vrućica, Serbia, Book of Abstracts 51.
3. **Savić A.**, Stanisavljević N., Jovanović Ž., Maksimović V., Radotić K., (2011) Improvement of method for viable cell counting based on matrix computations of fluorescence images, 19th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, June 13-15, Banja Vrućica, Serbia, Book of Abstracts 76.

4. **Savić A.**, Stanisavljević N., Jovanović Ž., Maksimović V., Radotić K., (2011) A method for removing dye artifacts from images of stained BY-2 tobacco cells by using low-pass filtering, 19th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, June 13-15, Banja Vrujci, Serbia, Book of Abstracts 76.
5. **Savić A.G.**, Križak S., Živić M., Vučinić Ž., (2012) Noise analysis of ion channel patch-clamp records – statistical, and wavelet based approach, 56. Konferencija za elektroniku, računarstvo, automatiku i nuklearnu tehniku ETRAN, June 11-14, Zlatibor, Serbia, 81.
6. Mihailović J., **Savić A.G.**, Križak S., Živić M., Vučinić Ž., (2012) A novel method for MRI images segmentation and coloring based on fuzzy c-means clustering algorithm, 56. Konferencija za elektroniku, računarstvo, automatiku i nuklearnu tehniku ETRAN, June 11-14, Zlatibor, Serbia, 81.
7. Pejin B., Conić P., **Savić A.**, Kien-Thai Y., Hegediš A., Karaman I., Horvatić M., Radotić K., (2012) An insight into statistics of fluorescence spectra of complex natural product mixtures, 5th Regional Biophysics Conference RBC2012, September 3-7, Kladovo – Belgrade, Serbia, Book of abstracts, 66.
8. **Savić G.A.**, Jovanović K., Janković R., Radulović S., Spasić S., Radotić K., Analysis of real-time PCR data by using factor analysis with promax rotation, 5th Regional Biophysics Conference RBC2012, September 3-7, Kladovo – Belgrade, Serbia, Book of abstracts, 82.
9. Steinbach G., **Savić G.A.**, Đikanović D., Radotić K., Garab G., Improvement of FDLI images through application of Gabor filters, 5th Regional Biophysics Conference RBC2012, September 3-7, Kladovo – Belgrade, Serbia, Book of abstracts, 102.
10. Mihailović J., **Savić A.**, Lambrev P., Vuković V., Texture image analysis followed by multivariate analysis of textural parameters, 5th Regional Biophysics Conference RBC2012, September 3-7, Kladovo – Belgrade, Serbia, Book of abstracts, 116.

8. ИЗЈАВЕ

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____

број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора _____

Број индекса _____

Студијски програм _____

Наслов рада _____

Ментор _____

Потписани/а _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.