

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
МУЛТИДИСЦИПЛИНАРНЕ ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ

Михајло Д. Радмиловић

**Интеракција ултракратких ласерских импулса са
молекулом хемоглобина и примена
савремених техника нелинеарне микроскопије
у осликавању еритроцита**

докторска дисертација

Београд, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE
MULTIDISCIPLINARY DOCTORAL STUDIES

Mihajlo D. Radmilović

**Interaction of ultrashort laser pulses with
hemoglobin molecule and application of advanced
nonlinear microscopy in imaging of erythrocytes**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ ЗА ОДБРАНУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Ментори:

др Александар Крмпот, научни саветник
Универзитета у Београду, Институт за физику

др Ивана Дрвеница, виши научни сарадник
Универзитета у Београду,
Институт за медицинска истраживања

Чланови комисије:

др Весна Илић, научни саветник
Универзитета у Београду,
Институт за медицинска истраживања

др Михаило Рабасовић, виши научни сарадник
Универзитета у Београду, Институт за физику

др Дренка Тривановић, виши научни сарадник
Универзитета у Београду,
Институт за медицинска истраживања

Датум одбране: _____

Ова докторска дисертација урађена је у сарадњи две институције, Института за физику Универзитета у Београду и Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, Института од националног значаја за Републику Србију, кроз истраживања предложених у ПРОМИС пројекту под акронимом HEMMAGINERO "Hemoglobin-based spectroscopy and nonlinear imaging of erythrocytes and their membranes as an emerging diagnostic tool," који је финансирао Фонд за науку Републике Србије у периоду од 2020. до 2022. године, а чији је руководиоца др Александар Крмпот.

Експериментални део рада ове докторске дисертације је изведен у Лабораторији за биофизику, Института за физику Универзитета у Београду, где је коришћена лабораторијска опрема делом набављена и кроз пројекат који финансира Фонд за науку Републике Србије у оквиру Зеленог програма сарадње науке и привреде за период 2022-2024 "Advanced BioPhysical Methods for Soil Targeted FUNgi-Based Biocontrol Agents", под акронимом BioPhisFUN (руководилац др Александар Крмпот), као и лабораторијама Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду. Део експерименталних резултата који се односи на спектрално осликавање хемоглобинског фотопродукта добијен је у Департменту за неуронауке, Каролинска института, Стокхолм, Шведска. Конфокална микроскопија хемоглобинског фотопродукта је снимана у Центру за ласерску микроскопију, Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Захвалница

Желим да се захвалим менторима др Александру Крмпоту, научном саветнику Института за физику, Универзитета у Београду на несебичној подршци у истраживачком раду и пруженој прилици да будем део његове групе, и др Ивани Дрвеници, вишем научном сараднику Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду на свему што ме је научила када су у питању еритроцити и хемоглобин, и њеном огромном стрпљењу и посвећености да ме усмерава на истраживачком путу израде научних радова и ове докторске дисертације.

Изузетну захвалност дугујем др Михаилу Рабасовићу на пруженој помоћи у експерименталном раду и пренесеном знању из области фотонике и што ме је као молекуларног биолога научио колико је важно разумевање принципа рада мерног инструмента у тумачењу експерименталних резултата.

Посебно желим да се захвалим др Александру Крмпоту на пруженој прилици за одлазак на стручно усавршавање на Каролинска Институт у Шведској и Хокаидо Универзитет у Јапану. Хвала на несебично пренесеном знању када су у питању флуоресцентна микроскопија и флуоресцентна корелациона спектроскопија и искуству које је за свако поштовање.

Захваљујем се др Весни Илић са Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду на несебичној помоћу у свим фазама научно радаг и стручности на коју сам се увек могао ослонити.

Захваљујем се др Дренки Тривановић на несебичној подршци у извођењу експеримената и саветима који су се увек показали као веома корисни.

Хвала младим колегама и колегиницама: др Тањи Пајић, Јовани Јелић, Марти Букумири, Миљани Пиљевић и Алекси Денчевском на колегијалности, дружењу и идејама које нашу групу чине јединственом и изузетном у сваком погледу.

Посебну захвалност дугујем својој мајци Светлани и осталим члановима своје породице без чије подршке не бих био овде.

Огромну захвалност дугујем супрузи Ани која је увек била уз мене током свих тешких тренутака и пружала ми несебичну подршку.

Боби, иако ниси имао појма шта радим када сам писао ову тезу, увек си био ту да ми својим топлим псећим очима искажеш своју безусловну љубав.

Магдалена, иако још ниси дошла на свет, твоје присуство ми је увек давало наду и мотивисало ме да наставим даље упркос свим препрекама, воли те тата!

Интеракција ултракратких ласерских импулса са молекулом хемоглобина и примена савремених техника нелинеарне микроскопије у осликавању еритроцита

Резиме

Ова докторска дисертација испитује интеракцију ултракратких ласерских импулса са молекулима хемоглобина који се налазе унутар еритроцита, као и са молекулима хемоглобина ван еритроцита, са аспекта генерисања флуоресцентног фотопродукта. Након оптимизације протокола за генерисање фотопродукта, извршена је његова фотофизичка карактеризација применом TPEF и SPEF микроскопије, UV/VIS апсорпционе спектроскопије и TPEF емисионе спектроскопије.

Добијени резултати указују на то да се приликом интеракције хемоглобина с ултракратким ласерским импулсима формира флуоресцентни фотопродукт уз фотодеградацију хемоглобина. Показано је за формирање фотопродукта потребан порфирин, али не и Fe^{2+} јон, и да оксидација тј. третирање хемоглобина H_2O_2 доводи до формирања флуоресцентних молекулских врста. Установљено је да је могуће извршити просторно локализовано формирање фотопродукта ласерском скенирајућом микроскопијом на танком филму хемоглобина.

Флуоресцентни фотопродукт је показао високу фотостабилност и искоришћен је и за селективно ласерско обележавање еритроцита у пуној крви, чиме је омогућено одређивање просторне расподеле хемоглобина. *In vitro* индуковани оксидативни стрес код еритроцита довео је до јасних промена у параметрима расејане светлости и флуоресценције у анализи проточном цитометријом, као и деформабилности у анализи ектацитометријом. Интегрисани оптички приступ иницијално је валидиран на еритроцитима пацијената са дијабетесом.

Резултати ове докторске дисертације, чија је окосница добијање флуоресцентног фотопродукта хемоглобина, доприносе унапређењу техника нелинеарне ласерске микроскопије у анализи еритроцита, уједно пружајући нове могућности за интегрисану дијагностику засновану на оптичким методама без коришћења обележивача код различитих патофизиолошких стања еритроцита.

Кључне речи: хемоглобин, еритроцити, фотопродукт, двофотонска ласерска скенирајућа микроскопија, проточна цитометрија, деформабилност, ектацитометрија

Научна област: Биофизика

Ужа научна област: Биофотоника

УДК број:

Interaction of ultrashort laser pulses with hemoglobin molecule and application of advanced nonlinear microscopy in imaging of erythrocytes

Summary

This doctoral dissertation examines the interaction of ultrafast laser pulses with hemoglobin molecules inside erythrocytes and with hemoglobin molecules outside erythrocytes from the perspective of generating fluorescent photoproducts. After optimizing the protocol for generating photoproducts, their photophysical characterization was performed using TPEF and SPEF microscopy, UV/VIS absorption spectroscopy, and TPEF emission spectroscopy.

The results indicate that when hemoglobin interacts with ultrafast laser pulses, a fluorescent photoproduct is formed alongside the photodegradation of hemoglobin. It was shown that the photoproduct formation requires porphyrin but not Fe^{2+} ion and that oxidation, or treatment of hemoglobin with H_2O_2 , leads to the formation of fluorescent molecular species. It was established that spatially localized formation of photoproducts is possible using laser scanning microscopy on a thin film of hemoglobin.

The fluorescent photoproduct demonstrated high photostability and was also used for selective laser labeling of erythrocytes in whole blood, which allowed for determining the spatial distribution of hemoglobin. *In vitro* induced oxidative stress in erythrocytes led to clear changes in light scattering and fluorescence parameters in flow cytometry analysis, as well as deformability in ektacytometry analysis. The integrated optical approach was initially validated on erythrocytes from diabetic patients.

The results of this doctoral dissertation, centered around obtaining fluorescent hemoglobin photoproducts, contribute to advancing nonlinear laser microscopy techniques in erythrocyte analysis while also providing new possibilities for integrated diagnostics based on optical methods for various pathophysiological states of erythrocytes.

Keywords: hemoglobin, erythrocytes, photoproduct, two-photon laser scanning microscopy; flow cytometry, elongation index, deformability, ektacytometry

Scientific field: Biophysics

Scientific discipline: Biophotonics

UDC number:

САДРЖАЈ

<i>1. Увод</i>	1
1.1. Еритроцити: функције и физиолошки/патофизиолошки значај	1
1.2. Структура хемоглобина и пренос кисеоника као основна функција коју еритроцити обављају захваљујући молекулу хемоглобина	3
1.3. Значај молекула хемоглобина за имунолошку улогу еритроцита	5
1.4. Метаболичке улоге еритроцита посредоване хемоглобином	7
1.5. Антиоксидативна улога хемоглобина	8
1.6. Дистрибуција и изоформе хемоглобина у еритроцитима	9
1.7. Маркери оксидативног стреса код еритроцита	9
1.7.1. Деформабилност еритроцита	11
1.8. Осликавање еритроцита и хемоглобина	12
<i>2. Циљеви и хипотезе</i>	16
<i>3. Материјал и методе</i>	18
3.1. Материјал	18
3.1.1. Сакупљање и обрада узорака крви здравих донора	18
3.1.2. Узорковање крви дијабетичара и контролне групе	18
3.1.3. Изоловање пакованих еритроцита	19
3.1.4. <i>In vitro</i> оксидација пакованих еритроцита здравих донора	19
3.1.5. Добијање еритроцитних мембрана осмотском лизом	19
3.1.6. Изоловање хемоглобина	20
3.2. Експериментални дизајн	21
3.2.1. Изолација и припрема хемоглобина за фотофизичка испитивања	21
3.2.3. Одређивање механичких особина еритроцита	23
3.3. Методе	24
3.3.1 Одређивање концентрације хемоглобина цијанометхемоглобинаском методом	24
3.3.2 Припрема танких филмова хемоглобина за ТРЕФ микроскопско осликавање	24
3.3.3. Припрема танких филмова протопрфирина IX за ТРЕФ микроскопију	24
3.3.4. ТРЕФ микроскопију еритроцита и ласерско гравирање хемоглобина	25
3.3.5. Једнофотонско осликавање фотопродукта хемоглобина	26

3.3.6. Мерење апсорпционих спектра фотопродукта хемоглобина.....	26
3.3.7. Спектрално осликавање (<i>енгл.</i> Spectral imaging) фотопродукта хемоглобина.....	28
3.3.8. Одређивање деформабилности еритроцита.....	28
3.3.9. Проточна цитометрија еритроцита без примене обележивача.....	29
3.3.10. Фазно-контрасна микроскопија еритроцита.....	30
3.3.11. Одређивање концентрације TBARS (<i>енгл.</i> Thiobarbituric Acid Reactive Substances) у оксидованим еритроцитима	30
3.3.12. Тест осмотске фрагилности.....	31
3.3.13. Статистичка анализа резултата.....	32
4. Резултати.....	33
4.1. Осликавање еритроцита и мерење емисионих спектра применом TPEF микроскопије	33
4.2. Формирање фотопродукта услед интеракције ултракратких ласерских импулса са танким филмовима хемоглобина.....	34
4.3. UV/VIS апсорпциона спектроскопија TPEF озраченог и неозраченог хемоглобина	36
4.4. Емисиони спектри фотопродукта при једнофотонској екситацији (SPEF) добијени помоћу спектралног осликавања-конфокалном микроскопијом.....	38
4.5. TPEF спектроскопија протопорфирина IX (<i>енгл.</i> Protoporphyrin IX, PPIX)	39
4.6. TPEF спектроскопија хемоглобина третираног водоник-пероксидом (H ₂ O ₂)	39
4.7. Просторно праћење фото-обележених еритроцита у пуној крви	41
4.8. Уцртавање образаца микронских димензија у танке филмове хемоглобина.....	41
4.9. Деформабилност мембране еритроцита – <i>in vitro</i> симулација оксидативног стреса.	42
4.10. Проточна цитометрија – анализа FSC и SSC дистрибуције оксидованих еритроцита	
4.11. Аутофлуоресцентна својства оксидованих еритроцита	47
4.12. Двофотонска микроскопија оксидованих еритроцита.....	49
4.13. Деформабилност еритроцита особа оболелих од DM	50
5. Дискусија.....	58
6. Закључци	70
7. Литература.....	72
8. Прилози.....	90

1. Увод

1.1. Еритроцити: функције и физиолошки/патофизиолошки значај

Црвена крвна зрнаца (еритроцити) су најбројније ћелије крви свих кичмењака. Број еритроцита се креће око 5 милиона ћелија по mm^3 крви. Просечан животни век еритроцита је око 120 дана код људи (Adewoyin и сар., 2019). Нормални хумани еритроцити су ћелије биконкавног облика, пречника 5-8 μm . Специфичан облик биконкавног диска резултат је активности и организације комплексне цитоскелетне протеинске мреже и еластичности њихове ћелијске мембране (Barger и сар., 2022). Јединствено својство еластичности, односно деформабилности, омогућава еритроцитима да реверзибилно мењају своју морфологију и неометано се крећу кроз танку мрежу крвних судова, чак и када је пречник капилара мањи од пречника еритроцита, преносећи кисеоник у све делове тела (Chien и сар., 1987).

Захваљујући главном унутарћелијском протеину-хемоглобину, који чини више од 95% суве масе еритроцита, еритроцити остварују своју основну биолошку функцију транспорта кисеоника од плућа до периферних ткива (Klinken 2002, Kuhn и сар., 2017). Додатно, преко везивања за структуру хема у хемоглобину, еритроцити транспортују и друге гасове, NO и угљен-моноксид CO. Еритроцити преносе и CO₂, али кроз реакцију CO₂ са аминским групама глобинских ланаца хемоглобина и формирање карбаминохемоглобина (Jensen 2004). Складиштење NO у еритроцитима и његово конвертовање у друге молекулске форме регулисано је хемоглобином. На овај начин еритроцити учествују у заштити ткива и хомеостазу крвних судова (Su и сар., 2020). NO се може везати за окси-хемоглобин где долази до оксидације хемоглобина у метхемоглобин, а такође NO може интераговати са деокси-хемоглобином у хипооксичним условима и формирати нитрозил-хемоглобин (Su и сар., 2020). Приликом ових интеракција NO се веже за Fe²⁺ јон у оквиру хемоглобина. NO се такође може ковалентно везивати за цистеин на позицији 93 у β ланцу градећи притом S-нитрозотиол-хемоглобин (*енгл.* S-nitrosohemoglobin – SNO-Hb) (Allen и Piantadosi 2006). Биолошки значај метхемоглобина и нитрозил хемоглобина, као доминантне форме хемоглобина у условима повишеног парцијалног притиска NO огледа се у томе да хемоглобин унутар еритроцита служи као секвенстратор NO (Helms и сар., 2013) док је за метхемоглобин показано да има већи афинитет да веже сулфиде него оксихемоглобин (Bianco и сар., 2018).

Због недостатка једра и органела, дуго се сматрало да еритроцити имају само значај за респирацију. Међутим, еритроцити имају и важне метаболичке и имунолошке улоге, које се у највећој мери остварују захваљујући молекулу хемоглобину (Rep и сар., 2023). На пример, преко специфичних рецептора на својој површини, еритроцити везују различите антигене и стимулишу фагоцитозу (Burger и сар., 2012). Еритроцити интерагују са ефекторским ћелијама имунског система макрофагима, преко CD47 рецептора и SIRP α рецептора који се експримира на површини макрофага (Burger и сар., 2012). Ова реакција може бити стимулаторна и инхибиторна у односу на старост еритроцита и њихову вијабилност (Burger и сар., 2012). На овај начин еритроцити директно интерагују са макрофагима где се врши селекција њиховог квалитета. Новија истраживања показују да

хемоглобин и његови деривати, као тзв. молекули алармини, имају велики значај у модулацији функционисања урођеног имунског система (Anderson и сар., 2018). Све наведено потврђује да еритроцити имају и улогу у одржавању хомеостазе читавог организма.

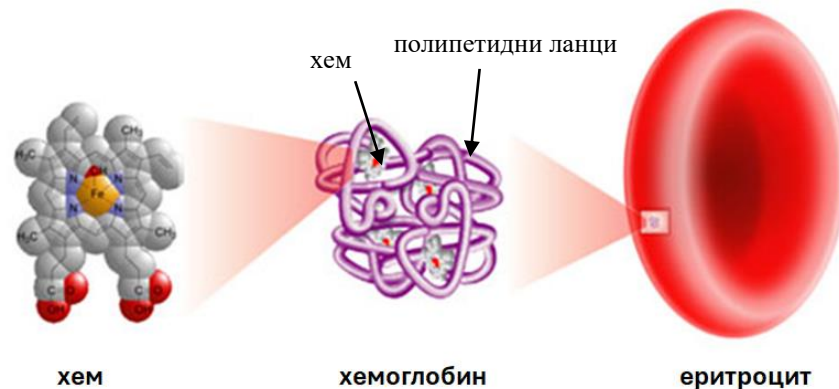
У смислу очувања функционалности еритроцита током животног века, намећу се три главна биолошка „изазова“ : а) еритроцити садрже бројне изворе оксиданата (укључујући високе нивое молекулског кисеоника везаног за хемоглобин); б) еритроцити имају високе нивое гвожђа у оквиру хемоглобина, које у слободном растворљивом облику представља јак катализатор производње реактивних – кисеоничних форми (*енгл.* Reactive oxygen species-ROS) путем Фентонове реакције (Rifkind и сар., 2013) и ц), еритроцити имају ограничену способност за обнављање оштећених протеина због губитка генетичке информације приликом процеса сазревања.

Услед дејства различитих фактора, долази до индукованих промена облика еритроцита (морфолошке карактеристике) и до измене просторне дистрибуције хемоглобина у њима, што може значајно утицати на функционалност ових ћелија (Vukara и сар., 2017), као што су везивање и допремање гасова од плућа до периферних ткива. Показано је да еритроцити имају ехиноцитну морфологију код пацијената оболелих од хроничног хепатитиса (Turchetti и сар., 1997). Уочено је да до промене морфологије еритроцита долази и код метаболичког синдрома, али и болести као што су дислипидемија, гојазност и хипертензија (Guawali и сар., 2012). Недавно је, поред традиционалног биохемијског испитивања гликозилованог хемоглобина код пацијената са Дијабетес мелитусом типа 1 (DMT1), као идеалан биомаркер за праћење прогресије болести идентификовано биофизичко стање мембране еритроцита пацијената (Maulucci и сар., 2017). Узимајући у обзир претходно наведено, уз чињеницу да је животни век хуманих еритроцита од 100 до 120 дана, ове ћелије представљају значајне биомаркере који обезбеђују податке о утицају различитих ендогених и егзогених фактора на развој великог броја болести (малигне болести и бројне инфламаторне и аутоимунске болести (De Franceschi и сар., 2011a, Sakaguchi и сар., 2016, Tsakanova и сар., 2017, Lam и сар., 2021, Wu и сар., 2010). Показано је да еритроцити имају ехиноцитну морфологију код пацијената оболелих од хроничног хепатитиса (Turchetti и сар., 1997). Уочено је да до промене морфологије еритроцита долази и код метаболичког синдрома, али и болести као што су: дислипидемија, гојазност и хипертензија (Guawali и сар., 2012). Недавно је, поред традиционалног биохемијског испитивања гликозилованог хемоглобина код пацијената са DMT1, као идеалан биомаркер за праћење прогресије болести идентификовано биофизичко стање мембране еритроцита пацијената (Maulucci и сар., 2017).

Због бројних функција еритроцита и хемоглобина као њиховог главног унутарћелијског протеина неопходно је развити нове методолошке приступе без примене обележивача у циљу откривања, праћења и квантификације функционалних и морфолошких промена еритроцита у физиолошком/патолошком окружењу, који би се за разлику од већ постојећих метода, које се заснивају на биохемијским својствима еритроцита и хемоглобина (као кључног молекула за остваривање физиолошке улоге еритроцита), заснивали на новооткривеним специфичним оптичким својствима хемоглобина која су актуелни предмет истраживања више од једне деценије (Zheng и сар., 2010, Sun и сар., 2015).

1.2. Структура хемоглобина и пренос кисеоника као основна функција коју еритроцити обављају захваљујући молекулу хемоглобина

Хемоглобин је главни унутарћелијски протеин еритроцита који чини више од 95% њихове суве масе. Хумани хемоглобин има структуру тетрамера и састоји се од четири субјединице, а сваку субјединицу чини хем и полипептидни ланац. Хем представља функционалну групу хемоглобина у чију структуру улази координатно везани јон гвожђа (Слика 1). Један молекул хемоглобина садржи 4 хем функционлне групе. У физиолошким условима, постоји 6 врста полипептидних ланаца. Током раног ембрионалног развића доминирају 2 врсте полипептидних ланаца(ϵ , ζ), а 4 током феталног живота и након рођења (α , β , γ , δ). Код одраслих особа у еритроцитима су присутни хемоглобини (Hb): HbA (2α и 2β), HbA2 (2α и 2δ) и HbF (2α и 2γ), а такође је постоји и неколико мање заступљених варијанти хемоглобина А (HbA1a1, HbA1a2, HbA1b и HbA1c) (Hill и сар., 1962, Nagatomo и сар., 2015).



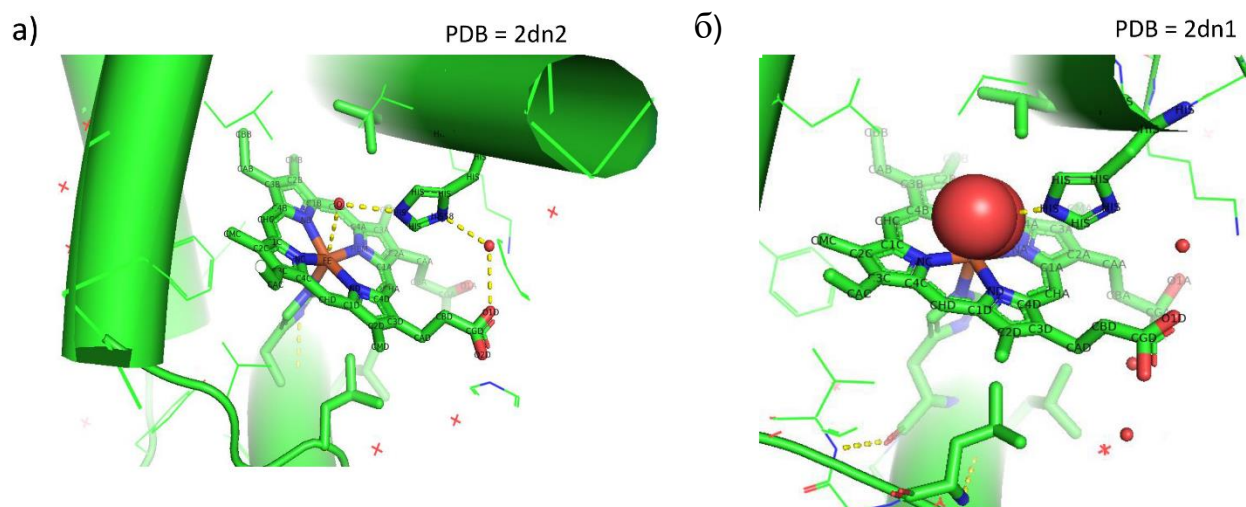
Слика 1. Схематски приказ структуре хемоглобина и хема.

Биолошки ефекат везивања кисеоника за хемоглобин испољава се кроз структурне промене кроз које молекул хемоглобина реверзибилно пролази током ове интеракције. У основи овог процеса налази се феномен кооперативности, који представља везу између кинетичке реакције везивања кисеоника за хемоглобин и његове терцијерне и кватернарне структуре (Eaton и сар., 1999, Nagatomo и сар., 2015). Везивање кисеоника се одвија кооперативно што значи да афинитет хемоглобина за кисеоник расте након везивања сваког молекула кисеоника (Perutz 1970, Nagatomo и сар., 2015). Везивање кисеоника доводи до конформационих промена терцијарне и кватернарне структуре хемоглобина, односно реверзибилних прелазака из Т конформације (која има низак афинитет за кисеоник, *енгл.* Tense-T) у R конформационо стање (које има висок афинитет за кисеоник *енгл.* Relax-R). На нивоу структуре, α и β субјединице глобинских ланаца, уочавају се структуре F – хеликса (на слици 2.а и 2.б приказане као зелене цилиндричне структуре), које су ковалентно везане за аминокиселину хистидин на позицији 58 (Nagatomo и сар., 2015). Одвајање F–хеликса од хема у β субјединице повећава афинитет хемоглобина за везивање кисеоника у α а субјединици (Nagatomo и сар., 2015). Приликом везивања кисеоника за јон гвожђа (Fe^{2+}) у оквиру структуре хема, долази до промене конформације хемоглобина и до раскидања одређених водоничних веза као што је веза кисеоника на позицији 1 порфириноског прстена и хистидина на позицији 58 F хеликса (Слика 2.б). Важно је поменути да се проблему везивања кисеоника за хемоглобин може приступити на два основна начина, први приступ подразумева кинетичку основу везивања кисеоника, док други обухвата и разумевање структурних промена које прате ове

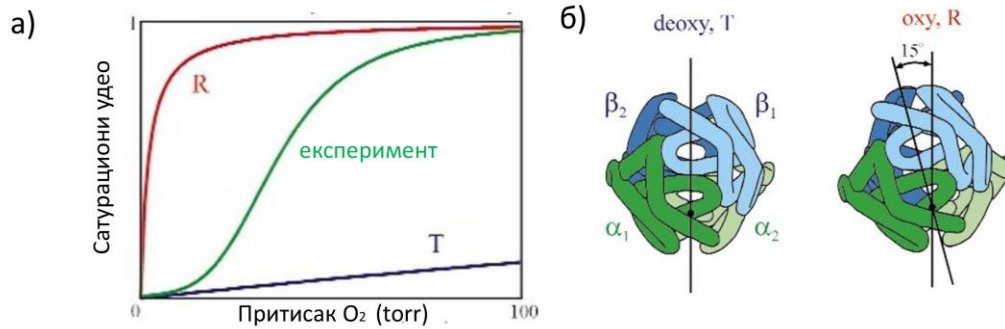
кинетичке процесе. Модел који објашњава алостеричке промене мултисубјединичних протеина је Monod–Wyman–Changeux (MWC) модел. Овај модел се заснива на хемијској равнотежи између различитих аранжмана субјединица протеина. Прелазак из једне конформационе форме у другу је стохастички и не зависи од већ везаних молекула кисеоника (Eaton и сар., 1999). Ово имплицира да се молекул хемоглобина налази у хемијској равнотежи између различитих могућих конформационих стања у којима се мења афинитет везивања кисеоника. Важно је истаћи да обе конформационе форме хемоглобина могу да вежу кисеоник, наравно са различитим афинитетом (Слика 3а). MWC модел не објашњава у потпуности феномен кооперативности на примеру хемоглобина, с обзиром да не узима у обзир структурне промене које се дешавају на нивоу α и β субјединица, а које су праћене раскидањем и стварањем хемијских веза приликом везивања кисеоника за хемоглобин (Eaton и сар., 1999).

Прелазак из једне у другу конформациону форму хемоглобина подразумева раскидање и формирање соних мостова између субјединица хемоглобина (Perutz 1970, Perutz и сар., 1998, Eaton и сар., 1999). Показано је да су субјединице међусобно повезане преко соних мостова, међутим сони мостови су присутни само у Т кватерерној структури (Perutz и сар., 1998), док приликом преласка у R кватернарну структуру долази до њиховог раскидања и промене кватерерне структуре хемоглобина (Слика 3б). Ово раскидање омогућава ефикасније везивање кисеоника за (Fe^{2+}) јон и измештање F хеликса у односу на хем (Perutz и сар., 1998, Eaton и сар., 1999).

Афинитет за везивање кисеоника за хемско гвожђе у фери облику (Fe^{2+}) у оквиру хемоглобина регулише се парцијалним притиском кисеоника ($p\text{O}_2$), кисело-базном равнотежом (pH) и нивоом 2,3-дифосфоглицерата. С друге стране, транспорт CO_2 зависи од активности карбонилне анхидразе и директно је укључен у контролу pH и пуферског капацитета еритроцита (Jensen 2004, Nilpert и сар., 1963). Додатна оксидација гвожђа (Fe^{2+}) у фери форму (Fe^{3+}) доводи до формирања метхемоглобина, што за резултат има драстично смањење афинитета метхемоглобина према кисеонику (Mansouri и сар., 1993, Darling и Roughton 1942). Да би се задржала биолошка функционалност, фери јон гвожђа (Fe^{2+}) у саставу молекула хемоглобина мора се одржавати у редукованом стању.



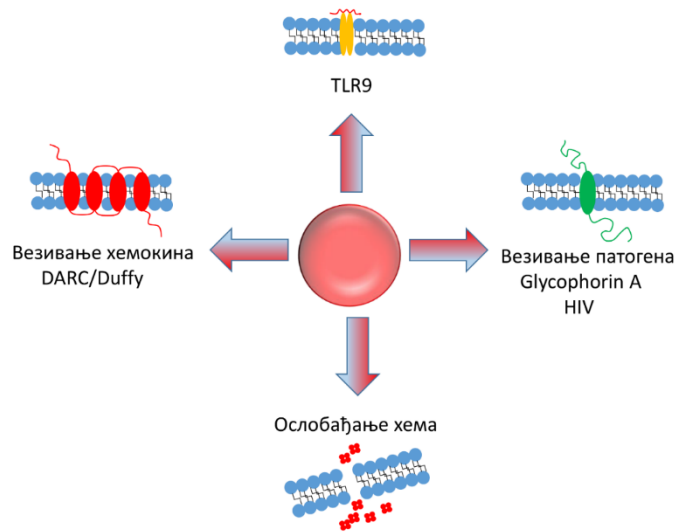
Слика 2. Просторни приказ хема–функционалне групе хемоглобина а) деокси-хемоглобин, б) окси-хемоглобин. Водоничне везе су представљене жутом испрекиданом линијом. Зелене цилиндричне структуре- α и β субјединице глобинских ланаца. За израду слике коришћен је PyMOL софтвер.



Слика 3. а) Кинетичке криве везивања кисеоника за хемоглобин, зелена (сигмоидна) добијена је експериментално и осликава кооперативност у везивању кисеоника за хемоглобин, црвена и зелена крива представљају везивање кисеоника у R или T стању, б) конформациона промена кватернарне структуре хемоглобина услед преласка у R форму. Модификовано из Eaton и сар., 1999.

1.3. Значај молекула хемоглобина за имунолошку улогу еритроцита

Иако је мање познато, еритроцити имају и бројне значајне улоге које омогућавају оптимално функционисање имунског система. (Anderson и сар., 2018) (Слика 4). Ова чињеница није изненађујућа с обзиром да су еритроцити најбројније ћелије крви. Код водоземаца, птица и риба, еритроцити имају једро и активно учествују у имунолошком одговору продукцијом фактора сличних цитокинима, а који директно регулишу експресију гена важних за имунски одговор (Passantino и сар., 2004, Workenhe и сар., 2008, Jeong и сар., 2016).



Слика 4. Схематски приказ имуномодулаторне улоге еритроцита (липидни двослој приказан је плавом бојом). Лево-DARC/Duffy хемокински рецептор схематски је представљен као мембрански протеин са 4 интермембранска домена (означена црвеном бојом). Горе – TLR9 рецептор нуклеинских киселина (означене црвеном испрекиданом линијом) приказан је као дво-доменски интермембрански протеин (означен жутом бојом), десно – Glycophorin A приказан као моно – доменски трансмембрански протеин (означен зеленом бојом), доле – ослобађање хема (означен са 4 црвена круга) приказано је као његов пролазак кроз руптуру ћелијске мембране. Модификовано из Anderson и сар., (2018).

И код хуманих еритроцита који не поседују једру, једна од важних имунолошких функција се остварује преко везивања имунолошки активних молекула-хемокина. Показано је да еритроцити делују као "пуфер" за везивање хемокина CXCL8 преко Duffy антигенског рецептора (Duffy antigen receptor; DARC) (Darbonne и сар., 1991) и на овај начин спречавају кооперативну регрутацију неутрофила и инфламаторну реакцију односно оштећење ткива (Anderson и сар., 2018, Darbonne и сар., 1991). Осим поменутог интерлеукина, еритроцити везују и хемокине, као што су SHS (α chemokines) и SS (β chemokines) (Darbonne и сар., 1991, Lee и сар., 2006). Важни модулатори хуморалног имунског одговора у коме учествују еритроцити, приказани су у **Табели 1**. Иако еритроцити не поседују наследни материјал, показано је да се у њима налазе различити микро – РНК молекули (*енгл.* miRNA) (Mantel и сар., 2015). Функција неких miRNA није у потпуности разјашњена, али показано је да еритроцити имају и информационе РНК које кодирају Ago– протеине (*енгл.* Argonaute proteins), чија се биолошка улога огледа у феномену смањења експресије РНК интерференцијом (Mantel и сар., 2016). Приликом инфекције еритроцита са *Plasmodium falciparum*, који изазива маларију, долази до формирања егзоцитотских везикула од стране еритроцита (Mantel и сар., 2016). Показано је да се у овим везикулама између осталог налазе комплекси miRNA и аргонаут протеина (Mantel и сар., 2016).

Табела 1. Имунолошке функције протеина еритроцита (модификовано из Anderson и сар., 2018).

Протеини еритроцита	Имунолошка улога	Биолошка функција
DARC	Везује хемокине и патогене	Секвестрација хемокина и патогена
TLR9	Везује нуклеинске киселине	Секвестрација нуклеинских киселина
GYPA	Везује патогене	Деструкција патогена (маларија)
хем/хемоглобин	Генерише ROS	Превенција раста бактерија и гљива

Велики допринос имунолошкој улози еритроцита поред поменутог механизма везивања хемокина, даје и молекул хемоглобина односно његова простетична група хем. Слободан хем се може сматрати молекулским обрасцем оштећења (*енгл.* Damage-associated molecular pattern molecules-DAMP), доводећи на тај начин до инфламације и потенцијалног оштећења ткива (Larsen и сар., 2010, Neal и сар., 2013). Важан регулатор концентрације слободног хема у ткивима је хем оксигеназа 1 (HO-1). Овај ензим се базално експримира у слезини, јетри и бубрезима (Otterbein и сар., 2000), док је на ћелијском нивоу складиштен у ендоплазматичном ретикулуму одакле се егзоцитозом избацује у међућелијски простор (Hooper и сар., 2019). У хемијској реакцији хема и HO-1 долази до продукције угљен монооксида (CO) (Слика 5а). Иако CO може бити извор продукције ROS, у комбинацији са HO-1 има антиинфламаторно

деловање, регулишући ниво интерферона 1, TNF- α и интерлеукина 8 (IL-8) (Cherry и сар., 2015, Wu сар., 2024). Протеин хемопексин који се налази у крвној плазми такође је значајан за везивање слободног хема у циркулацији. Показано је да пацијенти који имају смањену концентрацију овог протеина у плазми имају повећану вероватноћу од смртог исхода (Larsen и сар., 2012). Као што је већ поменуто, СО који се примарно продукује приликом разградње хема од стране ензима НО-1 и хем оксигеназе 2 (НО-2), активира солубилну гуанил циклазу (Bogdanova и сар., 2013, Ramos и сар., 1989), која генерише циклични–гуанозин-монофосфат (енгл. Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-cGMP), секундарни гласник бројних унутарћелијских метаболичких процеса (Maines 2000). Експресија НО-1 ензима може бити индукована и инфламацијом, хипоксијом, оксидативним стресом као и хипотермијом (Beckman et al., 2009, Immenschuh et al., 2010, Kacimi et al., 2011). Експресија НО-1 је регулисана негативном повратном спрегом помоћу СО и саме НО-1. Осим тога, NO такође активира експресију НО-1. Афинитет везивања СО за хемоглобин је веома висок, чак 210-250 пута већи него за кисеоник (Haldane, 1895, Nasmith и Graham, 1906, Amano и Samara 2013). Иако хемоглобин служи као секвестратор за СО, његово везивање за хемоглобин онемогућава везивање кисеоника. Физиолошки проценат карбокси-хемоглобина (СО–хемоглобин) износи око 0,1–10% (Rudra и сар., 2010). Највећи проценат продукције СО је у мозгу човека, као последица активности НО-2, где СО има улогу активатора вазодилаторских K^+ канала у артериолама и артеријама мозга (Leffler и сар., 2011). Услед хемолитизе која може бити индукована различитим патологијама крвних судова мозга, долази до везивања хема за ове K^+ канале услед чега они нису доступни за везивање за СО. На овај начин, хемоглобин може индиректно утицати на вазодилатацију крвних судова мозга, што је од великог значаја за исхемију (Sata и сар., 2001). Као што је већ описано, еритроцити имају бројне имунолошке улоге које су директно или индиректно повезане са хемоглобином, а чија ће фотофизичка својства, као потенцијални дијагностички параметар бити проучавана у склопу ове дисертације.

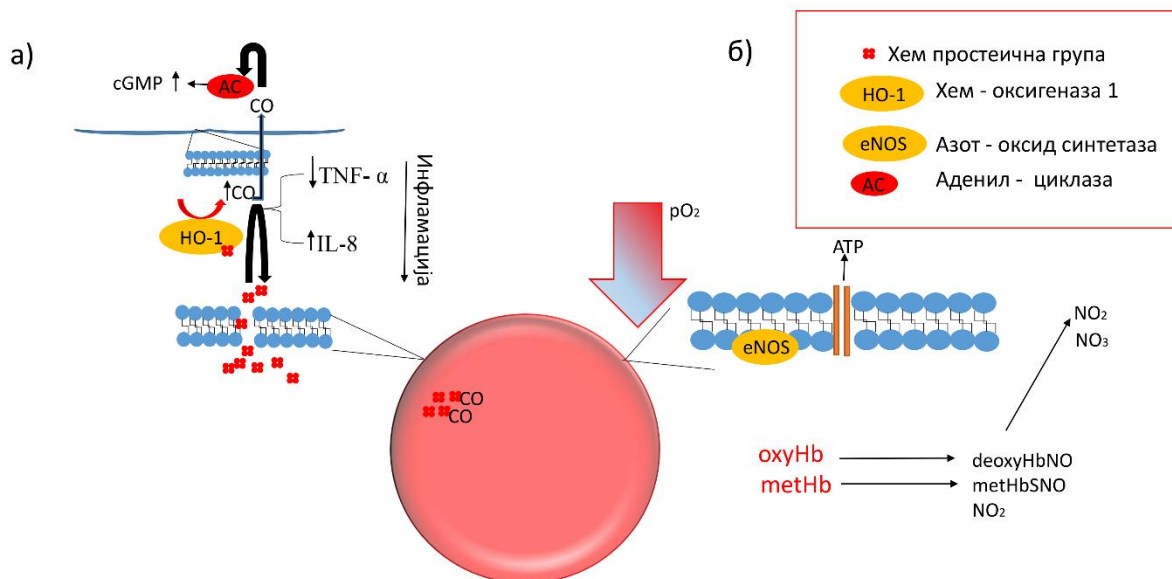
1.4. Метаболичке улоге еритроцита посредоване хемоглобином

Хемоглобин унутар еритроцита може везивати различите секундарне ефекторе, као што су хлоридни јони, протони као и органски фосфати (Giardina и сар., 1995). Ови ефектори су важни у одржавању хомеостазе организма. Афинитет везивања секундарних ефектора је обрнут када је у питању везивање кисеоника, где Т конформација хемоглобина која има низак афинитет за кисеоник, има висок афинитет за везивање секундарних ефектора и обрнуто (Perutz и сар., 1970, Giardina и сар., 1995). Из ове чињенице произилази да у еритроцитима мора постојати баланс између постојања конформационих форми хемоглобина (секција 1.2.).

Форме хемоглобина као што је метхемоглобин такође могу имати значајне физиолошке улоге (Слика 5б). Метхемоглобин има већи афинитет да веже сулфиде него оксихемоглобин (Bianco и сар., 2018). Везивање сулфида за метхемоглобин доводи до тога да метхемоглобин прелази у интермедијер који има везану сулфидну групу (SH), затим се овај интермедијер распада на неорганске полисулфиде и оксихемоглобин (Bianco и сар., 2018).

Регулација нивоа NO такође је контролисана хемоглобином. Физиолошки значај NO је пре свега у регулацији тонуса крвних судова и протоку крви (Vallance и сар., 1989). Поред тога што представља централни сигнални молекул кардиоваскуларног система (Moncada 1997), NO има значајну улогу у инфламацији (Nathan 1995, Nathan 1997), а такође и као неуротрансмитер (Bredt и сар., 1994). Окси-хемоглобин везује слободни NO, где долази до оксидације јона гвожђа (Слика 5б) (Cortese-Krott и сар., 2014). Показано је такође да еритроцити не служе само

као депои за складиштење NO, већ да се у њима одвија метаболизам и катаболизам NO, где хемоглобин има централну улогу (Helms и сар., 2013). Хемоглобин је веома значајан за хипооксичну ауторегулацију тока крви. У случају смањене концентрације кисеоника, у еритроцитима почиње да доминира доминантна форма деокси-хемоглобина која има већи афинитет да отпусти NO са позиције цистеина на позицији 93 у β ланцима (Premont и сар., 2020). На овај начин се постиже да у хипооксичним крвним судовима долази до отпуштања NO са хемоглобина, приликом чега он испољава своју вазодилаторску функцију. Како је NO молекула који регулише тонус крвних судова и проток крви (Vallance и сар., 1989), механичке особине мембране еритроцита биће изучаване у склопу ове дисертације, као додатни, али веома важан фактор регулације протока крви кроз капиларе.



Слика 5. Схематски приказ метаболичких функција хемоглобина и његових деривата. а) Приказан је утицај ослобађања хем простеичне групе на околне ћелије. Овај механизам подразумева активацију ензима хем–оксигеназа 1 (HO-1), који се налази у интрацелуларном простору. Као последица активности HO-1 ослобађа се угљен моноксид (CO), повећава се концентрација интерлеукина 8 (IL-8) и смањује се концентрација фактора некрозе тумора (енгл. Tumor necrosis factor α ; TNF α). Дифундовање CO у околне ћелије доводи до активације интерцелуларне аденил циклазе (енгл. Adenylate cyclase-AC), чија се биолошка активност испољава путем синтезе цикличног – гуанозин – монофосфата (енгл. Cyclic guanosine monophosphate – cGMP), б) приказана је улога хемоглобина у условима смањења парцијалног притиска кисеоника и метаболичке функције метхемоглобина (metHb). Деоксихемоглобин (доминантна форма у условима смањеног парцијалног притиска кисеоника) има већи афинитет да отпусти NO вазодилатор у околна ткива, где он испољава своје биолошко дејство у ширењу крвних судова. Метхемоглобин са друге стране има повећан афинитет да веже сулфиде, чиме се испољава његова улога у њиховом метаболизму.

1.5. Антиоксидативна улога хемоглобина

Код кичмењака хемоглобин има бројне значајне антиоксидативне улоге (Moleirinho и сар., 2013). Код људи на 93. позицији β ланца налази се аминокиселина цистеин која модулише аутооксидативну активност хемоглобина (Balagopalakrishna и сар., 1998). Везивање ROS и водоник пероксида за цистеин на 93. позицији β ланца инхибира реактивност ових молекула

унутар еритроцита (Bonaventura и сар., 1999, Vitturi и сар., 2013). На овај начин слободни електрони пореклом од ROS могу се са хемоглобина преносити на остале системе антиоксидативне заштите у еритроцитима (Harvey и сар., 1997). Међутим, приликом аутооксидације хемоглобина може доћи до формирања ROS, које даље могу преводити хемоглобин у метхемоглобин или ферилхемоглобин са оксидационим стањем гвожђа +4 (Meng и сар., 2017).

1.6. Дистрибуција и изоформе хемоглобина у еритроцитима

Просторна дистрибуција хемоглобина у еритроцитима може имати утицај на физиолошке процесе описане у претходним поглављима (1.3, 1.4, 1.5). Код здравих донора, 0,5 – 12% хемоглобина се налази везано за унутрашњу страну ћелијске мембране, док је остатак дистрибуиран у цитосолу (Kosmachevskaia и сар., 2019). Концентрација мембрански везаног хемоглобина повећава се у случају различитих патологија, оксидативног стреса или промене концентрације хемоглобина (Welbourn и сар., 2017, Morabito и сар., 2017, Signorini и сар., 1995). Интеракција хемоглобина са ћелијском мембраном по својој природи може бити 1) електростатичка, где је показано да на овај начин деоксихемоглобин интерагује са протеином Band 3, интегралним мембранским анијонским размењивачем (Rauenbuehler и сар., 1982, Datta и сар., 2008), 2) ковалентна, везивањем преко дисулфидних мостова и 3) хидрофобна интеракција са липидима мембране (Rauenbuehler и сар., 1982, Segal и сар., 2015, Datta и сар., 2008, Shaklai и сар., 1978a).

Код здравих индивидуа у еритроцитима постоје три основне изоформе хемоглобина (Giambona и сар., 2009), HbA0, HbA2 и HbF. Више од 96% запремине еритроцита, заузима HbA0 изотип, 2-5% чини HbA2 изоформа док је у феталним еритроцитима присутна фетална форма хемоглобина (HbF) (Steinberg и сар., 2015). Показано је да HbA2 изоформа има значајну улогу у метаболизму калцијума у еритроцитима, где ова изоформа активно циркулише између цитосола и мембране (Livshits и сар., 2023). Морфологија еритроцита утиче на дистрибуцију хемоглобина унутар њих (Bukara и сар., 2017).

Испитивање постојања корелације између дистрибуције хемоглобина и оксидативног статуса еритроцита као и њихових механичких карактеристика биће један од предмета ове докторске дисертације.

1.7. Маркери оксидативног стреса код еритроцита

Еритроцити су током свог животног века константно изложени кисеонику, што повећава вероватноћу појаве оксидативних оштећења (Maurya и сар., 2015). Ефекат оксидативног стреса се додано повећава са старањем еритроцита, односно он постаје повећан у каснијим фазама њиховог животног века, што може утицати на биохемијске и биофизичке карактеристике еритроцита: величину, деформабилност, ензимску активност, структуру мембране као и капацитет размене јона (Maurya и сар., 2015, Mazzetti и сар., 2015).

Зрели еритроцити немају ћелијске органеле које би супримирале дејство оксидативног стреса унутар њих или служиле за репарацију оштећења узрокованих оксидативним стресом (Celedón и сар., 1998). Са друге стране, еритроцити су „обезбеђени“ антиоксидативним одбрамбеним системом у облику ензимских и неензимских антиоксиданаса (Kurata и сар., 1993). Ензимски антиоксиданси укључују: супероксид дисмутазу (*енгл.* Superoxide dismutase -

SOD), која сублимира ефекат супероксид реактивног радикала (O_2^-), каталазу (CAT), која учествује у конверзији H_2O_2 у H_2O , и друге ензимске антиоксидансе као што су глутатион редуктаза (GR), глутатион пероксидаза (GPx) и глутатион-S-трансферазе (GSTs) (Johnson и сар., 2005, Nagababu и сар., 2003). Глутатион (GSH) представља неензимски антиоксиданс еритроцита (Rizvi и сар., 2007). Уочена је негативна корелација опадања нивоа GSH у еритроцитима са старашћу, а ово смањење такође корелише са укупним антиоксидантним потенцијалом крвне плазме (Rizvi и сар., 2006). Сnižени глутатион садржи аминокиселину цистеин преко које GSH помаже у одржавању SH група мембране еритроцита у редукованом стању, укључујући и многе друге биолошке функције (Maurya и сар., 2015). Оксидативни стрес доводи до оксидације оксидовањем SH група, што доводи до поремећаја многих функција ћелија.

Еритроцити су константно изложени потенцијално штетним нивоима ROS/RNS (*енгл.* Reactive Nitrite Forms-RNS), али њихови метаболички процеси могу да „савладају“ оксидативна оштећења у физиолошким условима. Познато је да различити физиолошки и патолошки фактори могу повећати нивое ROS/RNS који индукују оксидативни стрес, док хемоглобин може стимулисати пероксидацију липида (Arashiki и сар., 2013).

Један од молекула показатеља оксидативног стреса код еритроцита је малонилдиалдехид (MDA), производ пероксидације липида. Он може интераговати са аминокиселинама, мембранским протеинима, фосфолипидима, што доводи до структурних и функционалних промена ћелија (Maurya и сар., 2015). Мембрана еритроцита састоји се од 60% фосфолипида (који су богати незасићеним масним киселинама). Холестерол (главни конституент ригидних мембранских региона) чини око 30% липида еритроцита, а осталих 10% чине гликолипиди (Maurya и сар., 2015). Због присуства незасићених масних киселина, мембрана еритроцита је осетљивија на слободне радикале и „лакше“ долази до њене оксидације, што за последицу има деградацију двоструких веза у овим масним киселинама и продукцију MDA. Повећање нивоа MDA примећено је код пацијената оболелих од већег броја болести: Дијабетес Мелитусу (DM), хипертензији, коронарној болести и болести јетре (Maurya и сар., 2015). Протеини на спољашњој мембрани еритроцита лака су мета за слободне радикале који резултују у стварању MDA. Повећани ниво MDA резултује инверзном поларизацијом мембране еритроцита (Maurya и сар., 2015). Додатно повећање пероксидације липида је повезано са повећаном вероватноћом денатурације протеина. Показано је постојање директне везе између старења и нивоа MDA код еритроцита (Maurya и сар., 2015).

Мембрана хуманих еритроцита је богата -SH тиолним функционалним групама (Reglinski и сар., 1988). -SH групе играју главну улогу у одржавању оксидационо-редукционог статуса ћелије (Reglinski и сар. 1988). Оксидативни стрес изазван ROS и RNS у еритроцитима утиче на мембрану ћелије и њене механичке карактеристике. Свако оксидативно оштећење мембранских -SH група еритроцита изазива измене у микро-еластичности у патолошком и физиолошком стању оксидативног стреса (Wang и сар., 1999). Измене у балансу оксидације/редукције током нормалног старења могу модификовати активност неколико ензима и протеина унутар еритроцита (Rizvi и сар., 2007). Већина протеинских молекула садржи аминокиселине остатке који садрже сумпор, метионин и цистеин који су подложни променама у оксидационо-редукционом статусу. Ензими и протеини који садрже -SH групе су такође лака мета за ROS/RNS.

Као што је већ претходно наведено, механизми оксидативне заштите веома су важни за еритроците с обзиром да они представљају ћелије које су током свог животног века констатно изложене високом концентрацијом кисеоника. Проучавање оксидативног стреса представља

важан аспект ове дисертације. Оксидативни стрес биће изучаван са оптичког аспекта где ће бити представљене флуоресцентне и механичке особине оксидованих еритроцита.

1.7.1. Деформабилност еритроцита

Као што је претходно поменуто, еритроцити су током свог животног века изложени различитим нивоима оксидативног стреса, који зависи од бројних фактора као што су: старост, изложеност различитим агенсима, присуство болести итд. Током свог живота еритроцити подлежу метаболичким променама као што су губитак градијента јона, ћелијско старење, промене на нивоу липида и протеина мембране што утиче на њихово својство деформабилности која је веома значајна за неометани пролазак еритроцита кроз уске капиларе (Bartosz и сар., 1991, Catan и сар., 2019). Из свега наведеног је јасно да деформабилност мембране еритроцита представља важан ћелијски биофизички параметар који може бити од користи када је у питању праћење оксидативног стреса. Промене на нивоу деформабилности мембране еритроцита повезане су са бројним патолошким стањима као што су: DM (Kobayashi и сар., 2022), кардиоваскуларне болести, хематолошки поремећаји (Huisjes и сар. 2020, Di Giacinto и сар. 2020, Maeda и сар., 1996, Kobayashi и сар., 2022, Pretorius 2018)

Осигуравање ефикасног достављања кисеоника ткивима (Chien и сар., 1987, Kuck и сар., 2020) је између осталог омогућено деформабилношћу мембране еритроцита, важном физиолошком особином која омогућава еритроцитима да се крећу кроз комплексни микроциркулаторни систем. Еластична својства мембране еритроцита и њен отпор током многоструких пролазака кроз микрокапиларе обезбеђени су специфичним дискоидално - биконкавним обликом и организацијом протеина и липида у еритроцитима (Pretini и сар., 2019, Куо и сар., 2021). Осим неизбежног физичког притиска на еритроците, узрокованог зидовима микрокапилара током проласка еритроцита кроз њих, протеини и липидни двослој мембране еритроцита подлежу хемијским променама као што су: оксидација, метаболички поремећаји као и губитак јонског градијента (Catan и сар., 2019). Стога, деформабилност мембране еритроцита представља важан биофизички параметар нивоа оксидативног стреса или чак деградације хемоглобина (Hebbel 1990, Vecatti и сар., 2016). Губитак деформабилности повезан је са различитим патолошким стањима, укључујући кардиоваскуларне болести, DM и одређене хематолошке поремећаје (Huisjes и сар., 2020, Di Giacinto и сар., 2020). Ектацитометрија, ласерска дифракциона техника, користи се за одређивање деформабилности еритроцита, како у истраживачке тако и клиничке сврхе (Piety и сар., 2021). Међутим, стандардна ектацитометрија мери деформабилност популације еритроцита и не обезбеђујући информације о деформабилности појединачних ћелија. Различите оптичке методе, као што су оптичке пинцете (*енгл.* Optical tweezers) или ново дизајнирани микрофлуидични уређаји, могу обезбедити прецизнија мерења деформабилности појединачних еритроцита (Piety и сар., 2021, Kang и сар., 2022). С друге стране, важно је је анализирати деформабилност еритроцита на појединачном нивоу јер су истраживања показала да присуство чак и малог удела „недовољно“ деформишућих еритроцита у крвном току може ометати адхезију леукоцита за крвне судове, што утиче на ефикасност имунског одговора (Gutierrez и сар., 2018).

За проучавање деформабилности еритроцита како у клиничке тако и истраживачке сврхе најчешће се користи дифракциона оптичка техника-ектацитометрија. Поред бројних предности које ова техника пружа, као што су репродукцибилност и оперативна једноставност, основни проблем код ове технике је што се њоме не може пратити деформабилности појединачних еритроцита, већ целе анализирани популације. Еритроцити који имају смањену

деформабилност која доприноси опструкцији протока крви кроз микрокапиларе, могу бити узрок метаболичког стреса (Cho и сар., 2014). Показано је да је код метаболичких обољења као што је DM (поготово Diabetes mellitus тип 2) присутна је промена деформабилности мембране еритроцита (Shin и сар., 2007, Sokolova и сар., 2017, Babu 2021). Компликације изазване DM додатно мењају механичке и реолошке особине еритроцита (Wang и сар., 2021, Lee и сар., 2019). Хемореолошке детерминанте, као што је елонгациони индекс (*енгл.* Elongation index EI) који се израчунава након ектацитометријских мерења, могу предвидети патогенезу и компликације узроковане DM, превасходно ретинопатије, нефропатије и неуропатије (Schut и сар., 1993а, Chasis сар., 1989, Lee и сар., 2015). Показано је да је смањење EI еритроцита код DM пацијената повезано са повећаним нивоом гликозилованог хемоглобина, вишим садржајем сорбитола и повећаним нивоима оксидованих форми хемоглобина који може бити везан за унутрашњу страну мембране еритроцита, што може смањити однос површине и волумена еритроцита (Malandrino и сар., 2012, Mawatari и сар., 2004, Schut и сар., 1993а, Ercan и сар., 2002). Осим тога, показана је директна корелација између микроваскулатоних компликација и смањене деформабилности еритроцита (Kobayashi и сар., 2022). Дакле, EI добијен из анализе ектацитометријом представља важан хемореолошки параметар који се може применити у клиничким студијама (Baskurt и сар., 2004, Baskurt и сар., 2009).

1.8. Осликовање еритроцита и хемоглобина

Конвенционалан начин осликовања (*енгл.* Imaging) еритроцита подразумева примену обележивача у циљу њихове адекватне визуелизације (Mohanty и сар., 2008, Tokumasu и сар., 2003), најчешће на конфокалном флуоресцентном микроскопу. То подразумева коришћење специфичних обележивача за еритроците, као што је флуоресцентно обележено антитело на CD47 молекула, или неспецифично обележавање биолошких структура као што су липиди ћелијске мембране, помоћу различитих флуорофора које се везују за липиде као што је BODIPY, PKH67, или разних тиол реактивних обележивача (Abau и сар., 2019). Међутим, на овај начин долази до неизбежне пертурбације структуре обележеног молекула услед увођења флуорофора (обележивача).

Као један од посебних начина за обележавање еритроцита, искоришћене су фотофизичке особине молекула хемоглобина односно специфичности његове интеракције са блиским инфрацрвеним ласерским зрачењем у чијем опсегу је показана његова повећана апсорптивност (Clay и сар., 2007). Као последица повећане апсорпције хемоглобина у блиској инфрацрвеној области, за осликовање микроваскулаторних структура код хрчка, примењен је модалитет двофотонски побуђена флуоресцентна микроскопија (*енгл.* Two Photon Excitation Fluorescence-TPEF) (Rappaz и сар., 2008, Zheng и сар., 2010). Важно је истаћи да механизам TPEF емисије узорака који садрже хемоглобин није у потпуности објашњен. Испитивање двофотонског механизма побуде хемоглобина од стране Zheng и сар., 2010. је показало да су за апсорпцију два фотона истовремено фаворизирана ексцитациона стања са другачијом кинетиком него код једнофотонске побуде. Од стране истог истраживачког тима (Sun и сар., 2015) показано је да је за двофотонску побуду хемоглобина важна хем простетична функционална група. Без обзира што механизам који стоји иза двофотонске побуде хемоглобина није у потпуности расветљен, даља примена осликовања еритроцита и микроваскулаторних структура је настављена анализом микроваскулатуре ретине миша (He и сар., 2015) као и структуре филмова хемоглобина код пацијената оболелих од анемије српастих еритроцита (*енгл.* Sick cell disease) (Vigil и сар., 2015). Осим TPEF микроскопије, за осликовање микроваскулаторних структура без обележавања примењена је фотоакустична

микроскопија (Wang и сар., 2011, Shelton и сар., 2014). За волуметријско осликавање еритроцита без обележивача може се употребити холографска микроскопија заснована на промени индекса преламања материјала (Rappaz и сар., 2008).

Истраживање урађено у сарадњи Института за физику и Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду показало је да се коришћењем TPEF микроскопије на нивоу појединачних еритроцита и њихових празних мембрана може мапирати просторна дистрибуција хемоглобина без фиксирања и примене обележивача (Bukara и сар., 2017). TPEF микроскопијом је показано да просторна дистрибуција хемоглобина на нивоу појединачног еритроцита прати морфологију ових ћелија, и да се код измењене, ехиноцитне, морфологије хемоглобин акумулира у формираним протрузијама/инвагинацијама (Bukara и сар., 2017). Поред TPEF, до сада је описано и осликавање морфологије еритроцита без обележивача применом микроскопије генерисања трећег хармоника (*енгл.* Third Harmonic Generation-THG), примењеног на испитивање квалитета еритроцита за трансфузијске сврхе (Saytashev и сар., 2016).

Поменута интринзичка флуоресценција у узорцима који садрже хемоглобин након двофотонске ексцитације фемтосекундим импулсима у црвеном и блиско инфрацрвеном региону (600-750 nm) до данас није довољно истражена и описана (Zheng и сар., 2010). Наиме, механизам процеса појаве флуоресценције није у потпуности објашњен у случају молекула хемоглобина, јер детектовани флуоресцентни сигнал не испољава нека од својстава која су уобичајена за друге флуоресцентне молекуле. То се пре свега односи на изостанак феномена фото-избељивања (Shirshin и сар., 2018). Међутим, таква оптичка својства хемоглобина отворила су могућност примене TPEF микроскопије као алата за анализу морфологије еритроцита тј. њихово осликавање без обележивача, чак и у *in vivo* условима (Li и сар., 2011, Garrett и сар., 2012, He и сар., 2015). До сада је показано да постоји веза између TPEF ексцитације хема и хемоглобина, како је описано у раду Sun и сар., 2015 (Слика 6).

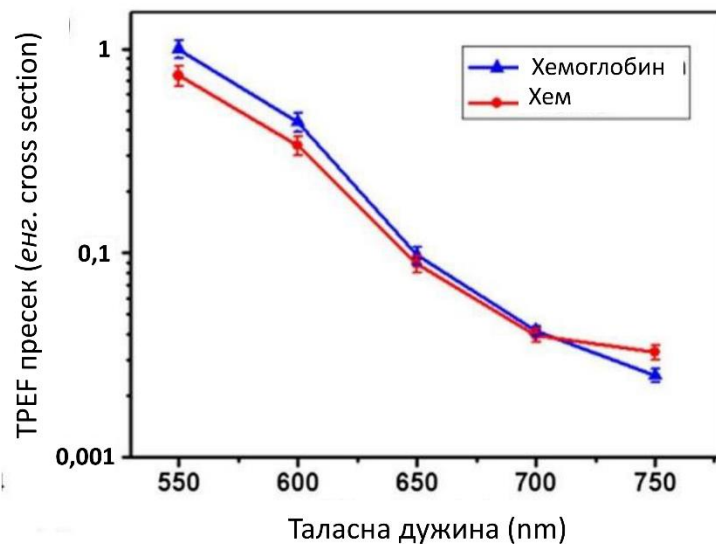
Иако је могућност примене TPEF микроскопије за анализу хемоглобина и еритроцита потврђена, ипак порекло генерисане флуоресценције приликом интеракције узорака који садрже хемоглобин са ултракратким ласерским импулсима није објашњено. Показано је да је флуоресцентно време полуживота (*енгл.* Decay time) узорака који садрже хемоглобин веома кратко и да је трајање реда величине временског одзива система за једнофотонску детекцију (*енгл.* Time Correlated Single Photon Counter-TCSPC) (Sun и сар., 2015). Било је потребно разумети порекло мултифотонске флуоресценције код хемоглобина с обзиром да је једнофотонска побуца била неизводљива или изводљива приликом временски дужег озрачивања хемоглобина (Shirshin и сар., 2018), што представља екстремне експерименталне услове. Да би се разумело порекло мултифотонске флуоресценције хемоглобина у обзир је узета структура хемоглобина. Као што је описано у секцији 1.1, молекула хемоглобина се састоји од глобинских ланаца и простетичне групе хем. Како су глобински ланци полипептидни по својој природи и састоје се од аминокиселина, било је очекивано да флуоресценција која потиче од њих има карактеристике цикличних аминокиселина као што је триптофан. Приликом TPEF ексцитације изолованих глобинских ланаца таласном дужином од 600 nm, максимум флуоресцентне емисије је био на око 350 nm (Слика 7, зелена крива), што није одговарало TPEF флуоресцентном максимуму узорака који садрже хемоглобин (Sun и сар., 2015). Време полуживота флуоресценције глобинских ланаца је дуже од времена живота TPEF флуоресценције узорака који садрже хемоглобин или хем (Sun и сар., 2015), што имплицира да порекло TPEF емисије потиче од хем простетичне групе. Иако је претпостављено да је TPEF емисија на извесан начин повезана са мономерима хем

функционалне групе, а не са глобинским ланцима, фотофизички механизам ТРЕФ емисије није био у потпуности јасан.

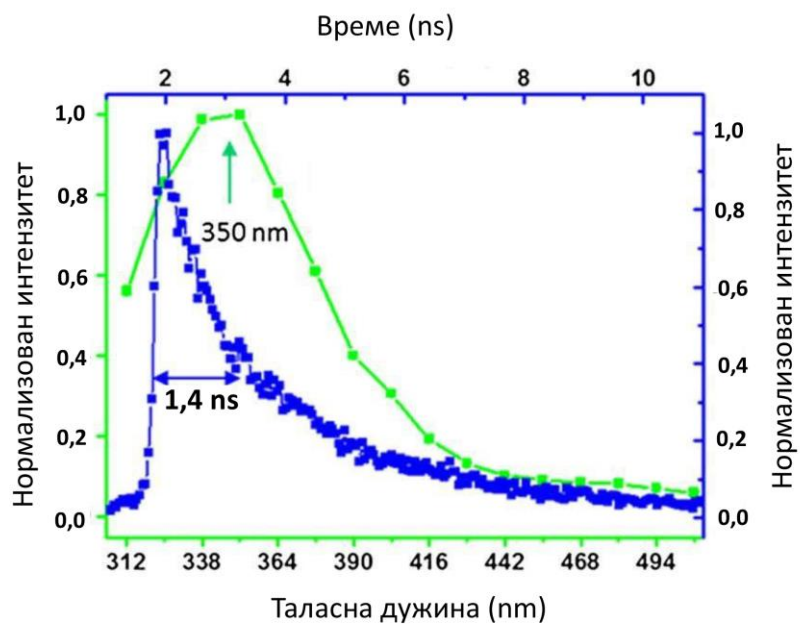
Показано је да фото-оштећење молекула приликом мултифотонске екситације може довести до појаве флуоресценције (Ladner и сар., 2014, Sun и сар., 2015), али веза са хемоглобином још увек није објашњена.

Првобитно је предложено да флуоресцентна емисија води порекло од хемоглобина (Zheng и сар., 2010, Sun и сар., 2015), а затим је показано је да ТРЕФ емисија не потиче директно од хемоглобина, већ од фотопродукта који је формиран приликом интеракције ултракратких ласерских импулса (који се користе у овој нелинеарној техници осликавања са хемоглобином) (Shirshin и сар., 2018). Ово је управо повезано са поменутом појавом флуоресценције приликом фото-оштећења. Уочено је да је флуоресцентно време полуживота једињења које настаје приликом интеракције ултракратких импулса са хемоглобином реда величине од око 1 ns (Слика 7 плава крива).

Из свега наведеног, јасно је да је даље испитивање недовољно разјашњене фотофизичке природе интеракције ултракратких ласерских импулса са хемоглобином, као главног унутарћелијског протеина еритроцита одговорног за већину функција које ове ћелије обављају, посебно релевантно са аспекта шире примене фотоничних техника у биомедицинске сврхе.



Слика 6. ТРЕФ оптички одговор хемоглобина (плава крива) и хем простеичне групе (црвена крива). Преузето и модификовано из Sun и сар., 2015.



Слика 7. ТРЕФ емисиони спектар глобинских ланаца (зелена крива), чија је таласна дужина побуде износила 600nm, флуоресцентно време полуживота глобинских ланаца глобинских ланаца (плава крива), преузето и модификовано из Sun и сар., 2015.

2. Циљеви и хипотезе

Основни циљ ове докторске дисертације је испитивање интеракције ултракратких ласерских импулса са унутарћелијским и ванћелијским молекулом хемоглобином током стварања флуоресцентног једињења (фотопродукта) (Shirshin и сар., 2018). Природа овог фотопродукта као и јасни услови под којима настаје применом технике нелинеарне ласерске микроскопије-ТРЕФ модалитета нису у потпуности познати и због тога је дизајнирање одговарајућег протокола за генерисање овог фотопродукта као и његова фотофизичка карактеризација представља окосницу ове докторске дисертације. Разумевање механизма настанка флуоресцентног фотопродукта хемоглобина омогућиће бољу основу за унапређење и примену техника нелинеарне ласерске микроскопије за анализу функционалног статуса еритроцита.

Непосредни циљеви ове дисертације:

- Анализа интеракције ултракратких ласерских импулса са изолованим (ванћелијским) молекулима хемоглобина и фотофизичка и фотохемијска карактеризацију насталог флуоресцентног фотопродукта, мерењем UV/VIS апсорпционог и двофотонског емисионог спектра. Спектрална карактеризација даје увид у структурне промене које настају услед интеракције ултракратких ласерских импулса са хемоглобином, а промене на карактеристичним спектралним линијама хемоглобина (промена интензитета и положаја максимума као и промене релативног односа пикова) могу послужити као маркери структурних промена индукованих ултракратким ласерским импулсима. Да би се установило који је структурни део хемоглобина одговоран за формирање фотопродукта биће испитиване фотофизичке особине простетичних група који улазе у састав хемоглобина: хема и протопорфирина IX.
- Формирање флуоресцентног фотопродукта на просторно-временски контролисан начин применом растерског скенирања (*енгл.* raster scanning) танких филмова хемоглобина ултракратким ласерским импулсима, на основу примене сазнања стечених кроз претходни циљ. Иако ће примена ових сазнања првенствено бити у селективном обележавању и осликовању еритроцита, оно ће омогућити и ласерско гравирање различитих флуоресцентних образаца (*енгл.* pattern) на изолованом хемоглобину, што у ствари подразумева просторно локализовано формирање фотопродукта. Ово додатно омогућава испитивање фотостабилности фотопродукта као и могућност испитивања и коришћења фотопродукта за различите примене као што су: креирање био-оптичких меморија, фотодинамску терапију, формирање флуоресцентних обележивача.
- Испитивање и праћење просторне дистрибуције хемоглобина у еритроцитима засновано на интеракцији ултракратких ласерских импулса са хемоглобином, у симулацији физиолошких и различитих патолошких стања еритроцита. Поред ТРЕФ, други модалитет нелинеарне микроскопије, снимање сигнала трећег хармоника (THG) примениће се у осликовању мембрана еритроцита. Резултати наведених метода нелинеарне микроскопије биће допуњене резултатима добијеним стандардним лабораторијским методама за анализу морфологије еритроцита и хемоглобина, што

укључује спектрофотометријске методе, као и метода засноване на расејању и дифракцији светлости (проточна цитометрија и ектацитометрија).

У оквиру ове докторске дисертације постављене су следеће хипотезе:

1. Претпоставља се да приликом интеракције хемоглобина са ултракратким ласерским импулсима долази до фотодеградације хемоглобина, која највероватније претходи формирању флуоресцентног фотопродукта.
2. Претпоставља се да је могуће извршити просторно локализовано формирање фотопродукта (ласерско уписивање флуоресцентних образаца) на танком филму хемоглобина нелинеарном ласерском скенирајућом микроскопијом.
3. Претпоставља се да флуоресцентни фотопродукт карактерише изражена фотостабилност која се може детектовати и коришћењем једнофотонског извора побуде.
4. Претпоставља се да се на основу UV/VIS спектроскопских података могу уочити значајне разлике између хемоглобина и формираног фотопродукта у релативним односима карактеристичних апсорпционих максимума, њиховом положају и интензитету.
5. Претпоставља се да је могуће селективно обележавање ласером и осликавање еритроцита услед флуоресценције фотопродукта у њима.
6. Претпоставља се да је могуће проучавање морфологије еритроцита *in vitro* и расподеле хемоглобина у њима на основу постигнуте флуоресценције фотопродукта.
7. Претпоставља се да се еритроцити који постају флуоресцентни (обележени) због формирања фотопродукта могу проучавати другим оптичким техникама као што су конфокална микроскопија, проточна цитометрија или екатцитометрија.
8. Претпоставља се да је могуће уочити значајне разлике у интензитету флуоресценције као и у дистрибуцији хемоглобина у еритроцитима здравих донора који су *in vitro* изложени оксидативном стресу или еритроцитима особа оболелих од DM, обољењем повезаним са повећаним нивоом оксидативног стреса.

3. Материјал и методе

3.1. Материјал

3.1.1 Сакупљање и обрада узорака крви здравих донора

Венска крв пореклом од здравих добровољаца сакупљена је у Институту за трансфузиологију и хемобиологију Војномедицинске академије, Београд, Србија. Протокол је одобрен од стране Институционалног етичког одбора (Број 9/2021), а у сагласности са Декларацијом Светске медицинске асоцијације у Хелсинкију. Након издвајања производа који се користе у различитим видовима терапије (еритроцити, крвна плазма (течна фаза крви) и тромбоцити), заостаје „buffy coat“ тј. материјал који се се у редовној процедури одбацује, а за ову докторску дисертацију из ових узорака су изоловани еритроцити. У изолованим еритроцитима су одређивани параметри квалитета еритроцита: хематокрит и концентрација хемоглобина. Ови параметри су били у физиолошким границама за здраве доносе. Након завршене анализе на еритроцитима из узетих узорака, узорци су уништени у складу са законом о одлагању медицинског отпада (Сл. Гласник бр. 78/2010).

3.1.2. Узорковање крви дијабетичара и контролне групе

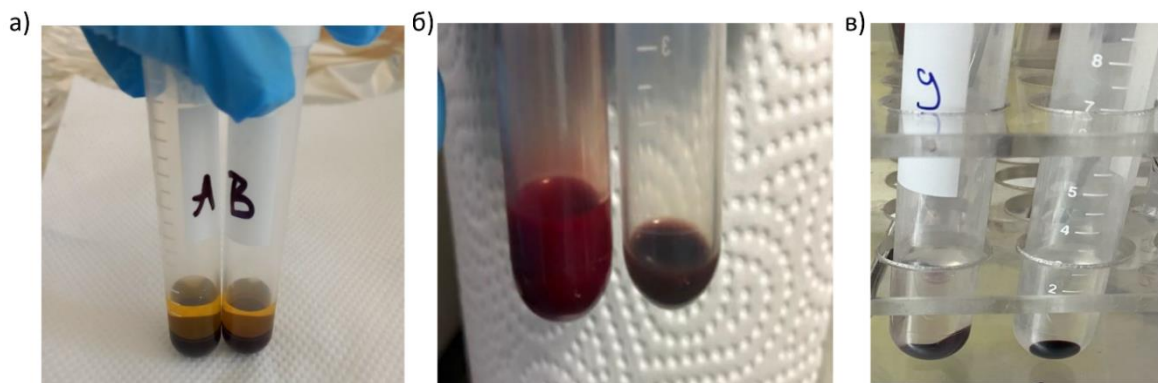
Венска крв од пацијената оболелих од DMТ1 ($n=7$) и типа II (DMТ2) ($n=6$) је узета користећи вакутејнер епрувете запремине 10 mL (BD Vacutainer® EDTA Тубе) са BD Hemogard™ која садржи 18 mg K₂EDTA). Пацијенти су били на редовним контролним прегледима у Клиници за ендокринологију, дијабетес и метаболичке болести Универзитетског Клиничког центра Србије. Етичка дозвола бр. 1332/VII-5, 7. јула 2020. године издата је од стране Медицинског факултета Универзитета у Београду за рад са пацијентима оболелих од DM. Хомогеност узорка DM пацијената осигурана је путем дизајнирања критеријума за укључивање пацијената у студију, као и усаглашавањем броја мушких и женских особа. За укључивање у групу DM, критеријуми су били: особе са дијагностикованим DM узраста између 18 и 75 година, стабилно дијабетично стање-дефинисано као стање без значајних промена у режиму терапије у последња три месеца. Из студије су били искључени: труднице, пацијенти са постојећим медицинским стањима која би могла значајно утицати на метаболизам глукозе (нпр. болести панкреаса, малигнитети), тренутна употреба лекова који се испитују или учешће у другим клиничким испитивањима која укључују истраживање DM. За контролну групу, венска крв је узета од 11 здравих донора истог узраста (особе које немају системска обољења) користећи вакутејнер тубе запремине 10 mL (BD Vacutainer® EDTA Тубе) са BD Hemogard™ која садржи 18 mg K₂EDTA). Критеријуми укључивања у контролну групу су били: особе без дијагнозе DM, узраст усаглашен са дијабетичном групом (између 18 и 75 година), тренутно без терапије лековима за које је познато да утичу на метаболизам глукозе. Критеријуми за искључивање из контролне групе били су: особе са историјом нарушене толеранције на глукозу, трудноћа, било које хронично медицинско стање које би могло утицати на метаболизам глукозе (нпр. полицистични оваријални синдром, Кушингов синдром), тренутна употреба лекова за које је познато да утичу на метаболизам глукозе. Псеудо-анонимизирани узорци су чувани на 4°C (не дуже од 1 сата након узимања узорака) до превоза и обраде у Институту за медицинска истраживања Универзитета у Београду.

3.1.3. Изоловање пакованих еритроцита

Еритроцити здравих донора и DM пацијената су изоловани из 10 mL пуне крви. Крв је центрифугирана на $1811 \times g$ (3000 rpm) у трајању од 20 min на 4 °C, (центрифуга Megafuge 1.0R Heraus centrifuge, Langenselbold, Немачка). Након првог центрифугирања супернатант који садржи плазму са леукоцитима (Слика 8a) је пажљиво аспириран и одбачен. У раствор преципитираних еритроцита додато је око 5 mL изотоничног физиолошког раствора (0,9 % NaCl, Natrii chloridi infundibile 9 g/L, Hemofarm, Србија) у волуметријском односу 1:4 а затим је ова суспензија пажљиво хомогенизована окретањем епрувете. Телијска суспензија је поново центрифугирана 10 min на $1257 \times g$ (2500 rpm) на 4 °C. У зависности од узорка и прецизности којом су уклањани протеини плазме и леукоцити, овај поступак је поновљен три или више пута. На крају овог поступка добијени су тзв. паковани еритроцити који су ресуспендовани у изотоничном фосфатном пуферу (енгл. Phosphate buffer saline-PBS) који је по саставу 0,8% NaCl са 10 mM раствором натријум фосфатног пуфера у волуметријском односу 1:4, pH 7,2 - 7,4) (Слика 8б).

3.1.4. In vitro оксидација пакованих еритроцита здравих донора

In vitro оксидација еритроцита здравих донора извршена је према протоколу Gutierrez и сар. 2018. Поступак подразумева третман пакованих еритроцита ресуспендованих у 0,50 mM и 0,75 ТВНР (енгл. Tert-butyl hydroperoxide). Процедура за *in vitro* оксидацију подразумевала је додавање 100 μ L пакованих еритроцита у 2,4 mL 0,50 mM и 0,75 mM ТВНР раствореног у PBS и следствено инкубирање на 37 °C. Након инкубације суспензија еритроцита је центрифугирана 20 min, на 3000 rpm на собној температури. Исталожени еритроцити (Слика 8в) су ресуспендовани у PBS, након чега су поново исталожени центрифугирањем у трајању од 15 min, на 3000 rpm. Овако припремљени еритроцити су коришћени за даље анализе.

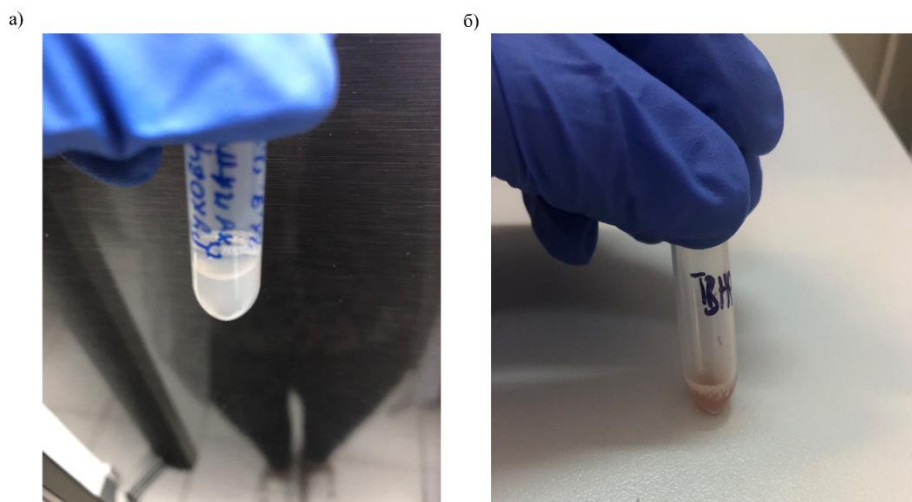


Слика 8. а) пуна крв након првог центрифугирања где се види плазма (тамно жути супернатант) и еритроцити (тамно црвени талог), б) контролни паковани еритроцити (лево) и еритроцити оксидовани 0,5 mM ТВНР (десно), в) исталожени испрани еритроцити оксидовани 0,5 mM ТВНР (тамни талог на дну епрувета).

3.1.5. Добијање еритроцитних мембрана осмотском лизом

Мембране еритроцита (духови) су добијени лизом пакованих еритроцита у хипоосмотском 5mM Na-фосфатном пуферу pH 7,2-7,4. Талогу пакованих еритроцита (1 mL)

додато је 9 mL 5mM Na-фосфатног пуфера, претходно охлађеног на 4 °C. Епрувета је мешана извртањем док се није уочио прелазак боје раствора из замућено црвене у бистро, тамно црвену. Хемолизат је остављен на 4 °C у трајању од сат времена. Након овог периода хемолизат је поново хомогенизован мешањем, односно извртањем епрувете, а затим је по 1 mL хемолизата распоређено у епендорф тубе од 2 mL. Хемолизат је затим центрифугиран на 10000 rpm у трајању од 20 min. Супернатант је одбачен, а талог сваке епендорфице допуњен хипоосмотским 5 mM Na-фосфатном пуфером рН 7,2-7,4, након чега је хомогенизован мешањем. Кораци центрифугирања, испирања и хомогенизовања су поновљени још три пута. Поступак је понављан док талог није добио беличасту боју која указује на уклањање хемоглобина из духова еритроцита (Слика 9а). На исти начин урађена је и хемолиза и изоловање мембране еритроцита након оксидације ТВНР (Слика 9б).



Слика 9. а) Суспензија изолованих мембрана еритроцита, б) Суспензија изолованих мембрана еритроцита *in vitro* оксидованих ТВНР.

3.1.6. Изоловање хемоглобина

За изоловање хемоглобина су коришћени паковани еритроцити здравих донора који су добијени на начин описан у секцији 3.1.3.

Хемолиза еритроцита је рађена тако што је у 1 mL суспензије пакованих еритроцита додавано 9 mL хипоосмотског 5 mM натријум-фосфатног пуфера рН 7,2, претходно охлађеног на 4 °C, а затим је епрувета са раствором лагано промешана извртањем и након тога остављена на 1 сат на 4 °C. Суспензија је центрифугирана 40 min на 3220 × g, на 4 °C. Након центрифугирања, супернатант који садржи ослобођене молекуле хемоглобина је сакупљен, а затим филтриран кроз 0,2 μm филтер. Уколико нису одмах коришћени, узорци хемоглобина су аликвотирани и чувани на -20 °C за касније анализе. Пре сваке анализе аликвоти хемоглобина су одмрзавани и одређена им је концентрација цијанметхемоглобинском методом. У раду је за сваки аликвот примењен само један циклус замрзавања и одмрзавања, што значи да су аликвоти одбацивани након завршене анализе. Пре сваког коришћења раствора хемоглобина за експерименте снимани су UV/VIS апсорпциони спектри да би се извршила провера квалитета хемоглобина, и у случају појаве одступања од стандардног UV/VIS апсорпционог спектра хемоглобина због оксидације или деградације молекула, аликвоти су одстрањивани. Замрзнути узорци хемоглобина чувани су мање од две године од изоловања с обзиром да су

претходни резултати показали да његова структура остаје непромењена-недеградирана и неагрегирана под овим условима чувања (Stančić и сар., 2020).

За потребе успостављања експерименталних протокола за нелинеарну микроскопију, коришћен је и говеђи хемоглобин, добијен са Института за медицинска истраживања, по развијеним протоколима за изоловање овог хемоглобина из отпадне кланичне крви (Kostić и сар., 2014, Stančić и сар., 2020) (Табела П1, прилог). За испитивање механизма који је укључен у индуковање флуоресценције након озрачивања хемоглобина, хемоглобин је третиран и применом H_2O_2 на следећи начин: 1 mL хемоглобина концентрације 22,3 g/L, је инкубиран са 0,5 mL 250 μM H_2O_2 у PBS током 30 min на собној температури (~ 21 °C).

3.2. Експериментални дизајн

3.2.1. Изолација и припрема хемоглобина за фотофизичка испитивања

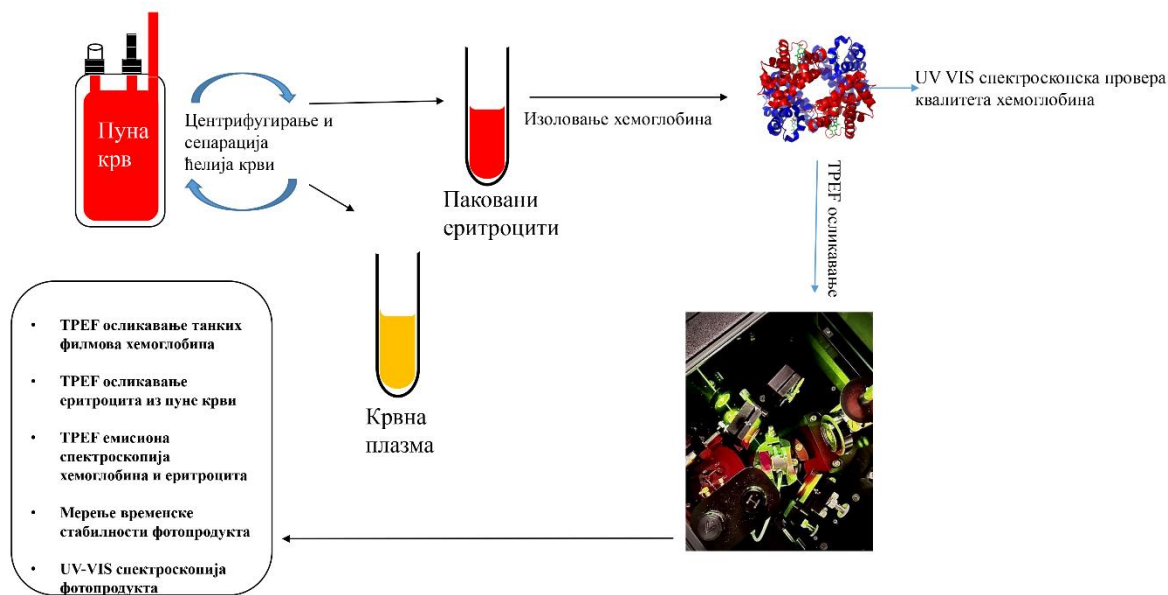
Хемоглобин пореклом од здравих донора је изолован хемоллизом пакованих еритроцита на начин описан у секцији 3.1.6. Цијанометхемоглобинском методом одређена је концентрација изолованог хемоглобина. Изоловани хемоглобин је затим нанет (развучен) на микроскопско стакло у танком слоју и осушен на ваздуху након чега су испитиване његове фотофизичке особине услед интеракције са ултракратким ласерским импулсима, као и услови под којима се формира фотопродукт, по (Прилог Табела П1). Експериментална поставка је приказана на слици 10. Пре снимања рађена је експериментална оптимизација и ти „покушаји“ оптимизације су приказани у Табели П1 у прилогу.

Изоловани хемоглобин је коришћен за:

- Испитивање интеракције са ултракратким ласерским импулсима у циљу разумевања фотофизичке природе настанка фотопродукта.
- Одређивање временске стабилности фотопродукта коришћењем једнофотонске односно конфокалне микроскопије.
- Мерење UV/VIS и TPEF емисионих спектра са танких филмова хемоглобина који су претходно третирану ултракратким ласерским импулсима и садрже фотопродукт.
- Прављење танких филмова хемоглобина за ласерско гравирање и уцртавање флуоресцентних структура различитих димензија.

Еритроцити из пуне крви су коришћени за:

- Селективно фото-обележавање и осликавање помоћу TPEF микроскопије
- Мерење TPEF емисионих спектра
- Просторно праћење у малој запремини физиолошког раствора у циљу симулације праћења кретања еритроцита у протоку крви

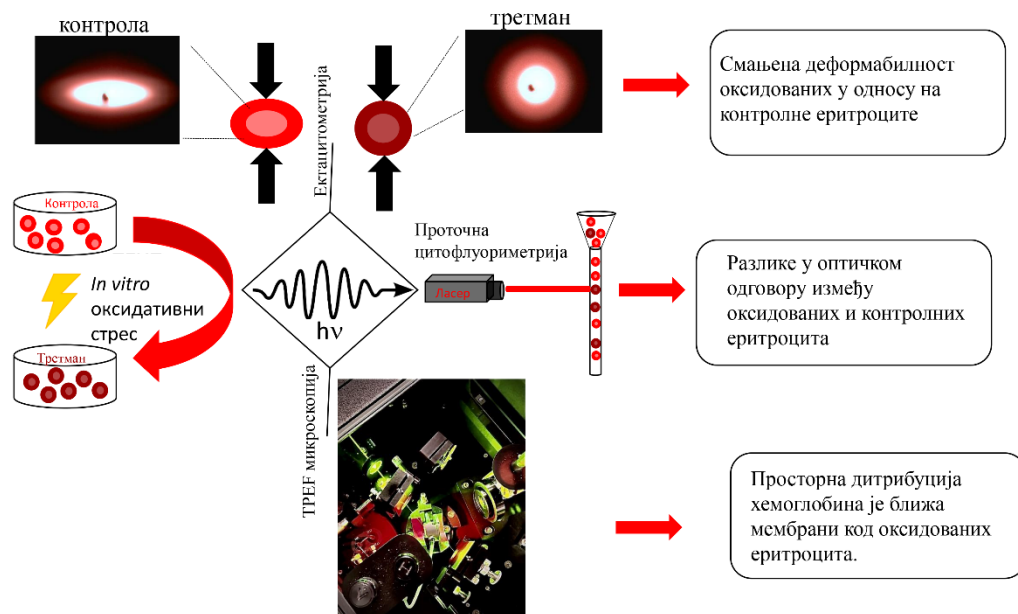


Слика 10. Експериментална поставка ТРЕФ осликовања еритроцита и хемоглобина.

3.2.2 Одређивање оптичких карактеристика *in vitro* оксидованих еритроцита

Паковани еритроцити су изоловани и третирани са 0,5 mM ТВНР и 0,75 ТВНР. Оптички одговор третираних еритроцита је анализиран коришћењем проточне цитометрије, ектацитометрије и ТРЕФ микроскопије. Експериментална поставка је приказана на слици 11, а обухватала је анализе:

- Дистрибуције FCS и SSC расејане светлости оксидованих и контролних еритроцита проточном цитометријом
- Интензитета аутофлуоресценције оксидованих и контролних еритроцита проточном цитометријом.
- Механичких особина оксидованих и контролних еритроцита ектацитометријом.
- Карактеристика флуоресцентног пика, тј. површина флуоресцентног пика, код оксидованих и контролних еритроцита.
- Нивоа агрегације оксидованих еритроцита анализом микрографија добијених фазно контрастном микроскопијом.
- Апсорпционих спектра лизата нетретираних и оксидованих еритроцита.
- Степена оксидације липида TBARS методом.
- Дистрибуције хемоглобина у оксидованим и контролним еритроцитима ТРЕФ микроскопијом



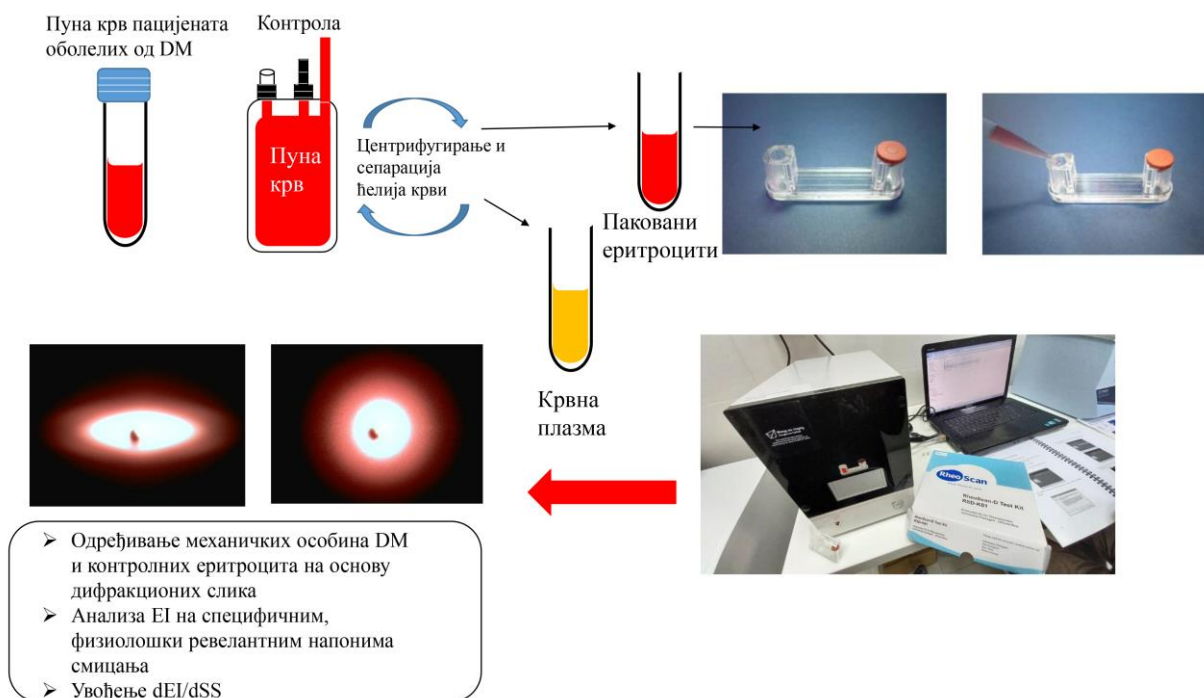
Слика 11. Експериментална поставка оптичких техника коришћених за проучавање оксидативног стреса еритроцита.

3.2.3. Одређивање механичких особина еритроцита

Деформабилност пакованих еритроцита здравих донора и пацијената оболелих од DM је анализирана дифракционом ласерском техником-ектацитометријом. Уведен је нови параметар први извод EI на половини максимума криве деформабилности (dEI/dSS) за процену одговора еритроцита на механички стрес. Експериментална поставка је приказана на слици 12.

Анализа механичких особина еритроцита здравих донора и пацијената оболелих од DM подразумевала је следеће:

- Анализу дифракционих слика популације еритроцита снимљене при различитим напонима смицања.
- Израчунавање промене dEI/dSS на половини криве деформабилности еритроцита под утицајем различитог напона смицања.



Слика 12. Експериментална поставка ектацитометријских мерења еритроцита здравих донора и пацијената оболелих од DM.

3.3. Методе

3.3.1 Одређивање концентрације хемоглобина цијанометхемоглобинаском методом

Концентрација хемоглобина одређена је коришћењем цијанометхемоглобинске методе, где је у 3 mL Драпкиновог реагенса (пуферизован хипоосмотски раствор KCN и $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) додато 10 μL пакованих еритроцита. Раствор је затим хомогенизован и апсорбанца је измерена на 540nm (A_{540}). Као слепа проба коришћен је Драпкинов реагенс. Концентрација хемоглобина (Hb) је израчуната по формули (једначина 1):

$$Hb \text{ (mg/mL)} = A_{540} * 1,465 * \text{разблажење узорка} \quad (1)$$

3.3.2. Припрема танких филмова хемоглобина за ТРЕФ микроскопско осликавање

Танки филмови нативног хемоглобина и хемоглобина третираног H_2O_2 су припремљени наношењем 5 μL раствора хемоглобина на микроскопско стакло, затим су сушени на ваздуху 3 min и прекривени покровним стаклом дебљине 170 μm . Дебљина филма је била < 50 μm , како је измерено конфокалним ласерским скенирањем, односно скенирањем по z-оси. Најмањи корак корачног мотора микроскопског сталка износио је 0,3 μm .

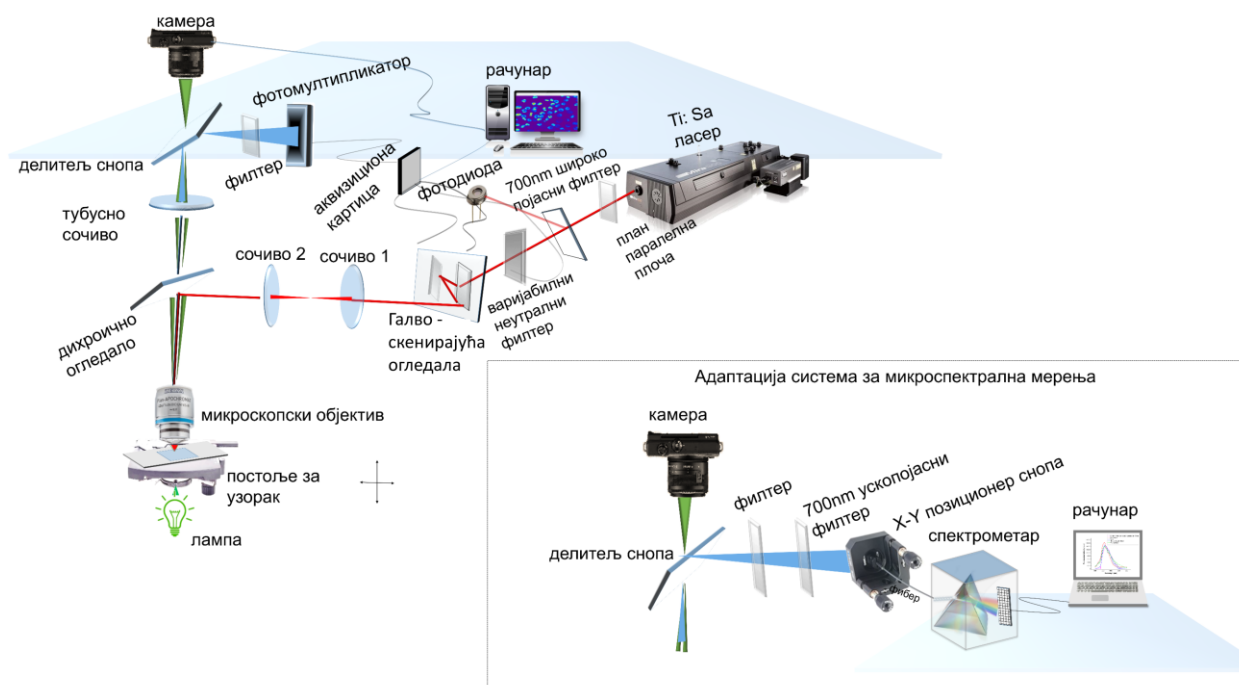
3.3.3. Припрема танких филмова протопорфина IX за ТРЕФ микроскопију

Протопорфин IX (PpIX) у форми соли произведен од стране Sigma Aldrich (SAD) је коришћен за испитивање фотофизичких особина, као молекула који је структурни део хем

функционалне групе хемоглобина. Раствор PpIX је припремљен тако да је 0,1g PpIX растворен у 50 mL 1M HCl. Овај концентровани раствор је чуван на тамном месту, како би се спречила евентуална фотодеградација PpIX. За TPEF микроскопију и спектрално осликовање концентровани раствор PpIX је разблажен PBS (Sigma Aldrich, 140 mM NaCl, 10 mM фофатни пуфер и 3 mM KCl, pH 7,4) до финалне концентрације од 5 μ M. По 5 μ L овог раствора је стављено на предметно стакло и третирано на исти начин као и танки филмови хемоглобина, користећи TPEF систем.

3.3.4. TPEF микроскопију еритроцита и ласерско гравирање хемоглобина

Схематски приказ експерименталне поставке приказан је на слици 13. Титан-сафирни ласер (Coherent, Mira 900-F), пумпан фреквенцијски дуплираним Nd:YVO₄ ласером (Coherent, Verdi V10), коришћен је за генерисање ултракратких ласерских импулса чија је репетиција износила 76 MHz док је трајање импулса било 160 fs. Галво-скенирајућа огледала (Cambridge Technology) коришћена су за растерско скенирање и ласерско микрогравирање танких филмова хемоглобина. За експерименте су коришћена су два микроскопска објектива: EC Plan-NEOFLUAR 40 \times /1.3 N.A. уљани (Carl Zeiss) за осликовање еритроцита и Plan-Apochromat 20 \times /0.8 N.A. ваздушни (Carl Zeiss) за ласерско микрогравирање хемоглобина. Пре него што дође до узорка, ласерски сноп је проширен да би се испунила задња апертура објектива који се користи за снимање или ласерско микрогравирање. Коришћено је дихроично огледало за рефлексију ласерског зрака ка објективу. Сигнал је даље прослеђен ка 15.1-мегапикселној (DSLR) камери (Canon, EOS 50D) и фотомултипликаторској цеви (*енгл.* Photomultiplier tube - PMT), (RCA, PF1006). Камера је коришћена за снимање слика у режиму светлог поља. (*енгл.* Brightfield), Инфрацрвени филтер је уклоњен са камере како би се видела рефлексија ласерског снопа са покровног стакла узорка а ради подешавања фокуса система и олакшања аксијалног позиционирања танког слоја хемоглобина. Оптички филтер опсега: VIS (400 – 700 nm) постављен је испред PMT-а за сакупљање флуоресценције фотопродуката хемоглобина. Коришћен је (*енгл.* Long pass) филтер 700 nm за уклањање паразитних ласерских линија краћих од 700 nm. Оптички филтер (*енгл.* Short pass) од 700 nm постављен је испред PMT-а да би додатно уклонила повратно расејана ласерска светлост. Формирање фотопродуката хемоглобина и осликовање еритроцита извршени су уз помоћ ултракратких ласерских импулса на таласној дужини од 730 nm. Ова таласна дужина је изабрана као оптимална у складу са оптичким особинама микроскопског система и оптичким својствима молекула хемоглобина (Bukara и сар., 2017). За припрему микроскопских слајдова за TPEF микроскопију еритроцита, 10 μ L пуне крви је разблажено је у изотоничном раствору 0,9 % натријум хлорида (0,9 % NaCl, Natrii chloridi infundibile 9 g/L, Хемофарм, Србија) у односу 1:30. По 3 μ L разблаженог узорка пуне крви је наносено на микроскопско стакло, а затим је узорак покривен покровним стаклом дебљине 170 μ m (No. 1,5).



Слика 13. Схематски приказ TPEF скенирајућег система.

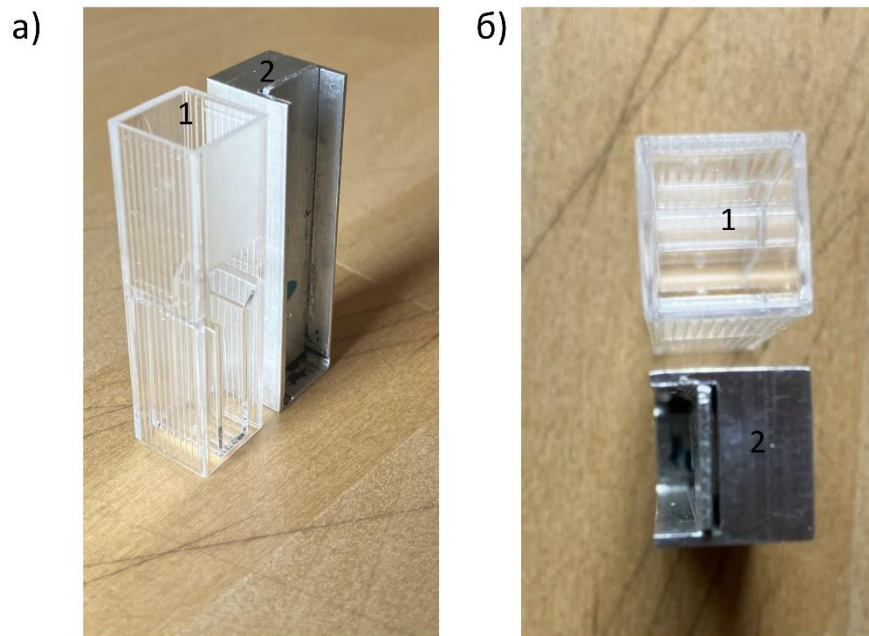
3.3.5. Једнофотонско осликавање фотопродукта хемоглобина

Стабилност фотопродукта, насталог интеракцијом ултракратких ласерских импулса са хемоглобином одређена је помоћу једнофотонске екситације (*енгл.* Single Photon Excitation Fluorescence-SPEF) користећи конфокалну скенирајућу ласерску микроскопију (*енгл.* Confocal Laser Scanning Microscopy-LSM 510, Carl Zeiss), коју карактерише могућност коришћења више ласерских линија (458 nm, 488 nm и 514 nm). Коришћен је уљани објектив $40 \times 1,3$ N.A (Carl Zeiss). Дебљина оптичког пресека је постављена на вредност мању од $4,3 \mu\text{m}$, избором дијаметра пинхола од 5,65 Ајријевих јединица (*енгл.* Airy unit), да би се сакупило што више флуоресцентног сигнала пореклом од фотопродукта и повећао однос сигнал / шум (*енгл.* Signal to Noise Ratio-SNR). Најбољи однос сигнала и шума на SPEF сликама фотопродукта који је био „направљен” у виду квадратног микрообрасца, био је при екситацији на 488nm. Флуоресцентна емисија је сакупљена користећи главни дихроични делитељ снопа, НФТ 488 nm и оптички филтер (*енгл.* Long Pass-LP 505 nm).

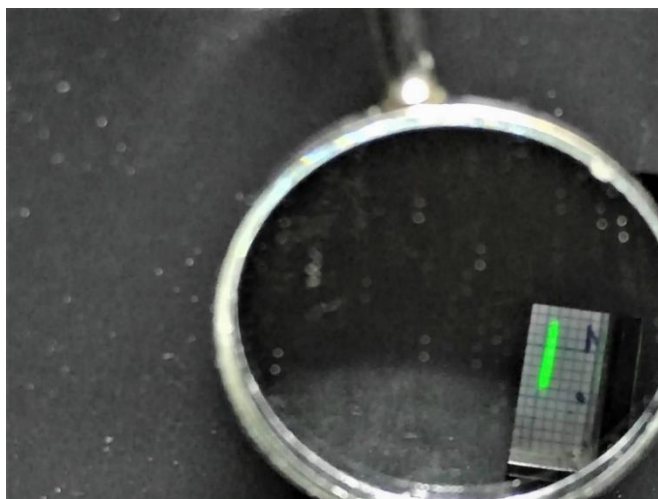
3.3.6. Мерење апсорпционих спектра фотопродукта хемоглобина

Апсорпциони спектри хемоглобина и TPEF озраченог хемоглобина у виду интактног танког филма мерени су користећи спектрофотометар Beckman Coulter DU700. Посебно дизајнирани алуминијумски носач узорка (Слика 14) је направљен тако да држи микроскопско стакло са нанесеним узорком, како би „имитирао” кивету за спектрофотометар. Димензије држача биле су $45 \text{ mm} \times 10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$. Маска са округлим отвором је постављена преко покривног стакла са слојем хемоглобина и поља са квадратним обрасцем фотопродукта. Отвор

је преклопљен са фотопродуктом хемоглобина, омогућавајући делу улазне светлости од спектрофотометра да прође само кроз регион где се налази фотопродукт хемоглобина, тако што је претходно помоћу огледала одређен положај снопа светлости (Слика 15). Пре мерења апсорпције, извршена је неопходна калибрација за укупну трансмисију.



Слика 14. Носач узорка танких филмова хемоглобина (2) који има димензије стандардне кивете (1) за спектрофотометријска мерења, а) поглед са стране, б) поглед одозго. Одређивање положаја снопа светлости на спектрофотометру вршено је помоћу обележеног милиметарског папира, као што је приказано на слици 15.



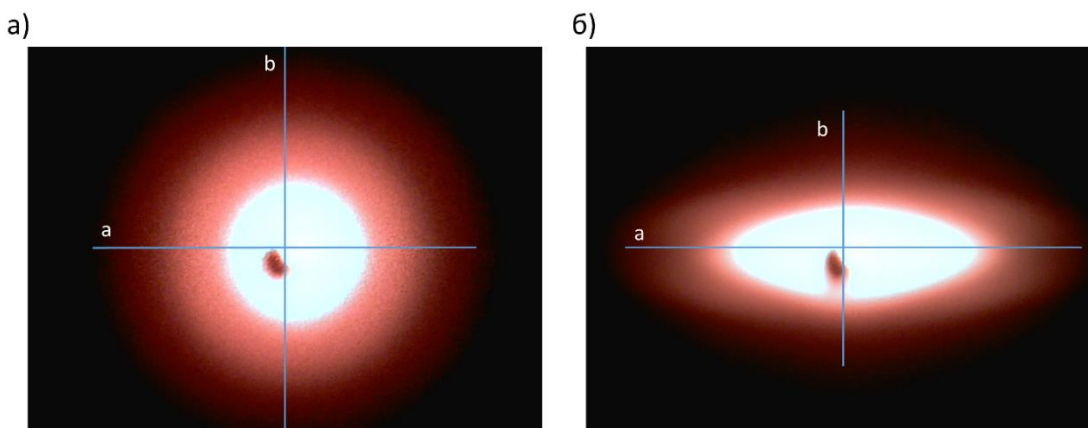
Слика 15. Одређивање положаја снопа светлости на спектрофотометру помоћу обележеног милиметарског папира. Милиметарски папир је убачен у носач у облику кивете, уместо покровног стакла са узорком. Тачка на милиметарском папиру представља вредност од 5 mm. Слика је направљена камером на мобилном телефону фотографишући снап светлости на милиметарском папиру у огледалу.

3.3.7. Спектрално осликовање (енгл. Spectral imaging) фотопродукта хемоглобина

Спектрална конфокална ласерска скенирајућа микроскопија (енгл. Confocal Laser Scanning Microscopy-CLSM) коришћена је за спектрално осликовање фотопродукта. Сlike су снимљене користећи инструмент LSM880 (Carl Zeiss), који има три диодна ласера следећих таласних дужина: 543 nm и 633 nm, и јонски аргонски ласер (линије: 458 nm, 488 nm и 514 nm). Коришћен је објектив (Plan Achromat 20× /0.8 N.A.) и дводимензионални спектрални детектор изграђен од галијум–арсенид-фосфата (GaAsP). Величина пинхола је постављена на 33 μm (1 Ајријева јединица при 488 nm). Флуоресцентна емисија је спектрално раздвојена дифракционим решетком и детектована у опсегу од 418 nm до 723 nm са резолуцијом од 3 nm улазне таласне дужине користећи поменути GaAsP детектор. За све таласне дужине, снага ласера је била 9,4 μW измерена на објективу. SPEF емисиони спектри су приказани само за таласне дужине веће од таласне дужине побуде.

3.3.8. Одређивање деформабилности еритроцита

Ектацитометрија, ласерска дифракциона техника је брза метода за процену деформабилности еритроцита. Заснива се на анализирању дифракционих образаца еритроцита под контролисаним напонам смицања (енгл. Shear stress-SS), омогућавајући квантитативну процену деформабилности путем дифракционе слике. Еритроцити су изоловани како је претходно описано (одељак Материјал и Методе 3.1.3), затим је припремљена суспензија од 6 μL пакованих еритроцита у 600 μL поливинилпиролидона (PVP), и мерења су извршена користећи ектацитометар RheoSCAN-D300 (RheoMeditech, Кореја). Конкретно, 500 μL PVP суспензије пакованих еритроцита је сипано у микроканалну кивету и стављено у ектацитометар. Ширина микроканала је износила 200 μm. За сваки специфични напон смицања снимљена је дифракциона слика (Слика 16а и б). Време аквизиције за једну дифракциону слику износило је 1s. Из сваке слике (снимљене при одређеном напону смицања) израчуната је вредност EI. Једно мерење на различитим напонима смицања захтева 100 дифракционих слика за ефикасну конструкцију криве деформабилности. Након 90 слика (снимљених по једном мерењу), вредности EI се не мењају превише са променом напона смицања и конвергирају ка некој вредности. Крива деформабилности осликава механичке карактеристике еритроцита кроз промену деформабилности при различитим вредностима напона смицања. За процену EI из сирових података може се користити Линевер-Бурков фит (Baskurt и сар., 2009), који представља двоструки линеарни облик Хилове функције, на којем се овај фит заснива. Међутим, дупла линеаризација повећава грешку процене реалних вредности EI и стога није најтачније средство за представљање кинетике (Gresco и сар., 1979) или било ког другог процеса. Из прилагођених крива деформабилности одређени су сви параметри као што су: SS на половини максимума вредности криве деформабилности ($\frac{1}{2}$ SS), вредност EI на половини максимума криве деформабилности ($\frac{1}{2}$ EI), вредност EI на притиску од 3 Pa и први извод EI по SS (dEI/dSS), такође на половини максималне вредности криве деформабилности. Формула за израчунавање EI дата је у Једн. 1. (Shin и сар., 2005). EI се израчунава из дифракционих слика при одређеном SS (једначина 2). dEI/dSS при одређеном SS се израчунава користећи метод коначних разлика.



Слика 16. Дифракционе слике усредњене популације еритроцита снимљене ектацитометром а) еритроцити без примењеног напона смицања, б) еритроцити снимљени при максималном напону смицања (18 Pa). Елонгациони индекс EI израчунат је на основу величине оса а и b, изражене у пикселима и дат је једначином 2.

$$EI = \frac{a-b}{a+b} \quad (2)$$

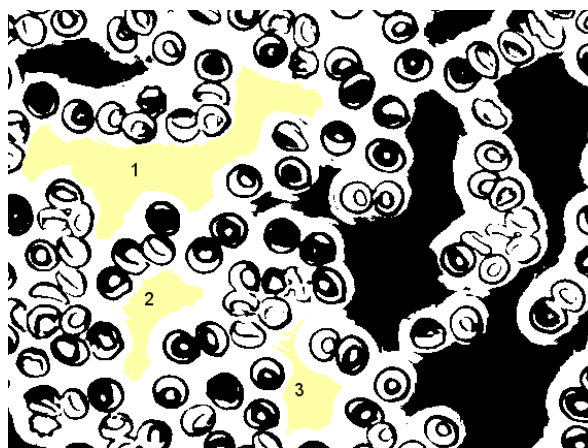
3.3.9. Проточна цитометрија еритроцита без примене обележивача

Проточном цитометријом рађена је анализа необележених здравих донора крви. Еритроцити су анализирани или нетретирани (у свом физиолошком стању) или након третмана оксидансом 0,5 mM ТВНР. Анализирање добијених резултата извршено је на основу протокола Drvenica и сар (2021). Да би се превазишло ограничење проточне цитометрије за анализирање еритроцита, који због карактеристичног биконкавног облика, дају сигнал бимодалне дистрибуције, еритроцити су инкубирани у хипоосмотском 93 mM натријум фосфатном пуферу. У овом пуферу еритроцити бубре и мењају облик из биконкавног у сферични али не хемолизују, услед чега се популација еритроцита види као унимодална (Drvenica и сар., 2021). Модел проточног цитометра који је коришћен у истраживањима је BD FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lake NJ, SAD). Екситација је била подешена на 488 nm. Параметри који су анализирани су: расејана светлост која се простире напред и пролази кроз еритроците (*енгл.* forward scatter FSC) и светлост која се са стране одбија о еритроците side scatter (*енгл.* side scatter SSC). Као додатну параметар за анализу необележених еритроцита, увели смо и површину флуоресцентног пика нетретираних еритроцита и еритроцита третираних оксидансом ТВНР као и узорача еритроцита у коме су помешане једнаке запремине нетретираних еритроцита и еритроцита истог донора третираних 0,5 mM ТВНР. Користили смо спектрални канал са следећим таласним дужинама екситације и емисије: екс = 488 nm/ем = 525 nm. Површина пика флуоресценције је коришћена као индиректна мера величине флуоресцентних честица (Kang и сар., 2010). Проточни цитометар мери интензитет флуоресценције у времену који се може представити као импулс, карактерисан излазним сигналом детектора током проласка флуоресцентне честице кроз ласерски сноп. Интензитет сигнала расте како ћелија пролази кроз ласерски зрак и враћа се на базични ниво по изласку из снопа. Сигнал интензитета флуоресценције је детектован од стране PMT који је интегрални део проточног цитометра. PMT мери промену напона генерисану од стране фото-електрона у времену. У следећој фази

обrade, сигнал се дискретизује и класификује према одређеном параметру као што је површина пика флуоресценције. Претпоставили смо да је површина пика флуоресценције директно пропорционална величини честице. Што се честица дуже задржава у ласерском снопу то је већа површина флуоресцентног пика. Подаци су анализирани користећи Flow Jo софтвер (v10.8.1) и Graph Pad Prism 7. Најмање 100.000 догађаја (ћелија и/или ћелијских везикула и/или агрегираних ћелија) је забележено по узорку.

3.3.10. Фазно-контрасна микроскопија еритроцита

Морфологија еритроцита као и степен агрегације услед оксидације применом ТВНР одређен је коришћењем фазно контрастне микроскопије. Коришћен је микроскоп Olympus Europa Holding GmbH, Хамбург, Немачка, са моделом камере Quick PHOTO Camera 2.3 (PROMICRA, Праг, Чешка Република). Обрада слика еритроцита са фазно контрастног микроскопа урађено је коришћењем Фиџи софтвера (2.9.0). Сlike су прво трансформисане Phase mask трансформацијом, а затим је израчуната површина црних региона са слике, односно региона који не садрже ћелије, као што је приказано на слици 17. За сваку слику израчуната је површина црних региона на не мање од три региона, и средња вредност површине изражена у μm^2 је узета у разматрање. Обрађене су по три слике на којима је анализирано више различитих региона од интереса којима је рачуната површина у пикселима.

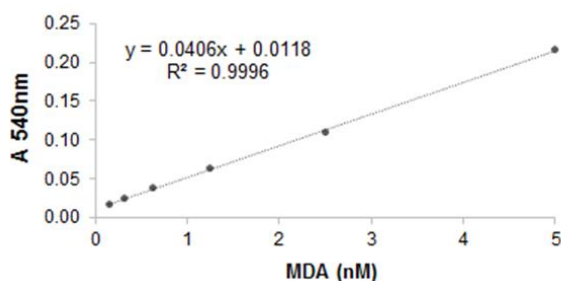


Слика 17. Одређивање степена агрегабилности ћелија, мерењем површине региона који не садржи ћелије (жути региони означени 1,2,3).

3.3.11. Одређивање концентрације TBARS (енгл. Thiobarbituric Acid Reactive Substances) у оксидованим еритроцитима

TBARS методом је анализиран ниво оксидације липида мембране еритроцита. Ова метода се заснива на детекцији секундарних продуката пероксидације липида као што је MDA. MDA формира једињења са тиобарбитуратном киселином—ТВА (енгл. thiobarbituric acid) чије присуство се детектује спектрофотометријски. За екстракцију липидних пероксида из узорака лизата еритроцита, прво су припремљени 48 пута разблажени лизати еритроцита мешањем 100 μL узорка са 4,7 mL физиолошког раствора. По 100 μL разблажених лизата еритроцита помешано је 500 μL 28% трихлор-сирћетна киселине – ТСА (енгл. Trichloroacetic acid). Узорци

су инкубирани 35 min, на леду, уз мешање на вортексу на сваких 10 min. Након завршене инкубације узорци су центрифугирани 10 min, на 15000 rpm, на 4 °C, а затим је по 200 µL супернатанта пребацивано у нову епрувету у коју је додавано по 50 µL 1 % ТВА у 0,05 М NaOH (запремински однос 4:1). Овај раствор је инкубиран 30 min на 95°C у воденом купатилу, а затим су охлађени. По 100 µL раствора је пренето у микротитарске плоче и мерена је апсорбанца на 540 nm. Исти поступак примењен је и на слепу пробу и на стандардне растворе (0,16-5 nM) MDA, а на основу добијених резултата конструисана је стандардна права (Слика 18) и израчуната концентрација липидне пероксидације у узорцима.



Слика 18. Стандардна права зависности A_{540} од концентрације MDA.

3.3.12. Тест осмотске фрагилности

Тест је изведен на следећи начин: 20 µL суспензије еритроцита додато је у епрувете које су садржале 5 mL раствора са опадајућим концентрацијама NaCl (0,90%, 0,80%, 0,75%, 0,70%, 0,65%, 0,60%, 0,55%, 0,50%, 0,45%, 0,40%, 0,35%, 0,30%, 0,25%, 0,20%, 0,10% и дестилована вода). Након додавања суспензије, све епрувете су хомогенизоване мешањем и остављене да се инкубирају 20 min на собној температури након чега су центрифугиране 5 min на 2000 rpm. Супернатанти, који садрже хемоглобин из лизираних еритроцита пажљиво су одвојени пипетирањем од талога са нелизираним еритроцитима и одређена им је апсорбанца на 540 nm. Апсорбанца хемолизата добијена лизом еритроцита у дестилованој води је коришћена као референтна вредност од 100% хемолизе, док је проценат хемолизе у сваком од раствора NaCl израчунат према следећој једначини (3):

$$\% \text{ хемолизе} = \left(\frac{A_{540} \text{ тестираног супернатанта}}{A_{540} \text{ хемолизата у дестилованој води}} \right) * 100 \quad (3)$$

На основу добијених података конструисане су криве осмотске фрагилности које представљају зависност (%) хемолизе од концентрација NaCl (%). Концентрација NaCl при којој се постиже 50% од максималне хемолизе, означена као H50, добијена је на основу Болтсманове сигмоидалне нелинеарне регресионе анализе експериментално добијених података OriginPro 8 софтвером (OriginLab, SAD).

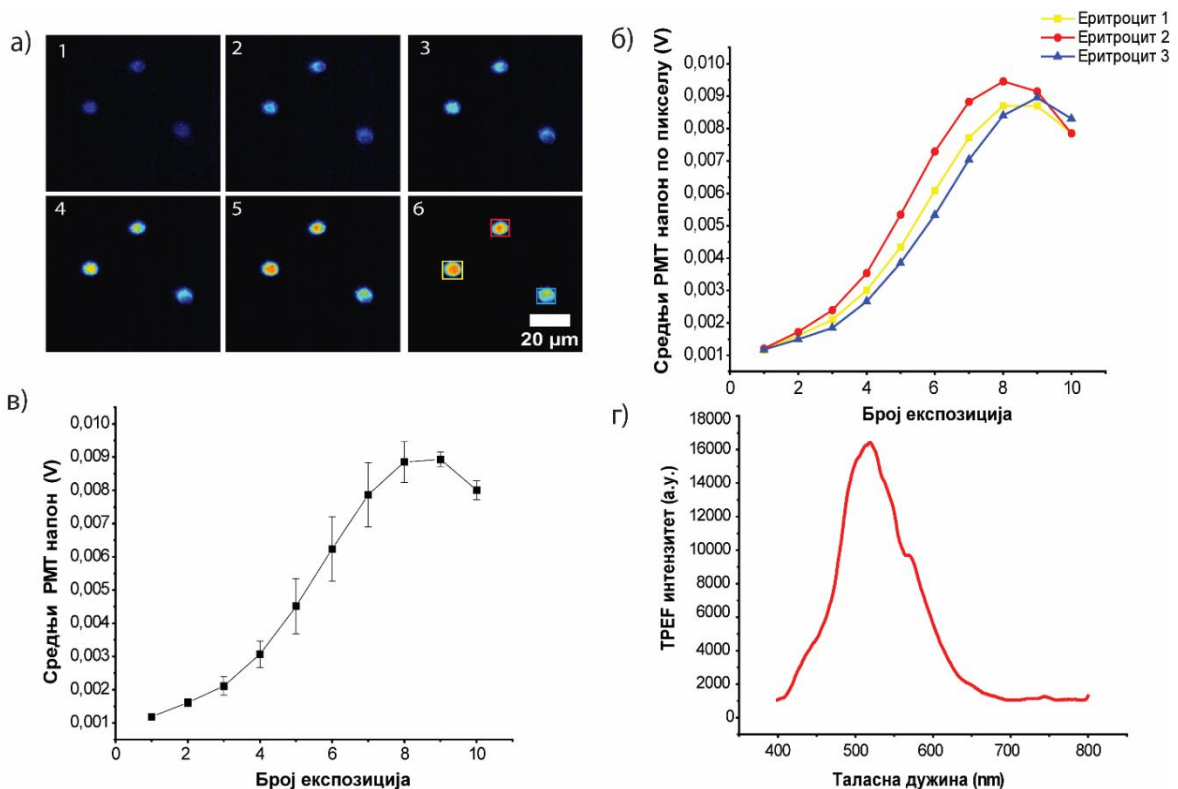
3.3.13. Статистичка анализа резултата

Већина статистичких анализа урађена је у софтверу R, верзији 4.3.2. Овај софтверски пакет има главну употребу у рачунарској статистици (*енгл.* Statistical computing). Резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна девијација. Примењена је анализа за проверу нормалности података, користећи Shapiro–Wilk тест. Статистичке разлике између група за анализу елонгационог индекса здравих донора и дијабетичара одређене су користећи two-tailed t-тест или two-tailed t-test или Mann–Whitney U тест у зависности од резултата претходне анализе нормалности података. Разлике у p вредности $< 0,05$ су приказане као статистички значајне. За корелациону анализу такође је урађен тест нормалности података и у зависности од резултата теста корелација између испитиваних параметара одређена је помоћу Pearson теста (r – Pearson коефицијент) или помоћу Spearman rank-order correlation теста. Статистичке анализе резултата проточне цитометрије урађене су користећи софтвер Graph PadPrism 9. У складу са протоколом Drvenica и сар. (2021) израчунати су скјунис (*енгл.* skewness) и куртозис (*енгл.* kurtosis) за FSC дистрибуцију. Анализирани опсег био је 400-1000 догађаја, чиме су из анализе искључени агрегати и ћелијски дебрис. Статистичке анализе између нетретираних еритроцита и еритроцита третираних ТВНР је рађена two-tailed paired t-тест, p вредност $< 0,05$ је узета као мера статистичке значајности.

4. Резултати

4.1. Осликавање еритроцита и мерење емисионих спектра применом ТРЕФ микроскопије

ТРЕФ микроскопију разблажене пуне крви смо урадили у првим фазама овог истраживања да бисмо у нашим експерименталним условима потврдили раније показану примењивост ТРЕФ микроскопије за осликавање еритроцита (Vigil и сар., 2015, Вукара и сар., 2017). Пуна крв је разблажена како би се добила суспензија у којој еритроцити нису агрегирани и где се појединачни еритроцити могу јасно уочити (Слика 19а).



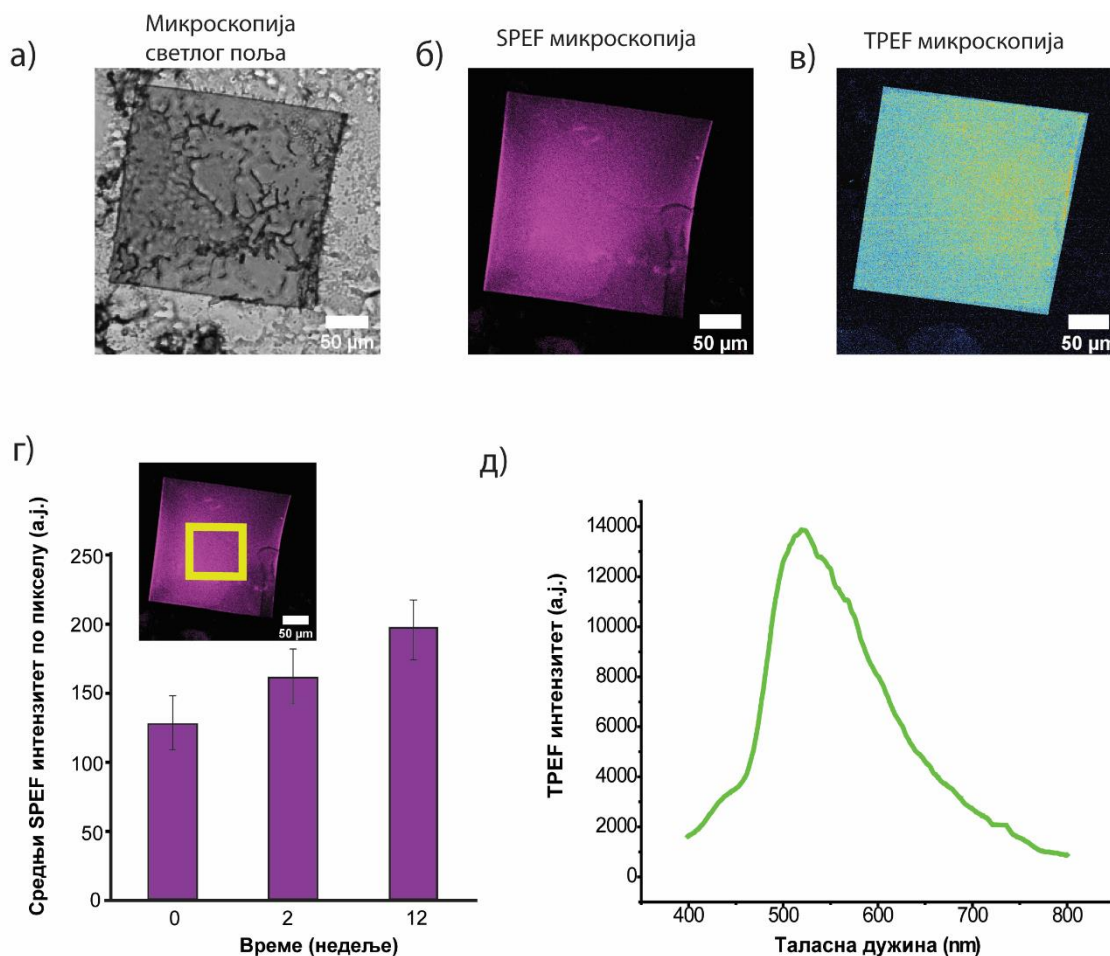
Слика 19. ТРЕФ микроскопија еритроцита. а) Сlike еритроцита (1 до 6) добијене ТРЕФ микроскопијом. Резолуција слика је 1024×1024 пиксела, настала је из 30 усредњавања са временом задржавања ласера у сваком пикселу од $8,53 \times 10^{-4}$ s. Укупно време за снимање сваке слике било је 26,1 s, што представља основну јединицу експозиције (број експозиције 1 означава време за снимање једне слике, односно 26,1 s). Интензитет флуоресценције је приказан псеудобојама РМТ вредности напона за сваки пиксел (тамно плава – најнижи ТРЕФ сигнал, црвена – највиши ТРЕФ сигнал). б) Средње вредности пиксела РМТ напона пропорционалне су ТРЕФ интензитету за сваки регион од интереса (жути, црвени и плави квадрат) приказани у (а₆), представљене су кривом одговарајуће боје. Средње вредности пиксела су израчунате за регију од интереса (*енгл.* Region of Interest-ROI), (жути, црвени и плави квадрати) и за сваку слику, величина квадрата је 100×100 пиксела, в) Црна крива представља средње вредности интензитета пиксела за три еритроцита приказана у (б), г) ТРЕФ емисиони спектар снимљен у

произвољно одабраној тачки у једном еритроциту, коришћењем адаптације микроспектралног мерења.

Постепени пораст ТРЕФ флуоресценције озрачених еритроцита са бројем експозиција добијен приликом ласерског скенирања узорка, приказан је на слици 19 в. Овај резултат је у складу са већ демонстрираним повећањем интензитета флуоресценције у еритроцитима при озрачивању ултракратким ласерским импулсима и формирањем такозваног хемоглобинског фотопродукта (Shirshin и сар., 2018). Овде је пораст ТРЕФ сигнала приказан кроз зависност РМТ напона од броја експозиција (Слика 19 б), јер је РМТ напон директно пропорционалан интензитету флуоресценције насталог фотопродукта, чиме је потврђено да са порастом броја експозиција расте интензитет ТРЕФ емисије. Просечни РМТ напон за сваки појединачни еритроцит, односно крива интензитета флуоресценције је приказана на слици 19б. Поред тога, добијен је ТРЕФ емисиони спектар (Слика. 19 г) коришћењем ССД спектрометра са оптичким влакнима монтираног на нелинеарни микроскоп, схематски приказаног на слици 13 (у оквиру означеног правоугаоника).

4.2. Формирање фотопродукта услед интеракције ултракратких ласерских импулса са танким филмовима хемоглобина

У циљу потврде хипотезе да ТРЕФ флуоресценција, као и повећање њеног интензитета потиче од фотопродукта који је настао при интеракцији еритроцита са ултракратким ласерским импулсима, таласне дужине 730 nm, а не од других молекула, урадили смо експерименте у којима су анализирани, не еритроцити већ изоловани хемоглобин. У ту сврху, квадратни образац је ласерски угравирани у танак филм хемоглобина на просторно временски контролисан начин: 1024×1024 пиксела при средњој снази ласера од 20 mW (Слика 20 а). Снимљене су и једнофотонске (SPEF микрографије) (Слика 20 б) и ТРЕФ микрографије (Слика 20 в). Поступак снимања је поновљен 10 пута (број експозиција) након што је максимални интензитет ТРЕФ постигнут после 8 скенирања, након чега је интензитет ТРЕФ почео да опада услед фото избељивања (Слика 19 в). Да бисмо демонстрирали да се ТРЕФ емисија одвија само у региону који је био изложен ултракратким ласерским импулсима, величина видног поља је проширена, тј. скенирани регион је проширен, средња ласерска снага је смањена на 2,5 mW и снимљена је ТРЕФ слика (Слика 20 в). Поред тога, снимање у режиму светлог поља (*енгл. brightfield*) је јасно показало да је скенирани регион постао мање транспарентан у односу на околни хемоглобин (Слика 20 а). Коначно, коришћењем једнофотонске ексцитације на 488 nm, детектовали смо SPEF емисију хемоглобинског фотопродукта формираног само у региону изложеном ултракратким ласерским импулсима, али не и у околном региону (Слика 20 б), љубичасти образац). Овде је значајно напоменути да хемоглобин није природно флуоресцентан (Shirshin и сар. 2018), што је и потврђено у нашим експериментима (Слике 20 б и 20 в на којима тамни регион око флуоресцентног квадрата (фотопродукта) представља површине са неозраченим хемоглобином).



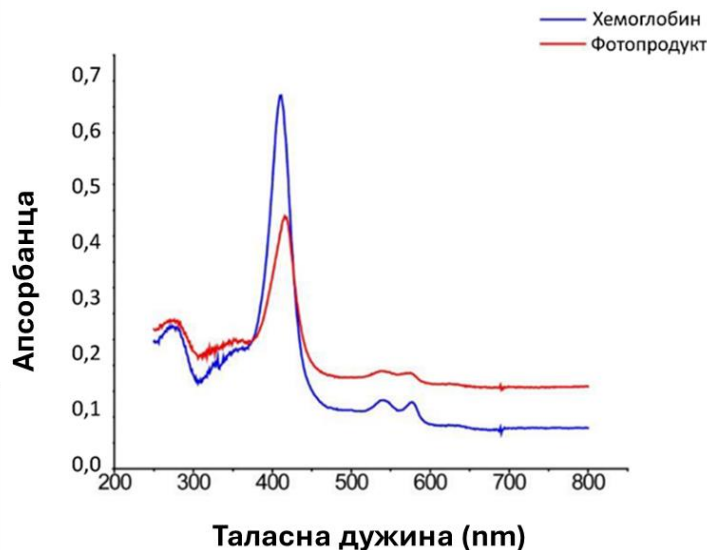
Слика 20. Формирање фотопродукта на танким филмовима хемоглобина. а) Микроскопија у режиму светлог поља приказује да је фотопродукт формиран нелинеарном микроскопијом (тамно сиви квадрат) мање оптички транспарентан од хемоглобина (светло сива околина), б) Једнофотонска емисија SPEF фотопродукта показује да се фотопродукт може једнофотонски побудити на 488 nm (љубичасти квадрат), док хемоглобин не може (црна површина око љубичастиг квадрата), в) TPEF микрографија показује интензивну емисију у жуто-зеленој квадратној области где је формиран фотопродукт, у поређењу са нефлуоресцентним хемоглобином у околини (црно), г) Фотопродукт је стабилан током времена и његове флуоресцентне особине су очуване током дужег времена, што је видљиво из средњег SPEF интензитета по пикселу (мерено у жутој правоугаоној области приказаној на уметку), д) TPEF спектар фотопродукта хемоглобина снимљен у произвољно изабраној тачки у танком слоју.

Формирање фотопродукта зависи од времена експозиције и средње снаге ласера, али и од других параметара који су били константни у нашем експерименту: таласна дужина, учестаност и трајање импулса. Интензитет флуоресценције почиње да расте чак и на самом почетку излагања хемоглобина ултракратким ласерским импулсима. За изоловани хемоглобин, TPEF интензитет хемоглобинског фотопродукта постаје детектабилан при ласерској снази од приближно 10 mW након прве експозиције, што одговара депонованој енергији од 261 mJ на квадрату површине од 62500 μm^2 . Слично као што је добијено при анализи еритроцита, повећање интензитета флуоресценције се постепено повећавало са бројем скенирања, тј. бројем експозиција, тако је график на слици 20 д (хемоглобин) еквивалентан графику

приказаном на слици 19 г (еритроцити). Овакав резултат указује да ултракратки ласерски импулси директно интерагују са хемоглобином, приликом чега долази до формирања фотопродукта у еритроцити. Снимање SPEF слика показало да је хемоглобински фотопродукт стабилан током времена (Слика 20 г). TPEF спектар фотопродукта снимљен у танком хемоглобинском филму је показао максимум на (550 ± 2) nm (Слика 20 д), и био је исти као и максимум TPEF емисионог спектра еритроцита (Слика 19 г). Овај резултат говори да ултракратки ласерски импулси интерагују искључиво са хемоглобином у еритроцитима, формирајући исти фотопродукт, или да је у датим условима интеракција ултракратких ласерских импулса са другим молекулским врстама у еритроцитима занемарљива. Динамика формирања фотопродукта је такође иста у еритроцитима и танком филму хемоглобина, што подразумева постепено повећање интензитета флуоресценције са бројем експозиција које се завршава са платоом засићења.

4.3. UV/VIS апсорпциона спектроскопија TPEF озраченог и неозраченог хемоглобина

UV/VIS апсорпциони спектар „нативног“ хемоглобина (Слика 21; плава крива) при једнофотонској апсорпцији и TPEF озраченог хемоглобина у танком филму (Слика 21; црвена крива) су добијени мерењем изван и унутар формираног квадратног региона приказаних на сликама 20 б и 20 в. Термин озрачени хемоглобин је коришћен због поступка мерења апсорпционих спектра. Како је фотопродукт формиран у танком слоју хемоглобинског филма, и хемоглобин и фотопродукт се налазе на истом оптичком путу. Поред тога, део хемоглобина остаје неконвертован у фотопродукт, чак и у третираној запремини. Због тога снимљени апсорпциони спектар не потиче искључиво од фотопродукта, већ од обе молекулске форме, фотопродукта и хемоглобина заједно.



Слика 21. UV-VIS апсорпциони спектар хемоглобина (плава крива) и фотопродукта тј. озраченог хемоглобина (црвена крива).

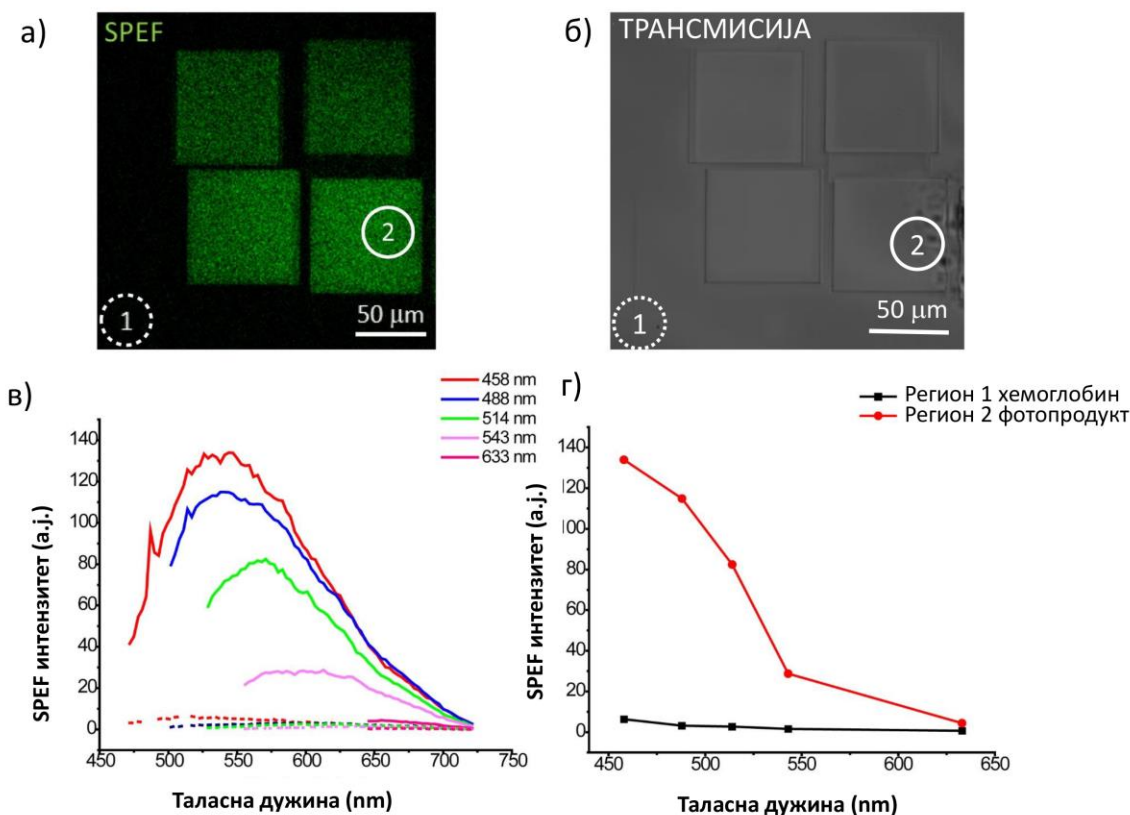
Како је и очекивано, UV/VIS апсорпциони спектар хемоглобина у танком филму је имао спектралне карактеристике оксихемоглобина (о_{ху}Н_б): апсорпциони максимуми у UV региону са максимумом на ≈ 275 nm због $\pi \rightarrow \pi^*$ прелаза и неколико апсорпционих максимума, као што је максимум на 350 nm који се приписује апсорпцији нековалентне везе између гвожђа и хистидина у глобинским ланцима; Soret или B пик на (410 ± 2) nm и Q пик са два прелаза, β пик на 539 nm и α пик на 577 nm (Hanson и сар., 2010) (Слика 21; плава крива). У UV/VIS апсорпционом спектру TPEF озраченог хемоглобина су уочене јасне разлике у односу на неозрачен хемоглобин у интензитету опсега и/или положају максимума (Слика 21, црвена крива). Уочен је померај ка црвеном делу спектра у вредности од 7 nm Soret-овог максимума у озраченом делу филма са значајним смањењем интензитета (табела 2). Пикови у видљивом делу апсорпционог спектра хемоглобина потичу од хем групе, а промене у њиховим положајима и интензитетима су индикатори померања дуж координата порфиринског прстена (Hanson и сар., 2010). Однос $\Delta\alpha/\Delta\beta$ је био < 1 и за хемоглобин и за хемоглобин након озрачивања ултракратким ласерским импулсима (табела 2). Ипак, овај однос у озраченом делу танког филма је био значајно нижи него у нетретираним хемоглобину што указује на деградацију хемоглобина након интеракције са ултракратким ласерским импулсима. Наведено померање Soret-овог максимума од 7 nm ка црвеној области у третираном делу танког филма указује на трансформацију оксигенисаних у оксидоване хемоглобинске врсте (Hanson и сар., 2010, Drvenica и сар., 2019, Bonaventura и сар., 2013). Смањен однос $\Delta\alpha/\Delta\beta$ озраченог хемоглобина у поређењу са нетретираним хемоглобином указује на присуство слободног хема и распад молекула хемоглобина (Hanson и сар., 2010).

Табела 2. Карактеристични апсорпциони максимуми UV/VIS апсорпционих спектра фотопродукта и хемоглобина. Приказане су средња вредност и стандардна девијација за четири независна мерења.

Апсорпциони максимуми позиција / интензитет	Хемоглобин	Озрачени хемоглобин који садржи фотопродукт
$\lambda_{max}^{UV} / \text{nm}$	273 ± 2	272 ± 2
$\lambda_{max}^{His} / \text{nm}$	351 ± 2	351 ± 2
$\lambda_{max}^{Soret} / \text{nm}$	410 ± 2	417 ± 2
$\lambda_{max}^{Q\beta} / \text{nm}$	539 ± 2	538 ± 2
$\lambda_{max}^{Q\alpha} / \text{nm}$	577 ± 2	576 ± 2
A_{max}^{UV}	$0,226 \pm 0,003$	$0,237 \pm 0,001$
A_{max}^{His}	$0,179 \pm 0,008$	$0,200 \pm 0,002$
A_{max}^{Soret}	$0,671 \pm 0,002$	$0,438 \pm 0,001$
$A_{max}^{Q\beta}$	$0,082 \pm 0,007$	$0,139 \pm 0,003$
$A_{max}^{Q\alpha}$	$0,079 \pm 0,001$	$0,134 \pm 0,003$
A_{560}	$0,063 \pm 0,002$	$0,132 \pm 0,005$
$\Delta A_{Q\alpha} / \Delta A_{Q\beta}$ $= (A_{max}^{Q\alpha} - A_{560}) / (A_{max}^{Q\beta} - A_{560})$	$0,804 \pm 0,027$	$0,371 \pm 0,014$
$A_{max}^{Soret} / A_{max}^{Q\alpha}$	$8,506 \pm 0,046$	$3,254 \pm 0,007$
$A_{max}^{Soret} / A_{max}^{UV}$	$2,962 \pm 0,042$	$1,848 \pm 0,014$

4.4. Емисиони спектри фотопrodukта при једнофотонској ексцитацији (SPEF) добијени помоћу спектралног осликовања-конфокалном микроскопијом

Квадратни флуоресцентни образац фотопrodukта (Слика 22 а и б), претходно формиран излагањем хемоглобина ултракратким ласерским импулсима снимљен је коришћењем конфокалне микроскопије тј. једнофотонске ексцитације (Слика 22 а). SPEF емисиони спектри хемоглобина су снимљени за различите ексцитационе таласне дужине (Слика 22 в) у тачно дефинисаним регионима од интереса: из региона где се налази хемоглобин (ROI 1, испрекидан круг) и из региона где се налази фотоподукт (ROI 2, пуни круг). Зависност ефикасности ексцитације је конструисана издвајањем максимума емисије на различитим ексцитационим таласним дужинама (Слика 22 г).



Слика 22. Спектрално осликовање квадратног обрасца фотопrodukта насталог озрачивањем хемоглобина. а) Флуоресцентна слика квадратног обрасца фотопrodukта снимљена при побуди од 458 nm: испрекидани круг представља регион од интереса 1 (ROI 1) који представља хемоглобин који није изложен ултракратким ласерским импулсима при условима потребним за формирање фотопrodukта, док пуни круг представља регион интереса 2 (ROI 2) који представља хемоглобин изложен ултракратким ласерским импулсима и јасно се разликује флуоресценцијом фотопrodukта, б) Слика фотопrodukта и његове околине снимљена микроскопијом у режиму светлог поља в) Емисиони спектри једнофотонске побуде за различите таласне дужине, издвојени из ROI 1 (испрекидана линија) и из ROI 2 (пуна линија), г) Ефикасност једнофотонске побуде, максимални интензитет емисије при различитим побудним таласним дужинама, где црна линија представља хемоглобин, а црвена фотоподукт.

SPEF емисиони спектар снимљен коришћењем ексцитационе таласне дужине, $\lambda_{exc} = 458 \text{ nm}$, показао је максимум флуоресцентне емисије на $\lambda_{em} = 550 \text{ nm}$ и широк емисиони опсег (црвена крива са слике 22 в), што је било у сагласности са TPEF емисионим спектром (Слика 20 д). Емисиони спектри снимљени коришћењем ексцитационих таласних дужина већих од 458 nm , $\lambda_{exc} > 458 \text{ nm}$, имали су максимуме емисије који су благо померени ка црвеној области са повећањем таласних дужина ексцитације, што можда сугерише да је хемоглобински фотопродукт заправо садржи неколико спектрално различитих молекула. Постојање више од једне молекулске врсте је потврђено апсорпционом спектроскопијом и у складу је са резултатима из литературе (Hanson и сар., 2010, Bonaventura и сар., 2013). Поред тога, ако би се побуђивала различитим таласним дужинама, једна молекулска врста би дала само промену у интензитету флуоресценције, док би положај спектралног максимума остао непромењен, што код фотопродукта насталог озрачивањем хемоглобина TPEF није случај.

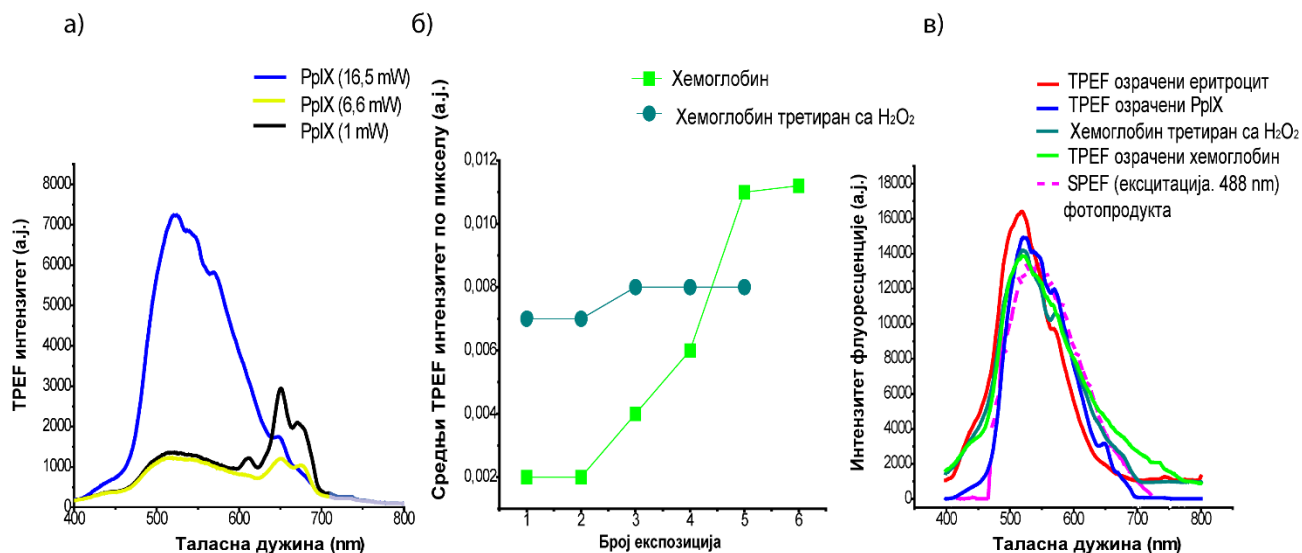
4.5. TPEF спектроскопија протопорфирина IX (енгл. Protoporphyrin IX, PPIX)

Да би се окарактерисала (потврдила или оповргла) улога јона гвожђа који се налази у саставу хема, протетичне групе хемоглобина приликом формирања фотопродукта, испитивана је интеракција ултракратких ласерских импулса са PPIX, једињењем које се састоји од тетра – пиролових прстена, које улази у састав хема, али у чијем саставу се не налази јон гвожђа. Добијени TPEF емисиони спектар PPIX (Слика 23 а; плава крива) показује сличности али и одступања од TPEF спектра фотопродукта (Слика 20 д). За разлику од хемоглобинског фотопродукта, PPIX се лако побуђује и TPEF емисија се одмах детектује чак и при ниским интензитетима ласера (Слика 23 а; црна крива). Међутим, TPEF емисија уочена при ниским интензитетима ласера потиче углавном од неизмењених PPIX молекула, као што су потврдили и Lu и сар., (2020). Када се користи већа снага ласера (око $16,5 \text{ mW}$), TPEF емисиони спектар PPIX се значајно мења: постаје шири и са позицијом максимума од око 550 nm (Слика 23 а, жута крива), што подсећа на TPEF емисиони спектар фотопродукта хемоглобина (Слика 20 д). Овакав резултат указује да интензивно зрачење PPIX доводи до стварања PPIX фотопродукта који је сличан фотопродукту насталом интеракцијом ултракратких импулса са молекулом хемоглобина, тако да јон гвожђа највероватније није неопходан за формирање хемоглобинског фотопродукта.

4.6. TPEF спектроскопија хемоглобина третираног водоник-пероксидом (H_2O_2)

Резултати претходних студија су показале да третман хемоглобина са H_2O_2 доводи до формирања флуоресцентних молекулских форми (Nagababu и сар., 1998, Nagababu и сар., 2000). Да бисмо утврдили да ли слични фотопродукти настају приликом третмана хемоглобина са H_2O_2 као и приликом интеракције са ултракратким ласерским импулсима, упоредили смо како се TPEF интензитет мења са повећањем времена експозиције (Слика 23 б) и TPEF емисионе спектре (Слика 23 в) еритроцита, хемоглобина и PPIX. За разлику од танког филма хемоглобина, где је уочено повећање интензитета флуоресценције и засићење на крају уочено (Слика 23 б; светлозелени квадрати), флуоресценција хемоглобина третираног са H_2O_2 указује на висок TPEF емисиони интензитет одмах након побуде, чак и при првој експозицији (Слика 23 б; маслинасто зелени кругови). Повећање флуоресценције у танком хемоглобинском филму (Слика 23 б; светлозелени кругови), показује исти тренд као и повећање флуоресценце у еритроцитима (Слика 23 в). Мало одступање које је видљиво је највероватније последица различитог броја тачака на графику и концентрације хемоглобина у еритроцитима и танком

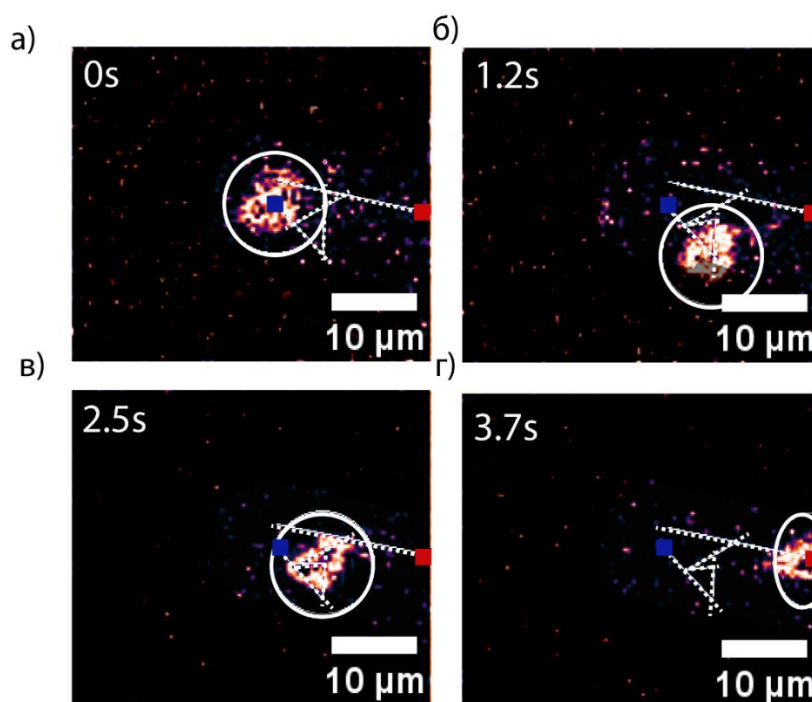
хемоглобинском филму. Уочени ТРЕФ интензитет хемоглобина третираног H_2O_2 није показивао зависност од броја експозиција, односно од апсорбоване дозе ултракратких ласерских импулса. Ово потврђује хипотезу о фотодеградацији хемоглобина, укљученој у формирање фотопродукта, јер интеракција између хемоглобина са 10 (или више) пута H_2O_2 у вишку доводи до деградације хемоглобина према Nagababu и сар. 2000. Коначно, ТРЕФ спектар танког филма хемоглобина третираног са H_2O_2 показао је поклапање са ТРЕФ спектрима фотопродукта на танком хемоглобинском филму, у еритроцитима и PpIX слојем при снази ласера од 16,5 mW (Слика 23 в).



Слика 23. Спектралне карактеристике фотопродукта и структурно сличних једињења. а) PpIX ТРЕФ емисиони спектри снимљени на различитим снагама ласера, б) Зависност интензитета флуоресценције у односу на број експозиција, танког слоја хемоглобина (светло зелена крива и хемоглобина третираног са H_2O_2 (тамно зелена крива), в) Преклољени емисиони спектри.

4.7. Просторно праћење фото-обележених еритроцита у пуној крви

Захваљујући високој фотостабилности фотопродукта добијеног интеракцијом ултракратких ласерских импулса са хемоглобином (Слика 20 г) и високој просторновременској резолуцији нашег TPEF скенирајућег микроскопа, извели смо праћење индивидуално фото-обележених еритроцита у пуној крви, *in vitro* (Слика 24 а-г). Приказане су 4 слике које представљају кретање једног селективног обележеног еритроцита. Овај приступ је инспирисан радом Zeng и сар. (2012), у коме је приказан проток еритроцита у васкулатури живог организма (zebrafish), али само са статичним сликама, док се у овој студији уводи и праћење динамике кретања (Слика 24).

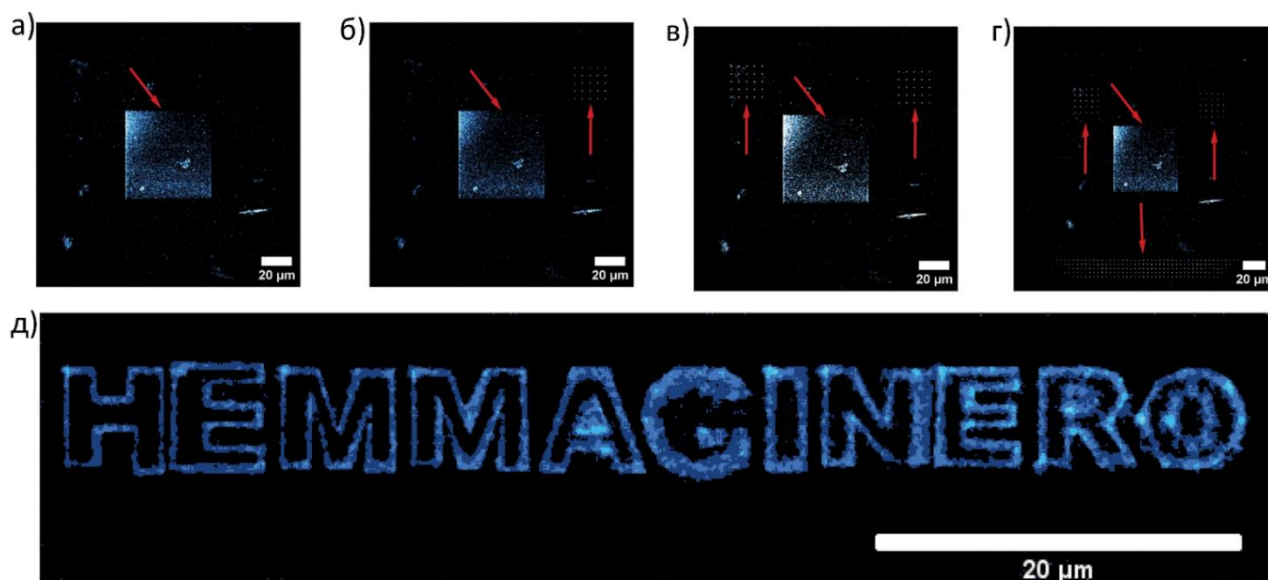


Слика 24. Временско праћење једног еритроцита у пуној крви (обележено белим кругом) (а-г). Беле испрекидане линије представљају путању еритроцита са почетном позицијом (плави квадрат) и коначном позицијом (црвени квадрат).

4.8. Уцртавање образаца микронских димензија у танке филмове хемоглобина

Дугорочна фотостабилност фотопродукта хемоглобина, омогућили су још једну потенцијалну примену, тзв. ласерско – микрогравирање танких слојева хемоглобина (Слика 25). Угравирани микрообрасци могу остати флуоресцентни чак и неколико месеци након што су угравирани у танак слој хемоглобина. На слици 25 а-д су представљени једноставни, тачкасти обрасци поред униформне квадратне површине хемоглобина. Тачке су добијене из дифракцијом ограничене фокусне запремине ласера и показују ограничење методе у погледу просторне резолуције. На свакој слици је додат нови тачкасти образац, док су претходни обрасци и даље јасно видљиви. Да би се демонстрирала могућности и свестраност методе, као и потенцијалне примене, угравирана су слова „HEMMAGINERO“ (димензија $60 \mu\text{m} \times 6 \mu\text{m}$) у слоју танком слоју хемоглобина (Слика 25 д). Стога се на просторно – временски контролисан

начин успешно формирају флуоресцентни микронски обрасци на танким слојевима хемоглобина. Микрогравирање на танким слојевима хемоглобина се показало као иновативан начин формирања произвољних флуоресцентних структура.



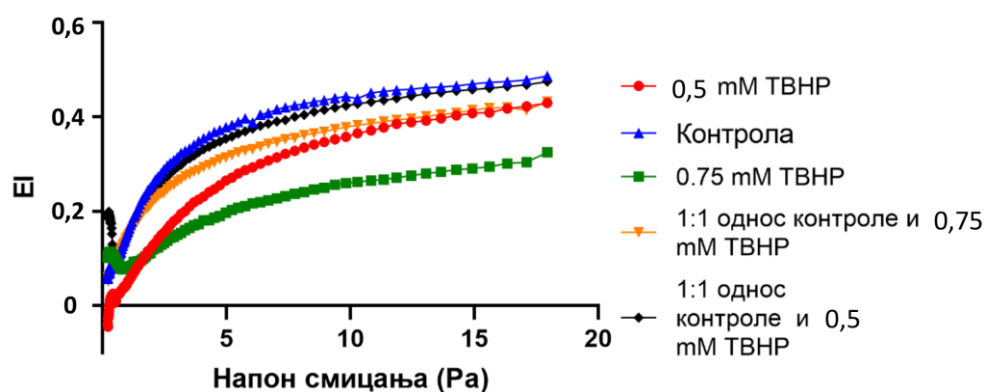
Слика 25. Микро-гравирање у танком слоју хемоглобина помоћу ултракратких ласерских импулса. (а-д) Произвољни униформни и тачкасти патерни (означени црвеном стрелицом) уписани у танак слој хемоглобина. Патерни показују повећан ТРЕФ сигнал (означен црвеним стрелицама). е) Флуоресцентни фотопродукт у облику патерна слова (д).

4.9. Деформабилност мембране еритроцита – *in vitro* симулација оксидативног стреса

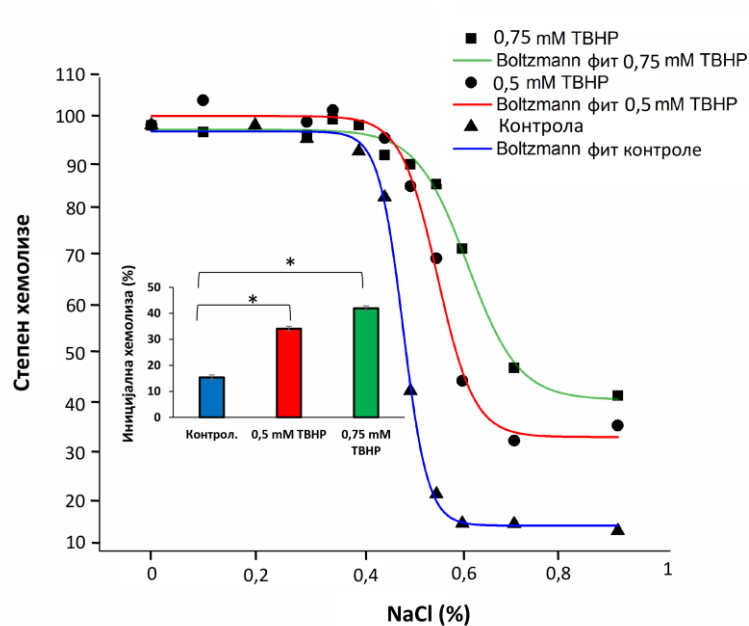
У циљу испитивања постојања везе између оксидације хемоглобина и деформибилности мембране еритроцита, извршена је *in vitro* оксидација еритроцита применом оксиданса ТВНР. Као последица оксидације хемоглобина настаје метхемоглобин и долази до интрамолекуларног умрежавања између метхемоглобина и спектрина, што резултира смањењем флексибилности мембране (Chen и сар., 2007, Maquyama и сар., 2022). Још пре неколико деценија доказано је да третман еритроцита H_2O_2 повећава ригидност и доводи до морфолошких и површинских промена еритроцита, што је највећим делом узроковано оксидацијом хемоглобина и његовим умрежавањем са цитоскелетним протеинима, доминатно спектрином и актином (Snyder и сар., 1985, Shaklai и сар., 1978b), као и са цитоплазматским компонентом Band 3 протеина.

У овој студији, утицај оксиданса ТВНР на деформибилност мембране еритроцита је праћен на основу њиховог одговора на механички стрес мерењем на ектацитометру, а добијени резултати су приказани на слици 26. Као што је претходно поменуто, циљ третмана еритроцита са оксидативним агенсом је био симулирање благог оксидативног стреса, па је због тога праћен утицај ниже концентрације ТВНР као стабилног оксидационог агенса (конкретно 0,5 mM ТВНР-а (Слика 26; црвени кругови).

Концентрација ТВНР од 0,5 mM је изазвала видан пад вредности деформабилности у поређењу са контролом. Утврђено је да након третмана еритроцита 0,5 mM ТВНР, спектри апсорбанције хемолизата указују на присуство метхемоглобина (Слика 31 а). Поред тога, уочен је повећан ниво липидних пероксида у третираним еритроцитима у поређењу са контролним (Слика 31 б), што сугерише да је дошло до оксидације. Третман еритроцита 0,75 mM ТВНР довео је до смањења деформабилности (Слика 26, зелени квадрати), и лизе ћелија, што је потврђено тестом осмотске фрагилности (Слика 27). Важно је напоменути да је анализа смесе нетретираних еритроцита и еритроцита третираног 0,5 mM ТВНР у једнакој запремини (Слика 26, црни ромбови) дала резултат индекса еластичности у опсегу сличном или приближном оном који је уочен за контролне узорке, што је такође случај са смесом нетретираних еритроцита и еритроцита третираног већом концентрацијом (0,75 mM) ТВНР (Слика 26, наранџасти троуглови). Овакав резултат указује на једно од ограничења ектацитометрије-израчунавање криве индекса еластичности као средње вредности за целокупну популацију еритроцита, тако да метода не пружа податке о промењеној деформабилности појединачних еритроцита или одређене субпопулације (Kim и сар., 2015), као што су оксидовани еритроцити изучавани у овој студији.



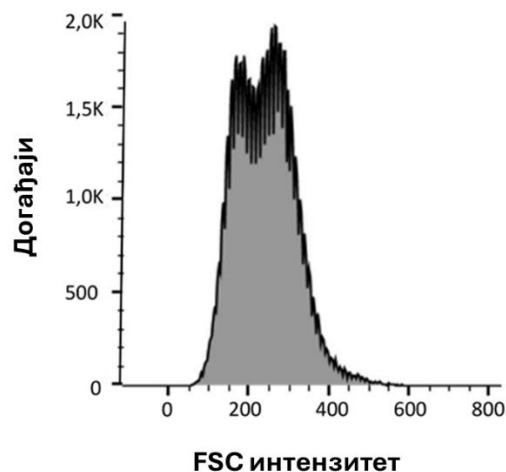
Слика 26. Криве деформабилности мембране нетретираних еритроцита (контрола) и *in vitro* оксидованих еритроцита 0,5 mM ТВНР и 1 mM ТВНР, и узорака који садрже нетретиране и оксидоване еритроците у односу 1:1.



Слика 27. Криве осмотске фрагилности контролних и еритроцита оксидованих применом 0,5 и 0,75 mM TBPH. Приказане су средње вредности \pm стандардна грешка за три експеримента; Резултати Boltzmann сигмоидалне нелинеарне регресионе анализе приказани су испрекиданим линијама.

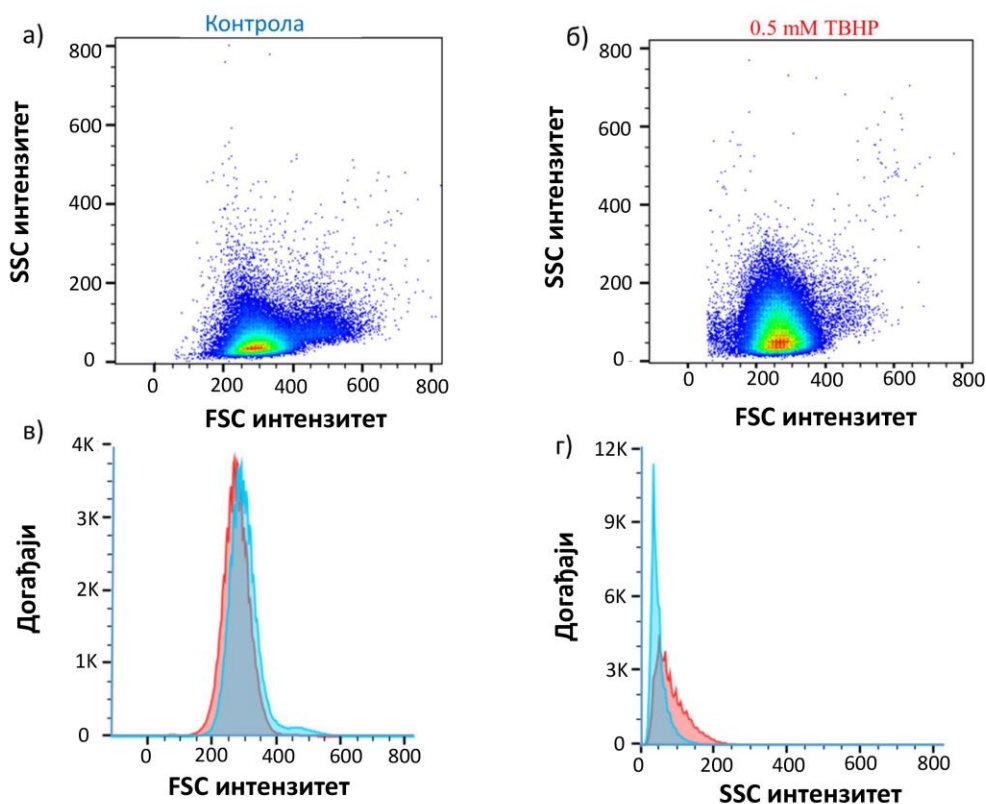
4.10. Проточна цитометрија – анализа FSC и SSC дистрибуције оксидованих еритроцита

Контролни и еритроцити третирани 0,5 mM TBHP су анализирани проточном цитометријом. Када су еритроцити били инкубирани у изотоничном раствору добијена је мултимодална FSC дистрибуција (Слика 28). Мултимодална дистрибуција FSC узрокована је пре свега случајном оријентацијом биконкавних еритроцита приликом протока кроз микроканал цитометра и хидродинамичким силама које утичу на њихову деформацију.



Слика 28. Мултимодална дистрибуција FSC сигнала еритроцита у изотоничном PBS пуферу.

Да би се избегао утицај оријентације еритроцита унутар проточног микроканала и индивидуалних варијација међу донорима на FSC и SSC сигнале (Drvenica и сар., 2021) и контролни и третирани узорци су непосредно пре анализе проточним цитометром пренети у хипоосмотски 93 mM фосфатним пуфером како би добили сферичан облик. Контролни еритроцити који су третирани хипоотоничним 93 mM фосфатним пуфером имали су унимодалну FSC дистрибуцију (Слика 29 в), што је у сагласности са постојећим резултатима Drvenica и сар., 2021, Gienger и сар., 2019, Gibaud 2015).



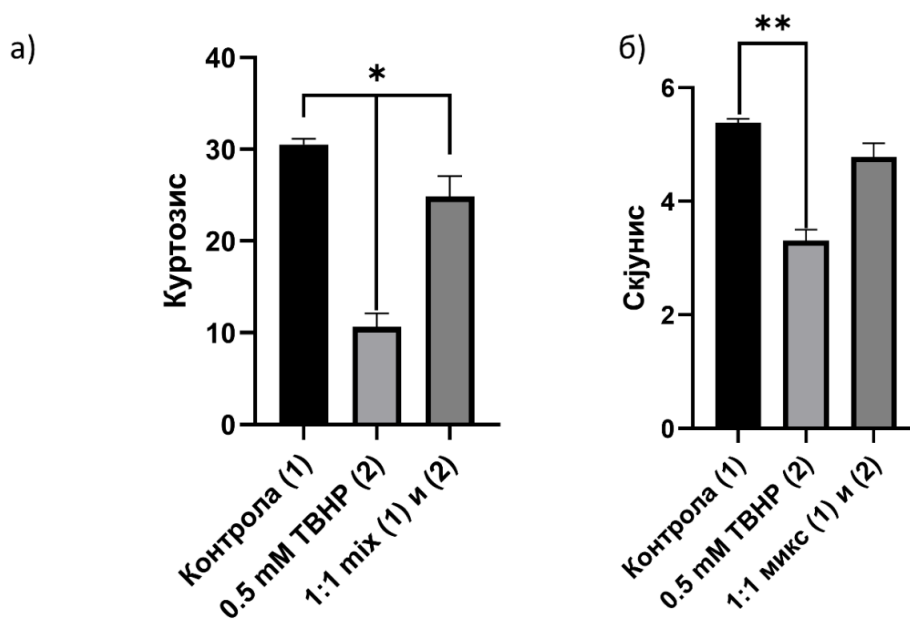
Слика 29. Оптичка својства *in vitro* оксидованих еритроцита мерена проточном цитометријом. а) Scatter plot приказ SSC/FSC дистрибуције контролних еритроцита ($n = 100000$ ћелија, б) Scatter plot приказ SSC/FSC дистрибуције третираних еритроцита 0,5 mM TBHP ($n = 100000$ ћелија), в) Унимодална FSC дистрибуција контролних (плава линија) и третираних еритроцита у хипотоничном раствору (црвена линија), г) SSC дистрибуција контролних (плава линија) и третираних еритроцита (црвена линија) у хипотоничном раствору.

Инкубација еритроцита у хипотоничном PBS раствору резултовала је променом дистрибуције расејане светлости у третираним и контролним узорцима (Слика 29 а и б). На основу хистограма FSC приказаног на слици 29 в, евидентно је да су оксидовани и уједно ригидни еритроцити третирани са 0,5 mM TBHP нешто мањих димензија. Ово смањење величине може се приписати повећању односа површине и запремине, што је већ утврђено да је повезано са смањењем деформабилности ћелија (Waugh и сар., 1987, McVey и сар., 2020). Хистограм SSC вредности добијених за оксидоване еритроцита третиране 0,5 mM TBHP и контролне еритроцита показао је израженију разлику у поређењу са FSC сигналом (Слика 29 г). Могући разлози за то могу бити промене изазване оксидационим третманом: промене облика еритроцита, или промене индекса преламања еритроцита до којих долази због унутарћелијских модификација које су изазване TBHP. До овог закључка смо дошли на основу

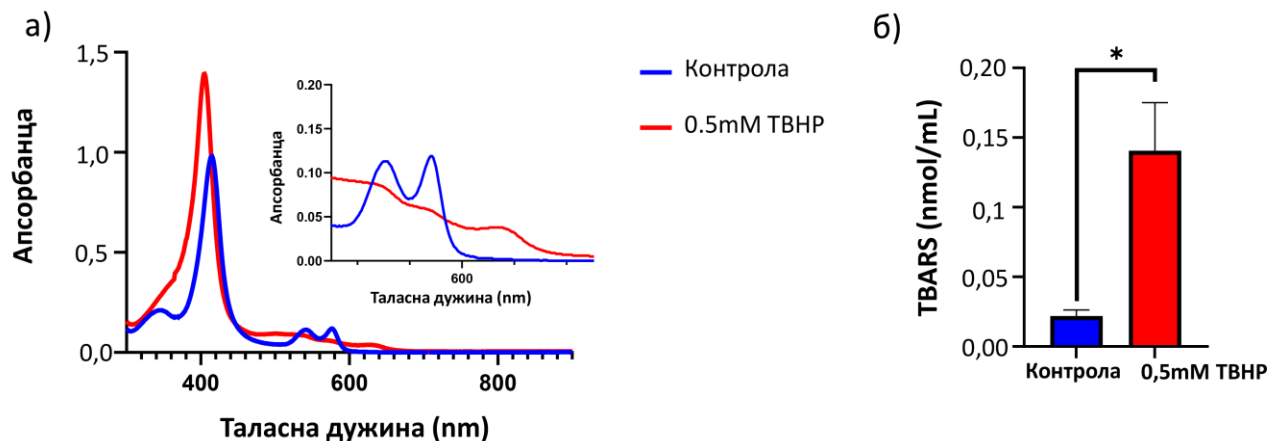
података који показују да расејање светлости под правим углом, карактеристично за SSC сигнал, зависи од облика ћелија и унутрашњих својстава ћелија о које се светлост расејава (De Grooth и сар., 1987).

На основу добијених дистрибуција FSC и SSC у хипотоничном PBS раствору, извршена је анализа два статистичка параметра у вези са сферичношћу еритроцита, скјунис (*енгл.* Skewness) и куртозис (*енгл.* Kurtosis). Куртозис је показао већу осетљивост на оксидацију у поређењу са скјунисом у анализи FSC дистрибуције. Добро је познато да хипоосмотска инкубација еритроцита доводи до смањења куртозиса (Drvenica и сар., 2021) како сферичност еритроцита постаје доминантна морфолошка форма (Ahlgrim и сар., 2013). Истраживања у оквиру ове докторске дисертације су потврдила да услови оксидативног стреса такође утичу на куртозис, са мањим утицајем на скјунис FSC дистрибуције (Слика 30 а и б), вероватно као последица оксидације хемоглобина у метхемоглобин унутар еритроцита (Слика 31 а) као и оксидације липида (.Слика 31 б).

Један од потенцијалних разлога за смањену вредност куртозиса FSC дистрибуције може бити индуковање оксидације хемоглобина и накнадно премештање оксидованог хемоглобина на мембрану ћелије (Maggiuana и сар., 2022). Параметар куртозиса расте са четвртим степеном разлике између средње вредности измерених параметара (Tukey 1977, Erickson и сар., 1992) и осетљивији је на одступања између вредности параметара него скјунис. Сходно томе, куртозис би могао служити као потенцијални параметар за процену ефеката оксидације на дистрибуцију FSC и SSC еритроцита.



Слика 30. Статистички параметри расејања ласерске светлости мерене проточном цитометријом. а) куртозис ($p < 0,05$), скјунис ($p < 0,05$).

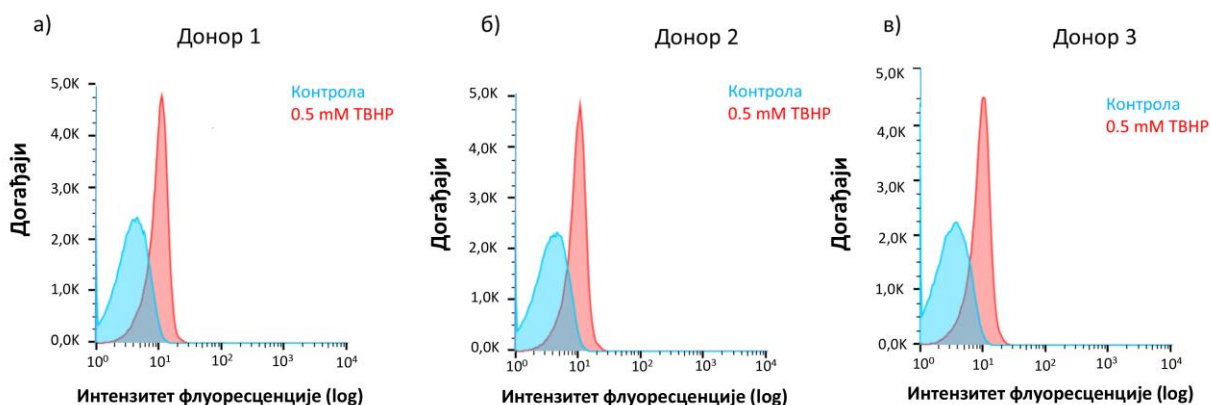


Слика 31. Оксидативни статус еритроцита третираних са 0,5 mM ТВНП. а) UV/VIS апсорпциони спектри хемоглобина изолованог из контролних и третираних еритроцита, б) концентрација TBARS молекула у контролним и оксидованим еритроцитима.

4.11. Аутофлуоресцентна својства оксидованих еритроцита

Појединачни оксидовани еритроцити се могу проучавати софистицираним микроскопским техникама као што су конфокална микроскопија или TPEF микроскопија. Међутим у случају да је потребно за релативно кратак временски период окарактерисати веома велики број еритроцита ефикасније је применити технике као што је проточна цитометрија (Yakimov и сар., 2019). У овој докторској дисертацији је показано да оксидација еритроцита 0,5 mM ТВНП изазива пораст флуоресцентне емисије у узорцима пореклом од здравих донора (Слика 32 а, б, в) у спектралном каналу који одговара следећим таласним дужинама екситације и емисије: екс = 488 nm / ем = 525 nm.

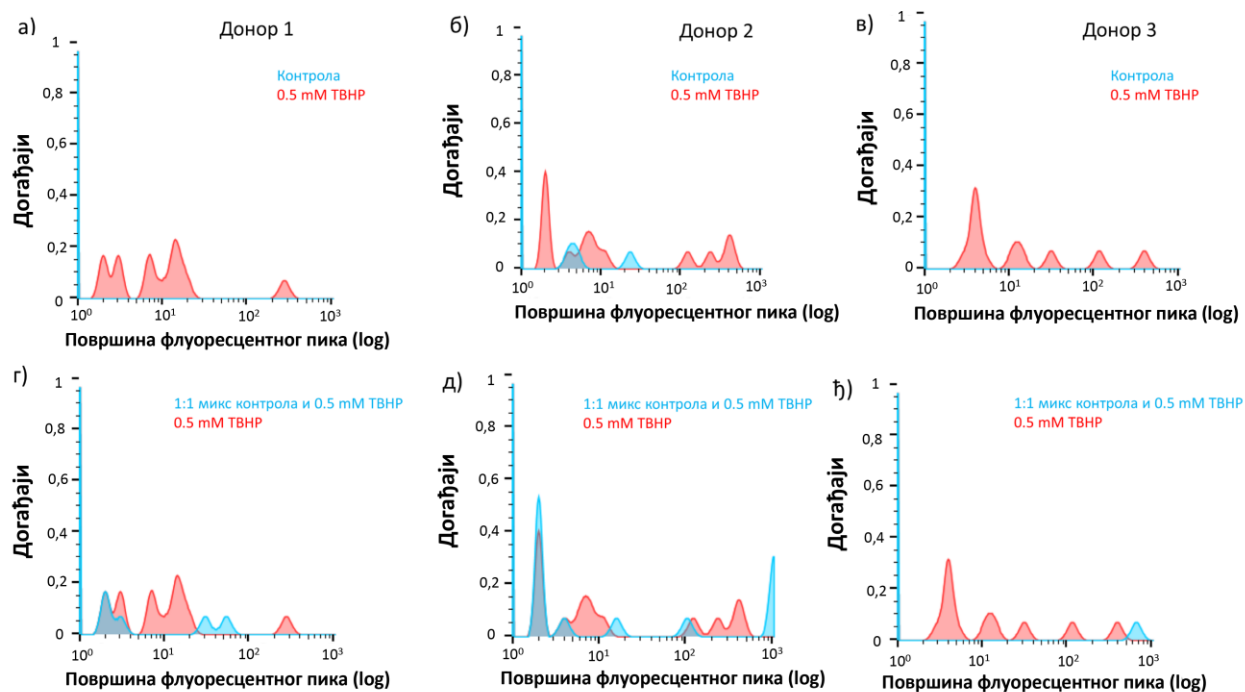
Сигнал који смо детектовали (слика 32) може такође потицати од продуката деградације хемоглобина, присутних у ниској концентрацији у еритроцитима здравих донора. Интензивирани формација хемских флуоресцентних продуката може бити индукована оксидацијом (Nagababu и сар., 2002) или присутна у неким патофизиолошким стањима као што су атеросклеротични плакови (Htun и сар., 2017).



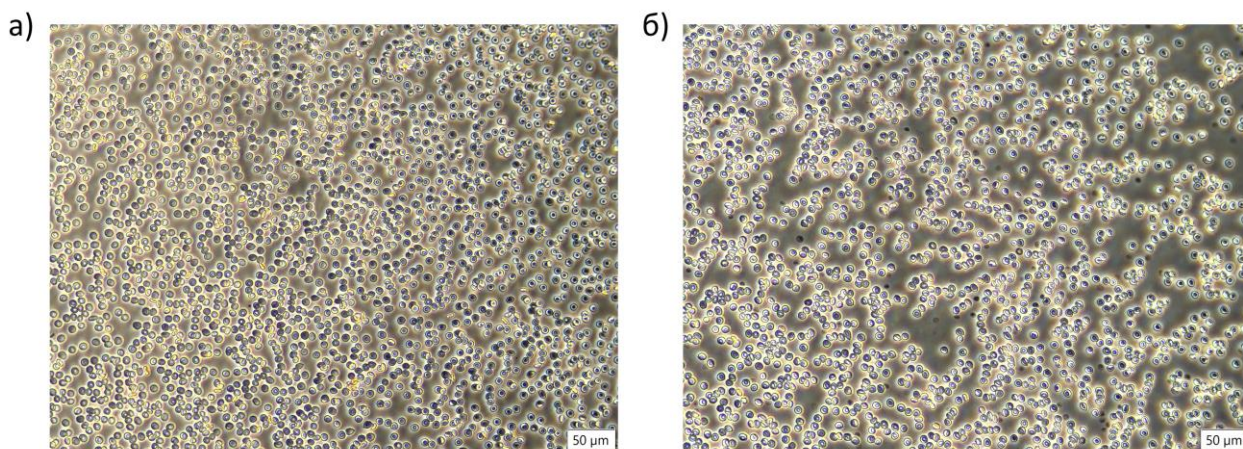
Слика 32. Аутофлуоресцентна својства контролних и оксидованих еритроцита за три независна донора (а,б,в).

Још један параметар, који није тако често употребљаван у анализи података са проточног цитометра је ширина флуоресцентног пика (FLW2). Показано је да овај параметар може пружити информације о величини флуоресцентних честица (Kang и сар., 2010), јер је могуће раздвојити сигнале који потичу од појединачних или агрегираних ћелија. Површина флуоресцентног пика је била параметар који се разликовао између контролних и ТВНР третираних еритроцита (Слика 33 а-в). У еритроцитима третираним ТВНР смо приметили неколико пикова који се јављају као последица повећаног интензитета флуоресценције и могуће формације кластера еритроцита. Међутим, ниво кластеризације односно агрегације, тј. хистограм зависности броја ћелија (догађаја) од FLW2 се разликовао између узорка, иако су донори сва три узорка приказана на слици 33 били здрави донори. Пикови су били присутни у свим ТВНР третираним узорцима еритроцита, али и у једном контролном узорку еритроцита (Слика 33 б), што указује на предност примене проточне цитометрије за детекцију интериндивидуалних разлика у оксидативном статусу здравих донора. Још важније, постојање флуоресцентних пикова са различитим површинама у популацији еритроцита оксидованих 0,5 mM ТВНР указује да оксидација изазива појаву кластера еритроцита који имају повећан интензитет флуоресценције. Индиректно је показана кластеризација у ТВНР третираним еритроцитима, коришћењем фазно контрастне микроскопије (Слика 34 а-б и Слика 35).

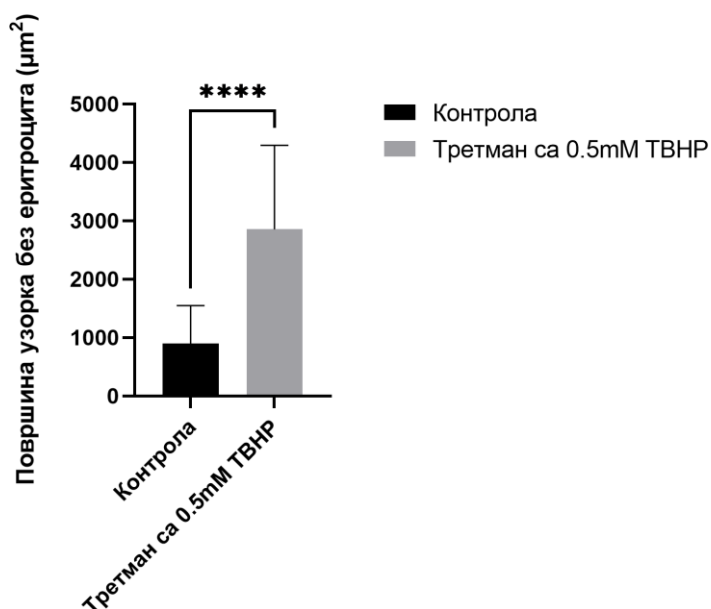
На тај начин, иако индиректно, смо потврдила да анализа проточном цитометријом, уз обавезно увођење и анализе FLW2 параметра дозвољава да се јасно уочи разлика између узорка нетретираних еритроцита, узорка оксидованих еритроцита и узорка који садржи једнак удео оксидованих и контролних еритроцита (Слика 33 г-ђ).



Слика 33. Површина флуоресцентног пика код контролних и оксидованих еритроцита и контролних еритроцита. а), б), в) оксидовани (црвена крива) и контролни еритроцити (плава крива) код донора 1, 2 и 3, г), д), ђ) микс контролних и оксидованих еритроцита (0,5 mM ТВНР) у односу 1:1 (плава крива) и оксидованих у 0,5 mM ТВНР (црвена крива) код донора 1, 2 и 3.



Слика 34. Фазно контрасна микроскопија контролних (а) и оксидованих еритроцита 0,5 mM ТВНР (б).



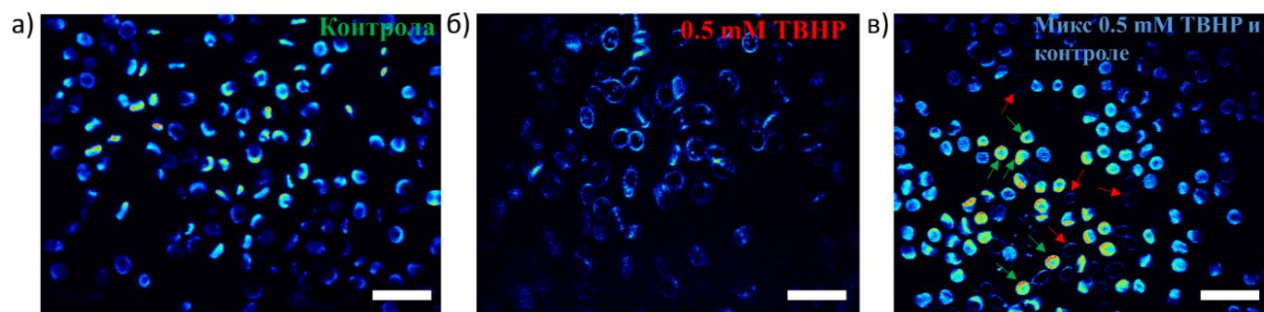
Слика 35. Статистички значајне разлике у површини региона без еритроцита између контроле и третмана ($p < 0.001$), као потенцијална индиректна мера нивоа агрегабилности

4.12. Двофотонска микроскопија оксидованих еритроцита

ТРЕФ осликовање је примењено на нетретираним еритроцитима (Слика 36 а) и еритроцитима оксидованим 0,5 mM ТВНР (Слика 36 б). Добијени резултати су показали да долази до дисторзије нативне морфологије еритроцита у узорку који је третиран са 0,5 mM ТВНР, што имлицира могућност јединственог флуоресцентног одговора оксидованих еритроцита осликованих помоћу ТРЕФ микроскопије. Показали смо да је третман ТВНР резултирао до тога да је ТРЕФ сигнал доминантно био локализован у мембрани еритроцита (Слика 36 б). Међутим индивидуална варијабилност у расподели ТРЕФ сигнала код третираних

узорака највероватније говори о различитом степену осетљивости појединачних еритроцита на оксидацију. Важно је напоменути да ТРЕФ микроскопија омогућава потенцијално осликавање дистрибуције хемоглобина (Вукара и сар., 2017) што пружа могућност изучавања интеракције оксидативних форми хемоглобина и компоненти мембране еритроцита, као што је показано ТРЕФ сигналом ограниченим на мембрани еритроцита (Слика 36 б). Овај резултат је у складу са нашом претходном студијом о интеракцији ултракратких ласерских импулса са молекулом хемоглобина било да се налази екстрацелуларно или унутар еритроцита (Radmilović и сар., 2023).

Разлике у дистрибуцији SSC између нетретираних и оксидованих еритроцита одражавају унутрашња својства ћелије, као што је промена индекса преламања. У суштини ова разлика може да омогући диференцијацију између оксидованих и нетретираних еритроцита у суспензији ових еритроцита у односу 1:1 (Слика 36 в), где зелена стрелица показује контролне еритроците, а црвена стрелица показује еритроците третиране 0,5mM ТВНР). Међутим, ТРЕФ осликавање оксидованих еритроцита треба детаљније истраживати јер индивидуалне разлике између еритроцита једног донора могу утицати на дистрибуцију ТРЕФ сигнала унутар еритроцита. Претходни резултати показују да је хемоглобин везан за мембрану, један од главних фактора који утичу на деформабилност еритроцита, тј. када еритроцит садржи више молекула хемоглобина везаних за мембрану, његова способност деформисања се нарушава (Gorudko и сар., 2016). У овој докторској дисертацији смо показали да највероватније долази до везивања фотопродукта хемоглобина за мембрану еритроцита и/или да су за ТРЕФ сигнал одговорни разградња/оксидовање хемоглобина. На овај начин, на основу добијених резултата са узорком који садржи две субпопулације еритроцита где су једнако заступљени нетретирани еритроцити и еритроцити оксидовани 0,5 mM ТВНР, показали смо да представљени ТРЕФ микроскопски уређај може индиректно служити, између осталог, и као техника за праћење квалитета еритроцита складиштених за потребе трансфузије, као што је већ предложено од стране Saytashev и сарадника (2016).



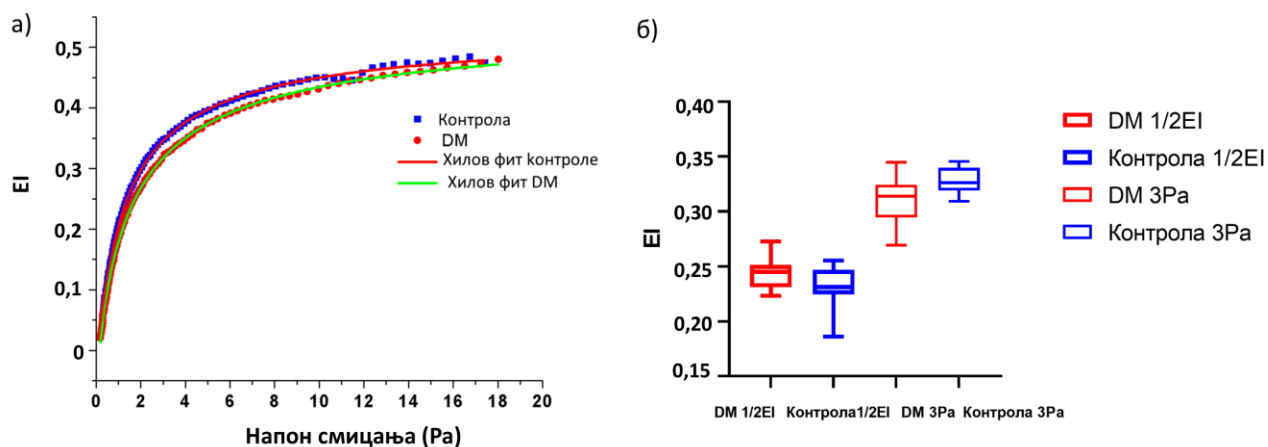
Слика 36. ТРЕФ осликавање оксидованих еритроцита. а) нетретирани еритроцити здравог донора, б) еритроцити здравог донора оксидовани 0,5 mM ТВНР, в) узорак који садржи оксидоване и нетретиране еритроците у односу 1:1.

4.13. Деформабилност еритроцита особа оболелих од DM

Смањена деформабилност мембране еритроцита, као значајан хемореолошки параметар, повезана је са неким патолошким стањима као што су одређени хематолошки поремећаји, маларија, кардиоваскуларне болести и метаболички поремећаји као што је DM (Huisjes и сар., 2020, Di Giacinto и сар., 2020). Глукоза је главни супстрат за енергетски

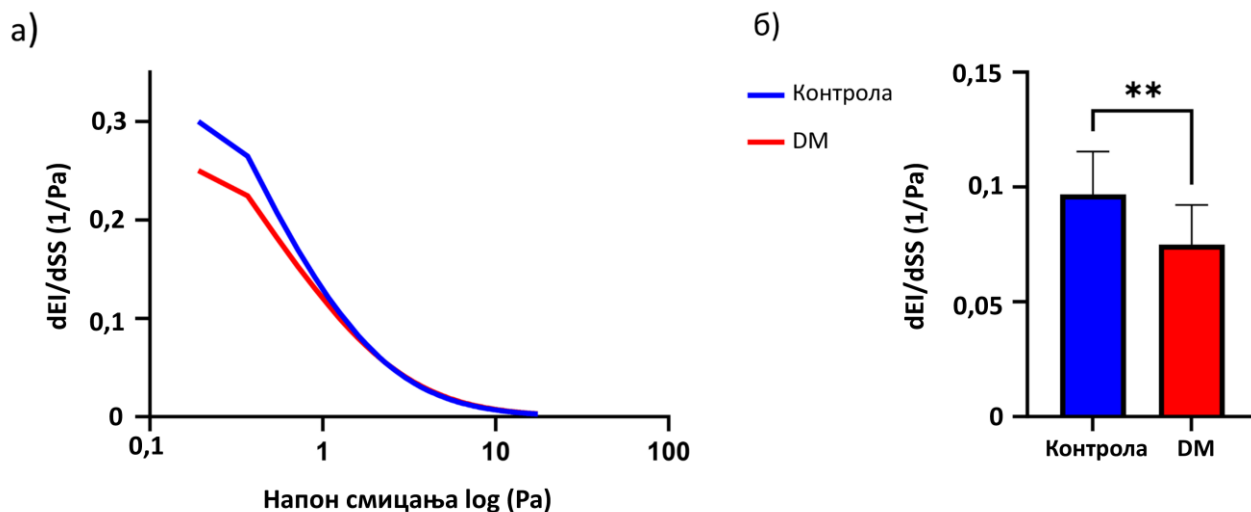
метаболизам еритроцита и добро је познато да због дуготрајне хипергликемије код DM пацијената, морфологија, метаболизам и функција еритроцита неизбежно подлежу серији сукцесивних промена које даље утичу на хемореологију еритроцита и микроциркулацију уопште (Zhou и сар., 2018; Sprague и сар., 2006). Ипак, код DM пацијената присутна је „прикривено абнормална“ реологија еритроцита (Schmid-Schönbein, 1987, Brun и сар., 2022), названа тако јер се не може увек лако измерити комерцијално доступним уређајима за брзу дијагностику у клиничким условима. Ектацитометрија, техника заснована на ласерској дифракцији, је примарни метод за процену деформабилности еритроцита како у истраживачким тако и у клиничким студијама (Piety et и сар., 2021) и заснива се на израчунавању EI из дифракционих слика снимљених под различитим напонима смицања. Међутим, пошто ектацитометрија мери усредњену деформабилност у популацији еритроцита не пружа информације о деформабилности појединачних ћелија, радови о деформабилности код пацијената са DM су и даље контрадикторни. Због тога EI код DM пацијената још увек није у потпуности потврђен као клинички користан реолошки биомаркер, док је прогностички значај EI за предвиђање компликација у случају анемије потврђен (Franck и сар., 2022). Мотивисани раније наведеним чињеницама, циљ нам је био да представимо деформабилност еритроцита кроз увођење новог хемореолошког параметра поређењем здравих донора и пацијената са DM.

Добијене криве деформабилности, приказане на слици 37 а, илуструју компаративну анализу еритроцита између контролних узорака (здраве особе, плава крива) и узорака пацијената оболелих од DM (црвена крива). Иако контрола показује благо повишене вредности EI у поређењу са DM, статистички значајне разлике у вредностима EI између здравих особа и особа са DM нису показане. Инхерентна варијабилност међу здравим донорима и пацијентима са DM вероватно доприноси суптилним разликама у деформабилности које је тешко квантификовати применом конвенционалног ектацитометра. Приказана анализа указује на недостатак статистичких разлика у вредностима EI на половини максимума криве деформабилности и на 3Pa (Слика 37 б).



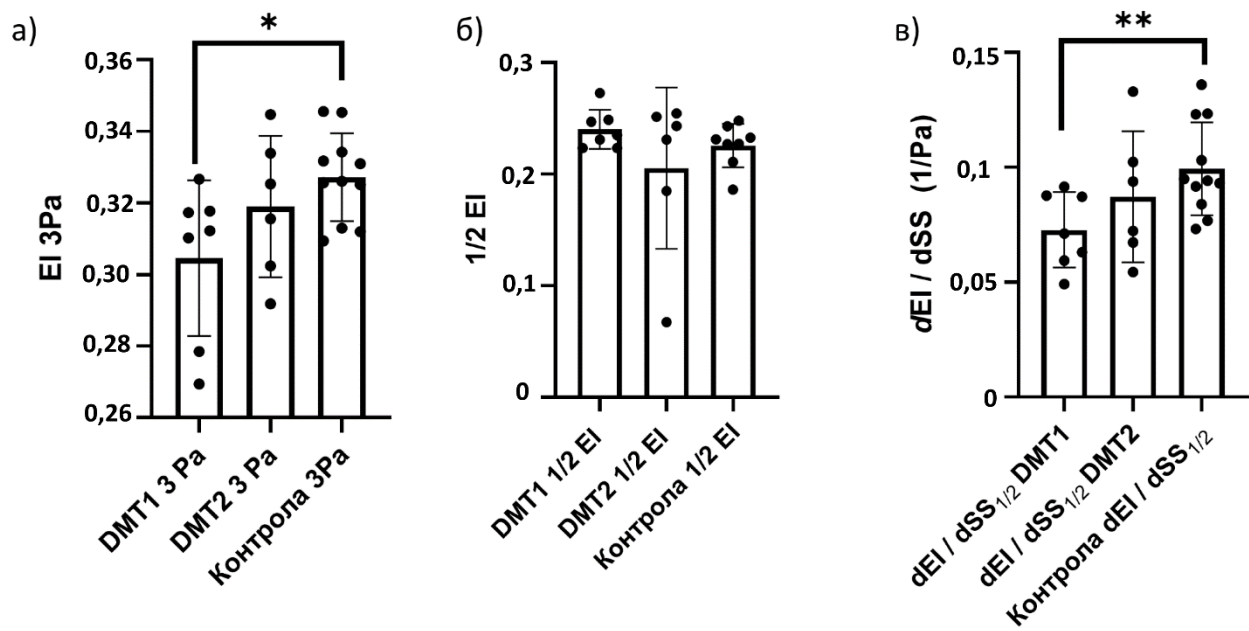
Слика 37. Параметри деформабилности еритроцита здравих особа (контрола) и еритроцита особа са DM. а) крива деформабилности контролних (плава) и еритроцита особа са DM (црвена), где су обе криве фитоване Хиловом функцијом, б) Средње вредности са стандардним грешкама измерених елонгационих индекса представљених у физиолошки важним тачкама, на половини криве деформабилности (1/2 EI) и на 3 Pa, су приказане плавом бојом за контролне и црвеном бојом за еритроците особа са DM.

Полазећи од оваквог резултат, наша пажња је пребачена на разликовање специфичних физиолошки релевантних тачака дуж криве деформабилности, као што су EI на половини максималне вредности и вредности EI на 3Pa. Израчунавање првог извода dEI/dSS у овим тачкама успостављено је као нова мера за процену промене деформабилности еритроцита услед механичког стреса (Слика 38 а). Резултати су показали статистички значајне разлике у вредностима dEI/dSS на половини максималне криве деформабилности између групе здравих донора и појединаца дијагностикованих са DM, што је приказано на слици 38 б), где су плавом бојом приказани резултати добијени са еритроцитима здравих особа, а црвена боја са еритроцитима особа са DM.



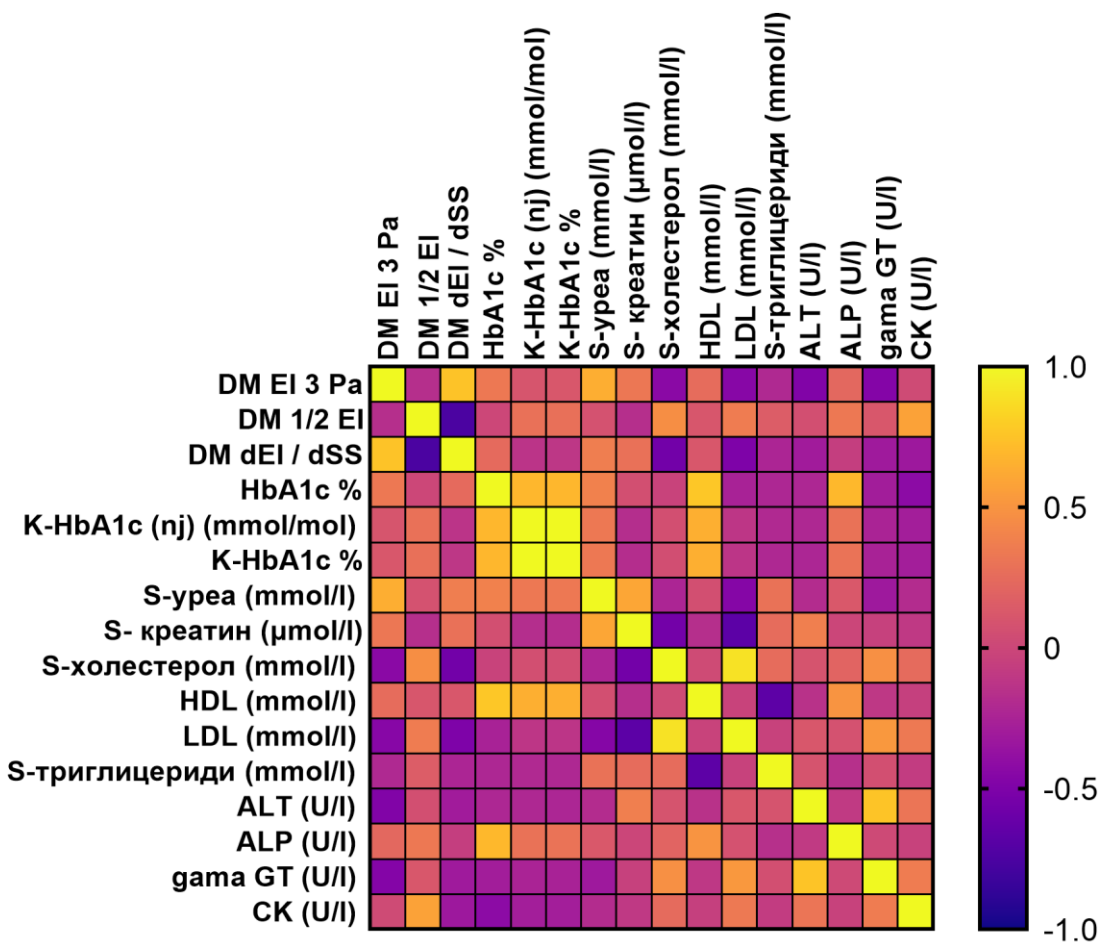
Слика 38. Први извод зависности EI од напона смицања еритроцита здравих особа (контрола) и еритроцита особа са DM. а) Приказ првог извода EI (dEI/dSS) у функцији напона смицања, б) статистички значајне разлике у средњим вредностима између dEI/dSS контролних (плава боја) и DM еритроцита (црвена боја).

Овим резултатом смо показали да постоји јасно уочљива разлика у одговору еритроцита на механички стрес између особа са DM и здравих особа, где су еритроцити особа са DM показали релативно спорији одговор. Ова чињеница истиче потенцијални клинички значај dEI/dSS као квантитативне мере у карактеризацији деформабилности еритроцита и обезбеђивање бољег разумевања промене биомеханике код пацијената са DM. За бољ карактеризацију механичких својстава еритроцита здравих особа и особа са DM, поделили смо DM групу на пацијенте са DMT1 и DMT2. Уочене су статистички значајне разлику у EI 3 Pa између еритроцита DMT1 групе и еритроцита здравих особа (Слика 39 а). Међутим, нису уочене статистички значајне разлике у вредностима параметра $\frac{1}{2}$ EI између контролних еритроцита и еритроцита пацијената са DM, независно од типа болести (Слика 39 б). Међутим, показано је да је dEI/dSS осетљивији хемореолошки параметар од EI 3Pa, који је омогућио да се, и поред релативно мале величине узорка, уоче разлике у реолошким својствима између еритроцита здравих особа и особа са DMT1 групе (Слика 39 в).

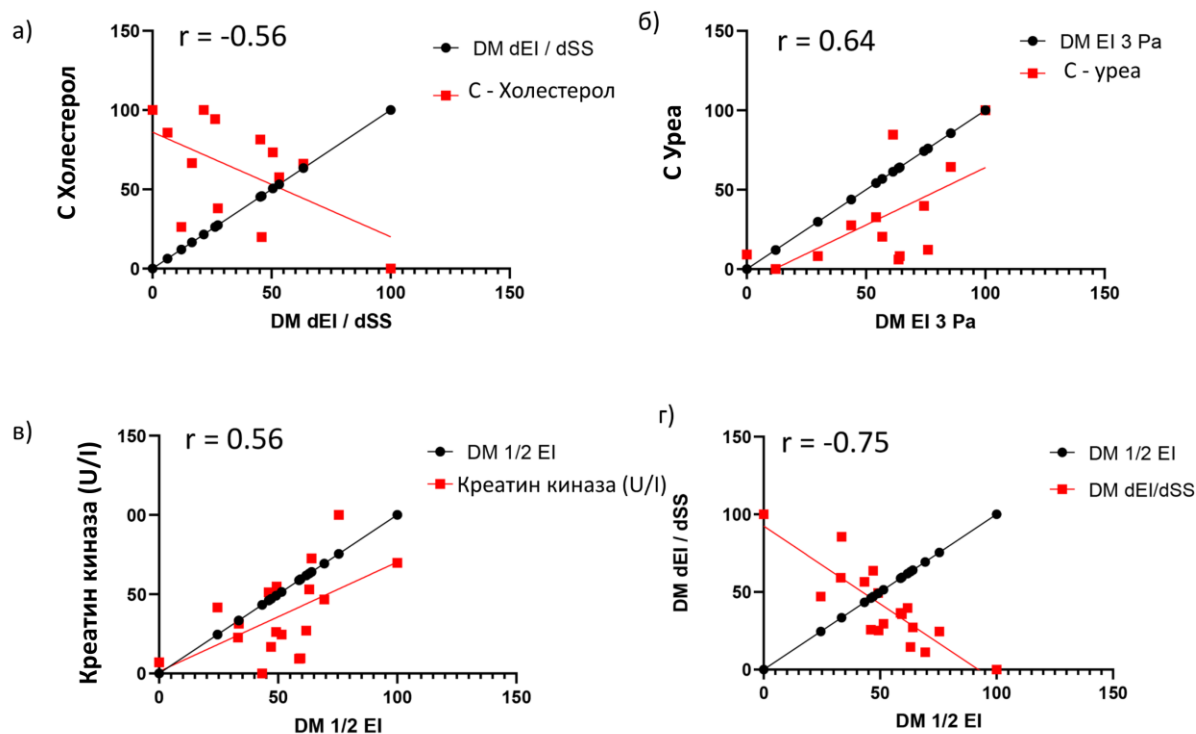


Слика 39. Приказ одвојених вредности параметара деформабилности за еритроците здравих особа (контрол) и еритроците особа са DMT1 или DMT2. а) статистички значајна ($p < 0,05$) промена елонгационог индекса на 3Pa (EI 3Pa) између контролних и еритроцита особа са DMT1, б) промена елонгационог индекса на половини криве деформабилности ($1/2$ EI), в) статистички значајна промена dEI/dSS између еритроцита особа са DMT1 и здравих особа ($p < 0,001$).

Повезаност између механичких својстава еритроцита и различитих клиничких биомаркера може пружити бољи увид у механизме одговорне за промену деформабилности еритроцита у DM. На пример, када се узјамно испитују параметри EI 3Pa, $1/2$ EI и dEI / dSS у односу на стандардне клиничке параметре као што је приказано на слици 39 могуће је потпуније разумевање њихових међусобних односа (Слика 40). Тако је показано да постоји статистички значајна корелација ($p < 0,05$) dEI/dSS и нивоа холестерола у серумима (слика 41 а). Овај резултат је у складу са подацима у литератури, који показују да виши нивои холестерола у серуму су повезани са повећаном ригидности ћелијских мембрана (Subczynski и сар., 2017; Chen и сар. 1997). Супротно томе, иако није пронађена значајна корелација између EI 3Pa и холестерола, директна веза је уочена између EI 3Pa и нивоа серумске уреје (Слика 41 б). Уреа игра улогу у одржавању осмотске стабилности еритроцита (Масеу, 1984), што потенцијално може бити разлог постојања корелације са EI 3Pa. Поред тога, параметар $1/2$ EI карактерише позитивна корелација са нивоом ензима креатин киназе (Слика 41 в), што може да се повеже са подацима који показују да и јетра и еритроцити учествују у елиминисању креатин киназе из циркулације (Pan и сар., 2023). Штавише, претходна истраживања су истакла снажну корелацију између нивоа серумског креатина и деформабилности еритроцита код пацијената са дијабетичком нефропатијом (Brown и сар., 2005). Узимајући у обзир дијабетичку нефропатију, код које долази до поремећаја на нивоу концентрације серумског креатинина и где је забележено постојање корелације између параметара деформабилности и концентрације серумског креатинина (Brown и сар., 2005), било је очекивано да ће dEI/dSS код дијабетичара бити у обрнутој корелацији са $1/2$ EI, као што је приказано на слици 41 г.



Слика 40. Heatmap дијаграм корелација клиничких и механичких параметара еритроцита особа са DM. Вредности корелације су приказане преко r вредности у опсегу од 1 (максимална позитивна корелација) до -1 (максимална негативна корелација)

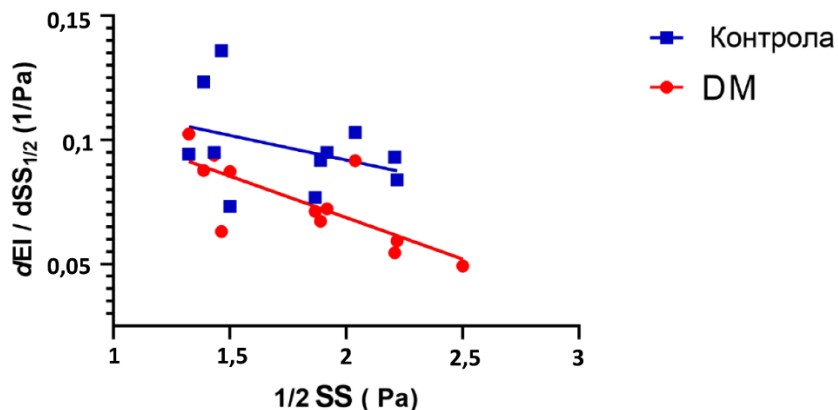


Слика 41. Значајне корелације механичких и клиничких параметара еритроцита особа са DM. а) Негативна корелација концентрације серумског холестерола (C-холестерол) и dEI/dS, б) позитивна корелација серумске уреје и EI 3Pa, в) позитивна корелација креатин киназе и 1/2 EI, негативна корелација dEI/dS и 1/2 EI.

Да бисмо разумели однос између dEI/dSS и 1/2 SS, користили смо регресиону анализу чији резултати су приказани на слици 42. И еритроцити здравих особа и особа са DM показују линеарни опадајући тренд, указујући на смањење dEI/dSS са повећањем 1/2 SS. Ово запажање наглашава феномен у коме се одзив еритроцита на механички стрес смањује са већим вредностима напона смицања и обрнуто повећава са нижим вредностима напона смицања. Оно што се запажа је да еритроцити особа са DM показују израженију и бржу промену у dEI/dSS (Слика 42, црвена линија; нагиб од-0.03) у односу на еритроците контролне групе (Слика 42, плава линија; нагиб од-0.015). Ова разлика говори да еритроцити у DM показују ограничен опсег контроле деформације мембране, односно промењен механички одговор на напон смицања.

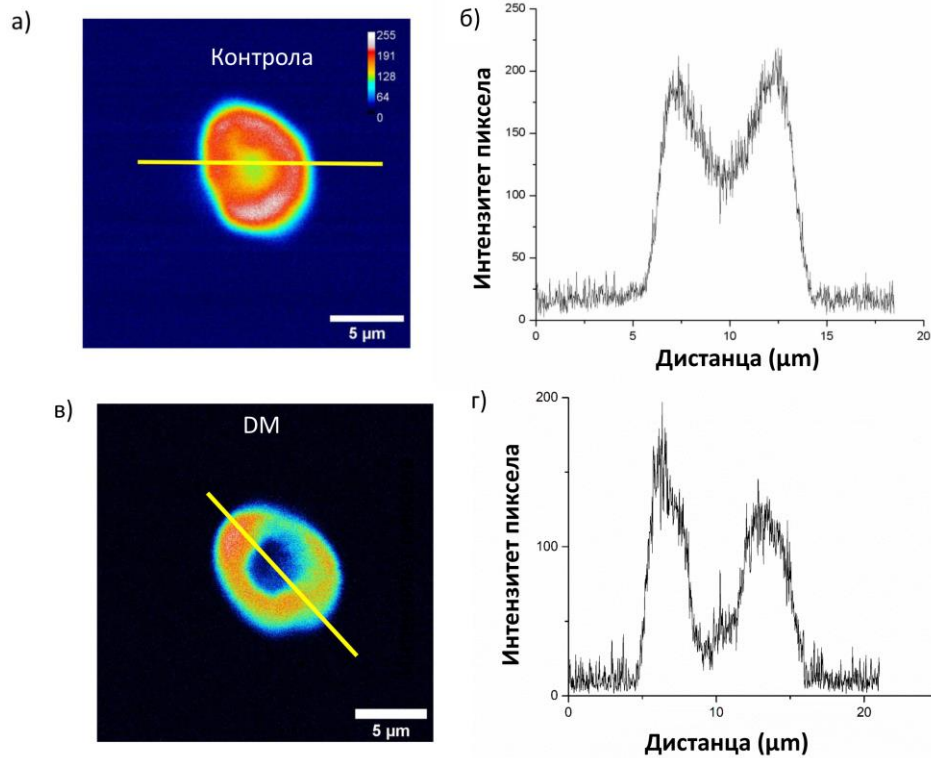
Међутим, важно је нагласити да при нижим вредностим напона смицања, флукуација EI у обе групе подлеже насумичним варијацијама у вредностима EI. Ово се приписује одсуству успостављеног ламинарног протока еритроцита у микроканалу под таквим условима (Shin и сар., 2005, McNamee и сар., 2020). Резултати приказани на слици 42 приказују механичке карактеристике еритроцита као одговор на различите напоне смицања, доприносећи разумевању основног биофизичког механизма деформабилности еритроцита у контексту патологије DM. Интензитет дифракционог сигнала популације еритроцита такође зависи од концентрације хемоглобина и глукозе (Streekstra и сар., 1994), што се може одредити стандардним биохемијским, али и различитим оптичким методама (Biswas et и сар., 2020, Cherkasova и сар., 2016). Постоји велико интересовање за проналажење нове метрике као

потенцијалног прогностичког маркера за превалентне клиничке компликације код DM пацијената и наше наредне студије ће укључити валидацију клиничких параметара и сврсисходност мерења dEI/dSS код особа са DM са специфичним микро- и макроваскуларним компликацијама.



Слика 42. Линеарни однос dEI/dSS на половини криве деформабилности и $\frac{1}{2}$ SS приказан за еритроците здравих особа (контрола) (плава линија) и особа са DM (црвена линија).

Еритроцити особа са DM и здравих особа анализирани су и TPEF методом. Као најизраженија разлика у дистрибуцији хемоглобина између контролних и еритроцита особа са DM се издваја разлика у опадању интензитета флуоресценције у централном региону еритроцита (Слика 43 а, в). Профил интензитета флуоресценције показује значајан пад интензитета у централном региону за еритроците особа са DM, као и благо одступање од бимодалне дистрибуције за ове еритроците (Слика 43 г). Интензитет флуоресценције еритроцита здраве особе је имао очекивану бимодалну дистрибуцију у складу са биконкавним обликом физиолошки неизмењених еритроцита (Слика 43 б).



Слика 43. Дистрибуција хемоглобина у контролним и у DM еритроцитима одређена ТРЕФ методом. а) ТРЕФ снимак контролног еритроцита (интензитет је кодиран помоћу особитног псеудоколора), б) интензитет пиксела контролног еритроцита дуж једног правца (жута линија), в) ТРЕФ снимак DM еритроцита, г) интензитет пиксела DM еритроцита дуж једног правца (жута линија).

5. Дискусија

Познато је да осликавање еритроцита и хемоглобина коришћењем технике конвенционалне флуоресцентне микроскопије засноване на примени обележивача (односно увођењу флуорофора) и даље није у потпуности „рутински“ експериментални поступак, и да може довести до нарушавањем структуре еритроцита и хемоглобина. Главни предмет ове докторске дисертације био је разумевање порекла флуоресцентног сигнала за који је показано да се добија без примене обележивача нелинарном ласерском скенирајућом микроскопијом хемоглобина, односно њеним ТРЕФ модалитетом. Предност овог метода се пре свега огледа у томе да није потребно користити одређени обележивач, који усложњава експериментални поступак и потенцијално нарушава неке од нивоа структуре хемоглобина.

Као што је описано у секцији 1.8, у литератури већ постоје подаци о примени нелинарне микроскопије пре свега ТРЕФ модалитета за осликавање еритроцита (Вукара и сар., 2017, Li и сар., 2011). Главне предности ове метода су изостанак употребе обележивача (*енгл. label free imaging*) и мања фототоксичност (So и сар., 2000). Међутим, порекло флуоресцентног сигнала и фотохемијски механизам ТРЕФ побуде узорака који садрже хемоглобин и даље није у потпуности разјашњен. С друге стране, због изузетног физиолошког значаја хемоглобина и еритроцита за опстанак свих кичмењака, као и њиховог значаја као биомаркера у патофизиолошким условима, разумевање поменутог феномена неопходно је за развој и ширу примену ове методе, не само у *in vitro*, већ и у *in vivo* условима. Управо су нас ове чињенице подстакле на истраживања у циљу потпунијег разумевања сложене интеракције ултракратких ласерских импулса са молекулом хемоглобина, како оних изван ћелије тако и хемоглобина присутног унутар еритроцита. Претходне студије су показале да интеракција ултракратких ласерских импулса са молекулом хемоглобина доводи до стварања фотопродукта, али без детаљније анализе о карактеристикама тог фотопродукта (Shirsin и сар., 2018), која би подразумевала спектралну или структурну анализу фотопродукта.

С обзиром на скуп фотоничних техника које су примењене у оквиру ове докторске дисертације, добијени резултати се могу поделити у неколико целина. Прва целина подразумева разумевање интеракције ултракратких ласерских импулса са изолованим хемоглобином и хемоглобином унутар еритроцита, са посебним акцентом на процес фотодеградације хемоглобина. Добијени резултати истраживања у оквиру ове докторске дисертације (поглавље 4) иду у прилог чињеници да је фотодеградација вероватно кључни процес у стварању фотопродуката, што отвара пут за развој метода анализе и карактеризације флуоресцентних фотодеградационих продуката као нових биомаркера у медицинској дијагностици. На ове анализе се надовезује испитивање утицаја оксидације на еритроците и веза са формирањем флуоресцентних продуката у њима, што чини другу целину која разматра везу *in vitro* оксидације са ТРЕФ индукованим настанком фотопродукта. Трећа целина обухвата анализирање механичких особина еритроцита ектацитометријом и проточном цитометријом, у нетреитираним и *in vitro* оксидованим еритроцитима здравх особа и еритроцитима особа оболелих од DM, и разматрања везе са настанком флуоресцентних продуката пореклом од хемоглобина. Све три целине заједно представљају примену скупа оптичких техника у разумевању оптичког одговора еритроцита и хемоглобина при једно- и двофотонској побуди.

Како је окосница ове дисертације била разумевање природе интеракције ултракратких ласерских импулса са хемоглобином, први циљ је било мерење оптичког одговора хемоглобина током ове интеракције. Добијени резултати сугеришу да приликом интеракције са ултракратким ласерским импулсима долази до фотодеградације хемоглобина. Фотодеградација хемоглобина највероватније је праћења раскидањем хемијских веза између хем простетичних група и глобинских ланаца, услед чега долази до ослобађања хема. Испитивање фотохемијских особина молекула који су прекурсори хема, као што је PpIX ближе су нам указале на хемијско порекло фотопродукта. TPEF емисиони спектри PpIX након одређеног времена озрачивања (не дуже од неколико експозиција) преклапају се са емисионим спектрима фотопродукта, насталог интеракцијом ултракратких ласерских импулса са хемоглобином. Ово указује да је фотопродукт највероватније хемског порекла (Sun и сар., 2015) с обзиром да је PpIX простетична група чини основу структуре хема. Ова чињеница указује и да за формирање фотопродукта није неопходан јон гвожђа с обзиром да PpIX не садржи гвожђе у својој структури. Важно је истаћи да хемијска структура фотопродукта није установљена и да су за то потребна даља истраживања. За адекватну карактеризацију фотопродукта, насталог у интеракцији са ултракратким ласерским импулсима, будући експерименти би подразумевали додатне високо софистициране и сензитивне аналитичке методе (као што је хроматографија под ултрависоким притиском у спрези са масеном спектрометријом), из разлога што је количина насталог фотопродукта, приликом TPEF ласерског скенирања мала (свега неколико фемтолитара). Будући експерименти подразумевали би симултано озрачивање хемоглобина, како је претходно описано и адекватно прикупљање насталог фотопродукта. Наиме, основни проблем који се јавља при овим експериментима је немогућност озрачивања довољне количине хемоглобина и проблем ефикасног прикупљања насталог фотопродукта, с обзиром да се он физички налази на предметном стаклу. Евентуално решење проблема прикупљања узорка би подразумевало да се узорак налази у одређеној малој запремини, налик микроквети, али је онда ефикасно озрачивање отежано зато што то подразумева коришћење објектива са великим радним растојањем што код нашег система није случај.

Иако је хемијску структуру фотопродукта под овим експерименталним условима тешко одредити, може се закључити да за његово формирање није неопходан јон гвожђа који би имао утицај на његова флуоресцентна својства, односно фаворизовао би нерадијативне процесе (Sun и сар., 2015, Eisinger и сар., 1985). Коришћењем хемијских третмана у овој докторској дисертацији показано је да је фотодеградација највероватније одговорна за настанак фотопродукта. На ово указује чињеница да третман хемоглобина H_2O_2 који помоћу супероксидних радикала деградује хемоглобин (Nagababu и сар., 2002) има исти спектрални одговор као хемоглобин који је претходно третиран ултракратким ласерским импулсима. Поклапање TPEF емисионих спектра фотопродукта хемоглобина, фотопродукта насталог у еритроцитима и PpIX указује на исту фотофизичку природу настанка фотопродукта. Не само да је хем простетична група хемоглобина у основи значајна за формирање фотопродукта, већ и да за његово формирање није неопходан јон гвожђа. Укратко, ово сугерише да при реакцији хемоглобина са H_2O_2 и у фотохемијској интеракцији ултракратких ласерских импулса са хемоглобином фотопродукт хемоглобина показује, барем у погледу TPEF емисије, сличне фотофизичке карактеристике. Ово може укључивати чак и оксидативну деградацију хема, као што је већ показано у патолошки измењеним еритроцитима Köln-овој болести, где уочена флуоресценција потиче од насталих флуоресцентних дипиролних једињења (Waugh и сар., 1986, Eisinger и сар., 1985), а који по својим спектралним особинама (када је у питању положај максимума, и када је ширина спектра у питању) одговарају емисионим спектрима фотопродукта добијеног у оквиру ове докторске дисертације. Пошто су дипиролни уринарни

пигменти код пацијената са хемоглобинопатијама окарактерисани и подржавају претходну претпоставку у вези са флуоресцентним еритроцитима у Köln-овој болести, највероватније је да ултракратки ласерски импулси појачавају деградацију порфириног прстена хема. Важно је напоменути да су флуоресцентни производи деградације хема већ препознати као маркери оксидативног стреса црвених крвних зрнаца (Steinberg и сар., 2009, Mohanty и сар., 2014). Резултати Nagababu и Rifkind (1998), који су показали да чак и мала концентрација H_2O_2 у еритроцитима разграђује протопорфирин и производи стабилне флуоресцентне производе деградације хема. Nagababu и Rifkind (1998) су детектовали два производа деградације хема, један који има таласну дужину побуде од 321 nm и емисиону таласну дужину у региону од 465 nm и други са таласном дужином побуде од 460 nm и емисионом таласном дужином у региону од 525 nm. Широки емисиони спектар фотопродукта хемоглобина добијен у нашој студији указује да вероватно постоји више од једне молекулске врсте фотопродукта. Иста група аутора (Nagababu и сар., 2002) је открила да механизам настанка продуката деградације хема у интеракцији са H_2O_2 подразумева формирање виших оксидационих стања јона гвожђа - Fe (IV), ферилхемоглобин или хемихрома, који даље интереагују са другим молекулом H_2O_2 производећи супероксид радикал, који може дуже остати у структурном „цепу“ хема него супероксид формиран током аутооксидације хемоглобина (физиолошки заступљен феномен), и самим тим иницира деградацију хема (Nagababu и сар., 2000). Наиме, чак и у физиолошким условима, еритроцити су континуирано изложени и ендогеним и екзогеним изворима реактивних форми кисеоника (тј. супероксид и водоник пероксид радикала), које углавном неутралише антиоксидативни систем еритроцита (секција 1.7). Међутим, аутооксидација хемоглобина везаног за мембрану се не може неутралисати антиоксидативним системом еритроцита који је углавном доступан у цитосолу. Овај процес је нарочито изражен када је хемоглобин делимично оксигенисан, што резултира повећаним степеном аутооксидације и повећаним афинитетом везивања за мембрану еритроцита, што за резултат има утицај на деформабилност еритроцита (Mohanty и сар., 2014). Чак и у свежим узорцима еритроцита могу се наћи производи деградације хема, а количина деградације хема се повећава са старењем (Mohanty и сар., 2014). Узимајући ове чињенице у обзир, можемо претпоставити да интеракција ултракратких ласерских импулса са хемоглобином вероватно убрзава деоксигенацију хемоглобина и генерисање супероксид радикала, што утиче на дисторзију структуре хема, изазивајући формирање стабилног флуоресцентног фотопродукта. Да је интеракција ултракратких ласерских импулса са хемоглобином углавном праћена интензивном деградацијом хемоглобина, можемо такође претпоставити на основу повећања интензитета флуоресценције током времена и евентуалног zasiћења интензитета флуоресценције када је већина хемоглобина у фокусној запремини ласера деградирана. Смањење интензитета апсорбанце Соретовог максимума иде у прилог потенцијалној деградацији хемоглобина у оквиру испитиваног квадратног обрасца. Дисторзија структуре хема јасно је уочљива губљењем појединачних α и β максимума у оквиру Q пикова који се налазе у видљивом делу апсорпционог спектра хемоглобина и јасно указује на фотодеградацију, евентуално праћену оксидацијом.

Интеракција ултракратких ласерских импулса хемоглобина кроз TPEF систем нам је омогућила да селективно фото-обележимо појединачне еритроците у узорку пуне крви. Фото-обележавање се односи на процес озрачивања појединачних еритроцита користећи ултракратке ласерске импулсе таласне дужине 730 nm, услед чега они постају флуоресцентни и могу на тај начин бити визуелизовани. Експериментални TPEF систем који је коришћен у истраживањима у оквиру ове докторске дисертације нажалост нема могућност примене за праћење еритроцита у крвним судовима претходно анестезираних животиња, као што су описали Wu и сар., (2023) с обзиром да је за то потребно имати комору за животиње са

контролисаним условима неопходним за ова мерења. У сваком случају, нови подаци о интеракцији хемоглобина са ултракратким ласерским импулсима из ове дисертације могу допринети развоју нових метода за карактеризацију како интрацелуларног (хемоглобина унутар еритроцита), тако и праћење присуства екстрацелуларног хемоглобина. Ово укључује екстрацелуларни хемоглобин из ендогених извора, који се јавља услед хемолize (у свим болестима којима је заједничка карактеристика хемоглобинемија, као што су ретинопатије, неуропатије, нефропатије и крварење мозга), али и егзогених извора хемоглобина, као у случајевима његовог коришћења као заменика за крв (Drvenica и сар., 2022, Garton и сар., 2017) или система за испоруку лекова, који имају велики потенцијал у терапији канцера (Charoenphol и сар., 2018).

У смислу оптичког и спектралног одговора на третман ултракратким ласерским импулсима, очекује се да хемоглобин сисара (Zheng и сар., 2010, Bukara и сар., 2017, Li и сар. 2011, Wu и сар., 2023, He и сар. 2015) или чак других кичмењака, има исте карактеристике због високог степена холомогије међу врстама (Zeng и сар., 2012, Ferrer Ortas и сар., 2023). С друге стране, крв сисара из кланица је отпадни материјал из којег се хемоглобин може изоловати релативно једноставним технолошким процесима који нису превише скупи (Kostić и сар., 2014, Van и сар., 2014). Ово би могло бити полазна тачка за добијање великих количина хемоглобина (Kostić и сар., 2014) и његово коришћење као материјала за оптичке меморије (Frolova и сар., 2022) и примену микро флуоресцентних угравираних образаца за осигуравање безбедности докумената или масовну производњу калибрационих узорака у флуоресцентној микроскопији (Begemann и сар., 2015, Benedetti и сар., 2014). Микроскопске плочице са флуоресцентним обрасцима су већ комерцијално доступне и широко се користе за калибрацију и мерење резолуције. С обзром да трајност флуоресценције микро-образаца у постојећим материјалима на тржишу није позната, предлажемо хемоглобин третиран кратким ласерским импулсима као материјал за дуготрајне флуоресцентне микро-обрасце.

Након што су успостављени услови за ефикасно осликавање еритроцита услед двофотонске побуде хемоглобина, та знања су примењена за изучавање ефеката оксидативног стреса на еритроците и његово повезивање са другим оптичким техникама као што су ектацитометрија, фазно – контрасна микроскопија и проточна цитометрија.

Наш други истраживачки циљ је био да комбинујемо технике засноване на феномену флуоресценције након двофотонског озрачивања хемоглобина са ектацитометријом, како бисмо прецизније разликовали различите популације еритроцита. Специфично, желели смо да тестирамо хипотезу о утицају ниских концентрација оксидативних агенаса, који су физиолошки релевантни, на деформабилност и морфологију одређене субпопулације еритроцита присутних у испитиваном узорку. У овој дисертацији еритроцити изоловани из пуне крви (тзв. паковани еритроцити) оксидовани су *in vitro* 0,5 mM ТВНР, а затим је мешањем у односу 1:1 оксидованих и нетретираних еритроцита истог здравог донора добијен узорак у коме се налазила, експериментално индукована, субпопулација оксидованих еритроцита.

Претходне студије показале су да третман еритроцита 1mM ТВНР резултује оксидацијом масних киселина фосфлипидног двослоја мембране и хемоглобина (Chen и сар., 1991, Nagababu и сар., 2014). Ова оксидација доводи до превођења јона гвожђа (кординантно везаног за тетра-пиролну простетичну групу) у виша оксидациона стања, што доводи до формирања метхемоглобина (Machiyama и сар., 2022) који је високо реактиван молекул и даље може иницирати оксидацију других протеина и липида. Да бисмо потврдили да ли долази до оксидације липида код еритроцита оксидованих применом 0,5 mM ТВНР, анализиран је ниво липидне пероксидације у односу на контролне, нетретиране еритроците користећи методу

zasnovanu na spektrofotometrijskom мерењу концентрације малонилдиалдехида (MDA). Добијени резултати су потврдили да и оксидација еритроцита 0,5 mM ТВНР доводи до оксидације хемоглобина и појаве метхемоглобина као и липидне пероксидације (Слика 31 а и б), уз повећање степена иницијалне хемоллизе, али генерално очување осмотске фрагилности (ЕН₅₀ оксидованих еритроцита се није разликовао од контролних еритроцита).

Применом ектацитометрије у овој докторској дисертацији, показали смо да *in vitro* оксидовани еритроцити имају јасно ниже вредности EI у односу на контролне еритроците, што потврђује да су им механичка својства, односно еластичност мембране измењени. Међутим, узорци еритроцита који су садржали једнаке уделе нетретираних и еритроцита третираних 0,5 mM ТВНР имали су EI у физиолошком опсегу, тј. ефекат оксидације био је анулиран усредњеним мерењем деформабилности узорка применом ектацитометрије. На основу овог резултата закључено је да стандардна ектацитометрија не пружа довољно информација о еластичности мембране појединачних еритроцита. Испитивање деформабилности еритроцита на појединачном нивоу је важно из разлога што су новије студије показале да чак и мале фракције ригидних еритроцита могу утицати на адхезију леукоцита на зидове крвних судова, која представља важну фазу у имунском одговору организма (Gutierrez и сар., 2018). Неколико студија показале су да деформабилност појединачних еритроцита може бити изучавана унапређеним техникама ектацитометрије, као што је LORCA систем (Hardeman и сар., 2001), али и техникама које се заснивају на примени оптичких пинцета (*енгл.* Optical tweezers) или микрофлуидичким чиповима различитог нивоа комплексности (Guo и сар., 2014, Bento и сар., 2018) Са друге стране, у оквиру ове докторске дисертације показали смо да је могуће разликовати оксидисане субпопулације еритроцита од неоксидисаних (физиолошких) применом проточне цитометрије на основу разлике у дистрибуцији расејане светлости која пролази кроз еритроците FSC (*енгл.* Forward scatter light). *In vitro* симулација оксидативног стреса код еритроцита након третмана 0.5mM ТВНР довела је до уочљивих промена у оптичким карактеристикама еритроцита, услед промена на хемоглобину и липидима еритроцита. Разлике у оптичким карактеристикама, праћене кроз промену дистрибуције FCS и SSC ласерске светлости између, третираних и нетретираних узорака су највероватније последица промене индекса преламања унутар еритроцита услед оксидације. Као последица оксидације долази до формирања ферил форми хемоглобин у коме је оксидациони број јона гвожђа +3 и више. Последице оксидације еритроцита су вишеструке и могу се квантитативно одредити коришћењем проточне цитометрије на великом броју ћелија. Осим промене у индексу преламања оксидованог хемоглобина у односу на контролу, промена дистрибуције FCS и SSC ласерске светлости може бити последица промена у одговору еритроцита на хидродинамичке силе које делују на њих унутар микроканала проточног цитометра. Као што су показали резултати ектацитометрије, механичка својства еритроцита нетретираних (физиолошких) и оксидованих еритроцита су се разликовала, при чему су еритроцити третирани 0,5 mM ТВНР имали већу ригидност, односно смањену деформабилност. Иако директно поређење резултата ектацитометрије и проточне цитометрије није у потпуности валидно, могуће је извући неке опште закључке о механичким односно морфолошким својствима еритроцита. На основу тога, реално је спекулисати да измењена биомеханичка својства еритроцита могу индуковати промене у интензитету FSC светлости, јер резултати студије Gienger и сар. (2019) већ дају доказ концепта да се информације о реолошким својствима еритроцита могу добити из мерења проточном цитометријом, али користећи прилагођену проточну цитометријску апаратуру. Коришћење комерцијално доступних проточних цитометара за ту сврху још увек није у потпуности могуће и захтева развој реалистичнијег модела еластичних својстава еритроцита, састављеног од неколико параметара

и нових математичких приступа као што су супституциони модели или алати за анализу велике количине података (Gienger и сар., 2019).

Статистички параметри резултата мерења проточном цитометријом који су били различити у *in vitro* оксидованим у односу на нетретиране еритроците су скјунис и куртозис. Код еритроцита оксидованих 0.5 mM ТВНР ниже вредности куртозиса дистрибуције FSC указују на релативну униформисаност популације оксидованих еритроцита. *In vitro* оксидативни стрес највероватније доводи до промене просторне дистрибуције хемоглобина. Како су ТРЕФ мерења показала да се у случају оксидованих еритроцита хемоглобин локализује у близини унутрашње стране ћелијске мембране, највероватније да то за последицу има промену дистрибуције FSC ласерске светлости за еритроците у односу на нетретиране еритроците. Са друге стране и вредност скјуниса дистрибуције FSC оксидованих еритроцита је била смањена, што указује на померање ове расподеле ка одређеним специфичним вредностима. Овакав резултат значи да се код оксидованих еритроцита највероватније формира група ћелија специфична по свом оптичким карактеристикама, када је у питању светлост која пролази кроз еритроците (FSC). Све ово наведено се може потенцијално искористити за увођење нових оптичких параметара који би могли да послуже за праћење нивоа оксидативног стреса код еритроцита, а који ће се заснивати на скјунису и куртозису дистрибуције FSC.

У оквиру ове докторске дисертације смо такође покушали да проширимо стандардну употребу проточне цитометрије изван њене уобичајене примене примене за анализу популација и субпопулација и сортирање флуоресцентно обележених ћелија. Конкретно, показали смо да интензитет аутофлуоресценције и анализа максимума (пика) флуоресценције (као што су: ширина на полу висини и површина), често занемарени параметри у проточној цитометрији необележених и једноструко обележених ћелија, могу бити коришћени за процену ефекта *in vitro* оксидације еритроцита. Осим разлика у расејаној ласерској светлости оксидованих еритроцита, приметили смо да у односу на контролне, нетретиране, оксидовани еритроцити имају повећан интензитет аутофлуоресценције детектабилан проточном цитометријом. Термин аутофлуоресценција се користи зато што еритроцити за потребе анализе проточном цитометријом нису додатно обележавани флуорофорама. Детектована аутофлуоресценција у контролној групи вероватно потиче од доминантних ендогених флуорофора у еритроцитима (Yakimov и сар., 2019, Monici и сар., 2005). Осим ендогених флуорофора, интризично присутним у еритроцитима, аутофлуоресценција може бити последица стварања флуоресцентних продуката хемоглобина услед оксидације, што смо закључили на основу резултата којим смо показали да третман танких филмова хемоглобина H_2O_2 доводи до повећања интензитета флуоресценције (Radmilović и сар., 2023). Стварање ових флуоресцентних продуката хемоглобина услед оксидације праћено је највероватније формирањем реактивних форми кисеоника (ROS) које својим слободним електронским паровима интерагују су хемоглобином (Nagababu и сар., 2002). С обзиром на примећене разлике у интензитету флуоресценције између оксидованих и контролних еритроцита, вероватно је да се интензитет флуоресценције, измерен проточном цитометријом може користити као потенцијално нови параметар мерења оксидативног стреса код еритроцита (Radmilovic et al. 2023).

Још један битан параметар проточне цитометрије који се заснива на флуоресценцији је површина флуоресцентног пика. Код узорака еритроцита третираних оксидансом повећан је број пикова, што највероватније указује на агрегацију оксидованих еритроцита, постојање агрегата еритроцита додатно повећава време задражавања у ласерском снопу приликом

кретања еритроцита кроз микроканал проточног цитометра. На овај начин највероватније се појављује више пикова, чији је број директно пропорционалан броју насталих агрегата еритроцита. Више различитих површина флуоресцентних пикова било је присутно и у контролном узорку. Ово највероватније указује да је одређени интритични ниво оксидације или поменуте аутооксидације хемоглобина, присутан и у еритроцитима здравих особа, што је у складу са ранијим резултатима (Eisinger и сар., 1985). Овим се могућности примене проточне цитометрије у испитивању оксидације еритроцита додатно проширују између осталог за контролу квалитета еритроцита здравих добровољаца који се чувају одређено време пре употребе у трансфузијске сврхе, јер је њихово складиштење је неминовно повезано са повећавањем вероватноће акумулације оксидативних оштећења у еритроцитима (D'Alessandro и сар., 2010).

У оквиру ове докторске дисертације показано је и да се употребом ТРЕФ микроскопије додатно могу детектовати промене карактеристичне за оксидоване еритроците. Раније је показано да се применом микроскопије трећег хармоника (ТНГ), као једног модалитета нелинеране скенирајуће ласерске микроскопије, могу испитати карактеристике еритроцита здравих донора у трансфузијским кесама (Saytashev и сар., 2016). У оквиру ове тезе, проширили смо примену нелинеране скенирајуће ласерске микроскопије кроз модалитет-ТРЕФ микроскопије за испитивање оксидованих еритроцита у поређењу са здравим еритроцитима. Међутим, наш покушај генерисања ТНГ сигнала од стране еритроцита у оквиру ове докторске дисертације остао на прелиминарном нивоу. Наиме, увођењем гране за ТНГ у постојећи систем за нелинеарну скенирајућу микроскопију добијен је сигнал за који, због техничких карактеристика доступног детектора, нисмо могли у потпуности да тврдимо да ли је резултат генерисања трећег хармоника или је у питању флуоресценција услед трофотонске апсорпције. С друге стране, ТРЕФ емисиони сигнал је недвосмислено добијен у постојећој апаратури. Добијени ТРЕФ емисиони сигнал код оксидованих еритроцита, за разлику од контролних, се јасно локализује у близини унутрашње стране ћелијске мембране. Ово имплицира да се оксидоване форме хемоглобина налазе везане за унутрашњу страну ћелијске мембране или за протеине који се налазе у близини ћелијске мембране. Добијени резултати указују на могућности примене ТРЕФ микроскопије у изучавању акумулације оксидативног стреса код током складиштења еритроцита добровољних давалаца крви.

Осликавање оксидованих еритроцита употребом ТРЕФ микроскопије може се применити у циљу унапређења разумевања биолошке улоге оксидативних форми хемоглобина, као што је метхемоглобин, у физиологији еритроцита. Као што је претходно показано, везивање хемоглобина за унутрашњу страну мембране еритроцита присутно је код различитих патологија (Welbourn и сар., 2017, Morabito и сар., 2016, Signorini и сар., 1995). Међутим, методе изучавања интеракције ћелијске мембране еритроцита са хемоглобином или његовим оксидованим формама, често подразумевају лизирање еритроцита (Welbourn и сар., 2017). Ми смо показали да је помоћу ТРЕФ микроскопије могуће осликавати појединачне интактне оксидоване еритроците, где је хемоглобин био доминантно везан за унутрашњу страну ћелијске мембране. Употребом UV/VIS апсорпционе спектроскопије лизата оксидованих еритроцита несумњиво је показана оксидација хемоглобина. Механизам оксидације еритроцита применом оксиданса ТВНР највероватније је праћен везивањем оксидованих форми хемоглобина за унутрашњу страну ћелијске мембране. Хемијска природа ове везе није у потпуности позната, али највероватније је да су у интеракцији оксидованих форми хемоглобина са мембраном присутне електростатичке интеракције, хидрофобне везе и интеракције са трансмембранским Band 3 протеином (Datta и сар., 2008, Shaklai и сар., 1978a).

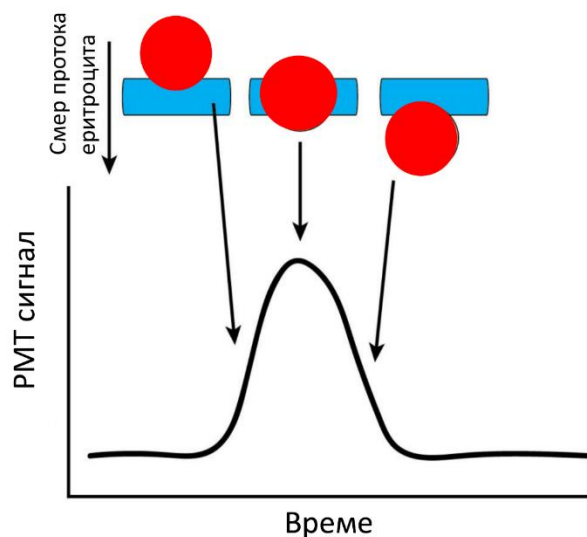
Утврђено је да везивање хемоглобина за унутрашњу страну ћелијске мембране еритроцита, са физиолошког аспекта представља сигнал за елиминацију тих еритроцита из циркулације фагоцитозом од стране макрофага (Кау 1975, Kannan и сар., 1988, Low 1986). На основу различитих модела показано је да се оксидоване форме хемоглобина везују за Band 3 протеин (Low и сар., 1985), што је потврђено и у студијама у којима су анализирани еритроцити особа оболелих од одређених хемоглобинпатија (Waugh и сар., 1986). Наиме, у експериментима где је за оксидацију еритроцита коришћен ТВНР дошло је до формирања оксидативних форми хемоглобина у форми хемихрома, за који је показано да је везан за ћелијску мембрану, односно за Band 3 протеин (Low и сар., 1985, Arashiki и сар., 2013, Waugh 1987, Welbourn и сар., 2017). Оксидација хемоглобина је праћена оксидацијом масних киселина, што највероватније потврђује механизам формирања слободних реактивних кисеоничних форми које осим хемоглобина, оксидују и масне киселине. Показано је да услед оксидације еритроцита долази до реорганизације липида у мембрани и њиховог ослобађања у цитосол еритроцита (Moxness и сар., 1996).

На основу свега наведеног јасно је да везивање оксидованих форми хемоглобина, вероватно у форми хемихрома, за унутрашњу страну ћелијске мембране и/или за Band 3 протеин има и последице на механичке односно реолошке карактеристике, што смо показали ектацитометријским мерењима оксидованих еритроцита. Значај ових експеримената огледа се у чињеници да је оксидативни стрес значајни параметар, не само у физиолошким условима, већ и као параметар структурне (и функционалне) очуваности еритроцита добровољних давалаца крви (D'Alessandro и сар., 2010). Оксидативни стрес нарушава основне метаболичке функције еритроцита, а формирање хемихрома (реверзибилно или иреверзибилно) доводи до стварања молекулских форми хемоглобина које не могу да вежу молекул кисеоника (Welbourn и сар., 2017). Термин хемихром се односи на било који молекул хемоглобина који има јон гвожђа са оксидационим бројем +3 или +4, и који због тога више не може да веже кисеоник (Welbourn и сар., 2017). Показано је да формирање хемихрома може бити реверзибилно или иреверзибилно (Rachmilewitz и сар., 1971). Свакако да већи проценат форми хемоглобина који се налазе у оксидативно вишем стању доприноси смањеној функционалности еритроцита, а смањена биолошка функционалност еритроцита има *in vivo* последице на одржавање хомеостазе организма (Vollaard и сар., 2005) и директно може довести до интраваскуларне хемоллизе (Mairböurl и сар., 2013).

Резултати анализе еритроцита проточном цитометријом добијени у овој докторској дисертацији су показали да су оксидовани еритроцити показивали виши ниво (ауто)флуоресценције, што је било у складу са претходним резултатима Nagababu и сар., (1998). Са друге стране, занимљиво је да је одређени, низак ниво аутофлуоресценције био присутан и у контролним узорцима. Није у потпуности јасна природа овог сигнала, али највероватније да потиче од интизични присутних деградационих форми хемоглобина. До данас је показано да повећан ниво флуоресценције може бити индукован ласерским озрачивањем еритроцита (Zheng и сар., 2010, Radmilović и сар., 2023), као и у одређеним патофизиолошким процесима, нпр. код атеросклеротских промена крвних судова (Htun и сар., 2017), у којима су показане флуоресцентне особине продуката деградације хема.

Број површина флуоресцентних пикова контролних, нетретираних, и оксидованих еритроцита је био различит. За узорке оксидованих еритроцита било је карактеристично више различитих површина флуоресцентних пикова, што имплицира не само повећан ниво аутофлуоресценције код оксидованих еритроцита, већ и вероватно и формирање агрегата еритроцита, што је индиректно потврђено фазно-контрасном микроскопијом. Основна

хипотеза о формирању агрегата оксидованих еритроцита заснива се на промени брзине проласка кроз микроканал проточног цитометра (Слика 44). Агрегати различите величине би требало да се спорије крећу кроз микроканал проточног цитометра, односно да се дуже задржавају у ласерском снопу, при чему површина флуоресцентног пика зависи од величине честице која пролази кроз ласерски сноп (Kang и сар., 2010). Разлике у брзинама проласка честица кроз ласерски сноп могу допринети разликовању оксидованих и неоксидованих еритроцита, иако је и у једном контролном узорку примећено постојање више различитих површина флуоресцентног пика. Ово имплицира да се параметри проточне цитометрије могу потенцијално користити за изучавање интра-индивидуалне варијабилности у оксидативном статусу еритроцита. Показано је да оксидација доводи до формирања интрамембранских кластера Band3 протеина (Shimo и сар., 2015). Осим еритроцита утврђено је да код других типова ћелија услед оксидације долази до агрегације протеина, како интраћелијских тако и мембранских (Squier 2001, De Vasconcellos и сар., 2017). С обзиром да је исти феномен показан код еритроцита када је у питању Band 3 протеин, вероватно је да формирање кластера овог протеина, доводи до међусобних интеракција између еритроцита, формирајући агрегате уочене анализом флуоресцентног пика. Пероксидација липида је такође једна од последица оксидације (Luchi и сар., 2021), што смо и у оквиру ове докторске дисертације потврдили применом TBARS методе код еритроцита које смо оксидовали *in vitro*.



Слика 44. Схематски приказ проласка еритроцита кроз микроканал проточног цитометра и формирања флуоресцентног пика у времену. Модификовано из Kang и сар., 2010.

Наши резултати јасно указују да предложени оптички приступ без примене флуоресцентних обележивача, а који комбинује комерцијално доступну ектацитометрију, проточну цитометрију и фазно-контрастну микроскопију са TPEF микроскопијом, представља скуп перспективних методологија за откривање промена у механобиологији различитих субпопулација еритроцита индукованих оксидацијом. Овај приступ може бити потенцијално применљив у клиничкој пракси за праћење утицаја метаболичког стреса на здраве особе, као и за обављање контроле квалитета складиштених еритроцита здравих донора у сврхе трансфузије.

У циљу потврде валидности, овај приступ је даље проширен и на изучавање еритроцита особа оболелих од DM типа 1 и 2, што уједно представља наш трећи истраживачки циљ.

Метаболичко обољење као што је DM је узроковало пет милиона смртних случајева у периоду од 1990. до 2015. а укупна средства издвојена на здравствену заштиту особа оболелих од DM на светском новоу достигла су суму од 673 милијарде америчких долара до 2016. године (Ogurtsova и сар., 2017). Земље са ниским и средњим годишњим приходима имају већу стопу обољевања од DM (Rabi и сар., 2006). Студије су показале да ће се број особа узраста од 20 до 79 година са DM попети на 642 милиона до 2040. године (Ogurtsova и сар., 2017). DM представља болест модерног доба са пандемијским тенденцијама. Измењена механичка и реолошка својства еритроцита у DM се су повезане са стањима које се јављају као компликација ове болести (Wang и сар., 2021; Lee и сар., 2015): ретинопатија, нефропатија и различити облици неуропатија (Schut и сар., 1993a, Schut и сар., 1993b, Lee и сар. 2015, Chung и сар., 2018). Смањење деформабилности, односно EI еритроцита особа са DM је повезано са повећаним нивоима гликозилованог хемоглобина, већим садржајем сорбитола и повећаним нивоом оксидованог хемоглобина који може бити везан за унутрашњу страну мембране еритроцита, што може утицати на поремећај односа површине и запремине еритроцита (Malandrino и сар., 2012, Mawatari и сар., 2004, Schut и сар., 1993a, Ergun и сар., 2002). Штавише, показано је да постоји директна корелација између микроваскуларних компликација и смањене деформабилности еритроцита (Kobayashi и сар., 2022). Другим речима, DM има значајан директни утицај на еритроците, с обзиром да код пацијената оболелих од DM долази до повећаног оксидативног стреса унутар еритроцита, као последица поремећаја биохемијских процеса и гликозилације хемоглобина (Wang и сар., 2021, Turpin и сар., 2020). С обзиром да у литератури нису усаглашени подаци о промени EI еритроцита особа са DM, на основу резултата добијених у овој докторској дисертацији предложили смо увођење новог хемореолошког параметра који представља први извод EI (dEI/dSS) на $\frac{1}{2}$ максималне вредности криве деформабилности. На овај начин покушали смо да одредимо брзину промене деформабилности еритроцита увођењем новог хемореолошког параметра dEI/dSS. Показали смо да је dEI/dSS код особа са DM директно пропорционалан нивоу холестерола у серуму (s-холестерол) и обрнуто пропорционалан вредности EI на половини максималне вредности криве $\frac{1}{2}$ EI. Постојање корелације између dEI/dSS и биохемијских параметара као што су: концентрација серумског холестерола и серумске урее, представља везу између механичких својстава еритроцита и различитих физиолошких процеса. На овај начин постиже се дубљи увид у однос механичких и метаболичких карактеристика DM еритроцита. Интересантно запажање се појавило при поређењу dEI/dSS са нивоима холестерола у серуму, указујући на статистички значајну корелацију ($p < 0,05$), као што је приказано на слици 32 а. Овај налаз се поклапа са резултатима у постојећој научној литератури, која сугерише да виши нивои холестерола доводе до повећане ригидности ћелијских мембрана (Subczynski и сар., 2017, Chen и сар., 1997). С друге стране, иако није пронађена значајна корелација између EI 3 Pa и холестерола, примећена је директна веза између EI 3 Pa и нивоа урее у серуму. Уреа игра важну улогу у одржавању осмотске стабилности еритроцита (Macey 1984), стога је постојање корелације са EI 3 Pa очекивано. На овај начин, сматрамо да је dEI/dSS нови параметар који би се могао користити у сврху бољег (поузданијег/прецизнијег) праћења промена деформабилности мембране еритроцита у клиничкој пракси, од конвенционалног EI. Даља истраживања на великом броју узорака применом овог приступа би можда могла допринети и бољем разумевању настанка неких компликација у DM (Radmilovic и сар., 2024). Осим основних биохемијских метода које се рутински користе у изучавању болести узрокованих оксидативним стресом, оптички приступ који укључује више различитих техника као што су ТРЕФ микроскопија и спектроскопија, проточна цитометрија и ектацитометрија пружа детаљнији увид у измењену физиологију еритроцита и потенцијално боље разумевање метаболичких обољења као што је DM.

На основу приказаних фотофизичких карактеристика хемоглобина изван и унутар еритроцита, може се претпоставити да примена оптичких техника које се заснивају на употреби ласера као извора побудне светлости имају перспективне биомедицинске примене. Фотофизичке карактеристике хемоглобина приликом ТРЕФ побуде искоришћене су за праћење и фото-обележавање еритроцита у одређеној (малој) запремени. Иако су фото-обележавање еритроцита и праћење изведени *in vitro*, ова метода базирана на ТРЕФ микроскопији може потенцијално да омогући дуготрајно праћење појединачних еритроцита у крвним судовима у различитим ткивима. Примена је већ показана на крвним судовима у лабораторијским животињама, на примеру зебра риба (Shroff и сар. 2019), као и у мозгу миша (Sardella и сар. 2023, Gutiérrez-Jiménez и сар 2018, Gutiérrez-Jiménez и сар. 2016). За разлику од приказаних резултата неколико студија (Sardella и сар. 2023, Gutiérrez-Jiménez и сар 2018, Gutiérrez-Jiménez и сар. 2016) у којима је приказан флукс еритроцита у протоку крви у живим организмима кроз кранијални прозор, коришћењем ТРЕФ микроскопије, еритроцити би могли бити флуоресцентно активирани ултракратким ласерским импулсима како би њихово кретање било праћено кроз крвне судове. Иако могућ, овакав приступ захтева развој посебне микроскопске поставке.

Поред селективног фото-обележавања одабраних еритроцита, што се може постићи просторно-временском контролом ласерског снопа, али не и третманом са H_2O_2 , постоје још неке предности представљене ТРЕФ методе. Наиме, третирање еритроцита са H_2O_2 је прилично неконтролисано у смислу циљане трансформације хемоглобина у флуоресцентне молекуле. H_2O_2 интерагује са другим молекулима у мембрани еритроцита и другим структурама које могу бити оштећене или измењене. Такође, овим третманом би морфологија еритроцита и дистрибуција хемоглобина могли били нарушени. Коришћењем методе ласерског фото-обележавања представљене у овој тези били би третирани само молекули хемоглобина, а еритроцити би задржали своју оригиналну морфологију, као и оригиналну дистрибуцију хемоглобина, што је показано и у претходним истраживањима нашег истраживачког тима (Bukara и сар. 2017). Морфологија еритроцита и унутрашња дистрибуција хемоглобина су једни од кључних маркера који указују на адаптацију ћелија на физиолошке процесе и њихов одговор на патолошке услове (Bukara и сар. 2018). На крају, предложена метода би могла имати примену за праћење еритроцита у крвним судовима живих организама, у снимању високо прокрвљених и слабо прозирних органа као што су бубрези, с обзиром да се ТРЕФ микроскопија интензивно користи данас у те сврхе (Sardella и сар. 2023). Претходна истраживања су недвосмислено показала да се морфологија еритроцита може проучавати коришћењем ТРЕФ микроскопије, што омогућава испитивање њиховог оксигенационог статуса (Wang и сар., 2011), као и дистрибуције хемоглобина (Bukara и сар., 2017). Међутим, није јасно да ли ултракратки ласерски импулси ометају способност хемоглобина да обавља своју примарну биолошку функцију везивања и ослобађања кисеоника. У нашој садашњој студији, утврдили смо да хемоглобин пролази кроз структурне промене као резултат такве интеракције.

Узимајући у обзир показан однос оксидативног стреса и флуоресценције настале након озрачивања хемоглобина, метода ТРЕФ заснована на хемоглобину је нова платформа за процену редокс статуса еритроцита и њихове деформабилности у физиолошким и патофизиолошким условима, па чак и у ширем спектру болести које деле заједничку особину појаве екстрацелуларног хемоглобина, или у случају ране прогресије неких облика малигнух солидних тумора, у смислу праћења и квантификације неоангиогенезе (Radmilovic и сар., 2023)

Истовремено, добијени резултати који се односе на оптичке карактеристике *in vitro* оксидованих еритроцита указују на иновативни начин примене проточне цитометрије у

анализи оксидативног стреса у различитим патофизиолошким процесима. Механичке особине еритроцита здравих донора и еритроцита особа оболелих од DM анализирани су увођењем новог хемореолошког параметра, а TPEF микроскопијом је потврђен образац флуоресцентног сигнала налик на *in vitro* оксидоване еритроците. Будућа истраживања обухватиће и примену развијеног приступа без обележавања заснованог на аутофлуоресценцији и FSC и SSC сигналу и код еритроцита особа са DM.

Описани интегрисани приступ заснован на оптичким техникама у овој докторској дисертацији пружа нове могућности када је у питању дијагностика и анализа различитих морфолошких и механичких детерминанти еритроцита. На овај начин отвара се нови правац истраживања који омогућава примену различитих биофотоничких метода у циљу анализе како физиологије, тако и патофизиологије еритроцита и хемоглобина. Овај правац истраживања у будућности ће подразумевати уједно и развој нових уређаја који би симултано могли да прате и биофизичке и биохемијске особине еритроцита. На овај начин ће се постићи не само боље разумевање физиологије еритроцита, него ће се стећи увид у индивидуалну варијабилност еритроцита како здравих донора, тако и пацијената оболелих од различитих болести, чиме се може постићи нови развојни аспект персонализоване медицине.

6. Закључци

У овој докторској дисертацији испитана је интеракција ултракратких ласерских импулса са молекулом хемоглобина који се налази унутар изван еритроцита, и која је одговорна за стварање флуоресцентног једињења-фотопродукта. Након оптимизације протокола за генерисање овог фотопродукта, урађена је његова фотофизичка карактеризација применом TRPF и SPEF микроскопије, UV/VIS апсорпционе спектроскопије и TRPF емисионе спектроскопије. Под истим експерименталним условима индукована је флуоресценција пореклом од хемоглобина и у изолованим еритроцитима. На основу тог резултата извршено је селектовано праћење еритроцита и у пуној крви. Добијени су прелиминарни резултати о механизму настанка флуоресцентног фотопродукта у *in vitro* симулацији оксидативног стреса. Успостављени услови за ефикасно осликавање еритроцита на основу флуоресценције услед двофотонске побуде хемоглобина су примењена за изучавање ефеката *in vitro* индукованог оксидативног стреса еритроцита здравих донора, као и еритроцита особа оболелих од DM, у спрези са другим оптичким техникама као што су ектацитометрија, фазно-контрасна микроскопија, и проточна цитометрија. На основу приказаних резултата могу се извести следећи закључци:

- Интеракцијом хемоглобина са ултракратким ласерским импулсима, формира се флуоресцентни фотопродукт, што је праћено фотодеградацијом TRPF озраченог хемоглобина
- PpIX има исти TRPF емисиони спектар као и фотопродукт након дужег озрачивања, што потврђује да за формирање хемоглобинског фотопродукта није неопходан Fe²⁺јон.
- Третирање хемоглобина водоник пероксидом доводи до формирања флуоресцентних молекулских врста чији спектар одговара TRPF емисионом спектру хемоглобина озраченог ултракратким ласерским импулсима.
- Могуће је извршити просторно локализовано формирање фотопродукта (ласерско уписивање флуоресцентних образаца) на танком филму хемоглобина TRPF микроскопијом.
- Флуоресцентни фотопродукт карактерише фотостабилност која се може детектовати и коришћењем једнофотонског извора побуде. Фотостабилност фотопродукта је временски одређена на период од неколико недеља.
- Могуће је селективно ласерско обележавање и осликавање еритроцита услед флуоресценције формираног фотопродукта у њима.
- На основу флуоресценције еритроцита могуће је одредити просторну расподелу хемоглобина у еритроцитима. Дистрибуција хемоглобина се разликује између еритроцита који су оксидовани *in vitro* и неоксидованих еритроцита (тј. еритроцита

у свом физиолошком стању), при чему је код оксидованих еритроцита хемоглобин доминантно локализован у близини унутрашње стране ћелијске мембране.

- *In vitro* оксидовани еритроцити, у односу на неоксидоване, имају другачије особине у погледу параметара расејане ласерске светлости измерене проточном цитометријом, и еритроците оксидовани 0,5 mM ТВНР имају ниже вредности скјуниса и куртозиса као статистичких параметара расподеле FSC.
- Оксидовани еритроцити имају повећан ниво аутофлуоресценције која се може детектовати проточном цитометријом на основу параметра површине флуоресцентног пика (F1W2).
- На основу EI вредности показано је да је деформабилност мембране *in vitro* оксидованих еритроцита смањена у односу на деформабилност неоксидованих еритроцита, при чему је за оксидоване еритроците карактеристично и присуство оксидованог хемоглобина локализованог уз унутрашњу страну ћелијске мембране који се може осликати применом нелинеарне ласерске скенирајуће микроскопије.
- Увођење dEI/dSS параметра омогућава прецизнију процену деформабилности мембране еритроцита особа оболелих од DM, при чему је показана корелација између dEI/dSS и концентрација серумског холестерола, урее и ензима креатин киназе.

Разумевање механизма настанка флуоресцентног фотопродукта хемоглобина ће омогућити унапређење развоја и ширу примену техника нелинеарне ласерске микроскопије за анализу функционалног статуса еритроцита. Интегрисани оптички приступ показан у овој докторској дисертацији пружа нове могућности када је у питању дијагностика и анализа различитих морфолошких и механичких детерминанти еритроцита. На овај начин отвара се нови правац истраживања који омогућава примену различитих биофотоничких метода у циљу анализе и физиологије и патофизиологије еритроцита и хемоглобина.

7. *Лумерамыпа*

Abay, A., Simionato, G., Chachanidze, R., Bogdanova, A., Hertz, L., Bianchi, P., van den Akker, E., von Lindern, M., Leonetti, M., Minetti, G., Wagner, C., & Kaestner, L. (2019). Glutaraldehyde—a subtle tool in the investigation of healthy and pathologic red blood cells. *Frontiers in Physiology*, **10**, 514.

Abay, B. S. (2022). *Using SHG Directionality to Characterize Collagen Alteration in Breast Cancer Tumor Microenvironment and Its Prognostic Applications*. The University of Maine.

Adewoyin, A. S., Adeyemi, O., Davies, N. O., & Ogbenna, A. A. (2019). Erythrocyte morphology and its disorders. *Erythrocyte*, 1-10.

Ahlgrim, C., Pottgiesser, T., Sander, T., Schumacher, Y. O., & Baumstark, M. W. (2013). Flow cytometric assessment of erythrocyte shape through analysis of FSC histograms: use of kurtosis and implications for longitudinal evaluation. *PLoS One*, **8(3)**, e59862.

Allen, B. W., & Piantadosi, C. A. (2006). How do red blood cells cause hypoxic vasodilation? The SNO-hemoglobin paradigm. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **291(4)**, H1507-H1512.

Amano, M. T., & Camara, N. O. O. (2013). The immunomodulatory role of carbon monoxide during transplantation. *Medical gas research*, **3**, 1-15.

Anderson, H. L., Brodsky, I. E., & Mangalmurti, N. S. (2018). The evolving erythrocyte: red blood cells as modulators of innate immunity. *The Journal of Immunology*, **201(5)**, 1343-1351.

Arashiki, N., Kimata, N., Manno, S., Mohandas, N., & Takakuwa, Y. (2013). Membrane peroxidation and methemoglobin formation are both necessary for band 3 clustering: mechanistic insights into human erythrocyte senescence. *Biochemistry*, **52(34)**, 5760-5769.

Babu, N. (2021). Hemorheological study on erythrocyte aggregation in patients with type 2 diabetes mellitus without cholesterol and with hyper cholesterol. *Thrombosis Update*, **5**, 100085.

Bah, C. S., Bekhit, A. E. D. A., Carne, A., & McConnell, M. A. (2013). Slaughterhouse blood: an emerging source of bioactive compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **12(3)**, 314-331.

Balagopalakrishna, C., Abugo, O. O., Horsky, J., Manoharan, P. T., Nagababu, E., & Rifkind, J. M. (1998). Superoxide produced in the heme pocket of the β -chain of hemoglobin reacts with the β -93 cysteine to produce a thiyl radical. *Biochemistry*, **37(38)**, 13194-13202.

Barger, A. M. (2022). Erythrocyte morphology. *Schalm's veterinary hematology*, 188-197.

Bartosz, G. (1991). Erythrocyte aging: physical and chemical membrane changes. *Gerontology*, **37(1-3)**, 33-67.

- Baskurt, O. K., & Meiselman, H. J. (2004). Analyzing shear stress–elongation index curves: Comparison of two approaches to simplify data presentation. *Clinical hemorheology and microcirculation*, **31(1)**, 23-30.
- Baskurt, O. K., Hardeman, M. R., Uyuklu, M., Ulker, P., Cengiz, M., Nemeth, N., Shin, S., Alexy, T., & Meiselman, H. J. (2009). Parameterization of red blood cell elongation index–shear stress curves obtained by ektacytometry. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, **69(7)**, 777-788.
- Becatti, M., Marcucci, R., Gori, A. M., Mannini, L., Grifoni, E., Alessandrello Liotta, A., Sodi, A., Tartaro, R., Taddei, N., Rizzo, S., Prisco, D., Abbate, R., & Fiorillo, C. (2016). Erythrocyte oxidative stress is associated with cell deformability in patients with retinal vein occlusion. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **14(11)**, 2287-2297.
- Beckman, J. D., Belcher, J. D., Vineyard, J. V., Chen, C., Nguyen, J., Nwaneri, M. O., O'Sullivan, M. G., Gulbahce, E., Hebbel, R. P., & Vercellotti, G. M. (2009). Inhaled carbon monoxide reduces leukocytosis in a murine model of sickle cell disease. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **297(4)**, H1243-H1253.
- Begemann, I., Viplav, A., Rasch, C., & Galic, M. (2015). Stochastic Micro-Pattern for Automated Correlative Fluorescence-Scanning Electron Microscopy. *Scientific Reports*, **5(1)**, 17973.
- Benedetti, L., Sogne, E., Rodighiero, S., Marchesi, D., Milani, P., & Francolini, M. (2014). Customized patterned substrates for highly versatile correlative light-scanning electron microscopy. *Scientific Reports*, **4(1)**, 7033.
- Bento, D., Rodrigues, R. O., Faustino, V., Pinho, D., Fernandes, C. S., Pereira, A. I., Garcia, V., Miranda, J. M., & Lima, R. (2018). Deformation of red blood cells, air bubbles, and droplets in microfluidic devices: Flow visualizations and measurements. *Micromachines*, **9(4)**, 151.
- Bianco, C. L., Savitsky, A., Feelisch, M., & Cortese-Krott, M. M. (2018). Investigations on the role of hemoglobin in sulfide metabolism by intact human red blood cells. *Biochemical pharmacology*, **149**, 163-173.
- Biswas, U., & Rakshit, J. K. (2020). Detection and analysis of hemoglobin concentration in blood with the help of photonic crystal based micro ring resonator structure. *Optical and Quantum Electronics*, **52**, 1-16.
- Bogdanova, A., Makhro, A., Wang, J., Lipp, P., & Kaestner, L. (2013). Calcium in red blood cells—a perilous balance. *International Journal of Molecular Sciences*, **14(5)**, 9848-9872.
- Bogdanova, A., Petrushanko, I. Y., Hernansanz-Agustín, P., & Martínez-Ruiz, A. (2016). “Oxygen sensing” by Na, K-ATPase: these miraculous thiols. *Frontiers in Physiology*, **7**, 212082.
- Bonaventura, C., Ferruzzi, G., Tesh, S., & Stevens, R. D. (1999). Effects of S-nitrosation on oxygen binding by normal and sickle cell hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, **274(35)**, 24742-24748.

- Bonaventura, C., Henkens, R., Alayash, A. I., Banerjee, S., & Crumbliss, A. L. (2013). Molecular controls of the oxygenation and redox reactions of hemoglobin. *Antioxidants & Redox Signaling*, **18**(17), 2298-2313.
- Bredt, D. S., & Snyder, S. H. (1994). Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annual review of biochemistry*, **63**(1), 175-195.
- Brown, C. D., Ghali, H. S., Zhao, Z., Thomas, L. L., & Friedman, E. A. (2005). Association of reduced red blood cell deformability and diabetic nephropathy. *Kidney international*, **67**(1), 295-300.
- Brun, J. F., Varlet-Marie, E., Myzia, J., Mercier, J., & Raynaud, E. (2022). Extended physiological functions for erythrocyte deformability and aggregation beyond regulation of oxygen delivery? *Series on Biomechanics*, **36**(1), 111811.
- Bukara, K., Jovanic, S., Drvenica, I. T., Stancic, A., Ilic, V., Rabasovic, M. D., Pantelic, D., Jelenkovic, B., Bugarski, B., & Krmpot, A. J. (2017). Mapping of hemoglobin in erythrocytes and erythrocyte ghosts using two-photon excitation fluorescence microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, **22**(2), 026003-026003.
- Burger, P., Hilarius-Stokman, P., De Korte, D., Van Den Berg, T. K., & Van Bruggen, R. (2012). CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, **119**(23), 5512-5521.
- Burger, P., Kostova, E., Bloem, E., Hilarius-Stokman, P., Meijer, A. B., van den Berg, T. K., Verhoeven, A. J., de Korte, D., & van Bruggen, R. (2013). Potassium leakage primes stored erythrocytes for phosphatidylserine exposure and shedding of pro-coagulant vesicles. *British journal of haematology*, **160**(3), 377-386.
- Catan, A., Turpin, C., Diotel, N., Patche, J., Guerin-Dubourg, A., Debussche, X., Bourdon, E., Ah-You, N., Le Moullec, N., Besnard, M., Veerapen, R., Rondeau, P., & Meilhac, O. (2019). Aging and glycation promote erythrocyte phagocytosis by human endothelial cells: Potential impact in atherothrombosis under diabetic conditions. *Atherosclerosis*, **291**, 87-98.
- Celedón, G., González, G., Sotomayor, C. P., & Behn, C. (1998). Membrane lipid diffusion and band 3 protein changes in human erythrocytes due to acute hypobaric hypoxia. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **275**(6), C1429-C1431.
- Charoenphol, P., Oswald, K., & Bishop, C. J. (2018). Therapeutics incorporating blood constituents. *Acta biomaterialia*, **73**, 64-80.
- Chasis, J. A., & Schrier, S. L. (1989). Membrane deformability and the capacity for shape change in the erythrocyte. *Blood*, **74** (7), 2562-2568.
- Chen, H., Khan, A. A., Liu, F., Gilligan, D. M., Peters, L. L., Messick, J., Haschek-Hock, W. M., Li, X., Ostafin, A. E., & Chishti, A. H. (2007). Combined deletion of mouse dematin-headpiece and β -adducin exerts a novel effect on the spectrin-actin junctions leading to erythrocyte fragility and hemolytic anemia. *Journal of Biological Chemistry*, **282**(6), 4124-4135.

- Chen, J. Y., & Huestis, W. H. (1997). Role of membrane lipid distribution in chlorpromazine-induced shape change of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1323**(2), 299-309.
- Chen, M. J., Sorette, M. P., Chiu, D. T. Y., & Clark, M. R. (1991). Prehemolytic effects of hydrogen peroxide and t-butylhydroperoxide on selected red cell properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1066**(2), 193-200.
- Cherkasova, O., Nazarov, M., & Shkurinov, A. (2016). Noninvasive blood glucose monitoring in the terahertz frequency range. *Optical and Quantum Electronics*, **48**, 1-12.
- Cherry, J. D., Olschowka, J. A., & O'Banion, M. K. (2015). Arginase 1+ microglia reduce A β plaque deposition during IL-1 β -dependent neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation*, **12**, 1-13.
- Chien, S., & Sung, L. A. (1987). Physicochemical basis and clinical implications of red cell aggregation. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **7**(1), 71-91.
- Cho, M., Shin, S., Kwon, H. M., Chung, H., & Lee, B. K. (2014). Effect of clinical and RBC hemorheological parameters on myocardial perfusion in patients with type 2 diabetes mellitus. *Biorheology*, **51**(2-3), 215-226.
- Chung, Y., Ko, D. H., Hyun, J., Kim, H. S., Park, M. J., & Shin, D. H. (2018). Establishing cut-offs for urine erythrocyte and leukocyte dipstick tests. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, **78**(4), 301-304.
- Clay, G. O., Schaffer, C. B., & Kleinfeld, D. (2007). Large two-photon absorptivity of hemoglobin in the infrared range of 780–880nm. *The Journal of chemical physics*, **126**(2).
- Cortese-Krott, M. M., & Kelm, M. (2014). Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function?. *Redox biology*, **2**, 251-258.
- D'Alessandro, A., Liunbruno, G., Grazzini, G., & Zolla, L. (2010). Red blood cell storage: the story so far. *Blood Transfusion*, **8**(2), 82.
- Darbonne, W. C., Rice, G. C., Mohler, M. A., Apple, T. H. C. A., Hébert, C. A., Valente, A. J., & Baker, J. B. (1991). Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *The Journal of clinical investigation*, **88**(4), 1362-1369.
- Darling, R. C., & Roughton, F. J. W. (1942). The effect of methemoglobin on the equilibrium between oxygen and hemoglobin. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, **137**(1), 56-68.
- Datta, P., Chakrabarty, S., Chakrabarty, A., & Chakrabarti, A. (2008). Membrane interactions of hemoglobin variants, HbA, HbE, HbF and globin subunits of HbA: Effects of aminophospholipids and cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1778**(1), 1-9.
- De Franceschi, L., Cappellini, M. D., & Olivieri, O. (2011a). Thrombosis and sickle cell disease. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* **37**(3), 226-236.
- De Franceschi, L., Tomelleri, C., Matte, A., Brunati, A. M., Bovee-Geurts, P. H., Bertoldi, M., Lasonder, E., Tibaldi, E., Danek, A., Walker, R. H., Jung, H. H., Bader, B., Siciliano, A., Ferru, E.,

- Mohandas, N., & Bosman, G. J. (2011b). Erythrocyte membrane changes of chorea-acanthocytosis are the result of altered Lyn kinase activity. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, **118(20)**, 5652-5663.
- De Grooth, B. G., Terstappen, L. W. M. M., Pupples, G. J., & Greve, J. (1987). Light-scattering polarization measurements as a new parameter in flow cytometry. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, **8(6)**, 539-544.
- De Vasconcellos, J. F., Tumburu, L., Byrnes, C., Lee, Y. T., Xu, P. C., Li, M., Rabel, A., Clarke, B. A., Guydosh, N. R., Proia, R. M., Miller, J. L. (2017). IGF2BP1 overexpression causes fetal-like hemoglobin expression patterns in cultured human adult erythroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114(28)**, E5664-E5672.
- Di Giacinto, F., Tartaglione, L., Nardini, M., Mazzini, A., Romanò, S., Rizzo, G. E., Papi, M., De Spirito, M., Pitocco, D., Ciasca, G. (2020). Searching for the mechanical fingerprint of pre-diabetes in T1DM: A case report study. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **8**, 569978.
- Drvenica, I., Mojsilović, S., Stančić, A., Marković, D., Kovačić, M., Maslovarić, I., Rapajić, I., Vučetić, D., & Ilić, V. (2021). The effects of incubation media on the assessment of the shape of human erythrocytes by flow cytometry: a contribution to mathematical data interpretation to enable wider application of the method. *European Biophysics Journal*, **50**, 829-846.
- Drvenica, I., Stančić, A., Kalušević, A., Marković, S., Dragišić-Maksimović, J., Nedović, V., Bugarski, B., & Ilić, V. L. (2019). Maltose-mediated, long-term stabilization of freeze-and spray-dried forms of bovine and porcine hemoglobin. *Journal of the Serbian Chemical Society*, **84(10)**, 1105-1117.
- Eaton, W. A., Henry, E., Hofrichter, J., & Mozzarelli, A. (1999). Is cooperative oxygen binding by hemoglobin really understood?. *Nature structural biology*, **6(4)**, 351-358.
- Eisinger, J., Flores, J., Tyson, J. A., & Shohet, S. B. (1985). Fluorescent cytoplasm and Heinz bodies of hemoglobin Koln erythrocytes: evidence for intracellular heme catabolism, 886-893.
- Ercan, M., Konukoğlu, D., Erdem, T., & Önen, S. (2002). The effects of cholesterol levels on hemorheological parameters in diabetic patients. *Clinical hemorheology and microcirculation*, **26(4)**, 257-263.
- Erickson, B. H., & Nosanchuk, T. A. (1992). *Understanding Data* 2nd edition Buckingham.
- Ferrer Ortas, J., Mahou, P., Escot, S., Stringari, C., David, N. B., Bally-Cuif, L., Dray, N., Négrerie, M., Supatto, W., & Beaurepaire, E. (2023). Label-free imaging of red blood cells and oxygenation with color third-order sum-frequency generation microscopy. *Light: Science & Applications*, **12(1)**, 29.
- Franck, P., Buijs, P., Meenhuis, A., Dane, M., Postma, C., Spaans, A., Gijsbertha, N., Kuypers, F. A., Hudig, C., & Kerckhoffs, J. L. (2022). The ektacytometric elongation Index (EI) of erythrocytes, validation of a prognostic, rheological biomarker for patients with sickle cell disease. *European Journal of Haematology*, **108(5)**, 413-422.

- Frolova, L. A., Furmansky, Y., Shestakov, A. F., Emelianov, N. A., Liddell, P. A., Gust, D., Visoly-Fisher, I., & Troshin, P. A. (2022). Advanced Nonvolatile Organic Optical Memory Using Self-Assembled Monolayers of Porphyrin–Fullerene Dyads. *ACS applied materials & interfaces*, **14**(13), 15461-15467.
- Garrett, N. L., Lalatsa, A., Uchegbu, I., Schätzlein, A., & Moger, J. (2012). Exploring uptake mechanisms of oral nanomedicines using multimodal nonlinear optical microscopy. *Journal of biophotonics*, **5**(5-6), 458-468.
- Garton, T., Keep, R. F., Hua, Y., & Xi, G. (2017). CD163, a hemoglobin/haptoglobin scavenger receptor, after intracerebral hemorrhage: functions in microglia/macrophages versus neurons. *Translational stroke research*, **8**(6), 612-616.
- Geers, C., & Gros, G. (2000). Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle. *Physiological reviews*, **80**(2), 681-715.
- Giambona, A., Passarello, C., Renda, D., & Maggio, A. (2009). The significance of the hemoglobin A2 value in screening for hemoglobinopathies. *Clinical biochemistry*, **42**(18), 1786-179.
- Giardina, B., Messina, I., Scatena, R., & Castagnola, M. (1995). The multiple functions of hemoglobin. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, **30**(3), 165-196.
- Gibaud, E. (2015). *Numerical simulation of red blood cells flowing in a blood analyzer* (Doctoral dissertation, Université Montpellier).
- Gienger, J., Gross, H., Ost, V., Bär, M., & Neukammer, J. (2019). Assessment of deformation of human red blood cells in flow cytometry: measurement and simulation of bimodal forward scatter distributions. *Biomedical optics express*, **10**(9), 4531-4550.
- Gorudko, I. V., Sokolov, A. V., Shamova, E. V., Grigorieva, D. V., Mironova, E. V., Kudryavtsev, I. V., Gusev, S. A., Gusev, A. A., Chekanov, A. V., Vasilyev, V. B., Cherenkevich, S. N., Panasenko, O. M., & Timoshenko, A. V. (2016). Binding of human myeloperoxidase to red blood cells: Molecular targets and biophysical consequences at the plasma membrane level. *Archives of biochemistry and biophysics*, **591**, 87-97.
- Greco, W.R., Hakala, M.T. (1979). Evaluation of methods for estimating the dissociation constant of tight binding enzyme inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, **254**, 12104-12109.
- Guo, Q., Duffy, S. P., Matthews, K., Santoso, A. T., Scott, M. D., & Ma, H. (2014). Microfluidic analysis of red blood cell deformability. *Journal of biomechanics*, **47**(8), 1767-1776
- Gutierrez, M., Fish, M. B., Golinski, A. W., & Eniola-Adefeso, O. (2018). Presence of rigid red blood cells in blood flow interferes with the vascular wall adhesion of leukocytes. *Langmuir*, **34**(6), 2363-2372.
- Gyawali, P., Richards, R. S., & Uba Nwose, E. (2012). Erythrocyte morphology in metabolic syndrome. *Expert Review of Hematology*, **5**(5), 523-531.
- Haldane, J. (1895). The action of carbonic oxide on man. *The Journal of Physiology*, **18**(5-6), 430.

- Hanson, E. K., & Ballantyne, J. (2010). A blue spectral shift of the hemoglobin soret band correlates with the age (time since deposition) of dried bloodstains. *PLoS One*, **5(9)**, e12830.
- Hardeman, M. R., Dobbe, J. G. G., & Ince, C. (2001). The Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **25(1)**, 1-11.
- Harvey, J. W. (1997). The erythrocyte: physiology, metabolism, and biochemical disorders. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 157-203.
- He, S., Ye, C., Sun, Q., Leung, C. K., & Qu, J. Y. (2015). Label-free nonlinear optical imaging of mouse retina. *Biomedical Optics Express*, **6(3)**, 1055-1066.
- Hebbel, R. P., Leung, A., & Mohandas, N. (1990). Oxidation-induced changes in microrheologic properties of the red blood cell membrane. *Blood*, **76(5)**, 1015-1020.
- Helms, C., & Kim-Shapiro, D. B. (2013). Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, **61**, 464-472.
- Hill, R. J., & Koningsberg, W. (1962). The structure of human hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, **237(10)**, 3151-3156.
- Hilpert, P., Fleischmann, R. G., Kempe, D., & Bartels, H. (1963). The Bohr effect related to blood and erythrocyte pH. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, **205(2)**, 337-340.
- Hooper, K. M., Barlow, P. G., Henderson, P., & Stevens, C. (2019). Interactions between autophagy and the unfolded protein response: implications for inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, **25(4)**, 661-671.
- Htun, N. M., Chen, Y. C., Lim, B., Schiller, T., Maghzal, G. J., Huang, A. L., Elgass, K. D., Rivera, J., Schneider, H. G., Wood, B. R., Stocker, R., & Peter, K. (2017). Near-infrared autofluorescence induced by intraplaque hemorrhage and heme degradation as marker for high-risk atherosclerotic plaques. *Nature communications*, **8(1)**, 75.
- Huisjes, R., Makhro, A., Llaudet-Planas, E., Hertz, L., Petkova-Kirova, P., Verhagen, L. P., Pignatelli, S., Rab, M. A. E., Schiffelers, R. M., Seiler, E., van Solinge, W. W., Corrons, J. V., Kaestner, L., Mañú-Pereira, M., Bogdanova, A., & van Wijk, R. (2020). Density, heterogeneity and deformability of red cells as markers of clinical severity in hereditary spherocytosis. *Haematologica*, **105(2)**, 338.
- Immenschuh, S., Baumgart-Vogt, E., & Mueller, S. (2010). Heme oxygenase-1 and iron in liver inflammation: a complex alliance. *Current drug targets*, **11(12)**, 1541-1550.
- Jensen, F. B. (2004). Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport. *Acta Physiologica Scandinavica*, **182(3)**, 215-227.
- Jeong, J. M., An, C. M., Kim, M. C., & Park, C. I. (2016). Cooperation of erythrocytes with leukocytes in immune response of a teleost *Oplegnathus fasciatus*. *Genes & genomics*, **38**, 931-938.

- Johnson, R. M., Goyette Jr, G., Ravindranath, Y., & Ho, Y. S. (2005). Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, **39**(11), 1407-1417.
- Kacimi, R., Giffard, R. G., & Yenari, M. A. (2011). Endotoxin-activated microglia injure brain derived endothelial cells via NF- κ B, JAK-STAT and JNK stress kinase pathways. *Journal of inflammation*, **8**, 1-15.
- Kang, K., Lee, S. B., Yoo, J. H., & Nho, C. W. (2010). Flow cytometric fluorescence pulse width analysis of etoposide-induced nuclear enlargement in HCT116 cells. *Biotechnology Letters*, **32**, 1045-1052.
- Kang, Y. J., Serhrouchni, S., Makhro, A., Bogdanova, A., & Lee, S. S. (2022). Simple Assessment of Red Blood Cell Deformability using blood pressure in Capillary channels for effective detection of subpopulations in Red Blood cells. *ACS Omega*, **7**(43), 38576-38588.
- Kannan, R., Labotka, R., & Low, P. S. (1988). Isolation and characterization of the hemichrome-stabilized membrane protein aggregates from sickle erythrocytes. Major site of autologous antibody binding. *Journal of Biological Chemistry*, **263**(27), 13766-13773.
- Kay, M. M. (1975). Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **72**(9), 3521-3525.
- Kim, J., Lee, H., & Shin, S. (2015). Advances in the measurement of red blood cell deformability: A brief review. *Journal of Cellular Biotechnology*, **1**(1), 63-79.
- Klinken, S. P. (2002). Red blood cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **34**(12), 1513-1518.
- Kobayashi, J., Ohtake, K., Murata, I., & Sonoda, K. (2022). Nitric oxide bioavailability for red blood cell deformability in the microcirculation: A review of recent progress. *Nitric Oxide*, **129**, 25-29.
- Kosmachevskaya, O. V., Nasybullina, E. I., Blindar, V. N., & Topunov, A. F. (2019). Binding of erythrocyte hemoglobin to the membrane to realize signal-regulatory function. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **55**, 83-98.
- Kostić, I. T., Ilić, V. L., Đorđević, V. B., Bukara, K. M., Mojsilović, S. B., Nedović, V. A., Bugarski, D. S., Veljović, Đ. N., Mišić, D. M., Bugarski, B. M., (2014). Erythrocyte membranes from slaughterhouse blood as potential drug vehicles: Isolation by gradual hypotonic hemolysis and biochemical and morphological characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **122**, 250-259.
- Kuck, L., Peart, J. N., & Simmonds, M. J. (2020). Active modulation of human erythrocyte mechanics. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **319**(2), C250-C257.
- Kuhn, V., Diederich, L., Keller, T. C. S., 4th, Kramer, C. M., Lückstädt, W., Panknin, C., Suvorava, T., Isakson, B. E., Kelm, M., & Cortese-Krott, M. M. (2017). Red blood cell function and dysfunction: redox regulation, nitric oxide metabolism, anemia. *Antioxidants & redox signaling*, **26**(13), 718-742.

- Kumar Nathella, P., & Babu, S. (2017). Influence of diabetes mellitus on immunity to human tuberculosis. *Immunology*, **152**(1), 13-24.
- Kuo, M. S., Chuang, C. H., Cheng, H. C., Lin, H. R., Wang, J. S., & Hsu, K. (2021). Different involvement of band 3 in red cell deformability and osmotic fragility—a comparative GP. Mur erythrocyte study. *Cells*, **10**(12), 3369.
- Kurata, M., Suzuki, M., & Agar, N. S. (1993). Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **106**(3), 477-487.
- Ladner, C. L., Tran, K., Le, M., Turner, R. J., & Edwards, R. A. (2014). Excited state photoreaction between the indole side chain of tryptophan and halocompounds generates new fluorophores and unique modifications. *Photochemistry and Photobiology*, **90**(5), 1027-1033.
- Lam, L. K. M., Reilly, J. P., Rux, A. H., Murphy, S. J., Kuri-Cervantes, L., Weisman, A. R., Ittner, C. A. G., Pampena, M. B., Betts, M. R., Wherry, E. J., Song, W. C., Lambris, J. D., Meyer, N. J., Cines, D. B., & Mangalmurti, N. S. (2021). Erythrocytes identify complement activation in patients with COVID-19. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **321**, L485-L489.
- Larsen, R., Gouveia, Z., Soares, M. P., & Gozzelino, R. (2012). Heme cytotoxicity and the pathogenesis of immune-mediated inflammatory diseases. *Frontiers in pharmacology*, **3**, 77.
- Larsen, R., Gozzelino, R., Jeney, V., Tokaji, L., Bozza, F. A., Japiassú, A. M., Bonaparte, D., Cavalcante, M. M., Chora, A., Ferreira, A., Marguti, I., Cardoso, S., Sepúlveda, N., Smith, A., & Soares, M. P. (2010). A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis. *Science translational medicine*, **2**(51), 51ra71-51ra71.
- Lee, J. S., Wurfel, M. M., Matute-Bello, G., Frevert, C. W., Rosengart, M. R., Ranganathan, M., Wong, V. W., Holden, T., Sutlief, S., Richmond, A., Peiper, S., & Martin, T. R. (2006). The Duffy antigen modifies systemic and local tissue chemokine responses following lipopolysaccharide stimulation. *The Journal of Immunology*, **177**(11), 8086-8094.
- Lee, S. B., Kim, Y. S., Kim, J. H., Park, K., Nam, J. S., Kang, S., Park, J. S., Shin, S., & Ahn, C. W. (2019). Use of RBC deformability index as an early marker of diabetic nephropathy. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **72**(1), 75-84.
- Lee, S., Lee, M. Y., Nam, J. S., Kang, S., Park, J. S., Shin, S., Ahn, C. W., & Kim, K. R. (2015). Hemorheological approach for early detection of chronic kidney disease and diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabetes Technology & Therapeutics*, **17**(11), 808-815.
- Leffler, C. W., Parfenova, H., & Jaggar, J. H. (2011). Carbon monoxide as an endogenous vascular modulator. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **301**(1), H1-H11.
- Li, D., Zheng, W., Zeng, Y., Luo, Y., & Qu, J. Y. (2011). Two-photon excited hemoglobin fluorescence provides contrast mechanism for label-free imaging of microvasculature in vivo. *Optics letters*, **36**(6), 834-836.

- Livshits, L., Peretz, S., Bogdanova, A., Zoabi, H., Eitam, H., Barshtein, G., Galindo, C., Feldman, Y., Pajić-Lijaković, I., Koren, A., Gassmann, M., & Levin, C. (2023). The Impact of Ca²⁺ on Intracellular Distribution of Hemoglobin in Human Erythrocytes. *Cells*, **12(18)**, 2280.
- Low, P. S., Waugh, S. M., Zinke, K., & Drenckhahn, D. (1985). The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Science*, **227(4686)**, 531-533.
- Lu, H., Floris, F., Rensing, M., & Andersson-Engels, S. (2020). Fluorescence spectroscopy study of protoporphyrin IX in optical tissue simulating liquid phantoms. *Materials*, **13(9)**, 2105.
- Luchi, W. M., Crajoinas, R. O., Martins, F. L., Castro, P. D. C., Venturini, G., Seguro, A. C., & Girardi, A. C. (2021). High blood pressure induced by vitamin D deficiency is associated with renal overexpression and hyperphosphorylation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻-cotransporter type 2. *Journal of Hypertension*, **39(5)**, 880-891.
- Lutz, H. U., & Bogdanova, A. (2013). Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans. *Frontiers in physiology*, **4**, 387.
- Macey, R. I. (1984). Transport of water and urea in red blood cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **246(3)**, C195-C203.
- Maeda, N. (1996). Erythrocyte rheology in microcirculation. *The Japanese journal of physiology*, **46(1)**, 1-14.
- Maines, M. D. (2000). The heme oxygenase system and its functions in the brain. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*, **46(3)**, 573-585.
- Mairbäurl, H. (2013). Red blood cells in sports: effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells. *Frontiers in physiology*, **4**, 332.
- Malandrino, N., Wu, W. C., Taveira, T. H., Whitlatch, H. B., & Smith, R. J. (2012). Association between red blood cell distribution width and macrovascular and microvascular complications in diabetes. *Diabetologia*, **55**, 226-235.
- Mansouri, A., & Lurie, A. A. (1993). Methemoglobinemia. *American Journal of Hematology*, **42(1)**, 7-12.
- Mantel, P. Y., Hjelmqvist, D., Walch, M., Kharoubi-Hess, S., Nilsson, S., Ravel, D., Ribeiro, M., Grüring, C., Ma, S., Padmanabhan, P., Trachtenberg, A., Ankarklev, J., Brancucci, N. M., Huttenhower, C., Duraisingh, M. T., Ghiran, I., Kuo, W. P., Filgueira, L., Martinelli, R., & Marti, M. (2016). Infected erythrocyte-derived extracellular vesicles alter vascular function via regulatory Ago2-miRNA complexes in malaria. *Nature communications*, **7(1)**, 12727.
- Maruyama, T., Hieda, M., Mawatari, S., & Fujino, T. (2022). Rheological abnormalities in human erythrocytes subjected to oxidative inflammation. *Frontiers in Physiology*, **13**, 837926.
- Maulucci, G., Cordelli, E., Rizzi, A., De Leva, F., Papi, M., Ciasca, G., Samengo, D., Pani, G., Pitocco, D., Soda, P., Ghirlanda, G., Iannello, G., & De Spirito, M. (2017). Phase separation of the plasma membrane in human red blood cells as a potential tool for diagnosis and progression monitoring of type 1 diabetes mellitus. *PLoS One*, **12(9)**, e0184109.

- Maurya, P. K., Kumar, P., & Chandra, P. (2015). Biomarkers of oxidative stress in erythrocytes as a function of human age. *World journal of methodology*, **5(4)**, 216.
- Mawatari, S., & Murakami, K. (2004). Different types of glutathionylation of hemoglobin can exist in intact erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **421(1)**, 108-114.
- Mazzetti, A. P., Fiorile, M. C., Primavera, A., & Bello, M. L. (2015). Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochemistry international*, **82**, 10-18.
- McNamee, A. P., Tansley, G. D., & Simmonds, M. J. (2020). Sublethal mechanical shear stress increases the elastic shear modulus of red blood cells but does not change capillary transit velocity. *Microcirculation*, **27(8)**, e12652.
- McVey, M. J., Kuebler, W. M., Orbach, A., Arbell, D., Zelig, O., Barshtein, G., & Yedgar, S. (2020). Reduced deformability of stored red blood cells is associated with generation of extracellular vesicles. *Transfusion and Apheresis Science*, **59(5)**, 102851.
- Meng, F., & Alayash, A. I. (2017). Determination of extinction coefficients of human hemoglobin in various redox states. *Analytical biochemistry*, **521**, 11-19.
- Mohanty, J. G., Nagababu, E., & Rifkind, J. M. (2014). Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Frontiers in physiology*, **5**, 84.
- Mohanty, K., & Ghosh, R. (2008). Novel tangential-flow countercurrent cascade ultrafiltration configuration for continuous purification of humanized monoclonal antibody. *Journal of Membrane Science*, **307(1)**, 117-125.
- Moleirinho, A., Seixas, S., Lopes, A. M., Bento, C., Prata, M. J., & Amorim, A. (2013). Evolutionary constraints in the β -globin cluster: the signature of purifying selection at the δ -globin (HBD) locus and its role in developmental gene regulation. *Genome biology and evolution*, **5(3)**, 559-571.
- Moncada, S., Higgs, A., & Furchgott, R. (1997). XIV International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacological reviews*, **49(2)**, 137-142.
- Morabito, R., Remigante, A., Di Pietro, M. L., Giannetto, A., La Spada, G., & Marino, A. (2017). SO₄⁼ uptake and catalase role in preconditioning after H₂O₂-induced oxidative stress in human erythrocytes. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, **469**, 235-250.
- Morabito, R., Romano, O., La Spada, G., & Marino, A. (2016). H₂O₂-induced oxidative stress affects SO₄⁼ transport in human erythrocytes. *PloS one*, **11(1)**, e0146485.
- Moxness, M. S., Brunauer, L. S., & Huestis, W. H. (1996). Hemoglobin oxidation products extract phospholipids from the membrane of human erythrocytes. *Biochemistry*, **35(22)**, 7181-7187.
- Nagababu, E., & Rifkind, J. M. (1998). Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide. *Biochemical and biophysical research communications*, **247(3)**, 592-596.
- Nagababu, E., & Rifkind, J. M. (2000). Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: superoxide production and heme degradation. *Biochemistry*, **39(40)**, 12503-12511.

- Nagababu, E., Ramasamy, S., Abernethy, D. R., & Rifkind, J. M. (2003). Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(47), 46349-46356.
- Nagababu, E., Ramasamy, S., Rifkind, J. M., Jia, Y., & Alayash, A. I. (2002). Site-specific cross-linking of human and bovine hemoglobins differentially alters oxygen binding and redox side reactions producing rhombic heme and heme degradation. *Biochemistry*, **41**(23), 7407-7415.
- Nagatomo, S., Nagai, Y., Aki, Y., Sakurai, H., Imai, K., Mizusawa, N., Ogura, T., Kitagawa, T., & Nagai, M. (2015). An origin of cooperative oxygen binding of human adult hemoglobin: Different roles of the α and β subunits in the $\alpha_2\beta_2$ tetramer. *PLoS One*, **10**(8), e0135080.
- Nasmith, G. G., & Graham, D. A. L. (1906). The haematology of carbon-monoxide poisoning. *The Journal of Physiology*, **35**(1-2), 32.
- Nathan, C. (1995). Natural resistance and nitric oxide. *Cell*, **82**(6), 873-876.
- Nathan, C. (1997). Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make?. *The Journal of clinical investigation*, **100**(10), 2417-2423.
- Neal, M. D., Raval, J. S., Triulzi, D. J., & Simmons, R. L. (2013). Innate immune activation after transfusion of stored red blood cells. *Transfusion medicine reviews*, **27**(2), 113-118.
- Neote, K., Darbonne, W., Ogez, J., Horuk, R., & Schall, T. J. (1993). Identification of a promiscuous inflammatory peptide receptor on the surface of red blood cells. *Journal of Biological Chemistry*, **268**(17), 12247-12249.
- Nikinmaa, M. (1997). Oxygen and carbon dioxide transport in vertebrate erythrocytes: an evolutionary change in the role of membrane transport. *Journal of Experimental Biology*, **200**(2), 369-380.
- Ogurtsova, K., da Rocha Fernandes, J. D., Huang, Y., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, N. H., Cavan, D., Shaw, J. E., & Makaroff, L. E. (2017). IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes research and clinical practice*, **128**, 40-50.
- Otterbein, L. E., & Choi, A. M. (2000). Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **279**(6), L1029-L1037.
- Pan, N., Wu, Y., Yang, B., Zhang, M., He, Y., Wang, Z., Tan, L., Zhang, L. (2023). The liver and blood cells are responsible for creatine kinase clearance in blood Circulation: A retrospective study among different human diseases. *Clinica Chimica Acta*, **544**, 117335.
- Passantino, L., Altamura, M., Cianciotta, A., Jirillo, F., Ribaud, M. R., Jirillo, E., & Passantino, G. F. (2004). Maturation of fish erythrocytes coincides with changes in their morphology, enhanced ability to interact with *Candida albicans* and release of cytokine-like factors active upon autologous macrophages. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, **26**(4), 573-585.
- Patterson, G. H., & Piston, D. W. (2000). Photobleaching in two-photon excitation microscopy. *Biophysical journal*, **78**(4), 2159-2162.

- Perutz, M. F. (1970). Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin: haem–haem interaction and the problem of allostery. *Nature*, **228(5273)**, 726-734.
- Perutz, M. F., Wilkinson, A. J., Paoli, M., & Dodson, G. G. (1998). The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, **27(1)**, 1-34.
- Piety, N. Z., Stutz, J., Yilmaz, N., Xia, H., Yoshida, T., & Shevkoplyas, S. S. (2021). Microfluidic capillary networks are more sensitive than ektacytometry to the decline of red blood cell deformability induced by storage. *Scientific Reports*, **11(1)**, 604.
- Premont, R. T., Reynolds, J. D., Zhang, R., & Stamler, J. S. (2020). Role of nitric oxide carried by hemoglobin in cardiovascular physiology: developments on a three-gas respiratory cycle. *Circulation research*, **126(1)**, 129-158.
- Pretini, V., Koenen, M. H., Kaestner, L., Fens, M. H., Schiffelers, R. M., Bartels, M., & Van Wijk, R. (2019). Red blood cells: chasing interactions. *Frontiers in physiology*, **10**, 945.
- Pretorius, E. (2018). Erythrocyte deformability and eryptosis during inflammation, and impaired blood rheology. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **69(4)**, 545-550.
- Rabi, D. M., Edwards, A. L., Southern, D. A., Svenson, L. W., Sargious, P. M., Norton, P., Larsen, E. T., & Ghali, W. A. (2006). Association of socio-economic status with diabetes prevalence and utilization of diabetes care services. *BMC Health Services Research*, **6**, 1-7.
- Rachmilewitz, E. A., Peisach, J., & Blumberg, W. E. (1971). Studies on the stability of oxyhemoglobin A and its constituent chains and their derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, **246(10)**, 3356-3366.
- Radmilović, M. D., Drvenica, I. T., Rabasović, M. D., Ilić, V. L., Pavlović, D., Oasa, S., Vukojević, V., Perić, M., Nikolić, S. N., & Krmpot, A. J. (2023). Interactions of ultrashort laser pulses with hemoglobin: Photophysical aspects and potential applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, **244**, 125312.
- Radmilović, M.D., Ilić, V.L., Trivanović, D., Petakov, A., Lalić, K., Rabasović, M.D., Krmpot, A.J., & Drvenica, I.T. (2024). Elongation index derivative as a potential hemorheological parameter in a diffraction analysis of diabetes mellitus patients' erythrocytes. *Optical and Quantum Electronics*, **56**, 1225
- Ramos, K. S., Lin, H., & McGrath, J. J. (1989). Modulation of cyclic guanosine monophosphate levels in cultured aortic smooth muscle cells by carbon monoxide. *Biochemical pharmacology*, **38(8)**, 1368-1370.
- Rappaz, B., Barbul, A., Emery, Y., Korenstein, R., Depeursinge, C., Magistretti, P. J., & Marquet, P. (2008). Comparative study of human erythrocytes by digital holographic microscopy, confocal microscopy, and impedance volume analyzer. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, **73(10)**, 895-903.

- Rauenbuehler, P. B., Cordes, K. A., & Salhany, J. M. (1982). Identification of the hemoglobin binding sites on the inner surface of the erythrocyte membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **692(3)**, 361-370.
- Reglinski, J., Hoey, S., Smith, W. E., & Sturrock, R. D. (1988). Cellular response to oxidative stress at sulfhydryl group receptor sites on the erythrocyte membrane. *Journal of Biological Chemistry*, **263(25)**, 12360-12366.
- Ren, Z., Sun, G., Zhang, Q., Zou, S., Chen, J., Zhao, W., Hou, G., Zhong, Z., Li, J., Ye, Y., Xu, X., & Lin, L. (2023). LC-MS/MS-Based absolute quantitation of hemoglobin subunits from dried blood spots reveals novel biomarkers for α -thalassemia silent carriers. *Analytical Chemistry*, **95(24)**, 9244-9251.
- Rifkind, J. M., & Nagababu, E. (2013). Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxidants & redox signaling*, **18(17)**, 2274-2283.
- Rizvi, S. I., & Maurya, P. K. (2007). Markers of oxidative stress in erythrocytes during aging in humans. *Annals of the New York academy of sciences*, **1100(1)**, 373-382.
- Rizvi, S. I., Jha, R., & Maurya, P. K. (2006). Erythrocyte plasma membrane redox system in human aging. *Rejuvenation research*, **9(4)**, 470-474.
- Rodríguez, L. E., Curtidor, H., Ocampo, M., Garcia, J., Puentes, A., Valbuena, J., Vera, R., López, R., & Patarroyo, M. E. (2005). Identifying Plasmodium falciparum merozoite surface antigen 3 (MSP3) protein peptides that bind specifically to erythrocytes and inhibit merozoite invasion. *Protein science*, **14(7)**, 1778-1786.
- Rodríguez, Y., & Christophe, A. B. (2005). Long-chain ω 6 polyunsaturated fatty acids in erythrocyte phospholipids are associated with insulin resistance in non-obese type 2 diabetics. *Clinica Chimica Acta*, **354(1-2)**, 195-199.
- Rudra, C. B., Williams, M. A., Sheppard, L., Koenig, J. Q., Schiff, M. A., Frederick, I. O., & Dills, R. (2010). Relation of whole blood carboxyhemoglobin concentration to ambient carbon monoxide exposure estimated using regression. *American journal of epidemiology*, **171(8)**, 942-951.
- Sakaguchi, M., Miyazaki, N., Fujioka, H., Kaneko, O., & Murata, K. (2016). Three-dimensional analysis of morphological changes in the malaria parasite infected red blood cell by serial block-face scanning electron microscopy. *Journal of structural biology*, **193(3)**, 162-171.
- Sardella, D., Kristensen, A. M., Bordoni, L., Kidmose, H., Shahrokhtash, A., Sutherland, D. S., Frische, S., & Schiessl, I. M. (2023). Serial intravital 2-photon microscopy and analysis of the kidney using upright microscopes. *Frontiers in Physiology*, **14**, 1176409.
- Sata, M., Nishimatsu, H., Suzuki, E., Sugiura, S., Yoshizumi, M., Ouchi, Y., Hirata, Y., & Nagai, R. (2001). Endothelial nitric oxide synthase is essential for the HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin to promote collateral growth in response to ischemia. *The FASEB Journal*, **15(13)**, 2530-2532.

- Saytashev, I., Glenn, R., Murashova, G. A., Osseiran, S., Spence, D., Evans, C. L., & Dantus, M. (2016). Multiphoton excited hemoglobin fluorescence and third harmonic generation for non-invasive microscopy of stored blood. *Biomedical Optics Express*, **7(9)**, 3449-3460.
- Schmid-Schönbein, G. W. (1987). Leukocyte kinetics in the microcirculation. *Biorheology*, **24(2)**, 139-151.
- Schut, N. H., Bilo, H. J. G., Popp-Snijders, C., Goedhart, P. T., & Wilmink, J. M. (1993a). Erythrocyte deformability, endothelin levels, and renal function in cyclosporin-treated renal transplant recipients: effects of intervention with fish oil and corn oil. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, **53(5)**, 499-506.
- Schut, N. H., Van Arkel, E. C., Hardeman, M. R., Bilo, H. J. G., Michels, R. P. J., & Vreeken, J. (1993b). No decreased erythrocyte deformability in type 1 (insulin-dependent) diabetes, either by filtration or by ektacytometry. *Acta Diabetologica*, **30**, 89-92.
- Sega, M. F., Chu, H., Christian, J. A., & Low, P. S. (2015). Fluorescence assay of the interaction between hemoglobin and the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **55(3)**, 266-271.
- Shaklai, M., & Tavassoli, M. (1978a). Demarcation membrane system in rat megakaryocyte and the mechanism of platelet formation: a membrane reorganization process. *Journal of ultrastructure research*, **62(3)**, 270-285.
- Shaklai, N. U. R. I. T. H., Benitez, L. I. T. A., & Ranney, H. M. (1978b). Binding of 2, 3-diphosphoglycerate by spectrin and its effect on oxygen affinity of hemoglobin. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **234(1)**, C36-C40.
- Shaw, J. E., Sicree, R. A., & Zimmet, P. Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*, **87(1)**, 4-14.
- Shelton, R. L., Mattison, S. P., & Applegate, B. E. (2014). Volumetric imaging of erythrocytes using label-free multiphoton photoacoustic microscopy. *Journal of Biophotonics*, **7(10)**, 834-840.
- Shimo, H., Arjunan, S. N., Machiyama, H., Nishino, T., Suematsu, M., Fujita, H., Tomita, M., & Takahashi, K. (2015). Particle simulation of oxidation induced band 3 clustering in human erythrocytes. *PLOS Computational Biology*, **11(6)**, e1004210.
- Shin, S., Ku, Y., Babu, N., & Singh, M. (2007). Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus. *Indian Journal of Experimental Biology*, **45**, 121-128.
- Shin, S., Ku, Y., Park, M.S., & Suh, J.S. (2005). Slit-flow ektacytometry: Laser diffraction in a slit rheometer. *Cytometry*, **65B**, 6-13.
- Shirshin, E. A., Yakimov, B. P., Rodionov, S. A., Omelyanenko, N. P., Priezzhev, A. V., Fadeev, V. V., Lademann, J., & Darvin, M. E. (2018). Formation of hemoglobin photoproduct is responsible for two-photon and single photon-excited fluorescence of red blood cells. *Laser Physics Letters*, **15(7)**, 075604.

- Shroff, U. N., Schiessl, I. M., Gyarmati, G., Riquier-Brison, A., & Peti-Peterdi, J. (2019). Novel fluorescence techniques to quantitate renal cell biology. In *Methods in cell biology* **154**, 85-107. Academic Press.
- Signorini, C., Ferrali, M., Ciccoli, L., Sugherini, L., Magnani, A., & Comporti, M. (1995). Iron release, membrane protein oxidation and erythrocyte ageing. *FEBS letters*, **362(2)**, 165-170.
- Silverman, B. W. (2018). *Density estimation for statistics and data analysis*. Routledge.
- Snyder, L. M., Fortier, N. L., Trainor, J., Jacobs, J., Leb, L., Lubin, B., Chiu, D., Shohet, S., & Mohandas, N. (1985). Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking. *The Journal of Clinical Investigation*, **76(5)**, 1971-1977.
- So, P. T., Dong, C. Y., Masters, B. R., & Berland, K. M. (2000). Two-photon excitation fluorescence microscopy. *Annual review of biomedical engineering*, **2(1)**, 399-429.
- Sokolova, I., Kachalova, A., Fabrichnova, A., Kovaleva, Y., Shahnazarov, A., & Koshelev, V. (2017). Hemorheological properties in patients with type-1 and type-2 diabetes mellitus. *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*, **3(3)**, 030402.
- Sprague, R. S., Stephenson, A. H., Bowles, E. A., Stumpf, M. S., & Lonigro, A. J. (2006). Reduced expression of Gi in erythrocytes of humans with type 2 diabetes is associated with impairment of both cAMP generation and ATP release. *Diabetes*, **55(12)**, 3588-3593.
- Squier, T. C. (2001). Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Experimental gerontology*, **36(9)**, 1539-1550.
- Stančić, A. Z., Drvenica, I. T., Obradović, H. N., Bugarski, B. M., Ilić, V. L., & Bugarski, D. S. (2020). Native bovine hemoglobin reduces differentiation capacity of mesenchymal stromal cells in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, **144**, 909-920.
- Steinberg, M. H., & Rodgers, G. P. (2015). HbA2: biology, clinical relevance and a possible target for ameliorating sickle cell disease. *British journal of haematology*, **170(6)**, 781-787.
- Steinberg, M. H., Forget, B. G., Higgs, D. R., & Weatherall, D. J. (2009). *Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management*. Cambridge University Press.
- Streekstra, G. J., Hoekstra, A. G., & Heethaar, R. M. (1994). Anomalous diffraction by arbitrarily oriented ellipsoids: applications in ektacytometry. *Applied optics*, **33(31)**, 7288-7296.
- Su, H., Liu, X., Du, J., Deng, X., & Fan, Y. (2020). The role of hemoglobin in nitric oxide transport in vascular system. *Medicine in Novel Technology and Devices*, **5**, 100034.
- Subczynski, W. K., Pasenkiewicz-Gierula, M., Widomska, J., Mainali, L., & Raguz, M. (2017). High cholesterol/low cholesterol: effects in biological membranes: a review. *Cell biochemistry and biophysics*, **75**, 369-385.
- Sun, Q., Zheng, W., Wang, J., Luo, Y., & Qu, J. Y. (2015). Mechanism of two-photon excited hemoglobin fluorescence emission. *Journal of Biomedical Optics*, **20(10)**, 105014-105014.

- Tokumasu, F., & Dvorak, J. (2003). Development and application of quantum dots for immunocytochemistry of human erythrocytes. *Journal of Microscopy*, **211(3)**, 256-261.
- Tsakanova, G., Arakelova, E., Ayvazyan, V., Ayvazyan, A., Tatikyan, S., Grigoryan, R., Sargsyan, N., & Arakelyan, A. (2017). Two-photon microscopy imaging of oxidative stress in human living erythrocytes. *Biomedical Optics Express*, **8(12)**, 5834-5846.
- Tukey, J. W. (1977). Exploratory data analysis. *Reading/Addison-Wesley*.
- Turchetti, V., De Matteis, C., Leoncini, F., Trabalzini, L., Guerrini, M., & Forconi, S. (1997). Variations of erythrocyte morphology in different pathologies. *Clinical hemorheology and microcirculation*, **17(3)**, 209-215.
- Turpin, C., Catan, A., Guerin-Dubourg, A., Debussche, X., Bravo, S. B., Álvarez, E., Van Den Elsen, J., Meilhac, O., Rondeau, P., & Bourdon, E. (2020). Enhanced oxidative stress and damage in glycated erythrocytes. *PLoS One*, **15(7)**, e0235335.
- Vallance, P., Collier, J., & Moncada, S. (1989). Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *The Lancet*, **334(8670)**, 997-1000.
- Vigil, G. D., & Howard, S. S. (2015). Photophysical characterization of sickle cell disease hemoglobin by multi-photon microscopy. *Biomedical Optics Express*, **6(10)**, 4098-4104.
- Vitturi, D. A., Sun, C. W., Harper, V. M., Thrash-Williams, B., Cantu-Medellin, N., Chacko, B. K., Peng, N., Dai, Y., Wyss, J. M., Townes, T., & Patel, R. P. (2013). Antioxidant functions for the hemoglobin β 93 cysteine residue in erythrocytes and in the vascular compartment in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, **55**, 119-129.
- Vollaard, N. B., Reeder, B. J., Shearman, J. P., Menu, P., Wilson, M. T., & Cooper, C. E. (2005). A new sensitive assay reveals that hemoglobin is oxidatively modified in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, **39(9)**, 1216-1228.
- Wang, X., Wu, Z., Song, G., Wang, H., Long, M., & Cai, S. (1999). Effects of oxidative damage of membrane protein thiol groups on erythrocyte membrane viscoelasticities. *Clinical hemorheology and microcirculation*, **21(2)**, 137-146.
- Wang, Y., Hu, S., Maslov, K., Zhang, Y., Xia, Y., & Wang, L. V. (2011). In vivo integrated photoacoustic and confocal microscopy of hemoglobin oxygen saturation and oxygen partial pressure. *Optics letters*, **36(7)**, 1029-1031.
- Wang, Y., Yang, P., Yan, Z., Liu, Z., Ma, Q., Zhang, Z., Wang, Y., & Su, Y. (2021). The relationship between erythrocytes and diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Research*, **2021(1)**, 6656062.
- Waugh, R. E. (1987). Effects of inherited membrane abnormalities on the viscoelastic properties of erythrocyte membrane. *Biophysical journal*, **51(3)**, 363-369.
- Waugh, S. M., Willardson, B. M., Kannan, R., Labotka, R. J., & Low, P. S. (1986). Heinz bodies induce clustering of band 3, glycophorin, and ankyrin in sickle cell erythrocytes. *The Journal of clinical investigation*, **78(5)**, 1155-1160.

- Welbourn, E. M., Wilson, M. T., Yusof, A., Metodiev, M. V., & Cooper, C. E. (2017). The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane. *Free Radical Biology and Medicine*, **103**, 95-106.
- Workenhe, S. T., Kibenge, M. J., Wright, G. M., Wadowska, D. W., Groman, D. B., & Kibenge, F. S. (2008). Infectious salmon anaemia virus replication and induction of alpha interferon in Atlantic salmon erythrocytes. *Virology journal*, **5**, 1-12.
- Wu, M., Fan, Y., Li, L., & Yuan, J. (2024). Bi-directional regulation of type I interferon signaling by heme oxygenase-1. *Iscience*, **27(3)**, 109185.
- Wu, X., Li, J. R., Fu, Y., Chen, D. Y., Nie, H., & Tang, Z. P. (2023). From static to dynamic: live observation of the support system after ischemic stroke by two photon-excited fluorescence laser-scanning microscopy. *Neural Regeneration Research*, **18(10)**, 2093-2107.
- Wu, Y., Huang, Y. X., Kang, L. L., Wu, Z. J., & Luo, M. (2010). Effect of pH on molecular constitution and distribution of hemoglobin in living erythrocyte. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, **93(4)**, 348-354.
- Yakimov, B. P., Gogoleva, M. A., Semenov, A. N., Rodionov, S. A., Novoselova, M. V., Gayer, A. V., Kovalev, A. V., Bernakevich, A. I., Fadeev, V. V., Armaganov, A. G., Drachev, V. P., Gorin, D. A., Darvin, M. E., Shcheslavskiy, V. I., Budylin, G. S., Priezzhev, A. V., & Shirshin, E. A. (2019). Label-free characterization of white blood cells using fluorescence lifetime imaging and flow-cytometry: molecular heterogeneity and erythrophagocytosis. *Biomedical Optics Express*, **10(8)**, 4220-4236.
- Zeng, Y., Xu, J., Li, D., Li, L., Wen, Z., & Qu, J. Y. (2012). Label-free in vivo flow cytometry in zebrafish using two-photon autofluorescence imaging. *Optics letters*, **37(13)**, 2490-2492.
- Zheng, W., Li, D., Zeng, Y., Luo, Y., & Qu, J. Y. (2010). Two-photon excited hemoglobin fluorescence. *Biomedical Optics Express*, **2(1)**, 71-79.
- Zhou, Z., Mahdi, A., Tratsiakovich, Y., Zahorán, S., Kövamees, O., Nordin, F., Uribe Gonzalez, A. E., Alvarsson, M., Östenson, C. G., Andersson, D. C., Hedin, U., Hermes, E., Lundberg, J. O., Yang, J., & Pernow, J. (2018). Erythrocytes from patients with type 2 diabetes induce endothelial dysfunction via arginase I. *Journal of the American College of Cardiology*, **72(7)**, 769-780.

8. Прилози

Табела П1. Приказ експерименталних услова за добијање фотопродукта на танким филмовима хемоглобина користећи ТРЕФ скенирајући систем.

Хемоглобин	Концентрација	Време сушења и запремина	Таласна дужина	Снага ласера и област скенирања (fast x slow axis)	Снага ласера после стварања фотопродукта	Резолуција	Усредњавања
Говеђи	38,10 g/l	3 min, 5 uL	730 nm	52,65 mW 0,2 x 0,2V	22,12 mW	1024 x 1024	30
Хумани	26,43 g/l	>5min, 5 uL	730 nm	194,35 mW 0,2 x 0,2V	195,18 mW 0,5 x 0,5V	1024 x 1024	30
Говеђи	76,30 g/l	0 min, 3 uL	730 nm	70 mW 0,2 x 0,2V	52 mW 1,5 x 1,5V	1024 x 1024	30
Хумани	26,43 g/l	3 min, 3 uL	730 nm	69 mW 0,2 x 0,2V	46 mW 0,2 x 0,2	1024 x 1024	30
Говеђи	76,30 g/l	3 min, 3 ul	730 nm	58,16 mW 1,5 x 1,5V	58,15 mW 1,5 x 1,5V	1024 x 1024	30
Хумани	26,43 g/l	0 min, 3 ul	730 nm	61 mW 1,5 x 1,5V	32,7 mW	1024 x 1024	30

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Михајло Радмиловић рођен је 06. августа 1993. године у Београду, Основне и мастер студије је завршио на Биолошком факултету Универзитета у Београду 2018. године на модулу Молекуларна биологија и физиологија, мастер Биофизика, са просечном оценом 9,13, одбранивши мастер рад под насловом “Анализа АТР-зависних струја кроз појединачне канале на мембрани цитоплазматичних капи из гљиве *Phycomyces blakesleeanus* “. Током основних и мастер студија вршио је волонтерски рад у Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић”, Институту од националног значаја за Републику Србију. Докторске академске студије из Биофотонике при Универзитету у Београду уписао је 2018. године. Звање истраживач приправник је стекао 16. априла 2019. године, а од 01. маја 2019. запослен је у Институту за физику Београд Универзитета у Београду. Од 15. маја 2022. изабран је у звање истраживач сарадник. Од септембра 2020. године Михајло Радмиловић учествује на пројекту који финансира Фонд за науку Републике Србије из позива за изврсне пројекте младих истраживача (ПРОМИС): „*Hemoglobin-based spectroscopy and nonlinear imaging of erythrocytes and their membranes as emerging diagnostic tool*“, акроним НЕММАГИНЕРО. Поред тога, био је и учесник на пројекту из програма научне и технолошке билатералне сарадње Србијеса Немачком за 2020-2021. годину, под насловом „*Осликавање и временски разложена спектроскопија у терахерцној, блиској инфрацрвеној и видљивој области за будуће биомедицинске примене*“, као и пројекту из програма научне и технолошке билатералне сарадње Србије са Словенијом за 2020-2021. годину, под насловом „*Нано-спектрално нелинеарно флуоресцентно осликавање хемоглобина без коришћења обележивача за потенцијалну дијагностичку примену*“. Провео је три месеца на усавршавању на Каролинска институту (Стокхолм, Шведска), под руководством проф. др. Владане Вукојевић, у Центру за молекуларну медицину. Тема његовог усавршавања је била везана за примену флуоресцентне корелационе спектроскопије у биомедицинским истраживањима. Тренутно је ангажован на пројекту Фонда за науку Републике Србије под називом: „*Advanced BioPhysical Methods for Soil Targeted Fungi-Based Biocontrol agents*“, 2022-2024, из позива Зелени програм сарадње између науке и привреде.

До сада је аутор 5 научних радова објављених у међународним часописима категорија M21a, M21 и M22, као и бројних саопштења на домаћим и међународним конференцијама.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Михајло Д. Радмиловић

број индекса 48/2018

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Интеракција ултракратких ласерских импулса са молекулом хемоглобина и примена савремених техника нелинеарне микроскопије у осликавању еритроцита

- 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 Михајло Д. Радмиловић

Број индекса 48/2018

Студијски програм Биофотоника

Наслов рада Интеракција ултракратких ласерских импулса са молекулом хемоглобина и примена савремених техника нелинеарне микроскопије у осликовању еритроцита

Ментори Др Александар Крмпот

Др Ивана Дрвеница

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:

Интеракција ултракратких ласерских импулса са молекулом хемоглобина и примена савремених техника нелинеарне микроскопије у осликавању еритроцита

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 - Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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.

