

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Ана З. Станчић

**УТИЦАЈ ВАНЋЕЛИЈСКОГ ХЕМОГЛОБИНА
КСЕНОГЕНОГ ПОРЕКЛА НА ФУНКЦИЈСКА
СВОЈСТВА МЕЗЕНХИМСКИХ ЋЕЛИЈА *IN VITRO***

докторска дисертација

Београд, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Ana Z. Stančić

**EFFECT OF EXTRACELLULAR HEMOGLOBIN OF
XENOGENEIC ORIGIN ON FUNCTIONAL
CHARACTERISTICS OF MESENCHYMAL CELLS *IN
VITRO***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ ЗА ОДБРАНУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

МЕНТОРИ:

др Александра Кораћ, редовни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Ивана Дрвеница, научни сарадник
Универзитет у Београду-
Институт за медицинска истраживања

ЧЛАН КОМИСИЈЕ:

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

Датум одбране:

Ова докторска дисертација урађена је у оквиру истраживања предложених у пројекту интегралних и интердисциплинарних истраживања "Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонента хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности" (ИИИИ 46010) чији су руководиоци проф. др Бранко Бугарски (2011-2014.) и проф. др Зорица Кнежевић-Југовић (2014-2019.), као и истраживања у оквиру пројекта "Регенеративни и модулаторни потенцијал адултних матичних ћелија" (ОИ 175062) чији је руководилац др Диана Бугарски, финансираних од стране Министарства за просвету, науку и технолошки развој Републике Србије у периоду од 2011. до 2019. године.

Експериментални део рада ове докторске дисертације већински је изведен у лабораторијама Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду, док су поједини експерименти који су рађени са циљем физичко-хемијске карактеризације хемоглобина, изведени у Лабораторији за фармацеутско инжењерство, Технолошко-металуришког факултета, Универзитета у Београду.

Захвалница

Највећу захвалност дугујем др Весни Илић на указаној прилици да ову докторску дисертацију урадим у оквиру Групе за имунологију, Института за медицинска истраживања, без чијег залагања и подршке она никада не би била завршена. Хвала за увод у свет науке, експерименталног рада, анализе резултата и научног објављивања. Хвала и за несебичну подршку која је одувек превазилазила оквире радног окружења и што ни на једну моју идеју никада нисте рекли „не“.

Велику захвалност дугујем др Ивани Дрвеници на несебичној подршци и помоћи у извођењу експеримената (посебно изоловања, пречишћавања и физичко-хемијске карактеризације хемоглобина), обликовању ове докторске дисертације и писању и објављивању научних публикација које су из ње проистекле. Хвала што си учинила да ме осећај да смо заједно у свему овоме никада не напусти.

Професорки др Александри Кораћ дугујем велику захвалност на корисним сугестијама и примедбама које су допринеле финалном облику ове докторске дисертације. Хвала и на инспиративним предавањима у току мог целокупног школовања која су ме усмерила ка области биологије ћелије и ставиле ћелију, која и даље не престаје да ме фасцинира, у фокус мог интересовања.

Др Диани Бугарски и проф. др Бранку Бугарском хвала што су ми омогућили да ову докторску дисертацију реализујем у оквиру њихова два пројекта, већински на Институту за медицинска истраживања, Универзитета у Београду и делом на Технолошко-металуришком факултету, Универзитета у Београду.

Својој колегиници и пријатељици, др Христини Обрадовић, која је ту од мог првог дана студија, дугујем велику захвалност што ме је увела у експериментални рад са ћелијама и помно пратила како те моје прве, тако и касније кораке у изради ове докторске дисертације. Без наших инспиративних дискусија, ова теза сигурно не би била иста. Хвала на дружењу, разумевању и подршци током свих ових година.

Колегиници из Групе за имунологију, др Маријани Ковачић, хвала на помоћи при извођењу експеримената и анализи резултата електрофоретским и хроматографским техникама. Колегиницама др Тамари Кукољ, др Дренки Тривановић и др Јелени Крстић из Групе за хематологију, хвала на помоћи при мојим првим корацима у раду са мезенхимским матичним ћелијама. Научном саветнику из Групе за молекуларну онкологију, др Хуану Франциску Сантибањезу, хвала што нам је обезбедио ћелијске линије коришћене у изради ове докторске дисертације и за корисне сугестије у раду са њима. Колеги др Славку Мојсиловићу из Групе за хематологију хвала на помоћи при извођењу и анализи резултата проточне цитометрије. Снежани Марковић, техничком сараднику, велико хвала на пренетом знању и помоћи у разазнавању колонија хематопоеетских прогенитора. Колеги из Групе за молекуларну онкологију, др Милошу Диклићу, хвала за корисне савете и сугестије при извођењу методе ланчане реакције полимеразе и тумачењу добијених резултата.

Велико хвала свим колегама са Института за медицинска истраживања из Група за имунологију, хематологију, молекуларну онкологију, кардиоваскуларну физиологију, неуроендокринологију, медицинску паразитологију и медицинску ентомологију што су ми улепшали дане проведене на Институту нашим разговорима. Хвала на сарадњи и колегијалности.

Својој породици захваљујем на подршци током целокупног школовања. Хвала свим мојим пријатељима што су увек имали довољно разумевања за моје бројне обавезе и што никада нису престали да слушају моје приче о науци. Без вас све ово не би ни имало смисла.

УТИЦАЈ ВАНЋЕЛИЈСКОГ ХЕМОГЛОБИНА КСЕНОГЕНОГ ПОРЕКЛА НА ФУНКЦИЈСКА СВОЈСТВА МЕЗЕНХИМСКИХ ЋЕЛИЈА *IN VITRO*

Сажетак

Истраживања обухваћена овом докторском дисертацијом имала су за циљ добијање података о утицају ванћелијског хемоглобина на функцијска својства мезенхимских ћелија *in vitro*. Свињски и говеђи хемоглобин коришћени су као модел ксеногених, лако доступних хемоглобина, који показују висок степен хомологије са хуманим хемоглобином. Као адекватни ћелијски модел системи одабрани су леукоцити периферне крви човека и мезенхимске матичне ћелије периферне крви човека (ПК-ММЋ), као ћелије са којима ванћелијски хемоглобин може доћи у контакт при инстраваскуларној хемолизи. Додатно, утицај хемоглобина испитан је и на четири ћелијске линије АТДС5, МС3Т3-Е1, 3Т3-Л1 и С2С12 које представљају униформније модел системе у односу на ПК-ММЋ за проучавање хондро-, остео-, адипо- и миогенезе.

Добијени резултати показују да ванћелијски хемоглобин има значајан утицај на функцијска својства мезенхимских ћелија, који зависи од врсте организма из ког је хемоглобин изолован, примењене концентрације и типа ћелија на којима је ефекат испитиван. Ванћелијски хемоглобин модулише вијабилност, способност адхезије и продукције реактивних врста кисеоника испитиваних леукоцита, као и пролиферацију/диференцијацију опредељених матичних ћелија хематопоезе. Додатно, показано је да ванћелијски хемоглобин у концентрацији од 0,1 μM остварује ефекат на вијабилност, миграторни и имуномодулаторни капацитет мезенхимских ћелија и инхибира њихову диференцијацију ка хондрогеној, остеогеној, адипогеној и миогеној линији, модулишући експресију специфичних генских маркера.

Ови резултати доприносе бољем сагледавању утицаја ванћелијског хемоглобина у условима интраваскуларне хемолизе на физиологију мезенхимских ћелија, као и његове потенцијалне примене као дијететског суплемента или адитива медијума за култивацију ћелија.

Кључне речи: свињски и говеђи хемоглобин, мезенхимске ћелије, вијабилност, миграција, хондрогена, остеогена, адипогена, миогена диференцијација, имуномодулација

Научна област: Биологија

Ужа научна област: Биологија ћелија и ткива

УДК број:

EFFECT OF EXTRACELLULAR HEMOGLOBIN OF XENOGENEIC ORIGIN ON FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF MESENCHYMAL CELLS *IN VITRO*

Abstract

The main goal of this doctoral dissertation was the investigation of the effect of extracellular hemoglobin on the functional properties of mesenchymal cells *in vitro*. Porcine and bovine hemoglobin were used as models of xenogeneic, readily available hemoglobins, showing a high degree of homology with human hemoglobin. Human peripheral blood leukocytes and human peripheral blood mesenchymal stem cells (PB-MSCs) were selected as adequate cell model systems, since extracellular hemoglobin may come into contact with these cells during intravascular hemolysis. In addition, the effects of hemoglobin were also tested on four cell lines ATDC5, MC3T3-E1, 3T3-L1, and C2C12 as more uniform model systems compared to PB-MSCs to study chondro-, osteo-, adipo-, and myogenesis.

The obtained results show that extracellular hemoglobin has major effect on the functional properties of mesenchymal cells, which depends on the species of organism from which hemoglobin was isolated, hemoglobin concentration used and the type of cells tested. Extracellular hemoglobin modulates viability, adhesion and synthesis ability of reactive oxygen species of leukocytes examined, as well as proliferation/differentiation of committed hematopoietic stem cells. Furthermore, at a concentration of 0.1 μM extracellular hemoglobin had the effect on viability, migratory and immunomodulatory capacity of mesenchymal cells and inhibited their differentiation toward chondro-, osteo-, adipo- and myogenic lineages, modulating the expression of specific gene markers.

These results contribute to a better understanding of the effects of extracellular hemoglobin during intravascular hemolysis on the physiology of mesenchymal cells, as well as its potential applications as a dietary supplement or cell culture media additive.

Key words: porcine and bovine hemoglobin, mesenchymal cells, viability, migration, chondrogenic, osteogenic, adipogenic, myogenic differentiation, immunomodulation

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Cell and Tissue Biology

UDC number:

Садржај

1. Увод	2
1.1. Хемоглобин	2
1.1.1. Појам хемоглобина	2
1.1.2. Историјат проучавања хемоглобина	3
1.1.3. Структура и биосинтеза хемоглобина	4
1.1.4. Функције хемоглобина	7
1.1.4.1. Улога хемоглобина у преносу гасова	7
1.1.4.2. Хемоглобин сисара у екстраћелијској средини	11
1.1.4.3. Улога хемоглобина у имунском одговору	17
1.1.4.4. Улога ванћелијског хемоглобина у различитим патолошким стањима и болестима	19
1.1.5. Хемоглобин у биотехнолошким истраживањима	22
1.1.5.1. Преносиоци кисеоника на бази хемоглобина	22
1.1.5.2. Хемоглобини бескичмењака у биотехнологији	26
1.1.5.3. Хемоглобин из кланичне крви у биотехнологији	27
1.2. Ћелијски модели за испитивање ефеката ванћелијског хемоглобина	29
1.2.1. Матичне ћелије	29
1.2.1.1. Хематопоеетске матичне ћелије	30
1.2.1.2. Мезенхимске матичне ћелије	31
1.2.1.2.1. Извори мезенхимских матичних ћелија	32
1.2.1.2.2. Функцијске карактеристике ММЋ	34
1.2.2. Леукоцити периферне крви	35
1.2.2.1. Мононуклеарне ћелије	36
1.2.2.2. Полиморфонуклеарне ћелије	38
2. Циљеви	42
3. Материјал и методи	46
3.1. Комерцијални реагенси	46
3.2. Медијуми и пуфери за култивацију ћелија и анализу ћелијских функција	49
3.3. Материјал	50
3.3.1. Хемоглобин	50
3.3.2. Мезенхимске ћелије	50
3.3.3. Леукоцити периферне крви човека	50
3.4. Експериментални дизајн	51
3.4.1. Изолација, пречишћавање и физичко-хемијска карактеризација свињског и говеђег хемоглобина	51
3.4.2. Испитивање цитотоксичности свињског и говеђег хемоглобина и потврда њихове биолошке активности	52

3.4.3. Испитивање утицаја свињског и говеђег хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија	53
3.5. Методи	54
3.5.1. Изолација и карактеризација хемоглобина	54
3.5.1.1. Добијање суспензије пакованих еритроцита	54
3.5.1.2. Изолација и делимично пречишћавање хемоглобина	54
3.5.1.3. Испитивање садржаја протеина у узорцима хемоглобина	55
3.5.1.3.1. Електрофореза протеина у полиакриламидном гелу са додатком натријум додецил сулфата	55
3.5.1.3.2. Изоелектрично фокусирање	55
3.5.1.4. Испитивање садржаја липида у узорцима хемоглобина	56
3.5.1.4.1. Екстракција укупних липида	56
3.5.1.4.2. Одређивање фракција укупних липида	56
3.5.1.4.3. Метилација масних киселина	56
3.5.1.4.4. Анализа масних киселина гасно-течном хроматографијом	56
3.5.1.4.5. Одређивање количине укупног фосфора	57
3.5.1.5. Фотон корелациона спектроскопија	57
3.5.1.6. UV-Vis спектроскопија	57
3.5.1.7. Испитивање способности редукције АВТС радикала	57
3.5.1.8. Испитивање садржаја хемоглобина у ћелијским културама	58
3.5.2. Анализа ћелијских функција	59
3.5.2.1. Испитивање утицаја хемоглобина на вијабилност ћелија	59
3.5.2.1.1. Одређивање вијабилности ћелија МТТ тестом	59
3.5.2.1.2. Одређивање вијабилности применом Hoechst ДНК обележивача	59
3.5.2.1.3. Одређивање броја вијабилних ћелија бојењем трипан плавим	60
3.5.2.2. Испитивање утицаја хемоглобина на функцијске карактеристике леукоцита периферне крви човека	60
3.5.2.2.1. Анализа адхезије леукоцита за полистирен	60
3.5.2.2.2. Анализа продукције ROS у леукоцитима	60
3.5.2.2.3. Анализа пролиферације/диференцијације одређених матичних ћелија хематопоезе периферне крви	61
3.5.2.3. Испитивање утицаја хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија	61
3.5.2.3.1. Анализа ћелијског циклуса ПК-ММЋ	61
3.5.2.3.2. Анализа клоногеног потенцијала ПК-ММЋ	62
3.5.2.3.3. Анализа способности миграције мезенхимских ћелија	62
3.5.2.3.4. Анализа диференцијационог потенцијала мезенхимских ћелија	63
3.5.2.3.4.1. Хондрогена диференцијација	63
3.5.2.3.4.2. Остеогена диференцијација	64
3.5.2.3.4.3. Адипогена диференцијација	65

3.5.2.3.4.4. Миогена диференцијација.....	65
3.5.2.3.5. Анализа имуномодулаторног капацитета ПК-ММЋ	66
3.5.2.3.5.1. Испитивање модулаторног ефекта ПК-ММЋ на ћелијски циклус и апоптозу алогених МНЋ	66
3.5.2.3.5.2. Испитивање модулаторног ефекта ПК-ММЋ на пролиферацију алогених МНЋ.....	67
3.5.2.3.5.3. Анализа експресије имуномодулаторних гена ПК-ММЋ.....	68
3.5.3. Анализа експресије гена.....	68
3.5.3.1. Изолација укупне РНК.....	68
3.5.3.2. Реверзна транскрипција.....	68
3.5.3.3. Ланчана реакција полимеразе	69
3.5.3.4. Визуелизација PCR производа електрофорезом у агарозном гелу	72
3.6. Статистичка анализа података	72
4. Резултати.....	74
4.1. Изолација, пречишћавање и физичко-хемијска карактеризација свињског и говеђег хемоглобина	74
4.2. Потврда биолошке активности свињског и говеђег хемоглобина.....	78
4.2.1. Садржај свињског и говеђег хемоглобина у културама хуманих ћелија	78
4.2.3. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на пролиферацију/диференцијацију одређених матичних ћелија хематопоезе периферне крви човека.....	80
4.2.4. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на адхезивност леукоцита периферне крви човека	85
4.2.5. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на продукцију ROS у леукоцитима периферне крви човека.....	86
4.3. Испитивање утицаја свињског и говеђег хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија	86
4.3.1. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на вијабилност мезенхимских ћелија .	86
4.3.2. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на ћелијски циклус и апоптозу мезенхимских ћелија	91
4.3.3. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на клоногени потенцијал мезенхимских ћелија.....	91
4.3.4. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на миграторни потенцијал мезенхимских ћелија.....	91
4.3.5. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на диференцијациони потенцијал мезенхимских ћелија	95
4.3.5.1. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на хондрогену диференцијацију мезенхимских ћелија.....	95
4.3.5.2. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на остеогену диференцијацију мезенхимских ћелија.....	97
4.3.5.3. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на адипогену диференцијацију мезенхимских ћелија.....	103

4.3.5.4. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на миогену диференцијацију мезенхимских ћелија.....	106
4.3.6. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на имуномодулаторни потенцијал мезенхимских матичних ћелија.....	109
4.3.6.1. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на модулаторни ефекат ПК-ММЋ на ћелијски циклус и апоптозу алогених МНЋ.....	109
4.3.6.2. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на модулаторни ефекат ПК-ММЋ на пролиферацију алогених МНЋ.....	111
4.3.6.3. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на експресију имуномодулаторних гена ПК-ММЋ.....	111
5. Дискусија.....	115
5.1. Хемоглобин изолован из кланичне крви има одлике нативног хемоглобина.....	116
5.2. Ефекат ванћелијског хемоглобина испитан је на одговарајућим ћелијским моделима.....	116
5.3. Индиректни докази потврђују да је структура хемоглобина очувана у ћелијским културама.....	117
5.4. Хемоглобин смањује вијабилност МНЋ.....	117
5.5. Хемоглобин модулише адхезивност и продукцију ROS од стране хуманих МНЋ и ПМЋ.....	118
5.6. Хемоглобин модулише пролиферацију/диференцијацију опредељених матичних ћелија хематопоезе периферне крви човека.....	119
5.7. Хемоглобин модулише вијабилност мезенхимских ћелија.....	120
5.8. Хемоглобин модулише миграторни капацитет мезенхимских ћелија.....	122
5.9. Хемоглобин смањује диференцијациони капацитет мезенхимских ћелија.....	123
5.10. Хемоглобин супримира хондрогену диференцијацију мезенхимских ћелија.....	124
5.11. Хемоглобин супримира остеогену диференцијацију мезенхимских ћелија.....	125
5.12. Хемоглобин супримира адипогену диференцијацију мезенхимских ћелија.....	129
5.13. Хемоглобин супримира миогену диференцијацију мезенхимских ћелија.....	130
5.14. HIF-1 може имати улогу у запаженим ефектима хемоглобина на диференцијацију мезенхимских ћелија.....	131
5.15. Хемоглобин утиче на имуномодулаторни капацитет ПК-ММЋ.....	132
5.16. Завршни коментар резултата.....	133
6. Закључци.....	136
7. Литература.....	140
8. Прилози.....	172

УВОД

1. Увод

1.1. Хемоглобин

1.1.1. Појам хемоглобина

Историја живота на планети Земљи уско је повезана са еволуцијом доступности кисеоника у њеној атмосфери. Појавом цијанобактерија, које су могле да користе енергију Сунца за фотосинтезу и ослобађање кисеоника, започет је процес оксигенације Земљине атмосфере. Животне форме све веће сложености (укључујући вишећелијске организме, кичмењаке, сисаре и човека) могу да користе кисеоник као крајњи акцептор у електрон транспортном ланцу у митохондријама, захваљујући протеину хемоглобину. На овај начин, хемоглобин учествује у процесу који обезбеђује енергију за метаболизам аеробних организама и у основи је свих њихових животних процеса (Coates, 1975; Quaye, 2015).

С обзиром на наведену функцију хемоглобина, не чуди што је овај протеин присутан у свим царствима живих организама – од археа и бактерија до животиња и човека. Међутим, његова структура, а самим тим и улога, се код различитих организама вишеструко разликују (Hardison, 1996; Frey & Kallio, 2003; Hoy & Hargrove, 2008). У царству животиња, забележен је у следећим филумима: Platyhelminthes, Nemertea, Nematoda, Annelida, Vestimentifera, Pogonophora, Echiura, Phoronida, Arthropoda, Mollusca, Echinodermata и Chordata, односно процене су да је присутан у око 33% данас познатих класа животиња (Weber & Vinogradov, 2001). Код археа (Freitas et al., 2004), бактерија (Frey & Kallio, 2003), цијанобактерија (Thorsteinsson et al., 1996), алги (Filina et al., 2019), квасца (Oshino et al., 1973) и нелегуминозних биљака (Hoy & Hargrove, 2008; Wang & Hargrove, 2013) пронађени су хемоглобини у форми једноланчаних глобина са једним доменом. Додатно, химерни глобини који се састоје од N-терминалног глобинског домена и C-терминалног редокс-активног протеинског домена, означени као флавоглобини, откривени су код бактерија (Frey & Kallio, 2003; Ferreira et al., 2013) и квасца (Panja et al., 2016). Скраћени (енг. *truncated*) хемоглобини који имају 2-на-2 хеликс структуру присутни су код бактерија, једноћелијских еукариота и биљки (Weber & Vinogradov, 2001; Frey & Kallio, 2003; Hoy & Hargrove, 2008). Хемоглобини бескичмењака обухватају читав спектар различитих структура почев од мономерних глобина до мултисубјединичних протеина и експримирају се на различитим локацијама у организму, укључујући цитоплазму једноћелијских организама, телесне течности или специфична ткива и ћелије вишећелијских организама (Frey & Kallio, 2003). Још увек недовољно испитане кватернерне структуре хемоглобина бескичмењака могу се поделити на неколико различитих група: мономерни једнодоменски хемоглобини, димери и тетрамери унутарћелијски хемоглобини, мултисубјединични дводоменски хемоглобини, мултисубјединични и мултидоменски хемоглобини и гигантски екстрацелуларни хексагонални двослојни хемоглобини (Garlick, 1980; Vinogradov et al., 1986; Zal & Rousselot, 2014).

Варијабилност структуре молекула хемоглобина код различитих организама може бити адаптација на специфичне функције које обављају или шири спектар услова животне средине у односу на оне у којима живе кичмењаци. У поређењу са кичмењацима, мање се зна о повезаности структуре и физиолошке функције хемоглобина археа, бактерија, алги, гљива, биљки и бескичмењачка. Код већине ових организама постоји конзистентна функција хемоглобина која се огледа у реверзибилном везивању кисеоника (Hardison, 1996; Frey & Kallio, 2003). Међутим, хемоглобини различитих организама могу остварити и неке специфичне улоге, попут оптичке (Burg et al., 2000), улоге у ембриогенези (Trewitt et al., 1986) или плутању (Wells et al., 1981). Чак се и та прилично конзервисана улога хемоглобина у преносу кисеоника код различитих организама остварује на различите начине, али често подразумева формирање ћелија (на пример еритроцита) или структура (чворова на коренима биљака које фиксирају азот), у којима је концентрација хемоглобина висока. Насупрот томе, код организама попут бактерија, хемоглобин није одвојен у засебне

ћелије или унутарћелијске компартмане, али се претпоставља да такође остварује улогу допремања кисеоника као крајњег акцептора електрона, у условима хипоксије (Hardison, 1996; Frey & Kallio, 2003).

1.1.2. Историјат проучавања хемоглобина

Код кичмењака, хемоглобин је металопротеин еритроцита са основном улогом у преносу кисеоника од плућа или шкрга до ткива, у којима ће бити искоришћен за метаболичке процесе. Први експериментални налази о хемоглобину датирају с почетка 19. века (Engelhard, 1825) када је показано да је однос гвожђа и протеинског дела хемоглобина неколико врсти сисара идентичан. На основу овог податка израчуната је молекулска маса хемоглобина, као $n \times 16000$, где је n број атома гвожђа по молекулу хемоглобина (данас познато да износи четири) (Engelhard, 1825). Овај закључак није наишао на разумевање научне заједнице тог времена, с обзиром на чињеницу да већина истраживача није веровала да може постојати толико велики молекул. Hünefeld (1840) је случајно извршио кристализацију хемоглобина из крви кишне глисте. Ово откриће описано је у његовом делу *“Der Chemismus in der thierischen Organisation”* („Хемизам у организацији животиња“). Била је то прва кристализација протеина икада урађена, и тек ће крајем 19. века истраживачи почети да ову методу масовније користе у сврхе пречишћавања протеина. Voigt и сарадници (1904) показали су да афинитет кисеоника за везивање за хемоглобин зависи од рН и концентрације угљен-диоксида. Овај феномен остаће означен у уџбеницима хематологије и биохемије као „Боров ефекат“. Десет година касније, описано је везивање кисеоника за хемоглобин као равнотежна реакција са монодиспергованим хемоглобином, у којој константа везивања зависи од животињске врсте из које је хемоглобин изолован (Christiansen et al., 1914). Сто година након првих експерименталних налаза о хемоглобину, потврђено је да је молекулска маса хемоглобина 65 kDa мерењем осмотског притиска раствора хемоглобина и показано да је везивање кисеоника за хемоглобин кооперативан процес (Adair, 1925). Истраживања утицаја рН на криву везивања кисеоника за хемоглобин (Henderson, 1920) и откриће да је гвожђе у молекулу хемоглобина за аминокиселинске остатке глобинских ланаца везано координативним везама (Conant & Scott, 1926), претходили су првој успешној синтези хема (Fischer & Zeile, 1929). Тродимензионална структура молекула хемоглобина потврђена је кристалографијом X зрацима од стране Perutz и сарадника (1960). Хемоглобин је тако постао први протеин са одређеном тродимензионалном структуром и за ово откриће додељена је Нобелова награда за хемију 1962. године. Од тада па до данас, хемоглобин остаје један од највише изучаваних протеина за кога интересовање истраживача не јењава. Због високе концентрације у еритроцитима, који су и сами многобројни у крви, хемоглобин је релативно лако доступан у већим количинама и може се једноставно пречистити у експерименталним условима. Хумани хемоглобин могуће је добити и из престареле крви која се више не може користити за потребе трансфузије и не носи са собом ризике етичке природе. Хемоглобин различитих врста сисара и птица је из кланичне крви доступан у практично неограниченим количинама. Сви набројани разлози чине хемоглобин најбоље окарактерисаним протеином на планети Земљи (Zheng et al., 2013; Wang et al., 2017).

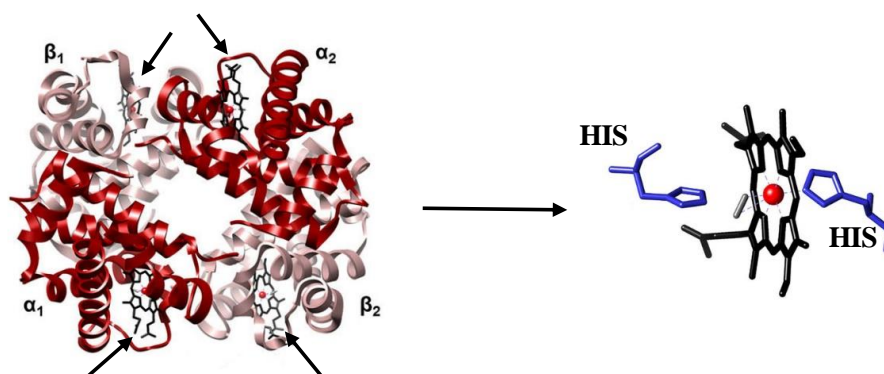
Међутим, док је структура хемоглобина оптимална да пре свега омогући везивање кисеоника и његову испоруку у ткива, она истовремено може довести до генерисања реактивних врста кисеоника (енг. *reactive oxygen species*, ROS) и оштећења ћелија услед аутооксидације у самим еритроцитима, или у условима када се хемоглобин нађе ван ћелија. Бројни су механизми који спречавају да дође до таквог нарушавања хомеостазе. Међутим, у условима траума, повреда, инфламације или инфекције који доводе до нарушавања или превазилажења капацитета хомеостатских механизма, ванћелијски хемоглобин може остварити бројне негативне ефекте на ткива/ћелије са којима долази у контакт и може бити укључен у етиологију и патофизиологију различитих болести (Lara et al., 2009; Rifkind et

al., 2015; Rother et al., 2015). Ова дихотомност у функцији чини хемоглобин тзв. "мачем са две оштрице" – пријатељем у физиолошким условима и непријатељем/потенцијалном опасношћу у условима стреса (Ogasawara et al., 2009; Jeney et al., 2013; Quaye, 2015). Из овог разлога ванћелијски хемоглобин представља актуелан предмет научних истраживања последњих година.

1.1.3. Структура и биосинтеза хемоглобина

У изради ове докторске дисертације коришћен је хемоглобин изолован је из две сисарске врсте (свиње и говеда). Како се структура хемоглобина традиционално изучава на примеру хемоглобина кичмењака, и у овом поглављу ће структура хемоглобина бити детаљније објашњена на примеру хемоглобина сисара.

Хемоглобин сисара је тетрамер, састоји се из четири субјединице. Свака субјединица има протеински део, глобински ланац, и непротеински део, хем групу, коју чини атом гвожђа повезан са четири атома азота у средишту порфириноског прстена (слика 1.1). Порфирин је везан за протеин преко карбоксилних група пропионске киселине. Гвожђе које је у феро стању (Fe^{2+}) остварује четири координативне везе са четири атома азота порфирина; пета координативна веза гвожђа формира се са азотом имидазола проксималног хистидина глобина, а шестом везује кисеоник реверзибилно (Coates & Decker, 2016; Olson, 2020).

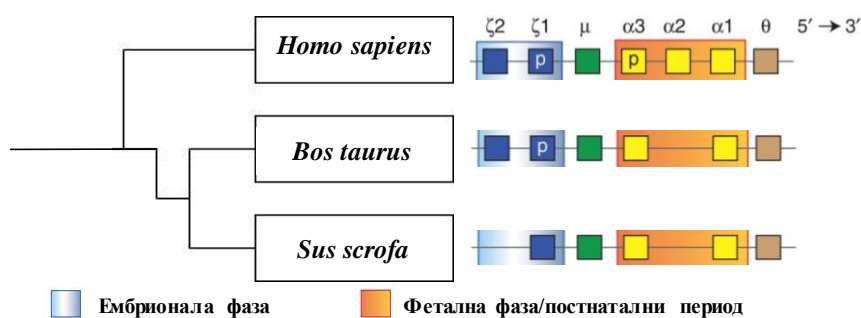


Слика 1.1. Структура хуманог хемоглобина. Свака од субјединица (α_1 , α_2 , β_1 и β_2) која чини тетрамер молекула хемоглобина садржи хем групу које су означене црним стрелицама. Проксимални хистидин (HIS) формира директну везу са атомом гвожђа, док се за дистални хистидин претпоставља да помаже у везивању O_2 . Атом гвожђа означен је црвеним кругом. Преузето и измењено према Coates & Decker, 2016.

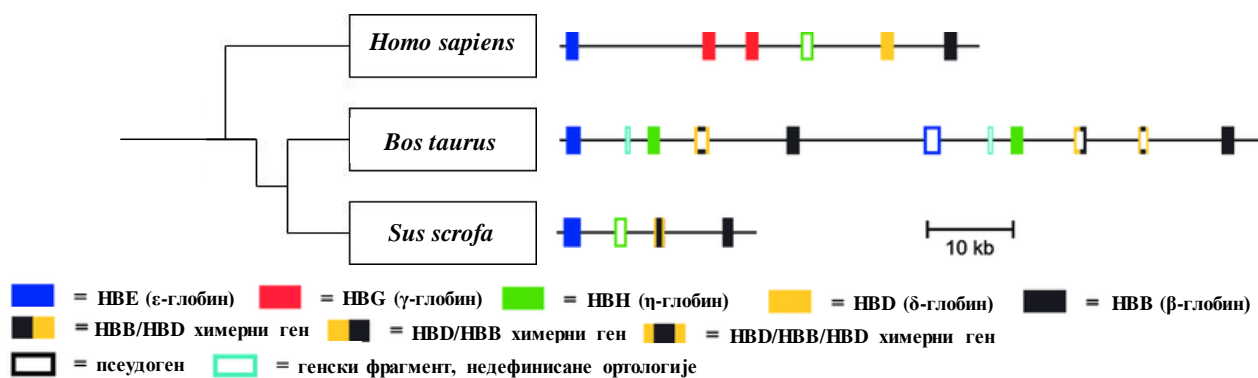
Три комплексна метаболичка сигнална пута неопходна су за биосинтезу хемоглобина и одговарају трима структурним компоненатама овог молекула: протеинском делу (глобинским ланцима), протопорфирину и гвожђу. Како хемоглобин чини приближно 90% суве масе еритроцита, биосинтеза хемоглобина је процес уско повезан са еритропоезом. Под утицајем еритропоетина у најранијим еритроидним прекурсорима, започиње транскрипција глобинских гена. Синтеза хемоглобина наставља се како ћелије даље сазревају и напредују до ступња ретикулоцита када долази до енуклеације. Како зрели еритроцити немају рибозоме, у овим ћелијама се не врши синтеза протеина (Telen, 2009).

Код људи, као и свих других врста кичмењака које су до сада проучене, различити α -слични (енг. *α -like*) и β -слични (енг. *β -like*) глобински ланци синтетичу се кроз прогресивне фазе развића како би учествовали у изградњи хемоглобина карактеристичног за примитивне (ембрионалне) и дефинитивне (феталне и адултне) еритроидне ћелије (Jorissen, 2019). Иако су гени који кодирају глобинске ланце високо конзервисани међу кичмењацима, не експримирају се код свих кичмењака исти глобински ланци у истим

фазама развића (Hardison, 2012). Код човека ембрионални глобини су ϵ и ζ , фетални глобини су α и γ , а у адултне глобине спадају α , β и δ глобини. Хемоглобин А ($\alpha\beta_2$) је преодминантан код адулта и чини више од 96% укупног хемоглобина, док преосталих 4% чини хемоглобин А2 ($\alpha_2\delta_2$) (Dessypris & Sawyer, 2009; Forget & Hardison, 2009). Deisseroth и сарадници (1977, 1978) показали су да се гени за хумане α -сличне и β -сличне глобинске ланце налазе на различитим хромозомима: 16 и 11, респективно. Гени за α и γ глобинске ланце дуплицирани су како код људи, тако и код других изучаваних таксона кичмењака, док постоји само по један пар гена који кодирају β и δ ланце (слике 1.2 и 1.3) (Dessypris & Sawyer, 2009; Hardison, 2012; Gaudry et al., 2014).



Слика 1.2. Мапа ортологичких α -сличних глобинских гена човека (*Homo sapiens*), говеда (*Bos taurus*) и свиње (*Sus scrofa*) и фазе онтогенетског развића у којима се експримирају. Сваки ген је шематски приказан квадрантом. Истом бојом приказани су гени ортологи хуманим глобинским генима који су обележени одговарајућим грчким словом. Фаза онтогенетског развића у којој се одређени гени експримирају приказана је другачијом позадинском бојом како је назначено у легенди. Слово „p“ означава псеудоген. Величина и удаљеност између гена нису веродостојно приказани. Преузето и измењено према Hardison, 2012.



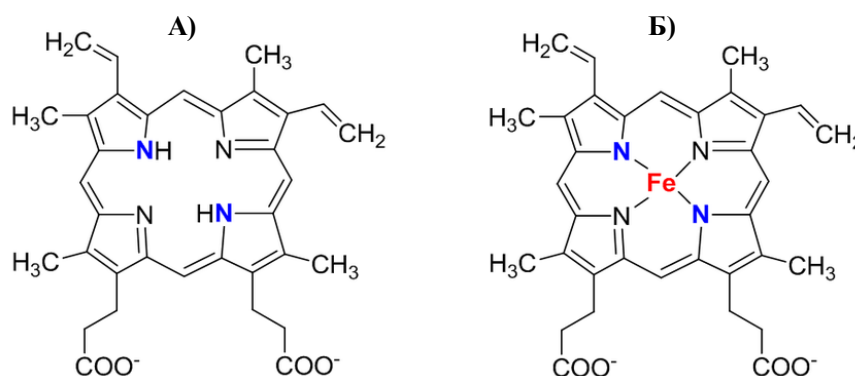
Слика 1.3. Генomsка структура ортологичких β глобинских гена човека (*Homo sapiens*), говеда (*Bos taurus*) и свиње (*Sus scrofa*). Легенда приказана на слици. Преузето и измењено према Gaudry et al., 2014.

Процеси експресије глобинских гена прате општи образац карактеристичан за еукариоте (Dessypris & Sawyer, 2009). Главну улогу у регулацији експресије глобинских гена игра хем делујући на процесе транскрипције и транслације (Fuchs et al., 1981). Овај вид регулације се делимично задржава и у ретикулоцитима у којима хем стимулише протеинску експресију глобина, док у одсуству ове простетичне групе долази до разградње полирибозома.

Хемоглобин, као и сваки протеин, има четири нивоа структурне организације. Без обзира на разлике у примарној структури, сви глобински ланци имају сличну секундарну

структуру, коју чине осам α -хеликса, означених словима од А до Н (Bolton & Perutz, 1970). Хеликси представљају око 75% молекула, а између њих смештени су нехелични сегменти. Док су хеликси прилично ригидни и линеарни, нехелични сегменти омогућавају савијање протеина (Telen, 2009; Lee et al., 2015). У воденим растворима и у кристалној форми, полипептидни ланци заузимају структуру у којој су поларне аминокиселине оријентисане ка површини молекула и интерагују са водом, што молекул чини солубилним. Групе оријентисане ка унутрашњости молекула су неполарне, и хидрофобне везе (ван дер Валсове) се успостављају између њих како би их стабилизовале. Резултат оваквог просторног распореда је грубо сферична, терцијерна структура, што је потврђено дифракцијом X-зрака (Shaanan, 1983). Истом методом потврђено је да када се формира тетрамер хемоглобина, сваки полипептидни ланац лежи апроксимативно на вертикалама правилног тетраедра (Bolton & Perutz, 1970). Везе између истих глобинских ланаца ($\alpha 1\alpha 2$ и $\beta 1\beta 2$) практично су непокретне и не мењају се ни при оксигенацији (Telen, 2009; Lee et al., 2015).

Основу хема чини порфиринско језгро од четири пиролова прстена, повезана двоструким везама којима се формира макроциклична структура (слика 1.4. А). Коњуговане двоструке везе доводе до резонантне стабилне структуре и одговорне су за специфичну пурпурну боју порфирина и његову карактеристичну флуоресценцу (Dilung & Karinus, 1978). Водоникови атоми у одређеним позицијама пиролових прстена који чине структуру порфирина, супституисани су одговарајућим групама. У зависности од врсте, броја и распореда тих супституената постоје различити порфирини. У састав хема улази протопорфирин III, односно изомер IX (по старој номенклатури) (слика 1.4. Б). Дакле, хем је протопорфирин IX у чијем се језгру налази везан јон гвожђа (Fe^{2+}). Уколико се гвожђе у протопорфирину IX оксидује до Fe^{3+} настаје хематин (у виду хидроксида) или хемин (у виду хлорида) (Telen, 2009; Da Silva et al., 2012).



Слика 1.4. Хемијска структура протопорфирина IX и хем групе. (А) Молекул протопорфирина IX. (Б) фери-протопорфирин IX, односно хем. Преузето и измењено према Da Silva et al., 2012.

Гвожђе које је неопходно за биосинтезу хемоглобина може бити рециклирано или унето у организам храном *de novo*. У физиолошким условима, већина гвожђа у организму човека налази се у еритроцитима, па се оно и рециклира за даље потребе еритрофагоцитозом у макрофагима ретикулоендотелског система. Поред њих, значајну улогу у рециклирању гвожђа имају и хепатоцити јетре. Док алвеоларни макрофаги плућа могу да фагоцитују еритроците и конвертују гвожђе у њима у форме за складиштење, али не и да отпусте гвожђе у циркулацију, макрофаги јетре и слезине омогућавају поновно коришћење гвожђа из оштећених или остарелих еритроцита које су фагоцитовали (Andrews, 2009; Alam et al., 2017). Гвожђе у ове макрофаге улази преко трансферин-трансферински рецептор (енг. *transferrin receptor*, TFR) комплекса и ослобађа се из хема под утицајем хем оксигеназе (енг. *heme oxygenase*, HO), а затим се зависно од потражње, или транспортује

назад у циркулацију преко феропортин-церулоплазмин система, или се складишти у овим ћелијама у виду феритина или хемосидерина (Andrews, 2009; Dev & Babitt, 2017).

Гвожђе унето храном апсорбује се у свим деловима танког црева активним процесом. Апсорпција гвожђа на апикалној мембрани ентероцита зависи од његовог порекла. Већина гвожђа у храни омнивора је у форми хемоглобина, миоглобина или других протеина који садрже хем, пореклом из животињских производа. При апсорпцији хемског гвожђа, хемоглобин се под дејством протеаза гастроинтестиналног тракта (ГИТ) разлаже на хем и глобинске ланце (апопротеин). Хем лако пролази мембрану активним процесом на који не утичу састојци хране, преко протеинског носача за хем-1 (енг. *heme carrier protein 1*, HCP1) (Le Blanc et al., 2012). Нехемско гвожђе до ГИТ најчешће стиже у фери облику и мора бити конвертовано у феро облик како би било апсорбовано (Tang et al., 2014, 2015). Када се нађе у цитоплазми ћелије, гвожђе улази у лабилни пул гвожђа (енг. *labile iron pool*, LIP) одакле се транспортује у митохондрије, складишти или експортује ван ћелије (Cheng & Juul, 2011; Sheftel et al., 2012; Ponka et al., 2017).

1.1.4. Функције хемоглобина

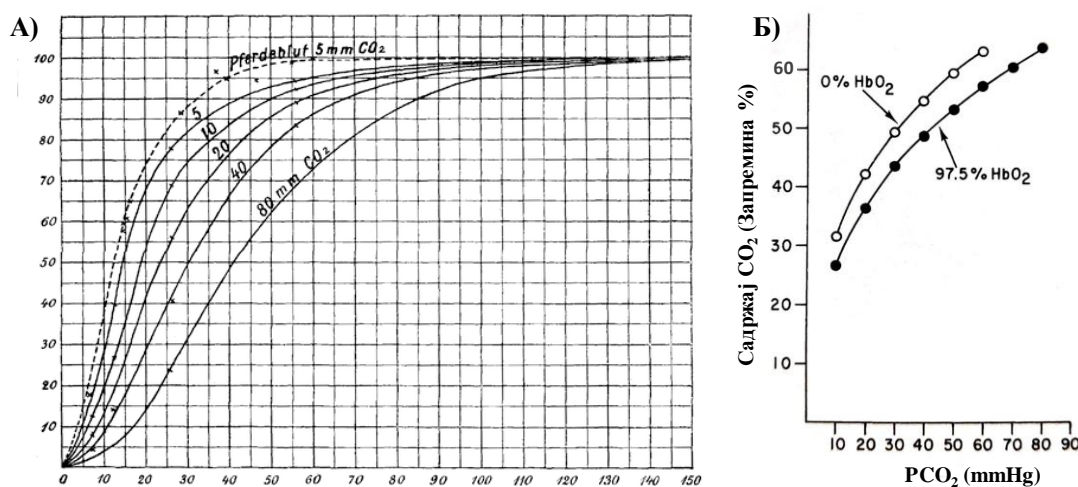
Поред добро познате улоге у преносу кисеоника, хемоглобин кичмењака учествује у транспорту и метаболизму неколико других гасова. Такође, када се нађе ван ћелије, хемоглобин има додатне улоге у имунском систему и укључен је у патофизиологију бројних болести, што ће бити описано у поглављима која следе.

1.1.4.1. Улога хемоглобина у преносу гасова

Основна улога кардиоваскуларног/циркуларног система јесте да допреми кисеоник и нутријенте до ћелија и ткива и олакша уклањање продуката метаболизма и угљен-диоксид (CO_2). У том смислу, улога хемоглобина у преносу гасова је од суштинског значаја за опстанак и преживљавање вишећелијских организама. Хемоглобин преко хема може да веже и транспортује кисеоник (O_2), азот-оксид (NO), и угљен-моноксид (CO), а афинитет везивања ових гасова опада следећим редоследом: $\text{NO} > \text{CO} > \text{O}_2$. Хемоглобин је укључен и у транспорт CO_2 , који се везује за глобинске ланце при чему хемоглобин прелази у карбаминохемоглобин (Mairbäurl & Weber, 2012; Coates & Decker, 2016; Kasai et al., 2018).

Кисеоник у плућима дифундује кроз алвеоларну баријеру у крв где се везује за хемоглобин у еритроцитима и допрема до ткива. Сваки молекул хемоглобина везује четири молекула кисеоника (Quaye, 2015) Иако хем протетична група хемоглобина може постојати у различитим редокс стањима, само у феро (Fe^{2+}) облику хемоглобин може да веже кисеоник (Mairbäurl & Weber, 2012). У еритроцитима постоји ензимски систем задужен за редукцију метхемоглобина (Fe^{3+}) у његово активно стање уколико хем подлегне оксидацији. Хемоглобин везује O_2 у условима високог парцијалног притиска кисеоника ($p\text{O}_2$) у плућима или шкргама и отпушта га у условима ниског $p\text{O}_2$ у ткивима. Везивање кисеоника за хемоглобин објашњено је алостерним механизмом и моделом у коме молекула кисеоника постоји у два стања: Т-стању, у ком је хемоглобин потпуно деоксигенисан и има мањи афинитет за везивање кисеоника и R-стању у ком хемоглобин има велики афинитет за везивање кисеоника (Helms & Kim-Shapiro, 2013). Везивање кисеоника за хемоглобин дешава се на позитивно кооперативан начин, односно са повећањем афинитета за O_2 са сваким новим везаним молекулом кисеоника. Када хемоглобин у Т-стању веже два до три молекула кисеоника, прелази у R-стање са високим афинитетом за даље везивање кисеоника. На афинитет хемоглобина за везивање кисеоника утичу рН, притисак, температура, CO_2 и ефекторни молекули, попут 2,3-дифосфоглицерата (енг. *2,3-diphosphoglycerate*, 2,3-DPG) (Mairbäurl & Weber, 2012; Bialas et al., 2019). Колико ће кисеоника бити испоручено ткивима зависи од засићености хемоглобина кисеоником.

Смањење рН вредности или повећање парцијалног притиска CO_2 (pCO_2) у системским капиларима смањују афинитет кисеоника за хемоглобин (Боров ефекат) што доводи до отпуштања кисеоника у ткивима (слика 1.5. А) (Bohr et al., 1904). Сходно томе, крива везивања кисеоника за хемоглобин има класичан сигмоидални облик.

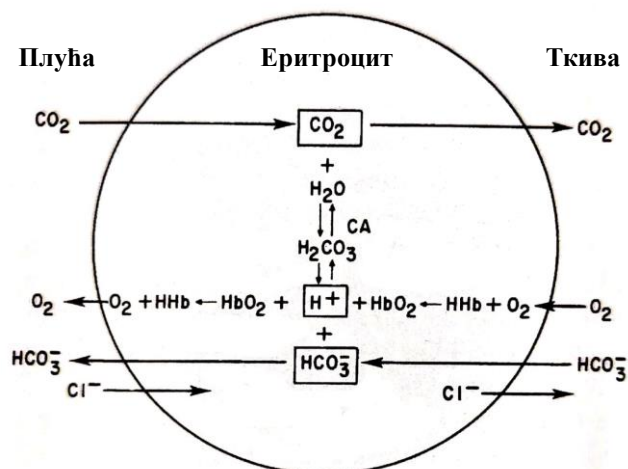


Слика 1.5. (А) Оригиналне криве дисоцијације Борових експеримената из рада у ком је први пут описан Боров ефекат које показују смањење афинитета хемоглобина за кисеоник са повећањем парцијалног притиска угљен-диоксида. Ово је уједно и први забележени пример кооперативног везивања молекула кисеоника за хемоглобин. Х-оса: парцијални притисак кисеоника у mmHg, Y-оса: % оксигемоглобина. Криве су добијене коришћењем пуне крви пса, изузев криве приказане испрекиданом линијом која је добијена коришћењем коњске крви. Преузето из (Bohr et al., 1904). (Б) Крива дисоцијације угљен-диоксида пуне крви. Крива је релативно линеарна између pCO_2 40 и 60 mm Hg. Разлика између кривих оксигенисане и деоксигенисане крви позната је као Халданов ефекат. Преузето и измењено према Telen, 2009.

Градијент кисеоника у ткивима укључен је у регулацију бројних функција. Хипоксија која се дефинише као смањен ниво кисеоника у микросредини ћелија и ткива у односу на нормално физиолошко стање (када потражња превазиђе производњу/допремање) повећава ткивну перфузију, синтезу еритропоетина и еритропоезу, допремање и отпуштање кисеоника (Mairbaurl, 1994; Semenza, 2009). Хипероксија има супротан ефекат (Revin et al., 2018). На молекуларном нивоу, транскрипциони фактор, фактор индукован хипоксијом (енг. *hypoxia-inducible factor*, HIF) координише одговоре на хипоксију преко активности хидролаза. Када је кисеоник доступан, хидролазе (које су у потпуности зависне од молекулског кисеоника) се активирају и деградују HIF, док ограничен доток кисеоника води стабилизацији HIF и експресији гена који утичу на васкуларни тон, еритропоезу, ангиогенезу и генерално метаболизам (Yeh & Alayash, 2004; Semenza, 2009). Снижење концентрације хемоглобина у еритроцитима које се дешава као последица хемоллизе, или патолошких стања попут анемије српастих еритроцита, маларије, пароксизомалне ноћне хемоглобинурије и других, директно доводи до смањеног допремања кисеоника до ткива и последичних оштећења (Liebman & Feinstein, 2003; Quaye, 2015; Kasai et al., 2018).

Хемоглобин има улогу и у метаболизму CO_2 , који настаје као нуспроизвод оксидативног метаболизма (респирације) у циклусу лимунске киселине код вишећелијских организама. Наиме, ензим карбонатна анхидраза (енг. *carbonic anhydrase*, CA) хидратише део CO_2 до угљене киселине (H_2CO_3) која дисосује на бикарбонат (HCO_3^-) и протон (H^+), а затим се у плућима активношћу истог ензима конвертује у воду и CO_2 (слика 1.6). Преостали угљен-диоксид у циркулацији везује се за хемоглобин и шаље у плућа где се

избацује издисајем (Cummins et al., 2014; Quaye, 2015). Смањење рН или повећање рО₂ у плућним капиларима смањује афинитет СО₂ за хемоглобин што доводи до његовог отпуштања из крви и издисања (Халданов ефекат, слика 1.5. Б) (Christiansen et al., 1914).



Слика 1.6. Транспорт кисеоника (O₂) и угљен-диоксида (CO₂) еритроцитима. Стрелице на лево указују на смер реакција које се одвијају у ткивима; стрелице на десно указују на смер реакција које се одвијају у плућима. У плућима СО₂ дифундује у еритроците и његову хидратацију катализује карбоанхидраза (СА). Дисоцијацијом настале угљене киселине даље се добијају бикарбонат (НСО₃⁻) и протон (H⁺). Бикарбонат се размењује за хлорид у плазми. Оксихемоглобин (HbO₂) прихвата протон, што (с обзиром на Боров ефекат) олакшава дисоцијацију кисеоника. Ове реакције су обрнуте у плућима због ниског рСО₂ и високог рО₂. Преузето и измењено према Telen, 2009.

Још један од гасова чији метаболизам регулише хемоглобин је азот-оксид. NO је важан сигнални молекул који има улогу у неутротрансмисији, вазодилатацији, одбрани домаћина имунским одговором који је посредован макрофагима, инхибицији агрегације тромбоцита и експресији ендотелских адхезивних молекула (Hill et al., 2010; Shiva et al., 2011; Halder & Stamler, 2013; Helms & Kim-Shapiro, 2013; Nicholls, 2019). NO се синтетише у сисарским ћелијама ензимским и неензимским механизмима. Ензимски механизам синтезе NO посредован је азот оксид синтазом (енг. *nitrogen oxide synthase*, NOS) која постоји у три изоформе: неуронална (nNOS или NOS I); индуцибилна (iNOS: NOS II, претежно се налази у макрофагима и ређе у хепатоцитима) и ендотелна (eNOS). Главни супстрат овог ензима је L-аргинин (Quaye, 2015; Premont et al., 2020). Неензимски извор NO су пре свега нитрити (NO₂⁻) (Lundberg & Weitzberg, 2010).

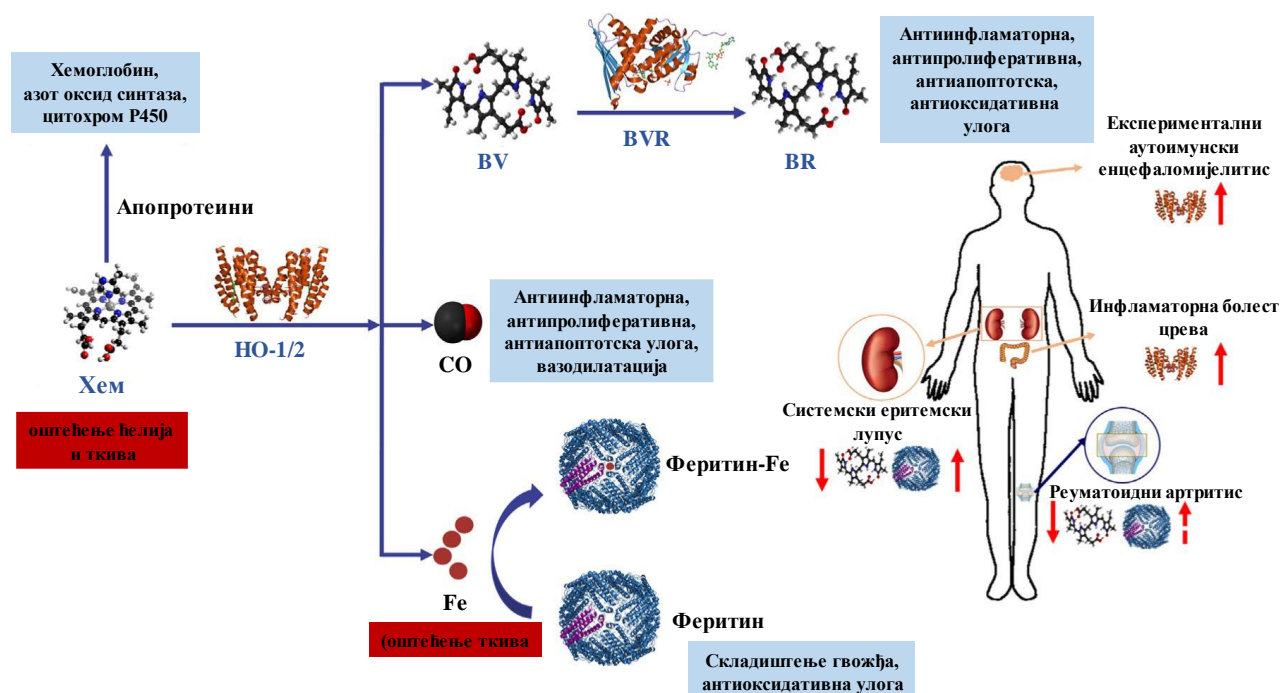
Главни начин на који хемоглобин инхибира NO сигнализацију је реакцијом оксихемоглобина са NO при чему настају метхемоглобин и нитрати. Ова реакција позната је као реакција диоксигенације и толико је брза да уколико еритроцити не би постојали, хемоглобин у крвним судовима (присутан у концентрацији у којој је присутан у еритроцитима) би везао сав NO који продукују ендотелске ћелије пре него што он стигне до ћелија глатких мишића. На тај начин би улога NO као вазодилатора била у потпуности блокирана (Helms & Kim-Shapiro, 2013). С друге стране, као и сам хемоглобин, и NO представља потенцијалну опасност јер је укључен у настанак реактивних врста азота (енг. *reactive nitrogen species*, RNS) (на пример, пероксинитрити) након интеракције са хемом или хемином. Ова активност може имати позитиван ефекат (нпр. при убијању микроба од стране ћелија имунског система), али може довести до оштећења протеина, ДНК и липида. Додатно, NO је токсичан за аконитазу у циклусу лимунске киселине и хем-бакар терминалну оксидазу у респираторном ланцу (Lee & Ding, 2013; Coates & Decker, 2016). Како хемоглобин конвертује NO и кисеоник у нитрате коришћењем никотинамид аденин

динуклеотид фосфата (NADPH) као кофактора, тако и гаси NO као извор RNS, па се азот-оксид диоксигеназна (енг. *nitric oxide dioxygenase*, NOD) функција хемоглобина може посматрати и са аспекта одржавања хомеостазе NO путем смањења потенцијалне опасности од стране RNS (Gardner, 2012; Quaye, 2015). Иако због NOD функције хемоглобина може доћи до смањеног протока крви услед уклањања NO, ова функција је фино усаглашена са активацијом солубилне гуанилат циклазе (енг. *soluble guanylate cyclase*, sGC) у циљу одржавања равнотежног стања. Додатно, NO се може везати и за деоксигенисану феро форму хемоглобина у реакцији нитрозилације. Иако је ова реакција реверзибилна, степен дисоцијације NO из овог комплекса је мали тако да хемоглобин и на овај начин празни пул NO у крвотоку и онемогућава му да оствари своје биолошке функције. Супротно, деоксихемоглобин својом активношћу нитрит редуктазе реагује са нитритима и генерише NO под утицај исхемије и хипоксије у ткивима. (Curtis et al., 2012; Quaye, 2015). На тај начин хемоглобин има улогу у отпуштању NO из нитрита када је неопходно постићи вишу концентрацију овог важног сигналног молекула (Hill et al., 2010; Gardner, 2012; Premont et al., 2020).

Поред претходно наведених, хемоглобин регулише и метаболизам угљен-моноксида. CO је сигнални молекул са антиоксидативним и антиинфламаторним активностима (Farrugia & Szurszewski, 2014). Сигнална улога CO је паралелна оној коју има NO (само је мање потентна), као неурогласник и регулатор васкуларног тонуса. Угљен-моксид се за хемоглобин везује афинитетом који је 210-250 пута већи него афинитет кисеоника (Amano & Samara, 2013). Делимичним заузимањем места везивања кисеоника у хемоглобину, CO инхибира ослобађање кисеоника са других хем места (Ryter & Choi, 2013). Тако да хемоглобин може деловати као сакупљач (енг. *scavenger*) CO у циљу смањења његовог физиолошког ефекта, али у исто време везивањем CO, хемоглобин не може да веже кисеоник и тако оствари своју најважнију функцију. Базални ниво карбоксихемоглобина (CO-Hb) код човека износи 0,1-1,0% од укупног хемоглобина. Ниво CO-Hb од 10-30% узрокује главобоље, несвестице и недостатак даха, док је ниво изнад 30% токсичан и и доводи до тешких главобоља, повраћања, несвестица, аритмија и смрти (Gorman et al., 2003; Leffler et al., 2011; La Fauci et al., 2012).

У вези са улогом хемоглобина у метаболизму CO, занимљиво је и то да управо највећи део CO у телу настаје услед разградње хема под дејством HO (Maines, 1997), док други мањи извори CO укључују липидну пероксидацију и активност прогестерона (Delivoria-Papadopoulos et al., 1974; Wolff, 1976). Наиме, још давних шездесетих година прошлог века показано је да 30 минута од интравенског инјектирања хемоглобина, или невијабилних еритроцита, долази до повишене концентрације билирубина у плазми и жучи, као и повећане продукције CO (Soburn et al., 1966). Након тога је откривено да је хем оксигеназа први ензим укључен у процес разградње хема (Tenhunen et al., 1968). Овај ензим присутан је у две главне изоформе: хем оксигеназа 1 (HO-1) и хем оксигеназа 2 (HO-2) које катализују исту реакцију и имају 45% идентичних аминокиселинских остатака. Како HO-2 представља конститутивну форму овог ензима, док је HO-1 индукцибилна, ћелије које експримирају HO-2 производе CO у континуитету, док продукција CO у ћелијама које експримирају HO-1 зависи од стимулуса из спољашње средине, попут инфламације, повреде, продукције ROS, хипоксије, исхемије и хипотермије (Vanella et al., 2012; Wegiel et al., 2015; Ma et al., 2016; Belcher et al., 2018).

Иако је главна улога HO у катаболизму хема, током година је показано да овај има улогу у регулацији већег броја процеса укључујући генску експресију, пролиферацију и диференцијацију ћелија, и имунски одговор. Данас су бројна истраживања усмерена су на испитивање улоге хема и HO у етиологији инфламаторних болести као што су инфламаторна болест црева, системски еритемски лупус, реуматоидни артритис и мултипла склероза (слика 1.7) (Wu et al., 2019; Canesin et al., 2020).



Слика 1.7. Метаболички пут хема. Хем оксигеназа (НО) катаболизује конверзију слободног хема у биливердин (BV), угљен-моноксид (CO) и Fe^{2+} . Биливердин се трансформише у билирубин (BR) дејством биливердин редуктазе (BVR). Гвожђе из хема може бити складиштено у ћелијама у форми феритина. Феритин има цитопротективну и антиоксидативну улогу. Молекул хема обезбеђује бројне виталне функције у форми различитих апопротеина попут хемоглобина, азот оксид синтазе и цитохрома. Метаболит који настаје дејством НО-1, CO, може имати антиинфламаторне, антипролиферативне, антиапоптотске и вазодилаторне ефекте у имунском систему. Слично, BR има важну антиинфламаторну, антипролиферативну, антиапоптотску и антиоксидативну улогу. НО-1, феритин и серумски BR/BV могу се користити као маркери различитих аутоимунских болести: системски еритемски лупус, реуматоидни артритис, инфламаторна болест црева, експериментални аутоимунски енцефаломијелитис. Црвене стрелице оријентисане на доле означавају негативну корелацију, док црвене стрелице оријентисане на горе означавају позитивну корелацију. Испрекидане стрелице означавају да је претпостављену корелацију још увек неопходно потврдити. Преузето и измењено према Wu et al., 2019.

1.1.4.2. Хемоглобин сисара у екстраћелијској средини

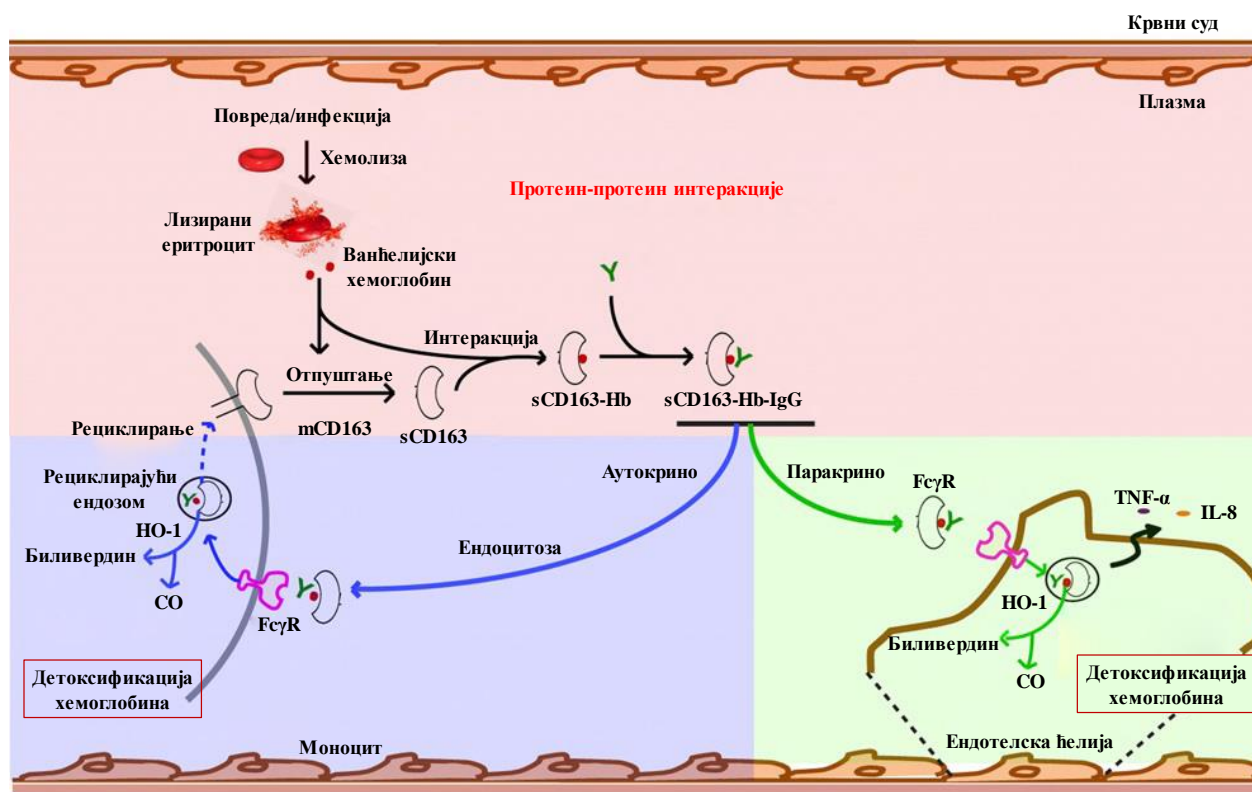
У физиолошким условима, око 80-90% деструкције еритроцита дешава се без отпуштања хемоглобина у плазму у процесу означеном као екстраваскуларна хемолиза. Преосталих 10-20% еритроцита се у физиолошким условима уклања процесом означеним као интраваскуларна хемолиза – хемолиза у оквиру крвних судова (Glader, 2009; Jeney et al., 2013; Bahl et al., 2014).

Екстраваскуларна хемолиза подразумева уклањање остарелих или оштећених еритроцита у јетри и слезини од стране резидентних макрофага јетре, слезине и косне сржи еритрофагоцитозом. Ћелије набројаних органа задужене су за деструкцију еритроцита у физиолошким условима, док у условима великог оштећења, практично сви органи који садрже макрофаге започињу са процесом уклањања вишка хемоглобина и гвожђа из циркулације (Glader, 2009; Alam et al., 2017). Еритроцити здравих људи имају просечан животни век од 120 дана (Glader, 2009; Schaer et al., 2013). Сигнал за уклањање остарелих или оштећених еритроцита од стране ћелија ретикулоендотелског система је појава:

Поред хаптоглобина, и хемопексин и албумин делују као механизми који ограничавају штетна дејства слободног хемоглобина (слика 1.8) (Rifkind et al., 2015; Smith & McCulloh, 2015). Ова два молекула способна су да вежу слободан хем, одрже га у солубилној форми и тако спрече да испољи своја оксидативна и проинфламаторна дејства (Glader, 2009; Smeds et al., 2017). Хемопексин је хем-везујући гликопротеин плазме који везује хем са афинитетом већим у односу на све остале познате хем-везујуће протеине. Такође, хемопексин посредује у уносу хема у хепатоците у којима се ова простетична група уклања. Хемопексин се синтетише у јетри и код здравих индивидуа и има полуживот од просечно 7 дана, док му се у комплексу са хемом време полуживота смањује се на 7-8 сати (Belcher et al., 2018). Хем-хемопексин комплекс у хепатоците улази ендоцитозом посредованом рецептором преко рецептора означеног као протеин-1 повезан са рецептором липопротеина (енг. *lipoprotein receptor-related protein-1*, LRP), познатог и под називом CD91. Након ендоцитозе, хем-хемопексин комплекс дисосује, а хемопексин се отпушта и враћа у плазму као интактан протеин. Транспорт хема у цитоплазми дешава се унутрашњим хем-везујућим мембранским протеином и гвожђе се брзо отпушта деловањем хем оксигеназе (Lee & Ding, 2013; Ponka et al., 2017).

Хем се у циркулацији може везати и за албумин и формирати металбумин. Када се дода у хумани серум, хем се иницијално примарно везује за албумин, вероватно због велике концентрације у односу на хемопексин. Уклањање металбумина из циркулације је кинетички комплексан процес (Glader, 2009; Smeds et al., 2017). Новија истраживања показују да хем у плазми може да веже и α 1-микроглобулин (A1M), гликопротеин од 26 kDa који се синтетише у јетри и секретује у крв. Овај протеин има редуктазну активност, спречава унутарћелијску оксидацију и снижава експресију HO-1 индуковану хемом, као и продукцију ROS услед присуства хемоглобина у ванћелијској средини (Penders & Delanghe, 2004; Olsson et al., 2008; Sverrisson et al., 2014).

Subramanian и сарадници (2013) идентификовали су „пречицу“ за детоксификацију хемоглобина из плазме, која функционише независно од хаптоглобина преко механизма „ухвати и угаси“ (енг. *“capture and quench”*) и укључује CD163 рецептор моноцита/макрофага (слика 1.9). Након регрутовања хемоглобина, мембрански CD163 (mCD163) директно супримира псеудопероксидазну активност хемоглобина *in situ* на мембрани моноцита. Хемоглобин индукује отпуштање mCD163 у плазму и резултујући солубилни CD163 (sCD163) даље хвата и гаси резидуални редокс-реактивни хемоглобин. Ови аутори показали су да sCD163 и имуноглобулини G (IgG) интерагују са слободним хемоглобином у плазми. Настали sCD163-Hb-IgG комплекс затим покреће аутокрину петљу ендоцитозе преко Fc γ рецептора (Fc γ R) на моноцитима и последично рециклирање интернализваних sCD163 преко ендозома да би се успоставила mCD163 хомеостаза, док интернализвани хемоглобин бива катаболизован од стране HO-1. Додатно, овај комплекс индукује паракрину трансактивацију ендотелских ћелија крвног суда, стимулише експресију HO-1 у њима и секрецију цитокина који ће покренути системски одбрамбени одговор усмерен ка ванћелијском хемоглобину (Subramanian et al., 2013).



Слика 1.9. Хипотетички механизам интраваскуларне детоксификације и уклањања ванћелијског хемоглобина преко CD163 рецептора, независно од хаптоглобина. Детаљнија објашњења у тексту. Преузето и измењено према Subramanian et al., 2013.

Уколико при интраваскуларној хемолити екстраћелијски хемоглобин превазиђе наведене хомеостатске механизме за његово уклањање, може испољити штетне ефекте на околне ћелије и ткива. Различити клинички аспекти који су повезани са прекомерном количином екстраћелијског хемоглобина у циркулацији приписани су специфичним структурним и биохемијским одликама молекула хемоглобина кроз четири предложена механизма који су међусобно у интеракцији (Glader, 2009; Schaer et al., 2013; Quaye, 2015).

Први од њих представља екстраваскуларну транслокацију хемоглобина (слика 1.10. А) (Schaer et al., 2013). Након хемолити, хемоглобин постоји у динамичкој равнотежи тетрамера и $\alpha\beta$ хетеродимера, са преодминантним димер стањем при ниској концентрацији хемоглобина у плазми. Хетеродимери су релативно мале величине, што омогућава њихову транслокацију и приступ анатомским местима која су рањива (на пример гломерули у бубрезима или васкуларни зид). Изложеност ткива хемоглобину најчешће прати случајеве прекомерне хемоглобинурије након масивне интраваскуларне хемолити, али је хемоглобин такође у могућности да се транслоцира кроз ендотелне баријере и да на тај начин уђе у субендотелне и периваскуларне просторе и лимфу (Nakai et al., 1998; Matheson et al., 2000).

Други механизам којим екстраћелијски хемоглобин остварује своје ефекте је прооксидативна реактивност хемоглобина у плазми или у оквиру ткива након екстравазације (слика 1.10. Б) (Schaer et al., 2013). Реакције хемоглобина са NO и физиолошким оксидансима (водоник пероксид и липидни пероксици) су најбоље проучене. Потрошња NO и последична оксидација хемоглобина дешавају се преко две реакције: NO диоксигенације оксихемоглобина у којој се генеришу нитрати (NO_3^-) и ферихемоглобин (Hb-Fe^{3+}) и преко нитрозилације гвожђа деоксихемоглобина која се дешава у директном везивању NO од стране гвожђа ферохемоглобина (Hb-Fe^{2+}) (Helms & Kim-Shapiro, 2013;

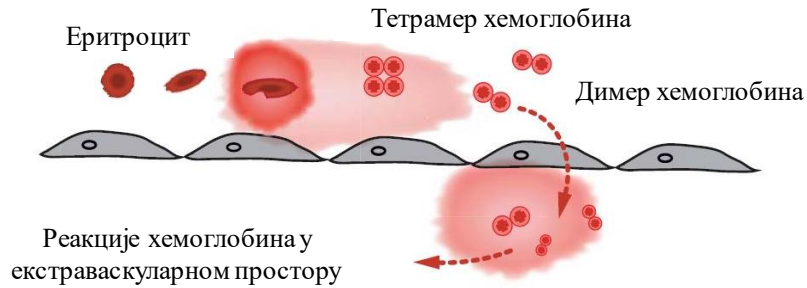
Schaer et al., 2013). Поред тога што везивање NO од стране слободног хемоглобина доводи до деплеције овог важног вазодилататора, резултат реакције хемоглобина и NO је и генерисање Hb-Fe³⁺ у оквиру ткивног паренхима, чија акумулација може да стимулише отпуштање и/или трансфер хемина на друге протеине и липиде чиме се испољава секундарна токсичност слободног хемина. Иако су реакције хемоглобина и пероксида предмет бројних изучавања већ више од 40 година, патофизиологија у чијој су основи ове реакције још увек није најбоље објашњена (Reeder et al., 2010; Lee & Ding, 2013; Schaer et al., 2013; Coates & Decker, 2016).

Показано је да у условима *in vitro*, реакција хемоглобина и пероксида доводи до формирања Hb-Fe³⁺ али и хемијских врсти у којима је гвожђе у ферил облику (Hb-Fe⁴⁺) и његовим радикалским формама (Rifkind et al., 2015; Chintagari et al., 2016; Vamm et al., 2017). Финални исход оваквих реакција је деградација хемоглобина, губитак хемина, унакрсно везивање, односно преципитација глобинских ланаца, који воде оштећењу ткива. Још увек је непознато колике се количине Hb-Fe⁴⁺ и радикала стварају у условима *in vivo* током хемоллизе и колико доприносе развоју болести. Једина оксидована врста хемоглобина коју је конзистентно могуће квантификовати *in vivo* јесте Hb-Fe³⁺ и треба имати на уму да диспаритет уочен у условима *in vitro* и *in vivo*, може бити последица померене равнотеже између реакција оксидације и редукције у условима *in vivo* (Reeder et al., 2002; Buehler et al., 2007).

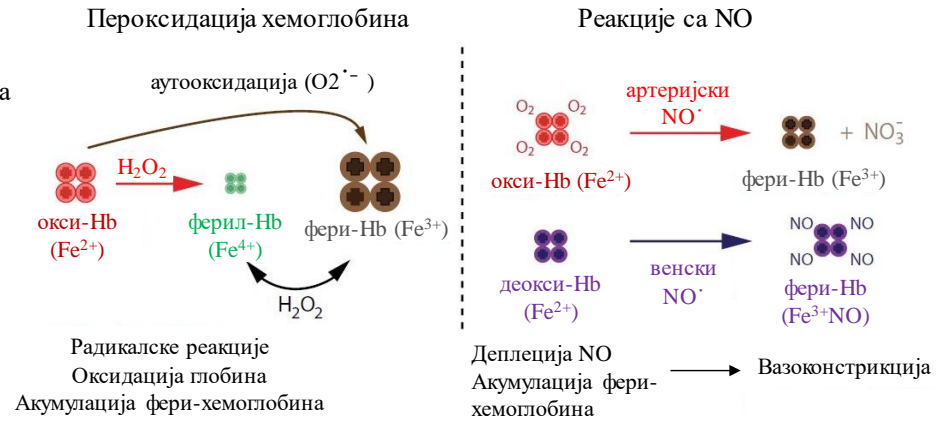
Трећи предложени механизам којим екстраћелијски хемоглобин остварује своје ефекте је преко отпуштања хемина из Hb-Fe³⁺ који је главни производ оксидативних реакција (слика 1.10. В) (Schaer et al., 2013). Ослобађање хемина омогућава трансфер реактивног порфирина на ћелијску мембрану или солубилне плазма протеине и липиде и обезбеђује слободан хемин као лиганд за различите сигналне путеве. Како је хемин хидрофобан молекул, мало је вероватно да ће се веће количине слободног хемина наћи у плазми, тако да се он брзо везује за албумин или липиде и формира комплексе. У зависности од тога за шта се веже, хемин може трансформисати молекул из комплекса у реактиван производ попут оксидованог липопротеина мале густине, (енг. *oxidized low density lipoprotein*, oxLDL) који ће даље довести до оштећења васкулатуре (Balla et al., 1991; Jeney et al., 2002; Nagy et al., 2010).

Четврти механизам односи се на ефекте које остварује хемин (слика 1.10. Г) (Schaer et al., 2013). Хемин се може селективно везати за неколико рецептора, транскрипционих фактора и ензима и довести до промене стања ћелијске активације, генске експресије и метаболизма. Најбоље окарактерисана интеракција је везивање хемина за транскрипциони репресор 1 који показује хомологију са ВТВ и CNC (енг. *VTB and CNC homology 1*, Bach-1) који регулише транскрипцију HO-1 и других антиоксидативних ензима неопходних за адаптивни одговор на повећан унутарћелијски ниво хемина (Ogawa et al., 2001). Хемин је такође лиганд за нуклеарни рецептор хормона REV-ERB који регулише циркадијални ритам, метаболизам глукозе и адипогенезу (Raghuram et al., 2007). Показано је такође да хемин може довести и до инхибиције протеазома у биохемијским тестовима (Haas & Rose, 1981). Слободан хемин такође може да покрене сигнални пут преко рецептора-4 сличног Toll-у (енг. *Toll-like receptor-4*, TLR-4) (Shaver et al., 2016; Belcher et al., 2018).

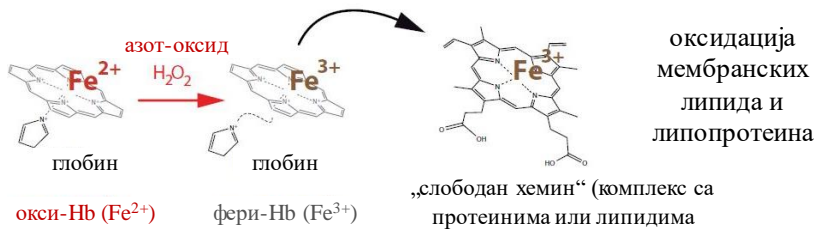
А) Механизам I: Екстравакуларна транслокација хемоглобина



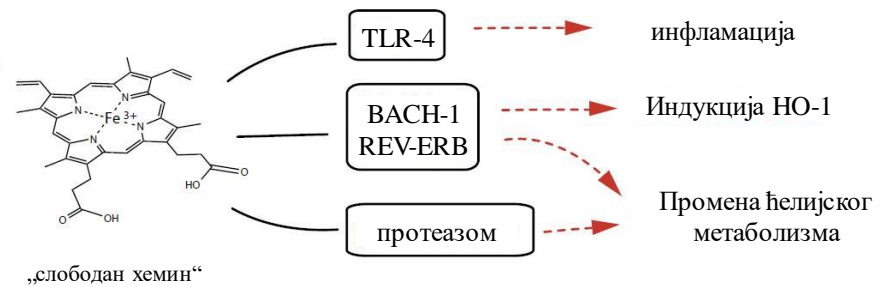
Б) Механизам II: Реакције са NO и оксидансима



В) Механизам III: Ослобађање и трансфер хемина



Г) Механизам IV: Ефекти хемина на сигналне путеве



Слика 1.10. Шематски приказ четири главна механизма токсичног дејства екстрахелијског хемоглобина. Преузето и измењено према Schaer et al., 2013.

1.1.4.3. Улога хемоглобина у имунском одговору

Хемоглобин остварује вишеструке функције у имунском одговору домаћина, преважно помажући/стимулишући реакције урођене имуности при бактеријским инфекцијама или инфестацији паразитима. Познато је да деловањем хемолитичких бактерија долази до лизе еритроцита и ослобађања прооксидативног хемоглобина у ванћелијску средину. Вирулентнији патогени настављају да секретују протеазе за дигестију хемоглобина који користе као извор гвожђа. Микробни лиганди и протеазе делују у синергији и амплификују псеудопероксидазну активност хемоглобина. Додатно, у комплексу са хемоглобином, специфичне структуре микроба делују као инфламаторни агонисти, стимулишући експресију цитокина пре него што буду уклоњени циркулишућим фагоцитима. С друге стране, патогени бивају окружени пептидима пореклом од хемоглобина који се везују за мембранске структуре и локално ослобађају цитотоксичне радикале како би ослабили/убили патогене *in situ*. (Jiang et al., 2007; Bahl et al., 2011; Du et al., 2012).

Микроби морају да превазиђу бројне механизме задржавања гвожђа од стране ћелијских конституената урођеног имунског одговора да би успели да колонизују метазое и да би наставили да се размножавају у њиховим ћелијама. Током инфекције, хемолитичке бактерије лизирају еритроците сисара како би могле да користе гвожђе из хемоглобина (Coates & Decker, 2016). Као што је описано у поглављу 1.1.4, када се нађе у ванћелијској средини хемоглобин бива препознат и везан од стране гликопротеина, хаптоглобина или хемопексина (Chiabrando et al., 2011; Belcher et al., 2018). Макрофаги препознају комплекс Нр-Нб преко CD163 рецептора и врше његову интернализацију како би спречили даљу инфламацију. Показано је да *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhimurium* (унутарћелијски патогени) могу да инхибирају апоптозу макрофага који су фагоцитовали Нр-Нб комплекс преко CD163 рецептора, купујући себи на тај начин време да ступе у контакт са гвожђем из хемоглобина (Subramanian et al., 2014). То уједно објашњава зашто су пацијенти са болестима које одликује хемоглобинемија подложнији инфекцијама унутарћелијским бактеријама (Bronzan et al., 2007; Scott et al., 2011). Занимљиво је да комплекс Нр-Нб има важну улогу и у елиминацији паразита *Trypanosoma brucei*. Овај паразит поседује рецептор за Нр-Нб комплекс (НрНбR) који у исто време може да веже и литички фактор трипанозоме 1 (енг. *trypanosome lytic factor-1*, TLF-1), протеин који спада у липопротеине велике густине (енг. *high-density lipoprotein*, HDL). Заједно са другим HDL из циркулације, TLF-1 и Нб-Нр комплекс олакшавају ендоцитозу и осмотску лизу овог паразита (Bullard et al., 2012). Неки микроорганизми у стању су да хемоглобин домаћина искористе у сврхе стицања предности у односу на микроорганизме са којима су у конкуренцији за исту животну средину. Тако, чест узрочник урогениталних инфекција код жена, *Candida albicans*, секретује до 10 киселих хидролаза када покушава да колонизује вагину. Настали ензими користе хемоглобин домаћина као супстрат за продукцију пептида за које је показано да имају бактерицидну улогу, посебно према *Lactobacillus acidophilus*. На овај начин *C. albicans* користи хумани хемоглобин да антагонизује бактерије и смањи конкуренцију у оквиру вагине (Bochenska et al., 2013). Због описане улоге коју хемоглобин остварује у метаболизму NO, показано је да је и код мишева и пужева (*Biomphalaria glabrata*) хемоглобин потентан регулатор отпорности на *Schistosoma mansoni*, јер она која зависи од продукције NO у макрофагама и хемотитима (James & Glaven, 1989; Hahn et al., 2001).

Димер/олигомер хемоглобина сматра се молекулским обрасцем повезаним са опасношћу (енг. *damage/danger-associated molecular pattern*, DAMP), док је хем независно препознат као „алармин“ (Alam et al., 2017; Schechter et al., 2008). Поред тога, неколико истраживања показало је да хемоглобин може да интерагује са микробним лигандима: молекулским обрасцима повезаним са патогеном (енг. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP), DAMP и TLR (Lee & Ding, 2013; Wegiel et al., 2015; Jeney, 2018). Показано

је да на α - и β - глобинским ланцима постоје места за везивање липополисахарида (енг. *lipopolysaccharides*, LPS) и да везивање за овај молекул доводи до промене у структури хемоглобина која омогућава активност пероксидазе (Bahl et al., 2011). Метхемоглобин, сам или у комбинацији са липотеихоинском киселином (енг. *lipoteichoic acid*, LTA), може бити препознат од стране TLR-2 на ћелијској мембрани неутрофила (Lee et al., 2015). Таква интеракција стимулише функцију неутрофила, иницирајући сигналну трансдукцију нуклеусног фактора- κ B (енг. *nuclear factor kappa B*, NF- κ B) која кулминира у синтези цитокина и других проинфламаторних агенаса (Sharma et al., 2019). Ендотелне ћелије такође могу да детектују ванћелијски хемоглобин посредством TLR-4 рецептора и сигналног пута. Каемпфер и сарадници (2011) показали су да ванћелијски хемоглобин у комплексу са хаптоглобином усмерава диференцијацију макрофага ка посебном фенотипу који се одликује повишеном експресијом CD163 и HO-1 молекула. Међутим, у овим ћелијама истовремено долази до снижења експресије главног комплекса ткивне подударности (енг. *major histocompatibility complex*, MHC) II класе. На овај начин настају макрофаги са супримираном антиген-предентујућом функцијом, специјализовани за уклањање прекомерног хемоглобина (Каемпфер et al., 2011).

Иако многе студије описују ванћелијски хемоглобин као потенцијално опасан молекул који се треба што пре уклонити из циркулације, он је у исто време и важно упозорење леукоцитима да је хомеостаза нарушена. Bahl и сарадници (2014) предложили су нову улогу хемоглобина у процесу коагулације. У присуству ванћелијског хемоглобина, THP-1 моноцити почињу синтезу функционално активног ткивног фактора (енг. *tissue factor*, TF) као иницијатора коагулације. Везивање хемоглобина за TF снижавало је LPS посредовану редокс активност хемоглобина. Додатно, хемоглобин је стабилизовао активност TF, смањујући његову сензитивност на антиоксидансе (Bahl et al., 2014). Занимљиво је да је експресија глобинских гена забележена и у хуманим алвеоларним ћелијама типа II (Bhaskaran et al., 2005), као и у мишјим LPS или цитокинима (нпр. интерфероном γ (енг. *interferon gamma*, IFN γ)) стимулираним макрофагима (Liu et al., 1999). Биолошка функција хемоглобина ван еритроидних ткива још увек није разјашњена, али се спекулише да хемоглобин може имати улогу заштите од нитрозативног стреса у овим ћелијама или деловати као сензор за O₂ и NO (Liu et al., 1999).

Хемоглобин може учествовати у одбрани домаћина и паракриним отпуштањем антимикробних пептида (енг. *antimicrobial peptide*, AMP) и ROS (Coates, 1975). Најранији докази да је хемоглобин укључен у одбрану организма и имунски одговор потичу из 1958. године (Hobson, 1958). Хемоглобин припремљен из хомогената хуманог ткива инхибирао је раст неколико ентеричних бактерија са максимумом активности на 37°C, у киселој средини (pH<5,5) и при ниским концентрацијама соли (<0,2 М). Говеђи, коњски, мишји и зечји хемоглобини деловали су на сличан начин. Тетрамери хемоглобина су вероватно превише велики да продру кроз мембрану бактерија директно, али се претпоставља да укупно наелектрисање хемоглобина може стимулирати неспецифичне електростатичке интеракције са киселим групама микробних полисахарида што води имобилизацији микробних ћелија и заустављању репликације. Мак и сарадници (2000) и Parish и сарадници (2001) показали су да је интактан хемоглобин имао умерену бактерицидну активност према *Escherichia coli*, док су уклањање хема и делимична денатурација протеина резултовали у ширем спектру бактерицидне активностима и вредностима средње леталне дозе (енг. *mean lethal dose*, LD50) које су се могле упоредити са оним конвенционалних AMP. Третирање апохемоглобина цијаноген бромидом доводи до разградње глобинских ланаца на AMP дужине 50 аминокиселина који су означени као „хемоцидини“ (Мак et al., 2000). Пре откривања хемоцидина, хумани хемоглобин био је познат извор преко 150 регулаторних пептида. Први AMP пореклом од хемоглобина изолован је из цревног система крпеља крава (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) (Fogaca et al., 1999). Овај AMP био је пореклом од α -

глобина говеђег хемоглобина и деловао је циљано на Грам позитивне бактерије, филаментозне гљиве и квасце.

До данас, хумани хемоцидини изоловани су из плаценте, еритроцита и менструалне крви (Mak, 2008; Coates & Decker, 2016). Хемоцидини присутни у вагини помажу одбрани имунског система током физиолошких, али драматичних догађаја као што су менструација и порођај. Још увек је непознато како хемоцидини настају и како се депонују у вагини. Претпоставља се да кисела средина вагине може да помогне денатурацију олигомера хемоглобина довољно да омогући формирање пептида под утицајем неутрофилних ендо/егзопептидаза и матриксних металопротеаза (Mak et al., 2006; Mak, 2008). Lierke и сарадници (2003) показали су присуство два АМР из плаценталног ткива, један пореклом од γ -, а други пореклом од β -глобина. Пептид пореклом од β -глобина био је присутан у великим количинама (~360 mg/kg ткива), потицао је од тетрамера из цитосола еритроцита, и могао је да се везује за ендотоксине. Иницијални скрининг менструалне крви за АМР пореклом од хемоглобина, омогућио је идентификацију 44 хемоцидина, од којих је већина била пореклом од N-терминуса α -глобина (Mak et al., 2004).

Откриће биолошки активних пептида пореклом од хемоглобина, довело је до тога да се синтетички аналози пептида пореклом од хуманог и говеђег хемоглобина данас рутински тестирају за евентуалну употребу у терапијске сврхе (Froidevaux et al., 2001; Lierke et al., 2003; Daoud et al., 2005). Захваљујући хемоглобину, открило се да је појава да се од једног већег „мајчинског“ протеина отпуштају пептиди, опште присутна у живом свету и да одликује и друге протеине (лактоферин, лизозим, катепсин G). На тај начин је термин „криптом“ ушао у ширу употребу, а означава субсет протеина/пептида насталих или отпуштених од истог почетног „мајчинског“ протеина (Autelitano et al., 2006; Pimenta & Lebrun, 2007; Ner et al., 2015).

1.1.4.4. Улога ванћелијског хемоглобина у различитим патолошким стањима и болестима

Хемолиза узрокована инфекцијом, повредом, траумом или трансфузијом крви доводи до ослобађања прооксидативног ванћелијског хемоглобина у плазму. При тешким хемолитичким стањима, ниво слободног хемоглобина у крви може достићи концентрације које су животну угрожавајуће. Патолошка стања и обољења са значајном интраваскуларном хемолизом укључују пароксизмалну ноћну хемоглобинурију (енг. *paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*, PNH), анемију српастих еритроцита (енг. *sickle-cell disease*, SCD), таласемије, урођене сфероцитозе и стоматоцитозе, микроангиопатску хемолитичку анемију као и анемије изазване инфекцијама или индуковане хемијски, дефицијенцију пируват киназе, трансфузијску реакцију изазвану неподударањем АБО крвих група, маларију и друге поремећаје и болести (Lee et al., 2015; Rifkind et al., 2015; Rother et al., 2015). Иако све наведене болести имају сопствене јединствене симптоме, заједнички за све су они повезани са хемоглобинемијом. Додатно, истраживања и резултати клиничких студија примене вештачких преносиоца кисеоника на бази хемоглобина који ће бити описани у следећем поглављу, дали су увид у последице и симптоме који прате повишену концентрацију слободног хемоглобина у крви (Alayash, 1999; Bialas et al., 2019; Sen Gupta, 2019).

Након превазилажења капацитета хомеостатских механизма, слободан хемоглобин у крви почиње да се везује за NO, и остварује све ефекте описане у поглављу 1.1.4.1. Код пацијената са PNH, при тешким хемолитичким епизодама, концентрација слободног хемоглобина у крви креће се у интервалу од 0,5–2 mg/mL (Subramanian et al., 2014), мада има података да може достићи и 10 mg/mL (Bahl et al., 2014). Код пацијената са SCD концентрација слободног хемоглобина у крви је око 0,04 g/dL током вазооклузивних криза (Reiter et al., 2002) и ови пацијенти показују снижен вазодилататорни одговор на инфузију

натријум нитропрусида као директног даваоца NO (Eberhardt et al., 2003). Поред тога што хемоглобин везује NO, хемолиза доводи до отпуштања аргиназе из еритроцита. Овај ензим катализује конверзију L-аргинина, почетног супстрата за синтезу NO, у орнитин што додатно доприноси смањењу нивоа овог сигналног молекула код SCD пацијената (Gladwin et al., 2003). Симптоми системског уклањања NO од стране хемоглобина обухватају спазам једњака и дисфагију, абдоминални бол, еректилну дисфункцију, хемоглобинурију, реналну дисфункцију и тромбозу. Додатно, системско ослобађање хемоглобина повезано је са пулмоналном и системском хипертензијом, смањеном перфузијом органа и повећаним морталитетом (Przybelski et al., 1996; Moyó et al., 2004; Schafer et al., 2004). Слободан хемоглобин и продукти разградње хема могу директно да активирају ендотелне ћелије и даље стимулишу инфламацију и коагулацију (Setty et al., 2008; Bahl et al., 2014).

Код болести које одликује хемоглобинемиа, повећана је инциденца тромбозе (Liebman & Feinstein, 2003). Хемолиза стимулише коагулацију преко неколико механизма, укључујући излагање фосфатидил серина на површини еритроцита, сакупљање и деплецију NO од стране слободног хемоглобина, дисфункцију ендотела и повишења експресије TF. Интраваскуларна коагулација резултује у депозицији фибрина који даље узрокује хемолизу стварајући механичка оштећења на еритроцитима. Roth (1994) је показао да док хемоглобин стимулише LPS индуковану продукцију TF у ендотелним ћелијама, он сам не индукује експресију TF у овим ћелијама. Међутим, хем има могућност да индукује производњу TF (Setty et al., 2008). Bahl и сарадници (2014) показали су да хемоглобин може да индукује експресију TF у макрофагима, иако још увек није познато да ли се ова улога остварује преко хема или апопротеина.

Како је показано да се глобински ланци експримирају у кортикалним и хипокамбалним астроцитима у *corpus striatum*, *corpus callosum*, *substantia nigra* и *medulla oblongata* (Biagioli et al., 2009), а затим и другим регионима мозга (Richter et al., 2009; Brown et al., 2016) започела су испитивања улоге хемоглобина у патофизиологији Алцхајмерове болести. Проблем терминологије присутан је и овим истраживањима, па се термином „хемоглобин“ често означавају глобински мономери овог протеина (Richter et al., 2009). Хемоглобин је детектован на унутрашњој мембрани митохондрија неурона, α - и β -глобински ланци у телу неурона, а β -глобини и у дендритима (Richter et al., 2009). Поједине студије показале су да је код пацијената са Алцхајмеровом болешћу концентрација глобинских ланаца нижа у нервним ћелијама (Ferrer et al., 2011; Schonberger et al., 2001), међутим има и резултата који указују на повишење експресије хемоглобина у хомогенатима мозга (Blalock et al., 2003). Претпоставља се да ова дискрепанца у подацима рефлектује различиту улогу ванћелијског и унутарћелијског хемоглобина у нервном систему. Док унутарћелијски хемоглобин штити неуроне од хипоксије, ванћелијски хемоглобин и његови деградациони производи могу да оштете крвно-мождану баријеру и олакшају даљи улазак хемоглобина из крви у мозак. Хронична хемолиза која доводи до сатурације система за прикупљање ванћелијског хемоглобина тако резултује у акумулацији слободног хемоглобина око церебралних микро крвних судова (Altinoz et al., 2019). Показано је и да еритроцити пацијената са Алцхајмеровом болешћу појачано везују IgG, као и да амилоид β код ових пацијената постоји и у еритроцитима, где формира комплекс са хемом и делује као прооксидативна пероксидаза (Zhao et al., 2013). Формирање комплекса између амилоида β и хема може бити обострано корисно јер смањује токсичност слободног хема, али и штетне ефекте амилоида β . Ипак, у унапредовалим фазама болести, везивање хема за амилоид β може олакшати акумулацију фибрила амилоида β . Како је показана значајна повезаност између анемије и пада когнитивних функција код Алцхајмерове болести (Beard et al., 1997; Pandav et al., 2004), може се спекулисати да је један од механизма укључених у развој овог обољења снижена концентрација хемоглобина, не само у еритроцитима, већ и у неуронима. То за последицу има смањено допремање кисеоника до мозга и смањено

складиштења кисеоника у неуронима (Altinoz et al., 2019). Ипак, додатна истраживања су неопходна како би се даље расветлила улога хемоглобина у етиологији ове болести.

Ванћелијски хемоглобин доводи се у везу и са мултиплом склерозом (енг. *multiple sclerosis*, MS). Наиме, како MS представља инфламаторни поремећај демиелинизације нерава, односно болест у чијој је основи инфламација, претпоставља се да слободни хемоглобин који доводи до настанка ROS може бити укључен и у оштећење нерава. Показано је да се код пацијената са MS гвожђе акумулира у дилатираним венама које се налазе проксимално у односу на демиелинизоване плаке у сивој и белој маси (Haacke et al., 2010). Постоји више сценарија који могу објаснити абнормално депоновање гвожђа у мозгу пацијената са MS, и то су: абнормалности у функционисању крвно-мождане баријере (Schwartz et al., 2013; Muldoon et al., 2013), неефиксано уклањање гвожђа (Stankiewicz et al., 2014) и хронична субклиничка церебрална микрокрварења (Eisele et al., 2016; Zivadinov et al., 2016). Vamm и сарадници (2017) предложили су механизам по ком слободан ванћелијски хемоглобин може да изврши инвазију паренхима ЦНС као резултат интраваскуларне хемоллизе или екстравазације еритроцита праћене њиховом лизом. Хемоглобин би даље могао да доведе до локалног оксидативног стреса, инфламације и оштећења ткива пошто је високо реактиван молекул. Како би потврдили ову своју хипотезу, Vamm и сарадници (2015, 2017) показали су да хемоглобин може довести до оксидативног оштећења мијелинских протеина и липида *in vitro*. У прилог овим резултатима иду и подаци да концентрација хемоглобина у серуму корелира са атрофијом мозга и секундарним прогресом MS (Lewin et al., 2017), као и да су еритроцити пацијената са MS осмотски фрагилнији у односу на еритроците здравих особа (Caspari et al., 1967).

Постоје подаци и о улози ванћелијског хемоглобина (у мет и ферил форми), али и хема у етиологији и патофизиологији церебралне интравентрикуларне хеморагије (енг. *cerebral intraventricular hemorrhage*, IVH) која је мултифакторијална, комплексна, хетерогена и недовољно расветљена болест, за коју и даље не постоји терапија (Erdei et al., 2020; Smeds et al., 2017). Посредни докази говоре о улози ванћелијског хемоглобина у патофизиологији ове болести. Показано је да интрацеребровентрикуларна инјекција хаптоглобина *in vivo* смањује инфламаторни одговор, активацију, оштећење и смрт ћелија након IVH (Gram et al., 2014). Дефероксамин, хелатор гвожђа, смањивао је апоптозу ћелија хипокампуса након IVH (Garton et al., 2016, 2017), а деплеција хемопексина је погоршавала симптоме оштећења мозга након интракранијалног крварења и депозиције гвожђа (Ma et al., 2016). Препоставља се да код деце са IVH долази до депоновања крви након екстравазације у интравентрикуларни простор, што је праћено лизом еритроцита и ослобађањем слободног хемоглобина у цереброспиналну течност у којој се хемоглобин оксидује до метхемоглобина и ослобађа хем који покреће каскаду оксидативних оштећења (Olsson et al., 2012; Ley et al., 2016).

Улога ванћелијског хемоглобина испитана је и у етиологији и прогресији атеросклерозе. Познато је да је атеросклероза мултифакторијална инфламаторна болест у којој су инфламаторни и имунски одговор кључни патофизиолошки фактори. Крварења унутар атеросклерозног плака су учестали догађаји који доводе до отпуштања слободног хемоглобина и активирања хаптоглобинског система за његово уклањање. Buttari и сарадници (2007) показали су да у присуству смеше која се састојала од 18% оксихемоглобина, 3% метхемоглобина и 79% хемихрома долази до експанзије Т лимфоцита специфичних за хемоглобин, који секретују IFN- γ , код пацијената са узнапредовалом каротидном атеросклерозом. Иста смеша промовисала је сазревање LPS стимулираних дендритских ћелија што је потврђено детекцијом матурацијског маркера CD83 и костимулаторних молекула CD80, CD40, антигена хуманих леукоцита – изотипа DR (енг. *human leukocyte antigen – DR isotype*, HLA-DR) и CD86 на дендритским ћелијама (Buttari et al., 2007). Исти аутори показали су да хемоглобин делује као хемоатрактант за моноците и дендритске ћелије, усмеравајући их ка васкуларном зиду (Buttari et al., 2011). У циљу

додатног испитивања механизма којим ванћелијски хемоглобин обавља ову своју улогу, Posta и сарадници (2020) показали су да у атеросклерозним лезијама (као и у цереброспиналној течности пацијената са IVH) долази до нагомилавања пептида пореклом од хемоглобина и ферил хемоглобина.

Показано је да ванћелијски хемоглобин може имати улогу и у патогенези прееклампсије (Bellos et al., 2020; Anderson et al., 2018). Centlow и сарадници (2008) су коришћењем техника микротестова и протеомике показали да постоји стимулација експресије гена за фетални хемоглобин (HbF) и акумулација ванћелијског феталног хемоглобина у васкуларном лумену плаценти код жена са прееклампсијом. Додатно, Olsson и сарадници (2010) показали су да жене са прееклампсијом имају повишене нивое не само HbF у плазми већ и ванћелијског хемоглобина А. Претпоставља се да у овом стању долази до индуковања локалне плаценталне хипоксије, што даље индукује експресију плаценталних HbF гена и протеина. Ванћелијски HbF доводи до формирања ROS и последично до оксидативног оштећења и цурења кроз фетоматерналну баријеру. Ово цурење резултује у повишеној концентрацији HbF у плазми мајке и даљој индукцији стварања ROS, а затим и ендотелној дисфункцији, хипертензији и протеинурији који су главни симптоми прееклампсије (Bellos et al., 2020; Anderson et al., 2018). Исти аутори детектовали су повишене нивое А1М микроглобулина у плазми жена са овим стањем (Olsson et al., 2008; Olsson et al., 2012). Sverrisson и сарадници (2014) показали су да је ванћелијски HbF код жена са прееклампсијом такође укључен и у повећање гломеруларне пропустљивости преко индукције оксидативног стреса.

1.1.5. Хемоглобин у биотехнолошким истраживањима

Хемоглобин је у биотехнологији највише проучаван са аспекта примене као замена за крв, односно преносиоца кисеоника на бази хемоглобина (енг. *hemoglobin-based oxygen carriers*, HBOC) (Alayash, 1999; Sakai et al., 2009; Bialas et al., 2019). Додатно, развијени су препарати на бази хемоглобина, који су патентирани, а са циљем презервације органа за трансплантацију (Mallet et al., 2014; Zal & Rousselot, 2014) и примене као оксигенацијског адитива за ћелијске културе (Le Pape et al., 2015; Le Pape et al., 2017a). Хемоглобин изолован из еритроцита крви добијене у клиникама нашао је примену у производњи продуката намењених исхрани људи и животиња (González-Rosendo et al., 2010; Soto Méndez & Caballero Pérez, 2011; Hoppe et al., 2013).

Како је хемоглобин један од најбоље окарактерисаних протеина, он се често користи и као модел систем за различите анализе: испитивање токсичности синтетичких боја, текстилних, козметичких (Kamaljeet et al., 2017) и фармацеутских производа (Yan et al., 2013; Liu & Liu, 2015; Xu et al., 2019). Хемоглобин се све чешће користи и као модел протеин за испитивање биолошких ефеката наночестица (Soto Méndez & Caballero Pérez, 2011; Aliakbari et al., 2019).

1.1.5.1. Преносиоци кисеоника на бази хемоглобина

Модерни покушаји да се произведе вештачка крв датирају из периода Првог и Другог светског рата, када је потреба за њом доспела у жижу интересовања. Захваљујући обавезној анализи на присуство инфективних болести које се могу пренети крвљу и побољшаном прикупљању, крв која се данас користи за трансфузију је далеко безбеднија, али и даље мора задовољити услов подударности крвних група давалаца и прималаца, а период у ком је погодна за трансфузију је максимално шест недеља од прикупљања. Сходно томе, заменик за крв требало би да буде универзално доступан, без ограничења које крвне групе намећу и са могућношћу чувања дужи временски период (Gould et al., 1998; Alayash,

1999; Chen et al., 2009). Док крв има бројне улоге, вештачки заменик за крв је пре свега дизајниран са идејом да омогући пренос кисеоника и угљен-диоксида. До сада нису развијени заменици који би имали и друге виталне функције крви попут оне у имунском одговору или коагулацији. Сходно томе, решења која се данас развијају се терминолошки исправније означавају као преносиоци кисеоника и за сада су развијене две групе ових производа: једна заснована на перфлуоро једињењима и друга заснована на хемоглобину. Перфлуорокарбонати (енг. *perfluorocarbons*, PFC) су инертни материјали који растварају 50 пута више кисеоника него крвна плазма. Јефтени су и лаки за производњу, а како представљају синтетички материјал не носе са собом ризик од преноса инфективних агенаса. Међутим, да би се могли применити као заменици за крв, морају се помешати са другим једињењима – липидима, тако да се примењују у форми емулзија (Winslow, 1999; Bialas et al., 2019).

Први НВОС представљао је хемоглобин изолован из лизираних еритроцита који је пацијентима даван интравенски. Међутим, примећено је да се убрзо након примене раствора хемоглобина на овај начин, јављају оштећења бубрега, висок крвни притисак и кардиоваскуларне компликације (Alayash, 1999), због ефеката ванћелијског хемоглобина који су данас добро познати и описани у 1.1.4.2. поглављу. Након ових открића, истраживања су усмерена на покушаје да се мутагенезом добије рекомбинантни хемоглобин, са жељеним карактеристикама и смањеним нежељеним дејствима. Међутим, како није било могуће увести бројне мутације без да се наруши функција овог комплексног молекула као преносиоца кисеоника, од ове идеје се убрзо одустало и приступило хемијским модификацијама молекула (Chen et al., 2009; Bialas et al., 2019).

Први хемијски модификовани НВОС били би базирани на хемоглобину који је умрежен (енг. *cross-linked*) сукцинилдисулфидним киселином (HemeAssist[®], Baxter, Илиноис, САД) (Lamy et al., 2000) или глицином (Optro[®], Somatogen, Колорадо, САД) (Winslow, 1999) (слика 1.11). У основи HemeAssist[®] производа био је хумани хемоглобин из престареле дониране крви, док је Optro[®] садржао рекомбинантни хемоглобин. Оба производа су успешно продужавала време полуживота хемоглобина у циркулацији са мање од 6 h на до 12 h. Међутим, код пацијената са траумама HemeAssist[®] је, у поређењу са физиолошким раствором, довео до повећаног морталитета тако да је ова клиничка студија прекинута. Претпоставља се да је повећан морталитет био последица вазопресорских ефеката овог производа (Chen et al., 2009; Bialas et al., 2019). Optro[®] је стигао до фазе II клиничких студија и није показао значајне нежељене ефекте, али како је страх од везивања NO остао, након што је Somatogen купљен од стране Baxter, производња Optro[®] је обустављена (Winslow, 1999; Bialas et al., 2019).

У следећој генерацији развијених НВОС коришћен је глутаралдехид за умрежавање молекула хемоглобина (Hemopure[®]; Biopure, Масачусетс, САД; Polyheme[®]; Northfield Labs, Илиноис, САД) (Jahr et al., 2008) или О-рафиноза (Hemolink[®]; Hemosol, Онтарио, Канада) (Gould et al., 1998; Cheng et al., 2004) (слика 1.11). Полимери формиран на овај начин садржали су четири или пет молекула хемоглобина, што је повећало како капацитет преноса кисеоника, тако и време живота у циркулацији на 24 h, смањујући екстравазацију због повећања величине. Hemopure[®] је тако постао први производ у биотехнолошкој примени хемоглобина који је садржао хемоглобин изолован из говеда, што га је између осталог учинило погодним за коришћење од стране одређених религијских групација (нпр. Јеховини сведоци) (Rogers & Crookston, 2006). Клиничке студије су показале да Hemopure[®] смањује потребу за трансфузијом крви у току кардиоваскуларних операција, али повећава учесталост аритмија и инфаркта. Сходно томе, Hemopure[®] није добио дозволу Америчке агенције за храну и лекове (енг. *Food and Drug Administration Agency*, FDA), па се тренутно у САД користи само за случајеве у којима трансфузија крви није могућа због етничких или религијских разлога (енг. *compassionate use*). Међутим, одобрен је у Јужној Африци под именом Hemopure[®] од априла 2001. године (Winslow, 1999; Bialas et al., 2019).

Polycheme[®] је сличан Hemopure[®] производу али користи хумани уместо говеђег хемоглобина (Gould et al., 1998; Cheng et al., 2004). Испитан је у неколико клиничких студија на пацијентима са траумама и у току кардиоваскуларних операција. У фази III клиничке студије са пацијентима са траумама, Polycheme[®] је умерено смањио потребу за трансфузијом крви, али је доведен у везу са повећањем морталитета које није било статистички значајно. Ни овај производ није добио лиценцу од FDA јер су га пратиле бројне контроверзе (Winslow, 1999; Bialas et al., 2019).

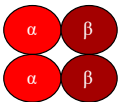
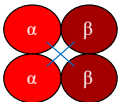
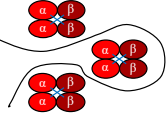
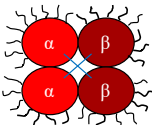
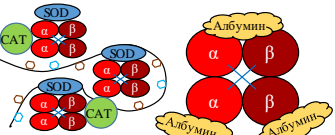
Hemolink[®] је још један производ на бази хуманог хемоглобина који је умрежен трисахаридом рафинозом. У фази II клиничке студије у 2003. години, показано је да Hemolink[®] примењен са аутологом трансфузијом крви смањује потребу за поновним трансфузијама, у поређењу са пацијентима који нису примили Hemolink[®]. Међутим употреба овог производа доводила је и да повишења крвног притиска и атријалне фибрилације, тако да је ово још један препарат који није добио дозволу од стране FDA (Winslow, 1999; Bialas et al., 2019).

Насупрот полимеризацији, алтернативни приступ да се повећа запремина НВОС јесте модификација површине молекула хемоглобина полиетилен гликолом (енг. *polyethylene glycol*, PEG) (слика 1.11). На овај начин настало је неколико производа: Hemospan[®] (MP4; Sangart, Калифорнија, САД) (Olofsson et al., 2006), PEG-Hb[®] (Enzon, Њу Џерзи, САД) и PNH[®] (Apex Biosciences, Северна Каролина, САД), међутим ниједан од њих није стигао до клиничких студија из безбедносних разлога (Bialas et al., 2019; Sen Gupta, 2019). Интересантна варијанта ове групе производа је Sanguinate[®] (Prolong Pharmaceuticals, Њу Џерзи, САД) који представља производ на бази PEG-илованог говеђег хемоглобина код кога је СО молекула везан за хем групу (Abuchowski, 2017). На овај начин се неколико минута након примене, СО ослобађа са хема и претпоставља се да доводи до инхибиције апоптозе, инфламације и вазоконстрикције. Sanguinate[®] се тренутно испитује у клиничким студијама као терапија за анемију српастих еритроцита (фаза I и II) и тешку анемију (фаза I).

Како би се побољшала безбедност НВОС, хемоглобин се често коњугује са различитим ензимима или биоактивним молекулима (слика 1.11). У циљу смањења везивања NO, β -субјединице хемоглобина су S-нитрозиловане како би се хемоглобин претворио у генератор NO (Roche et al., 2013). Ова истраживања су за сада само спроведена *in vitro*. Како би се ефикасније и реалније одражавала средина у којој се еритроцити физиолошки налазе и контролисало оксидативно оштећење, супероксид дисмутаза (енгл. *superoxide dismutase*, SOD) и каталаза (енг. *catalase*, CAT) су коњуговане за полимеризован хемоглобин. Други коњугати који су за сада испитани укључују редукционе ензиме (чија је улога да ограниче аутооксидацију), 2,3-DPG (који стимулише испоруку кисеоника или додавање аденозин трифосфата (енг. *adenosine triphosphate*, АТФ), аденозин и редуктовани глутатион (који умањују хипертензивне одговоре) (Hemotech[®], НемоBioTech, Тексас, САД) (Simoni et al., 2014). Клиничке студије у врло раној фази за препарат Hemotech[®] су у току у Демократској републици Конго са циљем примене у терапији анемије српастих еритроцита, болести коронарних артерија, трауматске повреде мозга и можданог удара.

Алтернативна стратегија у развоју НВОС је купловање хуманог серумског албумина (енг. *human serum albumin*, HSA) за који су везане наночестице од платине (енг. *platinum nanoparticle*, PtNP) за површину хемоглобина, коришћењем N-сукцинимидил 4-(N-малеимидомети) циклохексан-1-карбоксилата (енг. *N-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate*, SMCC) за умрежавање (слика 1.11) (Tomita et al., 2013). Финални производ добијен на овај начин садржи хемоглобин и HSA/PtNP у односу од 1:3. HSA делује као агенс који повећава запремину хемоглобина спречавајући екстравазацију или везивање NO, док PtNP служе као каталитичке (редукционе) површине које елиминишу штетне радикале кисеоника и спречавају оксидацију хемоглобина до мет форме. У *in vivo*

експериментима на пацовима и псима, HSA/PtNP-Hb је успешно довео до васкуларне ретенције без очигледног оштећења ткива, тако да се очекује да овај препарат уђе у преклиничке и клиничке студије (Iwasaki et al., 2018).

НВОС	Шематски приказ	Пример комерцијално доступног производа	Опис
Екстраћелијски хемоглобин		/	Хемоглобин изолован и пречишћен из хуманих еритроцита
Унакрсно повезан хемоглобин		HemeAssist (Baxter) Optro (Somatogen)	Екстраћелијски хемоглобин чије су субјединице унакрсно повезане сукцинилдисулфидним киселином или глицином
Унакрсно повезан, полимеризован хемоглобин		Hemopure (Biopure, касније HbO2 Therapeutics) Polyheme (Northfield labs) Hemolink (Hemosol)	Екстраћелијски хемоглобин са унакрсно повезаним субјединицама, полимеризован глутаралдехидом или О-рафинозом
Хемоглобин са модификованом површином		Hemospan (Sangart) PEG-Hb (Enzon) PHF (Apex Biosciences) Sanguinate (Prolong Pharmaceuticals)	Екстраћелијски хемоглобин са унакрсно повезаним субјединицама, са површином модификованом полиетилен гликолом или поли(оксиетиленом)
Хемоглобин конјугован са ензимом		Hemotech (HemoBioTech) и други	Различити молекули укључујући полимеризован хемоглобин куплован са SOD/CAT и АТФ или HSA и Pt наночестицама

Слика 1.11. Различити НВОС: назив, шематски приказ, име под којим је производ регистрован (компанија задужена за његов развој) и кратак опис. Детаљнија објашњења у тексту. Преузето и измењено према Bialas et al., 2019.

Бројне су предности система за испоруку кисеоника који се заснивају на инкапсулацији хемоглобина у односу на оне који користе „огољени“ молекул. Инкапсулација продужава време полуживота НВОС у циркулацији, смањује хипертензивни ефекат и фагоцитозу од стране мононуклеарних ћелија. НВОС поред хемоглобина могу да садрже и редукционе ензиме или ефекторске молекуле како би што веродостојније осликали физиолошку средину хемоглобина – унутрашњост еритроцита. Како су ови носачи мањи од еритроцита, лакше пролазе кроз места васкуларне блокаде или вазоконстрикције у циљу испоруке свог садржаја (Winslow, 1999; Bialas et al., 2019). У почетку су ови НВОС користили нитроцелулозу или PEG-полилактид за инкапсулацију хемоглобина са карбоанхидразом, каталазом и 2,3-DPG (Kumar, 1995; Bugarski et al., 2003; Sen Gupta, 2019). Иако су овакви носачи имали кинетику допремања кисеоника сличну еритроцитима, мане су се огледале у недостатку униформности, али и нестабилности, фузији и брзом уклањању (Bialas et al., 2019). Следећа генерација носача садржала је фосфолипиде, холестерол или TRM-645 (Нео црвене ћелије) (Sakai et al., 2009). Показано је да се мање везикуле (100–200 nm пречника) могу обложити са PEG како би се добиле PEG липозомалне везикуле које садрже хемоглобин (енг. *hemoglobin vesicle*, HbV). Због оваквог начина облагања, HbV промичу надзору имунског система што им смањује степен уклањања из циркулације и продужава време живота на 60 h. Тај додатни површински слој такође смањује опсонизацију и везивање NO. Иако су HbV показале задовољавајући степен испоруке O₂ у преклиничким моделима исхемије ткива, хеморагичног шока и трансплантације органа, фармакокинетички проблеми и имунски одговор посредован

комплементом одлажу клиничку примену и настављају да буду тема научних истраживања (Kaneda et al., 2009; Sheng et al., 2009).

Алтернативни полимерни системи као што су поли(ϵ -капролактон)/поли(L-лактатна киселина) и поли(L-лизин), поли(лактатна-когликолна киселина)/PEG кополимери такође су коришћени за инкапсулацију хемоглобина (Sheng et al., 2009). Добијене сферичне структуре означене као полимерозоми су мањи од везикула (80–200 μm) и показали су бољу биолошку компатибилност. И ови носачи поред хемоглобина често садрже ензиме и ефекторске молекуле како би веродостојније одражавали микросредину унутрашњости еритроцита и помогли у одржавању биофизичких својстава нативног хемоглобина. Додатна *in vivo* истраживања ових носача неопходна су како би се испитао утицај веће површине полимерозома на транспорт кисеоника. Произведене су и наночестице са умреженим субјединицама хемоглобина са албумином из серума или копреципитираним са калцијум-карбонатом (CaCO_3) или манган-карбонатом (MnCO_3) (Duan et al., 2012; Xiong et al., 2013). Молекули преципитирани са MnCO_3 имају смањен ефекат вазоконстрикције, мању имуногеност и не интерферирају са активацијом крвних плочица, док успешно транспортују кисеоник како *in vitro* тако и *in vivo*. Даља преклиничка истраживања неопходна су и на овом пољу.

Како је одавно познато да облик биконкавног диска, који нормални еритроцити имају у циркулацији, утиче на њихову способност транспорта кисеоника, покренута су истраживања неколико система који би боље имитирали морфологију ових ћелија. Неки од примера су полимерне честице пречника $\sim 7 \mu\text{m}$ од PEG или акрилатних хидрогелова са хемоглобином, или липозоми са инкапсулираним хемоглобином обложени матриксом актина који имају сличну деформабилност као еритроцити, а време живота у циркулацији између 8 и 72 h (Doshi et al., 2009; Merkel et al., 2011). Један нови приступ користи полиетилен-имин модификован палмитинском киселином за формирање тороидалних наночестица приближног пречника 200 μm (Erythromer[®], KaloCyte, Мисури, САД) (Pan et al., 2016). Ове партикуле садрже хемоглобин, леуко метилен плаво (редуктант), 2,3-DPG и рН сензитивне ефекторске молекуле који олакшавају отпуштање кисеоника при нижим рН вредностима. Erythromer[®] је тренутно у фази преклиничких истраживања на зечјем моделу хеморагичног шока. Системи са инкапсулираним хемоглобином за сада су најбоља опција када говоримо о развоју одрживог заменика за крв јер су успели да боље имитирају унутрашњу средину еритроцита и одвоје хемоглобин од других околних компоненти крви. Међутим, неопходна су додатна истраживања у циљу решавања проблема њиховог уклањања из циркулације, стабилности и имуногености.

1.1.5.2. Хемоглобини бескичмењака у биотехнологији

Међу хемоглобинима бескичмењака највећу пажњу истраживача који се баве биотехнологијом задобили су екстрацелуларни хемоглобини (енг. *extracellular hemoglobin*, ЕНб) анелида. Ови хемоглобини присутни су у три класе анелида: полихета (Polychaeta), олигохета (Oligochaeta) и ахета (Achaeta). Хемоглобини анелида су огромни биополимери велике молекулске масе 3000 - 4000 kDa.

Почетак примене ЕНб у биотехнологији везује се за француског професора Андре Тулмонда чији је докторанд Френк Зал 1993. године започео истраживања на морској полихети *Arenicola marina* и детаљно описао структуру неколико ЕНб. Zal и сарадници (1997) открили су да хемоглобин овог организма (HbAm) има све карактеристике универзалног преносиоца кисеоника којима се у њиховом развоју тежило: природно је екстрацелуларан и полимеризован, а молекулска маса му је 50 пута већа од масе хуманог хемоглобина. Има функциона својства везивања и ослобађања O_2 слична хуманом хемоглобину унутар еритроцита. Сваки HbAm молекул може да веже 156 молекула

кисеоника (хумани може само 4) и има природна антиоксидативна својства. Додатно, HbAm има функциона својства која су у потпуности независна од секундарних молекула попут 2,3-DPG. Молекул је функционалан без икаквих додатних хемијских модификација, стабилан је на температурама у распону од 4 до $>30^{\circ}\text{C}$ и не показује никаква вазоконстрикторска дејства. На основу ових својих истраживања, Френк Зал и Морган Русело су у марту 2007. године основали биотехнолошку компанију под називом HEMARINA како би наставили са развојем HbAm као заменика за крв треће генерације (Rousselot et al., 2006; Zal & Rousselot, 2014).

Један од производа HEMARINA је HEMO2life[®] намењен презервацији ткива и органа. Главни проблем при трансплатацији органа је продужавање њихове *ex vivo* вијабилности у циљу омогућавања њиховог транспорта. Време живота транспланта ограничавају штетни продукти, пре свега слободни радикали, који настају услед прекида циркулације (исхемијом) и који на 37°C доводе до брзе некрозе и пропадања ткива, и преносе се у примаоца перфузијом трансплантираног органа. Како је HbAm функционалан у природној средини при ниским температурама, HEMO2life[®] омогућава оксигенацију органа када се дода у неколико клиничких медијума за чување органа. Ефикасност HEMO2life[®] показана је на плућима, бубрезима и срцу. Поред тога, HEMO2life[®] има и унутрашњу активност супероксид дисмутазе која омогућава заштиту ћелија од оксидативног стреса, чиме додатно повећава ефикасност чувања органа за трансплатацију (Mallet et al., 2014; Zal & Rousselot, 2014).

HEMARINA је развила и свој HBOC, означен као HEMOXycarrier[®]. Интравенозна примена овог производа омогућава брзо, ефикасно и лако обнављање капацитета оксигенације након масивних губитака крви у анималним моделима, без нежељених ефеката. Овај молекул је стабилан на собној температури и може бити лиофилизован. Преклиничке студије овог производа на глодарима показале су да овај молекул не покреће имунолошке реакције, да нема вазоконстрикторски ефекат, као и да не утиче на вредност артеријског крвног притиска (Rousselot et al., 2006; Zal & Rousselot, 2014).

Иста компанија развила је и HEMOXCell[®], производ на бази екстрацелуларног хемоглобина анелиде *Nereis virens* са циљем примене у ћелијској култури као оксигенацијског адитива. HEMOXCell[®] је неимуноген, може да веже 156 молекула кисеоника и не захтева кофактор што омогућава отпуштање кисеоника у једноставном градијенту у складу са потребама ћелија (Zal & Rousselot, 2014; Le Pape et al., 2017a). Аутори овог патента показали су да HEMOXCell[®] повећава густину CHO-S ћелија (енг. *Chinese hamster ovary*, ћелије јајника кинеског хрчка адаптиране на услове култивације без серума) на дозно зависан начин од 2,5 до 4,6 пута у концентрацији од 0,5 g/L, као и да повећава продукцију рекомбинантних протеина од стране ових ћелија трансфектованих са побољшаним зеленим флуоресцентним протеином (енг. *enhanced green fluorescent protein*, EGFP) за 70%. И овај производ има SOD активност чиме доприноси одржавању квалитета медијума за ћелијске културе (Le Pape et al., 2015). Исти аутори показали су да HEMOXCell[®] у концентрацији од 0,025 g/L повећава степен пролиферације ММЋ изолованих из косне сржи за 25%, док им чува клоногени потенцијал, фенотип и пластичност (Le Pape et al., 2017a). Додатно, показано је да овај производ у тродимензионалној култури ММЋ у биореактору повећава принос ММЋ и стимулише остеогену диференцијацију (Le Pape et al., 2017b).

1.1.5.3. Хемоглобин из кланичне крви у биотехнологији

Главни изазов у истраживањима, припреми и даљем развоју производа који се заснивају на хемоглобину јесте његова доступност. Мала количина хуманог хемоглобина доступна из престареле крви која се није искористила у трансфузиолошке сврхе кључан је

фактор који ограничава његову примену у комерцијално доступним производима. Процене су да свега 5-10% дониране алогенске крви постане престарело (Wang et al., 2017a). С друге стране, кланична крв из контролисаних здравих животиња представља практично неограничен извор хемоглобина, па не чуди да се многи истраживачи на пољу биотехнолошке примене хемоглобина окрећу управо овом извору. Процењује се да годишње на свету настане 10 милиона тона кланичне крви (Hou et al., 2019). Део те крви се користи за прављење производа намењених за исхрану људи и животиња, али већи део заврши у животној средини где представља биохазард (Sun & Luo, 2011). Кланична крв представља јефтин извор протеина и њено рециклирање би уједно смањило и проблем загађења животне средине, који воде из кланица узрокују с обзиром на оптерећење кисеоником услед биодеградације (Zheng et al., 2013). Када је реч о кланичној крви, свињска и говеђа крв су посебно интересантне са аспекта добијања хемоглобина из неколико разлога. Свиње и говеда спадају у сисаре чији еритроцити не садрже једра, па је експериментална манипулација овим ћелијама и изолација хемоглобина из њих олакшана у поређењу са, на пример, еритроцитима живине који имају једра. И свињски (Yang et al., 2019) и говеђи хемоглобин (Wang et al., 2017a) показују висок степен хомологије са хуманим хемоглобином (84,4% и 85%, респективно). У присуству физиолошких концентрација хлоридних јона, говеђи хемоглобин има афинитет за везивање кисеоника сличан оном који има хумани хемоглобин у потпуности сатуриран својим алостеричним ефектором 2,3-DPG (Lima & Andrade, 2007), односно P_{50} (парцијални притисак O_2 , притисак на коме је хемоглобин 50% засићен кисеоником) је ~ 28 mmHg, док за хумани хемоглобин та вредност износи ~ 14 mmHg (Wang et al., 2017a). Иако су хумани и говеђи хемоглобин најчешће коришћени за развој НВОС, због ограничене доступности хумане крви и потенцијалне опасности од преноса хепатитиса, вируса хумане имунодефицијенције (енг. *human immunodeficiency virus*, HIV) и трансмисије болести лудих крава (говеђе спонгиформне енцефалопатије) међу врстама, свињска крв је такође постала занимљив извор хемоглобина која се све више истражује и користи као почетни материјал (Zhu et al., 2007, 2011).

Једна од примена хемоглобина и еритроцита из кланичне крви јесте у виду додатака производима који се користе у исхрани људи и животиња. Дефицијенција гвожђа је најчешћи поремећај исхране и процене су да 30% светске популације болује од овог поремећаја (Li et al., 2019a). Преваленца анемије узроковане дефицијенцијом гвожђа може се смањити применом дијететских суплемената, обогаћивањем хране гвожђем или разноврснијом исхраном. Поред тога што се хемоглобин и хемско гвожђе користе за производњу дијететских суплемената, хемоглобин из кланичне крви има примену и у производњи прехранбених производа чија је намена смањење дефицијенција гвожђа у општој популацији људи. Већ више од једног века у Русији се производи препарат од дефибриногеноване говеђе крви познат под називом Хематоген (Гематоген®). Најпре га је користила совјетска војска као извор гвожђа, а касније је почео да се примењује и у педијатрији. Доступан је у виду чоколадица и поред хемоглобина из кланичне крви садржи и кондензовано млеко, мед, кокос, орах, суво воће и какао. Захваљујући новим технологијама дошло је до развоја и пантохематогена, препарата у течном стању, од јеленске крви са додатком алкохола, прилагођеног људима у старијој животној доби (Большаков et al., 1976). González-Rosendo и сарадници (2010) показали су да свакодневна примена чоколадног бисквита са додатим концентратом свињског хемоглобина у току 7 недеља повећава ниво хемоглобина у крви адолесценткиња. Сличне резултате добили су Норре и сарадници (2013) који су показали да коришћење хлеба припремљеног са свињском или говеђом крвљу у току 12 недеља повећава ниво гвожђа у крви жена у репродуктивном добу. Иако нису тестирали на људима, Soto Méndez и Caballero Pérez (2011) успели су да развију чоколаду која садржи хемско гвожђе у концентрацији од 2,2 mg/порцији.

Међутим, црвено-браон боја и „метална“ арома који потичу од хемоглобина у неким производима нису пожељни. Шта више, еритроцити могу бити тешки за варење (због присуства мембрана) и састављени од неизбалансираних аминокиселина (већи садржај лизина, мање изолеуцина и метионина) за људе и животиње, тако да су многа истраживања усмерена ка побољшању како органолептичких, тако и функцијских карактеристика протеина изолованог из еритроцита (Toldrà et al., 2011; Zheng et al., 2013; Fu et al., 2019). Поред тога што је ензимска хидролиза коришћена за обезбојавање хемоглобина и уклањање карактеристичног укуса који није пожељан у прехранбеним производима, довела је до отварања једног новог поља истраживања – пептида пореклом од хемоглобина за које је показано да имају бројне функције: антиоксидативну, антихипергликемијску, антихипертензивну, антимикуробну и опиодну, чиме је значајно повећана могућност примене хидролизата хемоглобина пореклом из кланичне крви (Sun & Luo, 2011; Toldrà et al., 2011; Bah et al., 2013; Tang et al., 2014; Wang et al., 2017b). Кланична крв искоришћена је и за производњу спреја на бази свињског хемоглобина који има примену у зацељивању рана. Показано да овај производ смањује бол, величину рана и слој некротичног ткива који успорава њихово зарастање, уколико се примењује у правилним интервалима у току 2-4 недеље (Arenberger et al., 2011; Elg & Hunt, 2018).

Како представља један од најбоље окарактерисаних протеина, хемоглобин је препознат и као модел систем за студије на протеинима. Хемоглобин је нашао примену у испитивању токсичности синтетичких боја које улазе у састав многих производа који се свакодневно уносе у организам (храна или фармацеутски производи) или долазе у контакт са кожом (козметика, текстил, кожа, папир) (Kamaljeet et al., 2017). Због своје доступности, говеђи хемоглобин је највише коришћен у ове сврхе (Kamaljeet et al., 2017). Говеђи хемоглобин се користи и за испитивање интеракција са лековима јер је показано да се може везати за њих и утицати на њихову дистрибуцију и ефикасност (Yan et al., 2013; Liu & Liu, 2015; Xu et al., 2019), а у новије време и за испитивање ефекта наночестица на структуру и биолошку функцију протеина (Aliakbari et al., 2019).

1.2. Ћелијски модели за испитивање ефеката ванћелијског хемоглобина

1.2.1. Матичне ћелије

Појам „матичне ћелије“ односи се на недиференциране ћелије које имају потенцијал самообнављања и диференцијације ка различитим зрелим ћелијским типовима. Самообнављање представља способност ових ћелија да пролазе кроз неограничен број или вишеструке деобе. Деоба матичних ћелија може бити симетрична када су обе настале ћерке ћелије идентичне као и родитељска матична ћелија, или асиметрична када је једна од ћерки ћелија идентична родитељској матичној ћелији, док друга улази у процес диференцијације ка више специјализованим линијама ћелија. Симетричне деобе обезбеђују репопулацију недиференцираних матичних ћелија, док асиметричне деобе одржавају пул матичних ћелија, али и хомеостазу у оквиру датог ткива. Диференцијација матичних ћелија кључна је за регенерацију и репарацију ткива и органа у организму (McLeod & Mauck, 2017; Łos et al., 2019).

Матичне ћелије се према својој пластичности/регенеративном потенцијалу могу класификовати на:

1) Тотипотентне ћелије које имају способност да се диференцирају у ћелије сва три клицина листа: ендодерм, мезодерм и ектодерм, укључујући плаценталне ћелије. У овај тип матичних ћелија спадају зигот и неколико првих бластомера у хуманом организму.

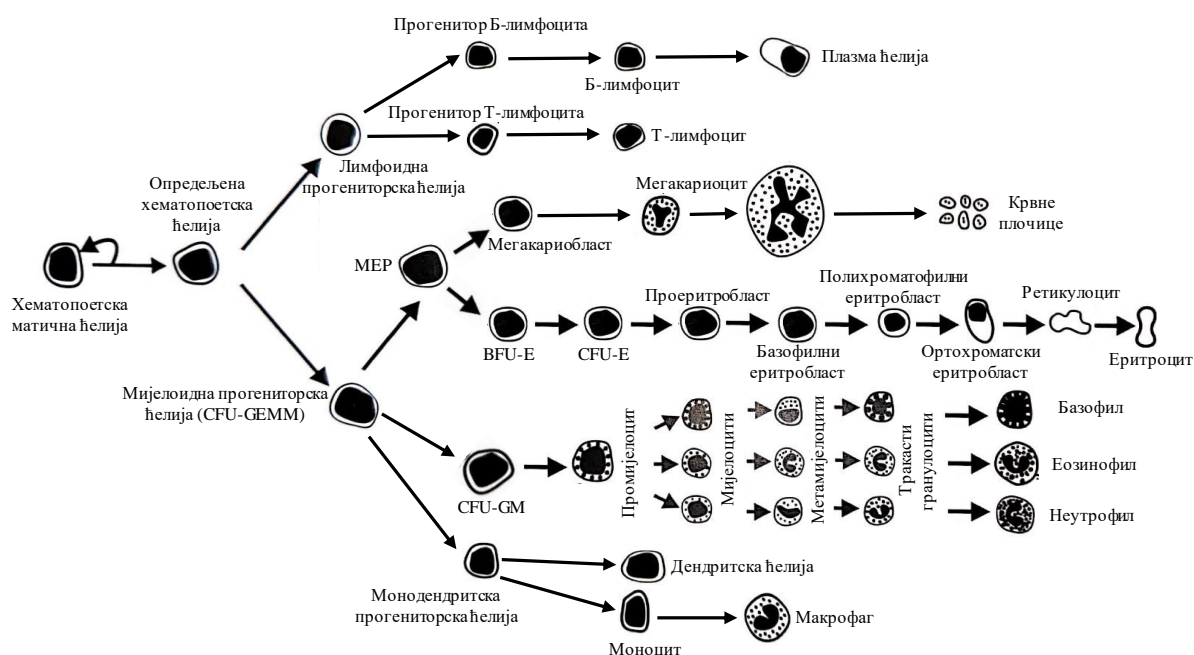
- 2) Плурипотентне ћелије имају могућност да се диференцирају у ћелије сва три клицина листа, али не и у ћелије плаценте. У ове ћелије спадају ћелије унутрашње масе бластоциста, односно ембрионалне матичне ћелије.
- 3) Мултипотентне ћелије имају могућност да се диференцирају у ограничен тип ћелија које све воде порекло од истог клициног листа.
- 4) Олигопотентне ћелије имају способност диференцијације у мањи број типова ћелија.
- 5) Унипотентне ћелије могу да продукују само ћелије свог типа (Łos et al., 2019).

Адултне матичне ћелије (означене и као ткивно-специфичне или соматске матичне ћелије) су мултипотентне ћелије одговорне за репарацију и замену оштећених и/или мртвих ћелија у организму. Налазе се у великом броју ткива и органа адултног организма где су смештене у специфичним ћелијским микросрединама означеним као нише матичних ћелија. Како организам стари, тако се квантитет и квалитет адултних матичних ћелија смањују, што утиче на њихов регенеративни потенцијал, раст и деобу (McLeod & Mauck, 2017; Łos et al., 2019).

1.2.1.1. Хематопоеетске матичне ћелије

Хематопоеетске матичне ћелије (ХМЋ) су мултипотентне ћелије које могу да се диференцирају у прогениторе и зреле ћелије крви. Одговорне су за хематопоезу и продукцију имунских ћелија у организму. Имају способност да мигрирају у оштећена ткива под утицајем различитих цитокина. Њихова ћелијска ниша је у косној сржи и садржи још и периците, ендотелске ћелије, симпатичке нерве и пратеће Шванове ћелије, које помажу одржавању ХМЋ у недиференцираном стању (Łos et al., 2019).

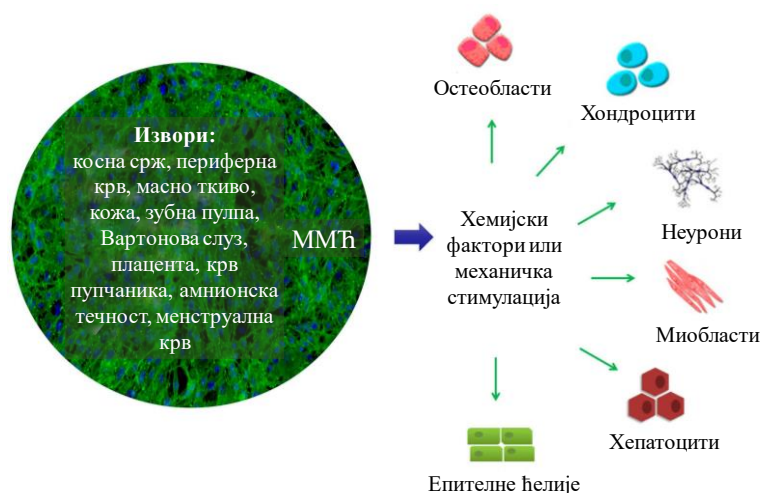
Крв садржи неколико типова ћелија, различитих морфологија и специфичних биолошких функција: еритроците, крвне плочице, леукоците (слика 1.12). Еритроцити човека немају једра, биконкавног су облика, испуњени хемоглобином и главна улога им је у транспорту и размени гасова (O_2 и CO_2) у организму. Крвне плочице су мале, ануклеарне ћелије које учествују у реакцији коагулације крви. У леукоците периферне крви убрајају се моноцити, лимфоцити и гранулоцити (неутрофили, еозинофили и базофили). Упркос свим овим структурним и функционалним разликама ћелија крви, данас се зна да све оне потичу од истог прогениторског типа ћелија, означених као ХМЋ, а процес у коме настају означен је као хематопоеза. Хематопоеза обухвата самообнову ХМЋ, опредељење ХМЋ ка одређеној ћелијској линији и матурацију опредељених прекурсора до функционалних ћелија крви. Овај процес се у стању хомеостазе дешава у косној сржи, где се ХМЋ физиолошки налазе. Међутим, у условима стреса ХМЋ могу мигрирати и колонизовати друге органе као што су јетра и слезина, где ће учествовати у настанку ћелија крви у процесу означеном као екстрамедуларна хематопоеза (Koury et al., 2009). Иако ХМЋ носе специфичне површинске маркере на основу којих се могу идентификовати и сортирати проточном цитометријом, развијени су и бројни функцијски тестови за њихову идентификацију и доказивање мултипотентности јер се експресија маркера може променити старењем, претходним трансплантацијама или под утицајем спољашњих фактора (Morita, 2015; Abbas et al., 2016).



Слика 1.12. Ћелије крви и лимфоидних органа и њихови прекурсори у косној сржи. CFU-GEMM (енг. *colony-forming unit – granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte*), прекурсор заједнички за гранулоците, еритроците, макрофаге и мегакариоците; MEP (енг. *megakaryocyte-erythroid progenitor*), заједнички прекурсор мегакариоцита и еритроцита; CFU-GM (енг. *colony-forming unit-granulocyte-monocyte*), прекурсор гранулоцитно-моноцитне лозе; BFU-E, CFU-E (енг. *colony-forming unit-erythroid*), еритроидни прекурсори. Преузето и измењено према Koury et al., 2009.

1.2.1.2. Мезенхимске матичне ћелије

Мезенхимске матичне ћелије (ММЋ) су мултипотентне нехематопоетске матичне ћелије, присутне у скоро сваком типу везивног ткива. До сада су успешно изоловане из косне сржи, масног ткива, коже, периферне крви, скелетних мишића, зубне пулпе млечних зуба, кости, Вартонове слузи, плаценте, крви пупчаника, амнионске течности, менструалне крви (слика 1.13). Иако носе назив „мезенхимске“, данас се зна да не настањују само ткива пореклом од мезодерма и да њихов потенцијал за диференцијацију превазилази ткива овог порекла, јер се могу диферентовати и у ћелије које воде порекло од ектодерма и ендодерма (Bianco et al., 2008; Han et al., 2019).



Слика 1.13. Шематски приказ типова ћелија у које се ММЋ изоловане из различитих ткива могу диференцирати под утицајем хемијских фактора или механичке стимулације. Преузето и измењено према Han et al., 2019.

Назив „мезенхимске матичне ћелије“ је први пут употребио Caplan (1991), како би описао популацију ћелија у косној сржи и периостеуму сисара које се могу изоловати и умножити у култури, а да при том задрже капацитет да при индукцији *in vitro* формирају различите ћелије ткива мезодермског порекла. У литератури се могу пронаћи и под називима мезенхимске стромалне ћелије, стромалне ћелије косне сржи, мезодермалне матичне ћелије, мултипотентне матичне/стромалне ћелије. Међународно друштво за ћелијску терапију предложило је назив „мултипотентне мезенхимске стромалне ћелије“ (Dominici et al., 2006), док је сам творац термина ММЋ 2017. године позвао научну јавност да престане са употребом термина „мезенхимске матичне ћелије“ и замени га са „медицинске сигналне ћелије“ (енг. *medicinal signaling cells*, MSC) (Caplan, 2017). Као разлог овој промени Caplan наводи чињеницу да термин ММЋ погрешно наводи на утисак да ће ове ћелије када се примене код пацијената бити те које ће се диференцирати у ћелије које ће извршити репарацију ткива, док оне заправо мигрирају на место повреде и секретују биоактивне факторе (имуномодулаторне и трофичке) како би подстакле резидентне матичне ћелије пацијента на месту повреде да започну формирање новог ткива. Како егзогене ММЋ заправо стимулишу резидентне адултне матичне ћелије, Caplan предлаже термин MSC који веродостојније осликава њихову употребу у терапијске сврхе (Caplan, 2017).

Иако су ММЋ предмет бројних истраживања већ скоро 30 година, и даље су велика непознаница за истраживаче. Циљ ових истраживања је стицање бољег увида у њихову биологију како би се могле применити у терапији различитих болести, односно регенеративној медицини. Међутим, прва препрека на том путу јесте њихова карактеризација јер још увек не постоји јединствени критеријум којим се може показати да су ћелије изоловане из различитих ткива заправо ММЋ. Осим тога, ћелије изоловане из ткива (примарна ћелијска култура), представљају хетерогену групу ћелија, морфологије сличне фибробластима, на различитим ступњевима диференцијације и са различитим потенцијалом за диференцијацију (He et al., 2007; McLeod & Mauck, 2017; Arnhold et al., 2019). Међународно друштво за ћелијску терапију (енг. *International Society for Cellular Therapy*, ISCT) дефинисало је три критеријума на основу којих се изоловане ћелије могу окарактерисати као ММЋ (Dominici et al., 2006):

- 1) способност адхезије за пластичну подлогу у посудама за ћелијске културе која се дуготрајно одржава у стандардним условима култивације ћелија;
- 2) висока експресија мезенхималних маркера, као што су CD73, CD90 и CD105, и минимална експресија маркера хематопоетских ћелија, CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79a или CD19 и HLA-DR антигена;
- 3) потенцијал за мултипотентну диференцијацију у правцу најмање три лозе: хондрогене, остеогене и адипогене под стандардним условима за диференцијацију *in vitro*.

1.2.1.2.1. Извори мезенхимских матичних ћелија

Косна срж је први извор матичних ћелија у коме су ове ћелије и откривене. Трансплантација косне сржи као и ћелијска терапија хематолошких обољења помоћу хематопоетских и стромалних матичних ћелија, данас су најчешће примењивани видови ћелијске терапије у којој се користи овај тип ММЋ (Pittenger et al., 1999; Kern et al., 2006). Иако су код људи примарно изоловане и функционално окарактерисане ММЋ пореклом из косне сржи, проблеми са добијањем узорака овог ткива су и даље велики. Процедура је неугодна за даваоца и добија се мала количина косне сржи из које је могуће изоловати мали број ММЋ. Због овога су истраживачки тимови покушали и успели да изолују ММЋ из других ткива из којих је изолација једноставнија и безопаснија за даваоца. Данас су истраживачи фокусирани на изолацију ММЋ пре свега из ткива која се одбацују након

медицинских процедура и до којих се може доћи без угрожавања здравља даваоца. Таква су перинатална ткива (плацента и пупчана врпца) која представљају медицински отпад након порођаја, масно ткиво које се одбацује након липосукције или других операција, као и зубна пулпа и периодонцијум до којих се може доћи током рутинских стоматолошких процедура (Sibov et al., 2012; Trivanović et al., 2014; Han et al., 2019).

Алтернативни извор ММЋ представља и периферна крв. Иако се у почетку претпостављало да су последица контаминације околним везивним или ендотелским ткивом до које долази при поступку узимања крви, убрзо се схватило да се ради о аутентичној популацији крвних ћелија (He et al., 2007). Међутим, број ММЋ у периферној крви је мали (око 1 на 10^8 ММЋ периферне крви) (Zvaifler et al., 2000; Kuznetsov et al., 2001) и претпоставља се да су то ММЋ пореклом из косне сржи које кроз крв мигрирају на места где ће остварити своју улогу у репарацији ткива (Valenti et al., 2008). Због малог броја у крви, примена ових ћелија у терапијске сврхе не истражује се колико и ММЋ из других извора (He et al., 2007; Cesselli et al., 2009). Показано је да се могу диферентовати у фибробласте, остеобласте, адипоците, хондроците, миобласте, као и нервне и глијалне ћелије што говори у прилог њиховој хетерогености (Kuznetsov et al., 2001; He et al., 2007).

ММЋ које се налазе у Вартоновој слузи пупчаника сматрају се примитивним у односу на ММЋ из других извора. Ове ћелије показују високу хромозомску стабилност и експримирају антигене хуманих леукоцита – изотипове А и G (HLA-A и HLA-G), а не експримирају HLA-DR антиген, што указује на њихову ниску имуногеност. Ове особине, уз лаку доступност, једноставну изолацију, добар принос, високу способност експанзије и велики диференцијациони потенцијал, чине ММЋ из Вартонове слузи добрим кандидатом за испитивање у циљу примене у ћелијској терапији и регенеративној медицини (Pittenger et al., 1999; Taghizadeh et al., 2011). Ниска имуногеност одликује и ММЋ пореклом из плаценте, још једног перинаталног ткива које се одбацује након порођаја (Parolini et al., 2008). Крв из пупчаника тренутно је најпопуларнији извор хематопоеетских матичних ћелија, али је показано да садржи и ретке ММЋ. Мала заступљеност је главни недостатак ових ћелија јер крв из пупчаника није увек могуће прикупити у довољним количинама при порођају за изолацију ових ММЋ (Kern et al., 2006; Sibov et al., 2012).

Још један, практично неограничен извор ММЋ је масно ткиво, које се рутински одбацује после хируршких интервенција. Давалац овог ткива може бити свака одрасла особа у било ком животном добу, а само узимање масног ткива, које је релативно једноставно и по правилу се изводи у локалној анестезији па није болно за даваоца (Zuk et al., 2001). Поред тога, велика предност овог ткива у односу на друге изворе ММЋ, је та што се из релативно мале количине масног ткива може изоловати релативно велики број ММЋ. Zhu и сарадници (2008) показали да се из 200 mL масног ткива добијеног након козметичке липосукције може изоловати око 1×10^6 ММЋ које задржавају снажан пролиферативни капацитет, имају очуван фенотип и снажан мултидиференционални потенцијал и после 25 пасажа. ММЋ изоловане из масног ткива могу се диферентовати у већи број ћелијских линија: адипоците, хондроците, осетобласте, нервне ћелије, ендотелне ћелије и кардиомиоците (Zuk et al., 2001; Witkowska-Zimny & Walenko, 2011; Ayuningtyas et al., 2020).

Матичне ћелије могу бити изоловане из различитих типова зубног ткива: зубне пулпе (Gronthos et al., 2000), отпалих млечних зуба (Miura et al., 2003), перидонталних лигамената (Seo et al., 2004), зубних фоликула (Morscheck et al., 2005) и апикалних папила (Sonoyma et al., 2008). Ове постнаталне ћелијске популације имају особине ММЋ, способност самообнове и способност диферентовања у правцу мезодермалних ћелија. Највећу пажњу истраживача привлаче матичне ћелије из млечних зуба, јер имају висок пролиферативни капацитет и представљају непресушан извор ћелија, што их чини супериорнијим у односу на друге адултне/постнаталне ММЋ (Miura et al., 2003).

1.2.1.2.2. Функцијске карактеристике ММЋ

Главним функцијским својствима ММЋ сматрају се њихова способност миграције на место у организму где ће остварити своју регенеративну улогу, способност диференцијације ка различитим ткивима мезенхимског порекла и имуномодулаторна улога.

Бројне студије показују да ММЋ имају могућност миграције на место у организму где учествују у репарацији ткива (Fiedler et al., 2002; Palumbo & Bianchi, 2004; Roufosse et al., 2004). Редослед корака у миграцији ММЋ сличан је оном којим леукоцити периферне крви мигрирају на места инфламације (описано у поглављу 1.2.2.2.) и обухвата активацију, адхезију, екстравазацију и трансмиграцију (Jervis et al., 2019). Иако тачан механизам миграције ММЋ још увек није у потпуности познат, студије показују да је овај процес зависан од интеракција неколико хемокина и њихових рецептора (Forte et al., 2006; Ball et al., 2007; Dwyer et al., 2007), а као најважнији препознати су фактор пореклом од стромалних ћелија (енг. *stromal cell-derived factor 1*, SDF-1) и СХС рецептор за хемокине тип 4 (енг. *chemokine receptor type 4*, CXCR4) (Nakamizo et al., 2005; Son et al., 2006).

Велики број истраживачких тимова ради на примени ММЋ као терапеутског средства у регенеративној медицини и ткивном инжењерству. Употреба ових ћелија заснована је на њиховој способности да се диферентују у различите ћелијске типове и способности да луче велики број биолошки активних молекула који (ин)директно могу да помогну регенерацију из прогенитора присутних у оштећеним ткивима. ММЋ имају могућност диференцијације у ћелије мезенхимске линије, укључујући: фибробласте, адипоците, остеобласте, хондроците, теноците и мишићне ћелије (Pittenger et al., 1999; Anjos-Afonso et al., 2004; Jervis et al., 2019). Међутим, резултати одређених студија показују да се диференцијациони потенцијал ММЋ може проширити ван ових граница и да се ове ћелије могу диференцирати и у ћелије ектодермског и ендодермског порекла, укључујући хепатоците (Petersen et al., 1999; Schwartz et al., 2002), неуроне (Tropel et al., 2006) и кардиомиоците (Pijnappels et al., 2008; Ayuningtyas et al., 2020). Мултилинијски диференцијациони потенцијал ММЋ уобичајено се испитује функцијским тестовима *in vitro* коришћењем специфичних медијума за диференцијацију. Резултати оваквих студија говоре у прилог потенцијалној примени ММЋ у регенерацији оштећених ткива, али је још увек недовољно информација о њиховој *in vivo* диференцијацији (Bianco et al., 2008; Han et al., 2019). Студије указују да долази до прихватања калема и трансдиференцијације ММЋ *in vivo* у различитим моделима оштећења костију, хрскавице (Pereira et al., 1995), миокарда (Toma et al., 2002), нервног ткива (Bae et al., 2007) и ткива јетре (Schwartz et al., 2002) али није јасно да ли су запажени терапијски ефекти последица паракриног дејства ММЋ или правог диференцијационог потенцијала ових ћелија.

Поред својих регенеративних особина, опште је прихваћено да ММЋ изоловане из различитих ткива имају способност супресије имунског одговора *in vitro* и *in vivo* (Newman et al., 2009; Shi et al., 2011; De Miguel et al., 2012; Soleymaninejadian et al., 2012). Имуносупресивно својство ММЋ није последица само ниске експресије МНС класе II и костимулаторних молекула, већ и директног интерферирања са различитим путевима имунског одговора путем директних ћелијских интеракција (у којима велики значај имају HLA-G антиген и адхезивни молекули), као и преко секреције већег броја активних супстанци (простангландин E2, фактор трансформишућег раста- β (енг. *transforming growth factor- β* , TGF- β), интерлеукин-6 (IL-6), интерлеукин-10 (IL-10), матриксне металопротеиназе, индоламин-2,3-деоксигеназа (енг. *indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase*, IDO), NO и др. (Bianco et al., 2008; Shi et al., 2011; Han et al., 2019). Да би ММЋ деловале као модулатори имунског одговора, морају прво бити активирани на месту инфламације, при чему су главни цитокини који доводе до њихове активације фактор некрозе тумора α (енг. *tumor necrosis factor α* , TNF- α), и IFN- γ .

ММЋ остварују имуносупресивно дејство и на урођени (неспецифични) и адаптивни (специфични) имунски одговор (Newman et al., 2009; De Miguel et al., 2012). Модулација неспецифичног имунског одговора остварује се путем инхибиције активности и пролиферације ћелија природних убица (енг. *natural killer*, NK), инхибиције апоптозе неутрофила, инхибиције лучења проинфламаторних цитокина од стране макрофага, спречавања диферентовања дендритских ћелија, снижене експресије костимулаторних молекула на овим ћелијама и смањеног лучења проинфламаторних цитокина. ММЋ модулишу и ћелијску и хуморалну грану адаптивног имунског одговора инхибирајући пролиферацију CD4⁺ Т лимфоцита индуковану антигенима, митогенима и алоантигенима, смањујући лучење проинфламаторних цитокина и стимулишући секрецију антиинфламаторних цитокина. Супресија пролиферације лимфоцита дешава се у контакту и са аутологом и са алогеним ММЋ, што указује да није ограничена главним хистокомпатибилним комплексом. Потребно је нагласити да ефекат ММЋ на пролиферацију Т лимфоцита не зависи само од степена активације ММЋ већ и од степена диферентовања самих Т лимфоцита. Тако ММЋ помажу преживљавање мирујућих Т лимфоцита, супримирају пролиферацију Т лимфоцита заустављањем у G0/G1 фази или индукују апоптозу активираних Т лимфоцита. ММЋ инхибирају и активацију цитотоксичних Т лимфоцита и секрецију IFN- γ и TNF- α . Спречавање хиперимунских реакција одвија се и путем генерисања регулаторних Т лимфоцита (енг. *regulatory T lymphocytes*, Treg), спречавањем диферентовања неопређених, „наивних“ Т лимфоцита у помоћничке T17 лимфоците (енг. *T17 helper lymphocytes*, Th17) и усмеравањем Т ћелијског одговора у правцу Th2 цитокинског профила (Le Blanc & Ringdén, 2007; Kim & Cho, 2013). Способност ММЋ да индукују настанак Treg запажена је и *in vitro* и *in vivo* у различитим моделима. ММЋ могу стимулисати и плазмацитоидне дендритске ћелије да продукују IL-10 који такође доприноси настанку и развоју Treg. Ова запажања указују на то да су ММЋ кључни регулатори модулације имунског одговора, директним супримирањем активираних ћелија имунског система и индиректно преко индукције диференцијације Treg. Ефекат ММЋ на хуморалну грану имунског одговора остварује се путем инхибиције пролиферације и терминалне диференцијације Б лимфоцита и инхибиције синтезе имуноглобулина (Le Blanc & Ringdén, 2007).

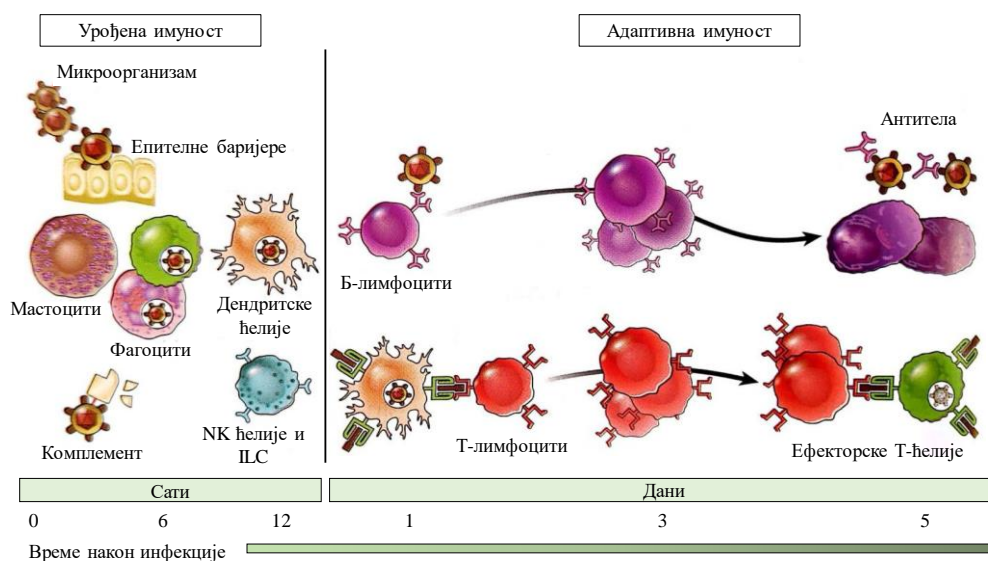
Треба нагласити да ММЋ нису конститутивно инхибиторне, већ њихова имуномодулаторна улога зависи од услова микросредине. У условима акутне инфламације, под утицајем M1 макрофага и цитокина Th1 лимфоцита (претежно IFN- γ), имуносупресивни капацитет ММЋ бива стимулисан и долази до повећане продукције молекула попут унутарћелијског адхезионог молекула-1 (енг. *intercellular adhesion molecule*, ICAM-1), IDO и других. С друге стране, у стању хроничне инфламације, када су ММЋ поларизоване M2 макрофагима и цитокинима Th2 лимфоцита, ове ћелије могу бити укључене у процес фиброзе (Kim & Cho, 2013; Klimczak et al., 2018).

1.2.2. Леукоцити периферне крви

Леукоците периферне крви чине моноцити, лимфоцити и гранулоцити (неутрофили, еозинофили и базофили). Гранулоцити и моноцити могу да изађу из крвних судова и мигрирају у ткива где имају кључне улоге у фагоцитози и инфламацији. Лимфоцити су посредници у специфичној имуности на микроорганизме и друге изворе страних молекула. Б лимфоцити продукују антитела, док Т лимфоцити учествују у убијању ћелија и презентацији страних молекула на површини своје ћелијске мембране. Ове ћелије се непрестано крећу по организму ношене крвотоком и лимфотокотом или миграцијом кроз ткива. Леукоцити функционишу заједно путем комплексног система протеина, липида и угљених хидрата (медијатора инфламације и њихових рецептора) који им помажу да лоцирају и убију патогене и идентификују и уклоне абнормалне, сенесцентне или мртве

ћелије, као и страни материјал. Сваки тип леукоцита може да стимулише или супримира одговор других леукоцита и овај високо регулисан одговор одржава хомеостазу у светлу сталних изазова антигена средине (Carrick & Begg, 2008; Abbas et al., 2016). Леукоцити периферне крви су интегрални део урођеног и адаптивног имунског система (слика 1.14). Урођена или неспецифична имуност обезбеђује физичке баријере. Поред епителних баријера и система комплемента, урођену имуност чине и неутрофили, моноцити и макрофаги (фагоцитне ћелије), дендритске ћелије, мастоцити, NK ћелије и урођене лимфоидне ћелије (енг. *innate lymphoid cell*, ILC). Адаптивни имунски систем чине Т и Б лимфоцити и њихови производи, цитокини и антитела. Адаптивни имунски систем омогућава специфичан одговор лимфоцита на индивидуалне антигене. Моноцити, макрофаги и дендритске ћелије преко своје антиген-презентујуће улоге повезују урођен имунски одговор са адаптивним (Abbas et al., 2016).

Центрифугирањем пуне крви на густинском градијенту густине 1,077 g/mL издвајају се две фракције: фракција ћелија мање густине у којој се налазе мононуклеарне ћелије (МНЋ) и фракција ћелија веће густине у којој се налазе еритроцити и полиморфонуклеарне ћелије (ПМЋ) тј. гранулоцити. Главна предност коришћења МНЋ и ПМЋ у експерименталне сврхе јесте њихова релативно лака изолација; изолују се из пуне крви или фракција крви обогачених леукоцитима (енг. *buffy coats*). Главна мана и ограничење овог модел система су фенотипске разлике између ћелија периферне крви и оних у ткивима (Carrick & Begg, 2008; Kleiveland, 2015).



Слика 1.14. Ћелије и механизми урођене и адаптивне имуности. Приказана је приближна кинетика урођеног и адаптивног имунског одговора која варира зависно од инфективног агенса. Преузето и измењено према Abbas et al., 2016.

1.2.2.1. Мононуклеарне ћелије

Хумане мононуклеарне ћелије периферне крви изолују се из периферне крви и идентификују као ћелије са округлим нуклеусом: лимфоцити (Т ћелије, Б ћелије и NK ћелије), моноцити и дендритске ћелије. Код људи, фреквенција ових ћелијских популација варира између различитих индивидуа, али типично лимфоцити чине 70-90%, моноцити 10-20%, док су дендритске ћелије ретке и чине 1-2%. Фреквенција ћелијских типова у оквиру популације лимфоцита укључује CD3⁺ Т ћелије (70-85%), Б ћелије (5-10%) и NK ћелије (5-20%). CD3⁺ лимфоците чине CD4⁺ и CD8⁺ Т ћелије, у грубом односу 2:1 (Carrick & Begg, 2008; Kleiveland, 2015).

Већина МНТ здравих особа су наивне или мирујуће ћелије које, с обзиром да у периферној крви не добијају одговарајући стимулус, нису у стању да започну ефекторске реакције. Сходно томе, у одсуству имунског одговора, изоловане Т ћелије су преобладајуће присутне као наивни или мирујући меморијски Т лимфоцити. Наивне ћелије се никада раније нису сусреле са антигеном за који су специфичне и уобичајно се препознају по одсуству активацијских маркера попут CD25, CD44 или CD69, и меморијског маркера CD45RO изоформе. Препознавање антигена од стране наивних Т лимфоцита може резултовати у активацији ових ћелија које потом улазе у програм диференцијације и развијају ефекторске функције. Активирани Т лимфоцити се могу даље развити у меморијске Т ћелије које су у стању да покрену бржи и јачи имунски одговор када следећи пут дођу у контакт са истим антигеном. Б ћелије у периферној крви су у највећем проценту наивне са површинским антигенским рецептором. Након што сусретну антиген, долази до њихове активације и диференцијације у меморијске Б лимфоците или плазма ћелије које секретују антитела (Paraskevas, 2009; Abbas et al., 2016).

У периферној крви учесталост лимфоцита специфичних за појединачни антиген је ниска. Стога се у експерименталном раду за *in vitro* стимулацију користе поликлонски активатори који активирају већи део лимфоцита, независно од специфичности лимфоцита према антигену. Најчешћи активатори су митогенски лектини, протеини који везују угљене хидрате гликопротеина експримираних на ћелијској мембрани лимфоцита. Најчешће коришћени митогенски лектини су фитохемаггулинин (енг. *phytohaemagglutinin*, РНА) и конкавалин А (енг. *concanavalin A*, con А) за индукцију пролиферације Т лимфоцита, митоген из корена винобојке (енг. *pokeweed mitogen*, PWM) који индукује пролиферацију Т и Б ћелија и липополисахариди (најчешће се користи LPS *E.coli*) који индукује пролиферацију Б ћелија и активацију моноцита. Такође, поликлонска активације Т ћелија може бити индукована антителима специфичним за CD3 или комбинацијом антитела на CD3 и CD28. Ефекат на имунску функцију МНТ се најчешће прати на основу промена у пролиферацији лимфоцита, карактеризацији профила секретованих цитокина и промена у генској експресији (Kleiveland, 2015). Познато је да бројни физиолошки фактори попут нутритивног или хормонског статуса, као и одговор на инфективне антигене средине или аутоантигене (а који не доводе до настанка болести) утичу на реактивност имунских ћелија здравих особа. Стога, састав и функцијски капацитет МНТ зависи од даваоца и његовог физиолошког статуса. Ове разлике у реактивности имунских ћелија здравих давалаца могу довести до великих интерексперименталних варијација какве не постоје ако се ради са ћелијским линијама или високоукрштеним сојевима експерименталних животиња. Међутим, иако рад са МНТ различитих давалаца повећава варијабилност резултата, само репродукцибилност резултата добијених са ћелијама различитих давалаца може обезбедити њихову општост (Carrick & Begg, 2008; Kleiveland, 2015).

При коришћењу МНТ као модел система за осликавање различитих *in vivo* стања треба бити обазрив зато што се МНТ изоловане из периферне крви разликују од оних присутних у ткивима. На пример, интраепителијални лимфоцити су преобладајуће CD8⁺ (90%) ћелије, док су лимфоцити у *lamina propria* претежно CD4⁺ ћелије које експримирају CD44^{hi}CD62L⁻ ефекторско-меморијски фенотип који указује на то да су ово антиген-презентујуће ћелије (Shinoda et al., 2012). Додатно, неке од популација имунских ћелија у интестиналној мукози нису уопште присутне у крви: Б1 ћелије, Т ћелије урођене убице (енг. *natural killer T*, NKT) и ИС. По примању инфламаторних сигнала, моноцити из крви ће мигрирати на место инфекције и диференцирати ка мијелоидним антиген-презентујућим ћелијама које представљају хетерогену популацију макрофага и дендритских ћелија. Сходно овој разлици у фенотипу ћелија присутних у периферној крви и *lamina propria* ГИТ, може се очекивати да ће МНТ из периферне крви одговарати другачије од МНТ из *lamina propria*. С обзиром на наведено, треба бити опрезан при екстраполацији резултата

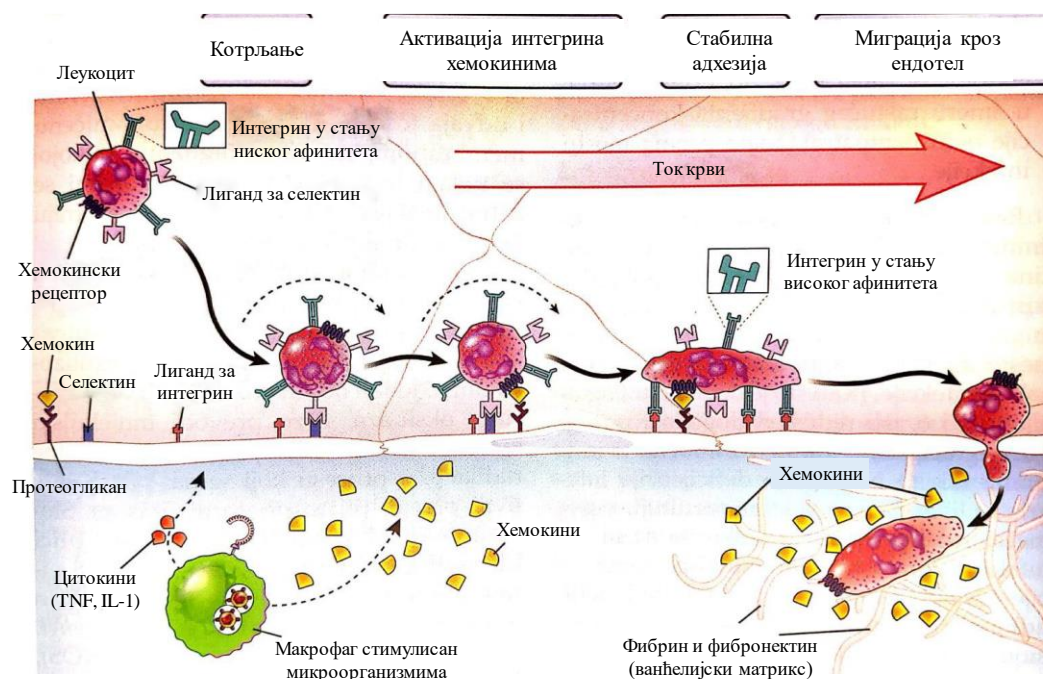
добијених *in vitro* експериментима са МНТ из периферне крви на имунски одговор присутан у ткивима *in vivo* (Paraskevas, 2009; Abbas et al., 2016).

1.2.2.2. Полиморфонуклеарне ћелије

Највећи проценат ПМТ изолованих из периферне крви чине неутрофили. Неутрофили као компонента урођеног имунског система чине прву линију одбране организма у случају инфекције, трауме, хемијског или физичког нарушавања равнотеже када њихов број у циркулацији може да порасте и до пет пута. Производња неутрофила у косној сржи стимулирана је цитокинима означеним као фактори стимулације колонија (енг. *colony-stimulating factors*, CSF) које луче бројни типови ћелија у одговору на инфекцију, а који делују на матичне ћелије хематопоезе тако што стимулишу пролиферацију и сазревање прекурсора неутрофила. Неутрофили стижу на место повреде/инфламације захваљујући хемоатрактантима попут протеина комплемента C5a, хемокина (IL-8), цитокина (TNF), леукотријена и продуката микроорганизама. На месту инфекције или повреде неутрофили фагоцитују (ингестирају) микроорганизме и убијају их. С обзиром да ове ћелије у ткивима живе само неколико часова и да прве одговарају на инфекцију или трауму, оне не обезбеђују продужену заштиту. Ту функцију надокнађују моноцити који као и неутрофили имају способност екстравазације како би дошли на место инфекције или повреде, али се на тим местима диферентују у макрофаге и ту преживљавају дуже време. Моноцити и макрофаги представљају два стадијума исте ћелијске линије која се често означава као систем мононуклеарних фагоцита (Carrick & Begg, 2008; Kleiveland, 2015).

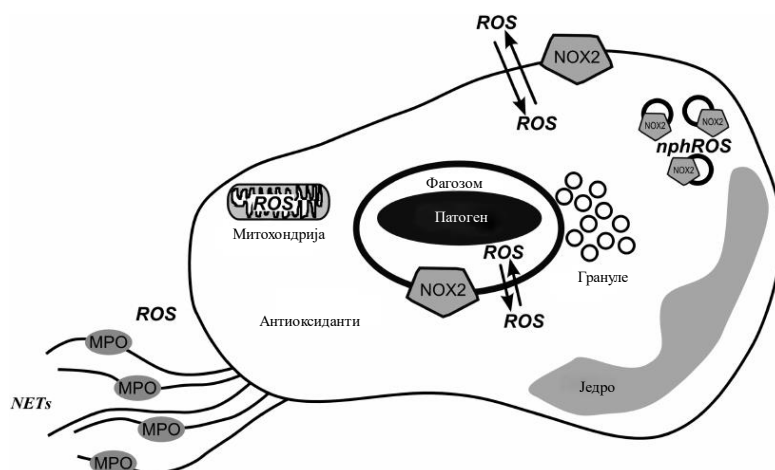
Неутрофили и моноцити мигрирају на екстраваскуларна места (места инфекције/оштећења ткива) везивањем за адхезивне молекуле ендотела крвних судова, у одговору на хемоатрактанте које продукују оштећене ћелије и ткива (слика 1.15). Миграција леукоцита из крви у ткива је процес који се одвија у више фаза, а почиње почетним slabим везивањем за ендотелне ћелије, за којим следи чврста адхезија и наставља се трансмиграцијом кроз ендотел. Микроорганизме на месту инфекције препознају резидентни макрофаги и друге ћелије које одговарају продукцијом цитокина. Два међу њима, TNF и IL-1 делују на ендотелне ћелије и индукују експресију адхезивних молекула из фамилије селектина (Е-селектин). Други стимулуси, попут тромбина, доводе до транслокације Р-селектина на површину ендотела. Моноцити и неутрофили се за селектине везују мембранским олигосахаридима специфичним за селектине. Међутим, ове везе су слабе и под утицајем сила смицања у крвотоку бивају раскинуте, али се и наизменично поново успостављају, тако да је овај процес означен као котрљање леукоцита низ површину ендотела. Леукоцити експримирају још једну групу молекула, означених као интегрини, молекули који интегришу сигнале из спољашње средине у промене цитоскелета. Интегрини леукоцита, антиген повезан са функцијом лимфоцита (енг. *lymphocyte function-associated antigen 1*, LFA-1) и веома касни антиген 4 (енг. *very late antigen 4*, VLA-4), налазе се у стању ниског афинитета на неактивираним леукоцитима. На месту инфекције макрофаги и ендотелне ћелије продукују хемокине који се везују за гликопротеине на луминалној површини ендотелних ћелија и тако бивају приказани у великој концентрацији леукоцитима који се котрљају по ендотелу. Под утицајем хемокина, расте афинитет интегрини за његове лиганде на ендотелу, ICAM-1 и адхезиони протеин васкуларних ћелија 1 (енг. *vascular cell adhesion protein 1*, VCAM-1). Најјачи стимулатори експресије ICAM-1 и VCAM-1 су проинфламаторни цитокини TNF и IL-1. Када се интегрини чврсто вежу за своје лиганде, котрљање леукоцита престаје, долази до реорганизације цитоскелета неутрофила и моноцита и ћелије крећу да се шире по површини ендотела. Хемокини такође стимулишу и миграторну способност леукоцита, као и неки продукти бактерија и компоненте система комплемента. Као збирни резултат свих тих сигнала, леукоцити почињу да мигрирају

између ендотелних ћелија кроз зид крвног суда у смеру растуће концентрације ових хемоатрактаната (Taylor & Weinberg, 2009; Abbas et al., 2016).



Слика 1.15. Редослед догађаја у миграцији леукоцита из крви на место инфекције. Под утицајем микроорганизама макрофаги, дендритске и друге ћелије, стварају цитокине који активирају ћелије ендотела крвних судова да експримирају селектине и лиганде за интегрине и секретују хемокине. Селектини омогућавају слабо везивање и котрљање неутрофила по ендотелу, интегрини обезбеђују чврсту адхезију неутрофила, а хемокини активирају неутрофиле и стимулишу њихову миграцију кроз ендотел. Преузето и измењено према Abbas et al., 2016.

Када дођу на место инфекције, неутрофили и макрофаги ингестирају микроорганизме и разграђују их у унутарћелијским везикулама. Процес фагоцитозе почиње везивањем рецептора за DAMP на мембрани патогена или препознавањем микроорганизма опсонизованог антителима или фрагментима комплемента. Везивање за микроорганизам праћено је екстензијом ћелијске мембране која обухвата микроорганизам у везикулу означену као фагозом, која се затим спаја са лизозомом и настаје фаголизомом. У исто време фагоцити добијају сигнал да започну продукцију ROS у процесу означеном као респираторни прасак (слика 1.16) (Lavoie & Levy, 2017). Ензим фагоцитна оксидаза преводи молекулски кисеоник у супероксидни анјон радикал ($O_2^{\cdot-}$). У исто време, ензим iNOS катализује конверзију L-аргинина у NO који је такође микробицидна супстанца. Ензими лизозомалне протеазе разлажу протеине микроорганизма. Главна одлика свих ових ензима је да делују унутар фаголизозома и не оштећују саме фагоците док убијају микроорганизме. Поред унутарћелијског убијања, неутрофили могу да опусте и грануле са микробицидним садржајем у ванћелијски простор. Такође, након што умру у одговору на патогене, неутрофили избацују свој једарни садржај и формирају хроматинске мреже, означене као неутрофилне ванћелијске замке (енг. *neutrophil extracellular traps*, NETs) које садрже антимикробне супстанце нормално присутне у гранулама неутрофила. NETs хватају микроорганизме и убијају их (Taylor & Weinberg, 2009; Dupré-Crochet et al., 2013; Abbas et al., 2016).



Слика 1.16. Места продукције реактивних врста кисеоника (ROS). Шематски приказ фагоцита који синтетишу ROS у три ћелијска компартмана: ћелијској мембрани, фагозому и нефагозомалним унутарћелијским органелма (nphROS). Најважнији извор ROS је фагоцитна NADPH оксидаза (NOX2). Одређене ROS, поготово H_2O_2 , дифундују кроз мембрану. Цитоплазма садржи различите антиоксидансе. Формирање NETs захтева ROS, а у NETs се налази и мијелопероксидаза (MPO). Преузето и измењено према Dupré-Crochet et al., 2013.

ЦИЉЕВИ

2. Циљеви

Због способности реверзибилног везивања кисеоника захваљујући којој га допрема до ћелија и ткива, хемоглобин, високо конзервисан протеин кичмењака, укључен је у процесе који се налазе у основи аеробног начина живота на планети Земљи. Примарна улога овог протеина огледа се у одржавању ћелијске хомеостазе, подржавањем њених енергетских захтева. Међутим, захваљујући изучавању хемоглобина већ пуних 175 година, данас се зна да овај протеин остварује и важне улоге у ћелијској сигнализацији и модулацији инфламаторног одговора. Хемоглобин ове функције остварује директно, везујући молекуле гасова (NO, CO и CO₂), или индиректно, делујући као њихов извор. Највећи број својих функција хемоглобин остварује док се налази унутар еритроцита (Quaye, 2015; Coates & Decker, 2016; Olson, 2020). Међутим, једном када се нађе у ванћелијској средини, хемоглобин постаје потенцијално штетан молекул који може да има негативне ефекте на преживљавање ћелија. Ванћелијски хемоглобин је редокс осетљив молекул са високим потенцијалом у стварању реактивних кисеоничних врста, тј. прооксиданаса, штетних за ћелијски интегритет (Igarashi & Sun, 2006; Jeney et al., 2013; Schaer et al., 2013). Додатно, хемоглобин и његови деградациони производи, дефинишу се и као „алармини“ који представљају индикаторе различитих патолошких стања у организму (Alam et al., 2017; Schechter et al., 2008). Хемоглобин може да интерагује са микробним лигандима (нпр. LPS и LTA), али и рецепторима (TLR) и да на тај начин модулише имунски одговор домаћина на патогене (Lee & Ding, 2013; Wegiel et al., 2015; Jeney, 2018). Све је више података који говоре о улози ванћелијског хемоглобина у етиологији и патофизиологији бројних болести, попут пароксизмалне ноћне хемоглобинурије, анемије српастих еритроцита, Алцхајмерове болести, мултипле склерозе, церебралне интравентрикуларне хеморагије, прееклампсије и других (Pandav et al., 2004; Rifkind et al., 2015; Rother et al., 2015; Bamm et al., 2017).

Услед интраваскуларне хемолизе, лизе еритроцита као последице физичке трауме, дејства микроорганизама или различитих патолошких стања, хемоглобин бива отпуштен директно у циркулацију. Хомеостатски механизми који учествују у уклањању ванћелијског хемоглобина (хаптоглобин, хемопексин, албумин и други) могу бити недовољни у условима екстремне хемолизе, при чему хемоглобин и његови деградациони производи могу директно или индиректно утицати на ћелије у циркулацији. Поред ћелија имунског система које учествују у његовом уклањању, посебно је занимљив утицај ванћелијског хемоглобина на ММЋ које су последњих неколико деценија стекле пажњу научне јавности због свог регенеративног потенцијала. Регенеративни потенцијал ММЋ заснива се на способности самообнове, као и на миграторном и диференцијационом потенцијалу (Gronthos et al., 2000; Dominici et al., 2006; Kern et al., 2006). ММЋ учествују у одржавању хомеостазе у организму захваљујући интеракцији са различитим компонентама микросредине у којој се налазе, укључујући и ћелије имунског система. Додатно, познато је да ММЋ одговарају на инфламаторне сигнале микросредине, као и да саме делују као имуномодулатори (Kukolj et al., 2018; Obradovic et al., 2019; Weiss & Dahlke, 2019).

Стога је предмет истраживања ове докторске дисертације испитивање утицаја ванћелијског хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија. Литературни подаци који говоре о утицају хемоглобина на мезенхимске ћелије су оскудни, често противречни и углавном усмерени на испитивање утицаја хемоглобина бескичмењака, који се по структури знатно разликују од хемоглобина кичмењака (Rousselot et al., 2006; Dutheil et al., 2014; Zal & Rousselot, 2014; Le Pape et al., 2015; Le Pape et al., 2017a; Le Pape et al., 2017b). У изради ове докторске дисертације коришћени су свињски и говеђи хемоглобин, као лако доступни хемоглобини кичмењака који показују висок степен хомологије са хуманим хемоглобином (Wang et al., 2017a; Yang et al., 2019). Ксеногени хемоглобини, осим што се користе као модели за испитивање утицаја ванћелијског

хемоглобина на функцијска својства ћелија, представљају битан предмет биотехнолошких истраживања. У овим истраживањима хемоглобин се изучава са циљем његове употребе као полазног материјала у технолошким поступцима за добијање потенцијалних замена за крв (Alayash, 1999; Chen et al., 2009). Такође, како сваки молекул хемоглобина сисара садржи четири атома гвожђа, ксеногени хемоглобини такође представљају и потенцијалну основу препарата за превенцију или лечење анемија узрокованих дефицитом гвожђа (González-Rosendo et al., 2010; Soto Méndez & Caballero Pérez, 2011; Hoppe et al., 2013).

За испитивање утицаја ванћелијског хемоглобина на ћелије са којима може доћи у контакт при интраваскуларној хемолизи, као адекватан модел систем одабрани су леукоцити (МНЋ и ПМЋ) и ММЋ изоловане из периферне крви човека (ПК-ММЋ). Иако су ММЋ изоловане из периферне крви релативно ретке (мање од 2 ћелије на 1000000 МНЋ) и претпоставља се да се заправо ради о ММЋ пореклом из косне сржи које кроз крв мигрирају на места регенерације (Valenti et al., 2008), предност коришћења ових ћелија је у мање инвазивном процесу изолације у поређењу са процесом изолације из других извора ММЋ, посебно косне сржи. С друге стране, када се успешно изолују, њихова пропација је дуга и стабилна. Како МНЋ и ММЋ представљају хетерогене популације ћелија, чије карактеристике зависе од даваоца, а показано је да код ММЋ (као примарних ћелија) са повећањем броја пасажа долази и до промене у генској експресији и ћелијској пролиферацији, утицај хемоглобина на функцијске карактеристике испитан је и на четири ћелијске линије које представљају униформније модел системе у односу на примарне ћелије: АТDC5, МС3Т3-Е1, 3Т3-Л1 и С2С12 (He et al., 2007; McLeod & Mauck, 2017; Arnhold et al., 2019). Ћелијска линија АТDC5 изведена од мишићних ћелија тератокарцинома окарактерисана је као хондрогена ћелијска линија која пролази кроз секвенцијалне процесе аналогне диференцијацији хондроцита. Стога се ова ћелијска линија сматра значајним *in vitro* моделом за проучавање фактора који утичу на ћелије у току процеса хондрогенезе (Yao & Wang, 2013). Остеобластна ћелијска линија МС3Т3-Е1 пореклом из лобање С57BL/6 мишева коришћена је за испитивање хемоглобина на остеогену диференцијацију. Ове ћелије имају могућност диференцијације у остеобласте и остеоците и показано је да формирају калцификовано ткиво костију *in vitro* (Yazid et al., 2010). Ћелијска линија 3Т3-Л1 са потенцијалом за диференцијацију у адипоците је широко примењивана за проучавање адипогенезе и биохемијских карактеристика ћелија масног ткива. Стога је на овој ћелијској линији испитан утицај хемоглобина на процес адипогене диференцијације (Zebisch et al., 2012). За експерименте испитивања утицаја хемоглобина на миогену диференцијацију, коришћена је С2С12 ћелијска линија имортализованих мишићних миобласта. Ове ћелије се брзо и лако умножавају у култури и изузетно су корисне за проучавање различитих аспеката миогенезе (Burattini et al., 2004).

У складу са описаним предметом истраживања, постављени су главни циљеви ове докторске дисертације:

- 1. Изолација, пречишћавање и физичко-хемијска карактеризација свињског и говеђег хемоглобина;**
- 2. Испитивање цитотоксичности свињског и говеђег хемоглобина и потврда њихове биолошке активности;**
- 3. Испитивање утицаја свињског и говеђег хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија.**

У оквиру главних циљева дефинисани су непосредни задаци:

- 1. Изолација и физичко-хемијска карактеризација свињског и говеђег хемоглобина:**
 - Изолација хемоглобина градуалном хипотоничном хемолизом и пречишћавање хемоглобина тангенцијалном ултрафилтрацијом;

- Испитивање садржаја протеина у узорцима хемоглобина електрофоретским техникама;
- Испитивање садржаја липида у узорцима хемоглобина хроматографским техникама;
- Анализа величине колоидних честица у узорцима хемоглобина фотон корелационом спектроскопијом;
- Анализа UV-Vis апсорпционих спектра хемоглобина;
- Одређивање способности хемоглобина да редукује АВТS радикал.

2. Испитивање цитотоксичности свињског и говеђег хемоглобина и потврда њихове биолошке активности анализом:

- Садржаја хемоглобина у ћелијским културама МНЋ и ПК-ММЋ;
- Цитотоксичности хемоглобина на моделу МНЋ;
- Утицаја хемоглобина на пролиферацију/диференцијацију одређених матичних ћелија хематопоезе периферне крви човека;
- Утицаја хемоглобина на адхезивност леукоцита периферне крви човека;
- Утицаја хемоглобина на продукцију ROS у леукоцитима периферне крви човека.

3. Испитивање утицаја свињског и говеђег хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија анализом:

- *Утицаја хемоглобина на раст мезенхимских ћелија праћењем ефекта на:*
 - Вијабилност ПК-ММЋ и мишићних мезенхимских ћелијских линија АТDC5, МС3Т3-Е1 3Т3-Л1 и С2С12;
 - Ћелијски циклус и апоптозу ПК-ММЋ;
 - Клоногени потенцијал ПК-ММЋ;
- *Утицаја хемоглобина на миграторни потенцијал мезенхимских ћелија ПК-ММЋ, АТDC5, МС3Т3-Е1, 3Т3-Л1 и С2С12 ћелија;*
- *Утицаја хемоглобина на диференцијациони потенцијал мезенхимских ћелија хистохемијским техникама уз праћење генске експресије специфичних маркера:*
 - Хондрогене диференцијације ПК-ММЋ и АТDC5 ћелија уз анализу експресије гена за SOX9, колаген тип I, II и XI;
 - Остеогене диференцијације ПК-ММЋ и МС3Т3-Е1 ћелија уз анализу експресије гена за RUNX2, алкалну фосфатазу (енг. *alkaline phosphatase*, ALP), остеокалцин и колаген тип I;
 - Адипогене диференцијације ПК-ММЋ и 3Т3-Л1 ћелија уз анализу експресија гена за рецептор γ који се активира уз пролиферацију пероксизома (енг. *peroxisome proliferator-activated receptor γ* , PPAR- γ), адипонектин и липопротеин липазу;
 - Миогене диференцијације ПК-ММЋ и С2С12 ћелија уз анализу експресија гена за миогенин и мишићну креатин киназу (енг. *muscle creatine kinase*, МСК);
- *Утицаја хемоглобина на имуномодулаторни потенцијал ПК-ММЋ праћењем ефекта на:*
 - Генску експресију специфичних имуномодулаторних гена ММЋ: *HLA-A, HLA-G, HLA-DRA, TGFB1, IDO1, PTGS2, IL6, HMOX1*;
 - Модулаторни ефекат ПК-ММЋ на ћелијски циклус и апоптозу МНЋ,
 - Модулаторни ефекат ПК-ММЋ на пролиферацију МНЋ.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

3. Материјал и методи

3.1. Комерцијални реагенси

Реагенс	Произвођач
1. Реагенси за изолацију и култивацију ћелија	
1.1. Медијуми за култивацију ћелија	
DMEM (енг. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Sigma-Aldrich, САД
RPMI-1640	Sigma-Aldrich, САД
IMDM (енг. <i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>)	Sigma-Aldrich, САД
MethoCult® GF M3434	Stem Cell Technologies, Канада
1.2. Серуми	
Фетални телећи серум (енг. <i>fetal calf serum</i> , FCS)	РАА Laboratories, Аустрија
Коњски серум (енг. <i>horse serum</i> , HS)	РАА Laboratories, Аустрија
1.3. Остале компоненте медијума за ћелијске културе	
Глутамин	AppliChem, Немачка
Пеницилин (10000 U/mL)/стрептомицин (10 mg/mL)	Thermo Fisher Scientific, САД
Дексаметазон	AppliChem, Немачка
Хидрокортизон	Галеника, Србија
Аскорбинска киселина	Sigma-Aldrich, САД
β-глицерофосфат	AppliChem, Немачка
Изобутил-метилксантин (енг. <i>isobutyl-methylxanthine</i> , IBMX)	AppliChem, Немачка
Инсулин	Sigma-Aldrich, САД
TGF-β	R&D Systems, САД
1.4. Пуфери и ензими	
Изотонични фосфатни пуфер (енг. <i>phosphate buffered saline</i> , PBS)	Capricorn-Scientific, Немачка
HEPES	Thermo Fisher Scientific, САД
Трипсин (2,5% трипсин, 10 mM етилен диамин тетра сирћетна киселина (EDTA))	Serva, Немачка

1.5. Остали реагенси

Густински градијент за раздвајање леукоцита <i>Lymphocyte separation medium</i> , ρ 1,077 g/ml	Capricorn-Scientific, Немачка
Фитохемаглутинин (енг. <i>phytohemagglutinin</i> , РНА)	Life Technologies, САД
Форбол миристат ацетат (енг. <i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i> , РМА)	Abcam, САД
Митомицин С	AppliChem, Немачка

2. Реагенси за визуелизацију ћелија и ћелијске активности**2.1. „Боје“**

Трипан плаво	Thermo Fisher Scientific, САД
Тирков раствор (енг. <i>Türk's solution</i>)	Superlab, Србија
Пропидијум јодид (енг. <i>propidium iodide</i> , PI)	Beckman Coulter, САД
Ноеchst 33258	Sigma-Aldrich, САД
МТТ (3-(4,5-диметил-тиазол-2ил)-2,5 дифенил-тетразолијум бромид)	Sigma-Aldrich, САД
NBT (<i>Nitro blue</i> тетразолијумова со)	Sigma-Aldrich, САД
Сафранин О	Merck Chemicals, Немачка
Oil Red О	Merck Chemicals, Немачка
Кристал виолет (енг. <i>crystal violet</i>)	Carlo Erba Reactifs, Француска
Ализарин црвено (енг. <i>alizarin red S</i>)	Riedel de Haen, Немачка
Карбокси-флуоресцеин диацетат сукцинимидил естар (енг. <i>carboxyfluorescein succinimidyl ester</i> , CFSE)	Affymetrix, Ebioscience, Велика Британија

2.2. Остали реагенси

5-бромо-4-хлоро-3-индолил фосфат, р-толуидин со (енг. <i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, p-toluidine salt</i> , BCIP)	Sigma-Aldrich, САД
Triton X-100	AppliChem, Немачка
РНКаза А (рибонуклеаза А)	Thermo Fisher Scientific, САД

3. Реагенси за анализу експресије гена	
TRIZoL	Thermo Fisher Scientific, САД
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA, комерцијални комплет	Fermentas, САД
PCR Master Mix	Fermentas, САД
Дестилована DEPC третирана вода (енг. <i>diethyl pyrocarbonate</i>)	Thermo Fisher Scientific, САД
Прајмери за PCR	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, САД
Агароза (температура гелирања (1,5%): 34,5°-37,5°C; ЕЕО (-mr): 0,09 – 0,13)	Lonza, САД
Пуфер за наношење узорка за агарозну ДНК гел електрофорезу (енг. <i>DNA gel loading dye</i> (6x))	Thermo Fisher Scientific, САД
Етидијум-бромид	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, САД
Маркер дужине ДНК ланаца Gene Ruler plus Prestained DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, САД
Хлороформ	VWR Chemicals, Француска
Метанол	Zorka, Србија

4. Реагенси за електрофорезу протеина	
Раствор мономера акриламида 30% Т, 2,7% С	Serva
Tris	Serva, Немачка
Натријум додецил сулфат (енг. <i>sodium dodecyl sulfate</i> , SDS)	AppliChem, Немачка
Амонијум персулфат	Serva, Немачка
Дитиотретитол	Serva, Немачка
Тетраметил етилен диамин (TEMED)	Serva, Немачка
Глицерол	Zorka, Србија
Бром фенол плаво	Serva, Немачка
Глицин	Serva, Немачка
Маркер молекулске масе протеина PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, САД
Coomassie Brilliant Blue R	Serva, Немачка

Метанол	Zorka, Србија
Сирћетна киселина	Zorka, Србија
Ampholine® pH range 3.5 - 10.0	Sigma Aldrich, Немачка
Фосфорна киселина	Sigma Aldrich, Немачка
Етилен диамин	Sigma Aldrich, Немачка
Трихлорсирћетна киселина	Sigma Aldrich, Немачка
Сулфосалицилна киселина	Sigma Aldrich, Немачка

5. Реагенси за анализу липида танкослојном и гасном хроматографијом

Хлороформ	VWR Chemicals, Француска
Метанол	Zorka, Србија
Бутиловани хидрокситолуен	Sigma Aldrich, Немачка
Хексан	Sigma Aldrich, Немачка
Петролетар	Zorka, Србија
Диетилетар	Zorka, Србија
Силика гел 60 GF 254	Sigma Aldrich, Немачка
Стандард полинезасићених масних киселина (PUFA-2 standard)	Supelco, Inc., Belleforte, САД

Остали реагенси

Физиолошки раствор (0,9% NaCl)	Хемофарм, Србија
2,2'-азино-бис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) (ABTS)	Roche Diagnostics GmbH, Немачка
NaH ₂ PO ₄	Merck, Немачка
Na ₂ HPO ₄	Sigma Aldrich, Немачка
KH ₂ PO ₄	Merck, Немачка
Na ₂ EDTA	AppliChem, Немачка
NH ₄ Cl	Pliva, Хрватска
NaHCO ₃	Merck, Немачка

3.2. Медијуми и пуфери за култивацију ћелија и анализу ћелијских функција

Као стандардни медијум за култивацију мезенхимских ћелија (СМ) коришћен је DMEM обогаћен 1% глутамином, 10% FCS, пеницилином (100 U/ml) и стрептомицином (100 µg/ml) и 1% HEPES пуфером.

Као стандардни медијум за култивацију леукоцита коришћен је RPMI-1640 медијум обогаћен 1% глутамином, 10% FCS, пеницилином (100 U/ml) и стрептомицином (100 µg/ml) и 1% HEPES пуфером.

Пуфер за лизирање еритроцита (pH 7,2-7,4), коришћен при изолацији леукоцита из периферне крви човека садржао је 155 mM NH₄Cl, 0,1 mM Na₂EDTA и 10 mM NaHCO₃.

Хипоосмотски (35 mM) фосфатни пуфер за изолацију хемоглобина градуалном хемоллизом свињских и говеђих еритроцита садржао је 1,14 mM NaH₂PO₄, 2,88 mM Na₂HPO₄ и 0,18% NaCl у дестилованој води.

Хипоосмотски ДНК екстракциони пуфер (pH 7,8) коришћен у протоколу за обележавање МНЋ пропиридијум-јодидом састојао се од 192 mL 0,2 M Na₂HPO₄ и 8 mL 0,1% Triton X-100 (v/v).

3.3. Материјал

3.3.1. Хемоглобин

Узорци свињског и говеђег хемоглобина коришћени у изради ове докторске дисертације изоловани су из еритроцита кланичне крви добијене у кланици ПКБ Имес у Падинској Скели. Крв је прикупљана у стерилне боце са претходно асептично додатим антикоагулансом (3,8% натријум-цитрат) и транспортована на амбијенталној температури до Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду. Из пуне крви издвојени су еритроцити из којих је хемоглобин изолован градуалном хипотоничном хемоллизом.

3.3.2. Мезенхимске ћелије

Примарне мезенхимске матичне ћелије периферне крви (ПК-ММЋ) изоловане су на Институту за медицинска истраживања по методологији описаној у раду Trivanović и сарадници (2013a). Ћелијска линија C2C12 мишјих миобласта набављена је од American Type Culture Collection (ATCC, САД). Мишја хондрогена ћелијска линија ATDC5, мишји преостеобласти MC3T3-E1 и мишји преадипоцити 3T3-L1 са потенцијалом за диференцијацију у адипоците добијени су љубазношћу др Carmelo Bernabeu (Центар за биолошка истраживања, Шпански национални истраживачки савет, Мадрид, Шпанија). Ћелије су култивисане у DMEM/10% FCS медијуму при стандардном условима који подразумевају гајење на 37°C у атмосфери са 5% CO₂ и релативном влажношћу 100%. Медијум је мењан на свака 2 дана. Након достизања конfluентности од 80-90%, ћелије су испиране раствором PBS и „одлепљиване“ 0,25% трипсином са у 1mM EDTA. Третман трипсином је трајао 5 min у инкубатору за ћелијске културе, на 37°C, након чега је дејство трипсина заустављено додавањем DMEM/10% FCS медијума. Суспензија ћелија прикупљена је серолошком пипетом и пренета у стерилну епрувету, а ћелије су затим исталожене центрифугирањем 10 min на 400xg, на 22°C. Након центрифугирања ћелијски талог ресуспендован је у свежем стандардном медијуму. Вијабилност ћелија одређена је на основу бојења 0,4% раствором трипан плавог након чега је концентрација ћелија одређена бројањем у хемцитометру (описано у поглављу 3.5.2.1.3). За потребе даљег умножавања, ћелије су засејаване у флашкове у броју од 4x10³ ћелија/cm². Експерименти са ПК-ММЋ рађени су са ћелијама чији број пасаже није прелазео десет.

3.3.3. Леукоцити периферне крви човека

За потребе испитивања утицаја свињског и говеђег хемоглобина на функцијске карактеристике леукоцита периферне крви, мононуклеарне ћелије (МНЋ) и полиморфонуклеарне ћелије (ПМЋ) изоловане су из јединица целе крви негативних на маркере инфективних болести који се могу пренети крвљу, а које су дали добровољни даваоци крви на Институту за трансфузиологију и хемобиологију Војномедицинске

академије у Београду. МНЋ и ПМЋ изоловане су из фракција крви обогачених леукоцитима и „осиромашених“ у садржају тромбоцита (енг. „*buffy coat*“) које представљају отпадни материјал и издвојене су након диференцијалног центрифугирања из јединица целе крви. Узорци коришћени за израду ове докторске дисертације су анонимизовани и сваки контакт који би могао да послужи за добијање информација о даваоцима крви је прекинут.

У циљу изоловања хуманих леукоцита, „*buffy coat*“ прво је разблажен раствором PBS у односу 1:1, а затим је суспензија ћелија наношена на густински сепарациони медијум и центрифугирана 30 min, при брзини од 400xg, на 22°C, без кочнице. Након центрифугирања, слој плазме са тромбоцитима је покупљен вакуумском аспирацијом и одбачен. МНЋ које су се налазиле у слоју интерфазног прстена, покупљене су аутоматском пипетом, а затим ресуспендоване у раствору PBS. Да би се уклонио сепарациони медијум ћелије су додатно испиране два пута центрифугирањем у трајању од 10 min при брзини 450xg, на 22°C. Како би се поред остатака густинског градијента отклонили и заостали тромбоцити, МНЋ су последњи, трећи пут, центрифугиране у RPMI-1640 медијуму при брзини 200xg, 5 min, на 22°C, а затим ресуспендоване у RPMI/10% FCS медијуму. Концентрација изолованих МНЋ одређивана је бројањем у хемоцитометру, након бојења Тирковим раствором.

ПМЋ су заједно са еритроцитима остајале у талогу након центрифугирања на густинском сепарационом медијуму. Из ове ћелијске суспензије ПМЋ су изоловане након лизе еритроцита. Еритроцити су лизирани тако што је на талог додавана шест пута већа запремина пуфера за лизу еритроцита, а затим је ћелијска суспензија мешана извртањем епрувета у трајању од 5 min. Лизат са интактним ПМЋ је центрифугиран 10 min при брзини 400xg на 22°C. Након центрифугирања супернатант је пажљиво одливан, а ПМЋ из талога су ресуспендоване у раствору PBS и додатно испиране два пута центрифугирањем. Након последњег испирања, ПМЋ су ресуспендоване у RPMI/10% FCS медијуму и концентрација им је одређивана бројањем у хемоцитометру, након бојења Тирковим раствором.

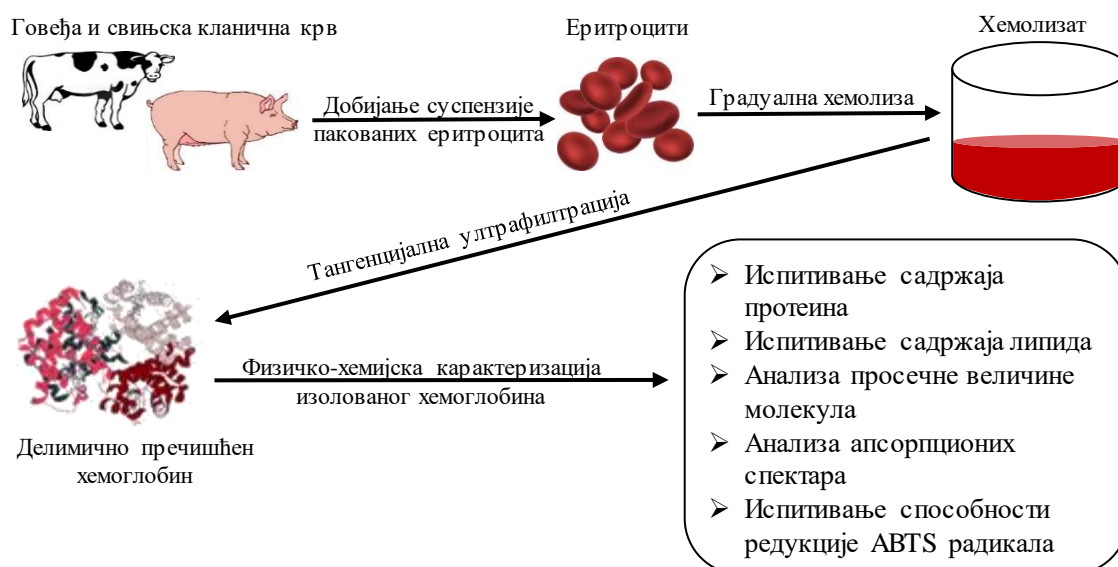
3.4. Експериментални дизајн

3.4.1. Изолација, пречишћавање и физичко-хемијска карактеризација свињског и говеђег хемоглобина

Свињски и говеђи хемоглобин изоловани су из суспензије пакованих еритроцита кланичне крви градуалном хипотичном хемолизом (слика 3.1). Добијени хемолизати делимично су пречишћени процесом тангенцијалне ултрафилтрације. Степен пречишћености узорака хемоглобина анализиран је:

- 1) Одређивањем садржаја протеина:
 - електрофорезом у полиакриламидном гелу са додатком натријум додецил сулфата (енг. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE*),
 - Изоелектричним фокусирањем;
- и
- 2) Одређивањем садржаја укупних липида:
 - Једнодимензионалном хроматографијом на танком слоју силика гела,
 - Анализом масних киселина гасно-течном хроматографијом и
 - Одређивањем количине укупног фосфора методом Vis спектрофотометрије.

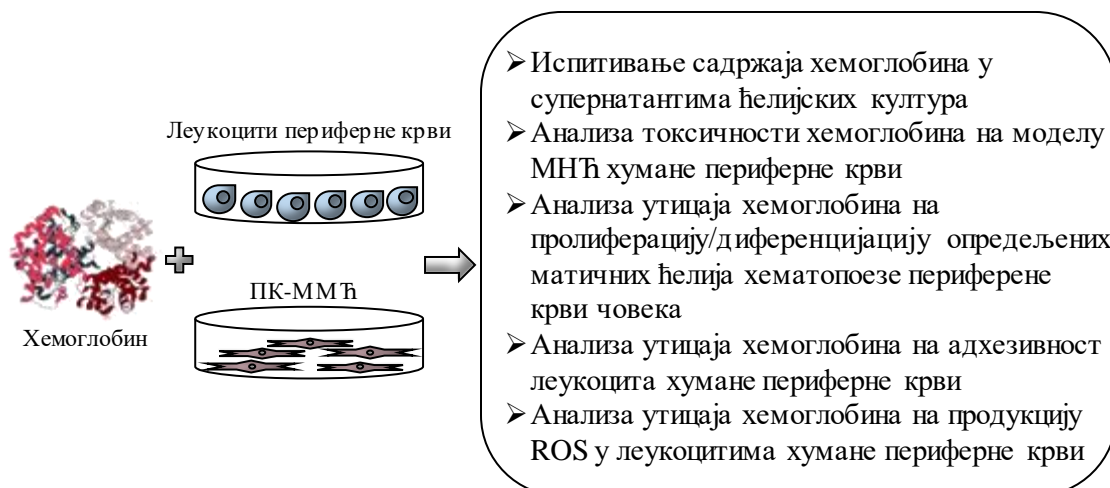
Након анализе пречишћености узорака свињског и говеђег хемоглобина, фотон корелационом спектроскопијом одређена је величина молекула у узорцима, а UV-Vis спектроскопијом анализирани су апсорпциони спектри. Способност хемоглобина да редукује ABTS радикал, испитана је применом ABTS теста.



Слика 3.1. Шематски приказ протокола за изолацију, пречишћавање и физичко-хемијску карактеризацију свињског и говеђег хемоглобина.

3.4.2. Испитивање цитотоксичности свињског и говеђег хемоглобина и потврда њихове биолошке активности

Промена садржаја делимично пречишћеног и физичко-хемијски окарактерисаног свињског и говеђег хемоглобина у ћелијским културама, испитана је на хуманим МНЋ и ПК-ММЋ (слика 3.2). Након култивације ћелија са хемоглобином, у супернатантима је мерена апсорбанца на 415 nm или 540 nm и концентрација хемоглобина изражавана као проценат од почетне концентрације.



Слика 3.2. Шематски приказ протокола за проверу цитотоксичности и потврду биолошке активности свињског и говеђег хемоглобина.

Цитотоксичност свињског и говеђег хемоглобина испитана је на моделу МНЋ периферне крви човека МТТ тестом и бројањем ћелија у трипан плавом. Ћелије су 5 дана инкубирани у RPMI/10% FCS медијуму са различитим концентрацијама хемоглобина (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 и 16 μM). Утицај 0,1, 1 и 10 μM свињског и говеђег хемоглобина на пролиферацију/диференцијацију одређених матичних ћелија хематопоезе периферне

крви човека испитан је CFC (енг. *colony forming cells*) тестом. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на адхезивност леукоцита периферне крви човека (МНЋ и ПМЋ) анализиран је тестом (Oez et al., 1990) који су прилагодили Vlaški и сарадници (2004). Тест је извођен на два начина, са и без пре-адхезије, а хемоглобин је додаван у концентрацијама од 0,1, 1 и 10 μM . Утицај свињског и говеђег хемоглобина на продукцију ROS у леукоцитима периферне крви човека анализиран је NBT тестом (Vlaški et al., 2004).

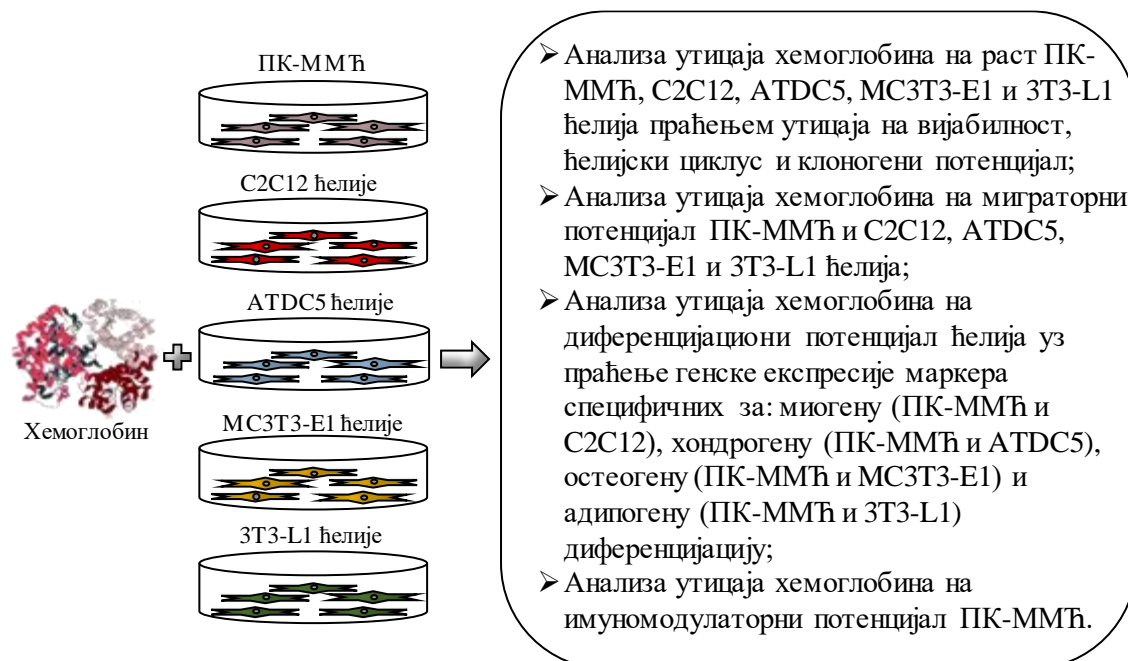
3.4.3. Испитивање утицаја свињског и говеђег хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија

Утицај свињског и говеђег хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија процењен је на основу њиховог ефекта на раст, способност миграције и диференцијације примарних хуманих мезенхимских матичних ћелија (ПК-ММЋ) и мишјих ћелијских линија (ATDC5, MC3T3-E1, 3T3-L1 и C2C12) (слика 3.3).

МТТ тестом и применом Hoechst ДНК обележивача испитан је ефекат на вијабилност и пролиферацију мезенхимских ћелија. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на ћелијски циклус анализиран је бојењем пропидијум јодидом, а утицај на клоногени потенцијал ПК-ММЋ тестом формирања колонија фибробласта (енг. *colony-forming units fibroblasts*, CFU-F). Утицај хемоглобина на миграторни потенцијал мезенхимских ћелија испитан је применом „Scratch“ теста.

Ефекат хемоглобина на способност ПК-ММЋ и ATDC5 да се диференцирају у правцу хондрогене лозе, култивацијом у специфичном хондрогеном диференцијационом медијуму, испитан је бојењем сафранином О и анализом експресије гена маркера хондрогене диференцијације (гени за SOX9, колаген тип I, II и XI) ланчаном реакцијом полимеразе којој претходни реверзна транскрипција (енг. *reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR) методом. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на способност ПК-ММЋ и MC3T3-E1 да се у присуству различитих остеогених диференцијационих медијума диференцирају у правцу остеогеног ткива, анализиран је праћењем активности ALP ензима бојењем NBT/BCIP и минерализације бојењем ализарин црвеним. RT-PCR методом анализиран је утицај хемоглобина на експресију маркера остеогене диференцијације (гени за RUNX2, ALP, остеокалцин и колаген тип I). Способност адипогене диференцијације ПК-ММЋ и 3T3-L1 ћелија у присуству одговарајућих адипогених медијума потврђена је детекцијом липидних тела oil red бојењем, а утицај свињског и говеђег хемоглобина на способност диференцијације ка масном ткиву анализиран је праћењем промене у експресији гена за маркере адипогенезе PPAR- γ , адипонектин и липопротеин липазу. Утицај хемоглобина на потенцијал ПК-ММЋ и C2C12 да се, у присуству миогеног диференцијационог медијума, диференцирају у правцу миогене лозе испитан је бојењем кристал виолет бојом, идентификацијом миотуба светлосном микроскопијом и морфометријском анализом формираних миотуба, а затим потврђен праћењем експресије гена за маркере миогене диференцијације (миогенин и MCK) применом RT-PCR метода.

Такође, у оквиру овог циља, испитан је и утицај свињског и говеђег хемоглобина на имуномодулаторни потенцијал ПК-ММЋ праћењем ефекта ПК-ММЋ на пролиферацију МНЋ CFSE тестом и анализом ефекта ПК-ММЋ на ћелијски циклус и апоптозу МНЋ бојењем пропидијум јодидом. Додатно, испитан је утицај хемоглобина на експресију специфичних имуномодулаторних гена ММЋ: *HLA-A*, *HLA-G*, *HLA-DRA*, *TGFB1*, *IDO1*, *PTGS2*, *IL6*, *HMOX1*.



Слика 3.3. Шематски приказ протокола за испитивање утицаја свињског и говеђег хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија.

3.5. Методи

3.5.1. Изолација и карактеризација хемоглобина

3.5.1.1. Добијање суспензије пакованих еритроцита

Еритроцити су из свињске и говеђе кланичне крви исталожени центрифугирањем на 1800xg у току 20 min. Након центрифугирања крвна плазма и леукоцити уклоњени су вакуумском аспирацијом, а да би се уклонили протеини плазме еритроцити су ресуспендовани у раствору PBS и испирани два пута центрифугирањем на 1800xg у току 15 min. Суспензија пакованих еритроцита добијена је мешањем раствора PBS и талога испраних еритроцита до вредности хематокрита од 60%.

3.5.1.2. Изолација и делимично пречишћавање хемоглобина

Свињски и говеђи хемоглобин изолован је градуалном хемоллизом описаном у раду Kostić и сарадника (2014). Паковани еритроцити (припремљени на начин описан у одељку 3.5.1.1.) додати су у запремини од 100 mL у стаклену чашу запремине 1 L. Чаша је постављена на хоризонталну ротациону мешалицу (Yellow line OS 5 basic, Ika Werbe GmbH & Co, Немачка), са брзином ротације од 320 обртаја/min, довољном за хомогенизовање суспензије еритроцита. Хипотонични, 35 mM натријум-фосфатни пуфер за хемолизу увођен је у чашу помоћу перисталтичке пумпе (Инфузиона пумпа, IP610, Биомедицина, Србија) протоком од 300 mL/h током 27 min. Постепено снижавање јонске јачине пуфера, довело је до постепеног ослобађања хемоглобина из еритроцита у околни раствор у реакционој чаши. Након градуалне хемоллизе, мембране лизираних еритроцита исталожене су центрифугирањем, на 4°C, брзином од 3200xg, у трајању од 40 min. Супернатанти су даље пречишћени тангенцијалном ултрафилтрацијом кроз филтере величине пора 0,2 μm и 100 kDa (Viva Flow®50, Sartorius AG, Немачка). Концентрација хемоглобина у супернатанту одређена је цијанметхемоглобинском методом, односно мерењем A_{540} хемолизата, по формули (Zijlstra, 1997) (једначина 1):

$$c \left(\frac{g}{L} \right) = A540 \times 1.465 \times F \quad (1)$$

где је $A540$ апсорбанца цијанметхемоглобина на 540 nm, а F фактор разблажења.

Након изолације и делимичног пречишћавања, узорци хемоглобина су аликвотирани и замрзнути на -20°C . Непосредно пре почетка сваког експеримента са ћелијама одмрзавани су нови аликвоти хемоглобина, којима су поново одређени концентрација и апсорпциони спектри. Експерименти на ћелијским културама завршени су у периоду од две године након изоловања хемоглобина, с обзиром да смо показали да у овом периоду хемоглобин складиштен на описани начин остаје у форми нативног протеина (неразграђен и неагрегиран $\alpha 2\beta 2$ - глобински тетрамер) (Drvenica et al., 2019).

3.5.1.3. Испитивање садржаја протеина у узорцима хемоглобина

3.5.1.3.1. Електрофореза протеина у полиакриламидном гелу са додатком натријум додецил сулфата

Протеински садржај у делимично пречишћеним растворима свињског и говеђег хемоглобина, анализиран је дисконтинуираном SDS-PAGE у редукујућим условима (Laemmli, 1970). Електрофореза је рађена на SE 260 Mighty Small II Vertical Slab Electrophoresis Unit (GE HealthCare LifeScience, САД) апарату за вертикалну SDS-PAGE са системом за хлађење. Узорци су раздвајани помоћу два гела: гел за узорковање (4% акриламид, 0,063 М Tris рН 6,8, 0,1% SDS, 0,1% амонијум персулфат, 0,04% TEMED) и гел за раздвајање (10% акриламид, 0,375 М Tris рН 8,8, 0,1% SDS, 0,1% амонијум персулфат, 0,1% TEMED). Гелови су били дебљине 1 mm. Пре nanoшења на гел, узорци раствора хемоглобина мешани су у једнаком запреминском односу са редукујућим пуфером за узорке (0,125 М Tris рН 8,8, 4% SDS, 20% глицерол, 0,2 М дитиортреитол, 0,02% бром фенол плаво), кувани 5 min у воденом купатилу, нагло охлађени водом и центрифугирани 2 min на 3000xg. На гел су nanoшени супернатанти који су садржали по 25 μg хемоглобина. Поред узорака, на гел су nanoшени и протеински маркери стандардних молекулских маса (PageRuler Prestained Protein Ladder). За електрофоретско раздвајање коришћен је 0,025 М Tris, 0,192 М глицин, 0,1% SDS пуфер. Електрофоретско раздвајање вршено је при константној јачини струје од 10 mA по гелу, уз непрестано хлађење. Протеинске фракције бојене су 0,12% Coomassie Brilliant Blue бојом раствореном у смеси 40% метанола и 7% сирћетне киселине, а вишак боје је уклоњен истим метанол-сирћетним раствором. Релативни удео (%) електрофоретских фракција и њихове молекулске масе одређивани су денситометријском анализом електрофореграма, коришћењем ImageMaster TotalLab TL120 програма (GE HealthCare Life Science, САД).

3.5.1.3.2. Изоелектрично фокусирање

У циљу анализе протеинског садржаја делимично пречишћених раствора свињског и говеђег хемоглобина, примењен је и метод изоелектричног фокусирања (LKB 2117 Multiphor II, LKB Instruments Ltd, Велика Британија) на 7,5% полиакриламидном гелу са 3% раствором амфолита на рН градијенту од 3,5 до 10 (Drvenica et al., 2019). Као катодни и анодни пуфери су коришћени етилен диамин и фосфорна киселина, а раздвајање је вршено при јачини електричног поља од 20 W и напону од 1500 V. Након електрофоретског раздвајања, протеини су преципитирани (фиксирани у гел) раствором 5% сирћетне киселине и 5% сулфосалицилне киселине, а затим бојени и квантификовани на начин описан у одељку 3.5.1.3.1.

3.5.1.4. Испитивање садржаја липида у узорцима хемоглобина

3.5.1.4.1. Екстракција укупних липида

Како би се одредио садржај укупних липида у узорцима свињског и говеђег хемоглобина, у 0,5 mL узорка додавано је 4,5 mL меше органских растварача хлороформ-метанол помешаних у односу 2:1 (v/v). Када су липиди изоловани за потребе анализе масних киселина гасном хроматографијом у мешу растварача је додаван антиоксиданс бутиловани хидрокситолуен. Смеша је вортексована до формирања емулзије, остављена 3 h на 4°C, и центрифугирана на 2500xg, 15 min. Издвојен доњи слој липида прикупљен је у нове епрувете и остављан преко ноћи на -20°C. Центрифугирање је поновљено сутрадан, а затим је липидни екстракт пропуштен кроз слој натријум-сулфата и упарен до сува. Суви пречишћен екстракт растворен је у 0,3 mL меше хлороформ-метанол (2:1 v/v) и коришћен за хроматографско раздвајање липида.

3.5.1.4.2. Одређивање фракција укупних липида

Укупни липиди су радвојени једнодимензионалном хроматографијом на танком слоју силика гела (енг. *thin-layer chromatography*, TLC) (Gloster & Fletcher, 1966). Гел је припремљен мешањем 70 g силика гела 60 GF 254 и 158 mL дестиловане воде, а затим је развучен на стаклене плоче површине 20x20 cm и дебљине 0,5 mm. Гел је остављен да се осуши 24 h на собној температури, а непосредно пре почетка анализе активиран је загревањем 110°C у трајању од 45 min. На активiranу плочу наношено је 0,3 mL липидног екстракта. Као мобилна фаза за раздвајање укупних липида на неутралне липиде и фосфолипиде, коришћена је меша растварача петролетар-диетилетар-сирћетна киселина (87:12:1, v/v/v). Радвојене фракције липида су после 45 min бојене 24 h парама јода и након тога скениране.

3.5.1.4.3. Метилација масних киселина

Естерификација масних киселина рађена је по модификованој методи трансестерификације описаној у раду Christopherson и Glass (1969). Процес естерификације започет је додатком 1,5 mL 3M HCl у метанолу у 100 µL узорка свињског и говеђег хемоглобина, а затим је меша инкубирана 45 min на 85°C. Након тога додат је 1,5 mL хексана и меша је центрифугирана на 3000xg, 10 min. Хексански слој је покупљен и упарен у струји азота, а талози су чувани на -20°C до анализе.

3.5.1.4.4. Анализа масних киселина гасно-течном хроматографијом

Садржај масних киселина анализиран је гасно-течном хроматографијом. Коришћена је капиларна колона Rtx 2330, RESTEK, САД, висине 60 mm и унутрашњег пречника од 0,25 mm. Дебљина филма стационарне фазе била је 0,2 µm. Проток носећег гаса хелијума био је 5 mL/min, проток ваздуха 320 mL/min, и проток водоника 30 mL/min. Температура детектора била је 240°C, а температура инјектора 220°C. Температура колоне је са 140°C (почетна фаза), подизана до 190°C, брзином 3°C/min, а након тога до 210°C брзином 1°C/min. Узорци припремљених метил-естара растворени су непосредно пре инјектовања у 10 µL хексана, а затим ињектовани у запремини од 1 µL. Идентификација масних киселина вршена је поређењем са хроматограмом стандарда полинезасићених масних киселина (PUFA-2 standard). Резултати су изражени као проценат укупно издвојених масних киселина.

3.5.1.4.5. Одређивање количине укупног фосфора

За одређивање укупног садржаја фосфора у узорцима хемоглобина, узорци су припремљени на начин описан у одељку 3.5.1.4.1. Након упаравања, талог је растворен са 100 μL смеше хлороформ-метанол (2:1, v/v), пребачен у чисту епрувету и испран са 1,9 mL дестиловане воде тако да укупна запремина узорка буде 2 mL. Спектрофотометар је подешен тако да је апсорбанци дестиловане воде на 405 nm додељена вредност 0, а као слепа проба коришћена је смеша хлороформ-метанол (19:1, v/v) у запремини од 2 mL. Као стандард фосфора коришћен је раствор KH_2PO_4 концентрације 1,6 mmol/L од кога је направљена серија двоструког разблажења за конструисање стандардне праве. По 2 mL узорка/бланка/слепе пробе/стандарда мешано је са 1 mL раствора I (0,25% амонијум-ванадат, 1,94% азотна киселина у дестилованој води) и 1 mL раствора II (4,94% амонијум-молибдат, 6,66% азотна киселина у дестилованој води) до укупне запремине од 4 mL, кратко вортексовано и остављено 10 min на собној температури. Након тога, очитана је апсорбанца на 405 nm. Концентрација фосфора у узорцима израчуната је коришћењем стандардне праве.

3.5.1.5. Фотон корелациона спектроскопија

Просечна величина молекула (просечан хидродинамички пречник) (енг. *Intensity-weighted mean diameter z-average*) присутних у делимично пречишћеним узорцима свињског и говеђег хемоглобина одређена је применом технике динамичког расипања светлости (енг. *dynamic light scattering*) тј. фотон корелационе спектроскопије (енг. *photon correlation spectroscopy*) по протоколу описаном у раду Drvenica и сарадници (2019). За анализу је коришћен уређај Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Велика Британија), повезан са софтверским пакетом Zetasizer software верзија 7.03. Мерни опсег инструмента је од 6 nm до 6 μm . Мерења су спроведена на температури од 25°C, при углу расипања од 173°, и уз примену начина мерења означеног као „*automatic sampling time mode*“. Непосредно пре анализе узорци су центрифугирани, а затим је супернатант у запремини од 1,2 mL пренет у кивете за анализу (пластичне полистиренске кивете за једнократну употребу, дијаметра 10 mm). Узорци су анализирани употребом одговарајућих оперативних процедура (енг. *standard operating procedures, SOP*). Математичком обрадом криве (кумулантна анализа) софтвером којим је снабдевен апарат Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Велика Британија), урађена је и анализа величине молекула. Резултати су приказани као појединачне криве зависности удела броја молекула (%) од величине молекула. Свако мерење је поновљено десет пута, а коришћењем Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, SAD) програмског пакета конструисане су криве које представљају средњу вредност десет мерења.

3.5.1.6. UV-Vis спектроскопија

UV-Vis апсорпциони спектри узорака свињских и говеђих хемоглобина анализирани су UV-1800 UV-VIS спектрофотометром (Shimadzu, Јапан). Пре анализе узорци су центрифугирани 10 min, на 800xg, на 4°C, а затим је апсорбанца на таласној дужини од 415 nm подешена на вредност 1 разблаживањем узорака раствором PBS (Drvenica et al., 2019).

3.5.1.7. Испитивање способности редукције ABTS радикала

Способност узорака хемоглобина да редукују ABTS радикал одређивана је ABTS тестом. Овим тестом испитује се антиоксидативна активност неког једињења на основу његове способности да редукује плаво-зелени радикал-катјон 2,2'-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонске киселине) (ABTS катјон радикал, $\text{ABTS}^{\cdot+}$, оксидовани

ABTS) до безбојног реакционог производа. ABTS реагенс припремљен је растварањем 0,01920 g ABTS у 5 mL дестиловане воде, док је ABTS радикал припремљен мешањем 5 mL ABTS реагенса и 88 μ l раствора калијум-пероксисулфата. Након припреме, сток раствор ABTS радикала је, да би се потпуно оксидовао, остављен најмање 16 сати у мраку на собној температури. На дан извођења теста, сток раствор ABTS радикала разблажен је етанолом до радног раствора ABTS радикала, односно до вредности апсорбанце на 724 nm од 0,680-0,720, што одговара његовој концентрацији од приближно 1%.

ABTS тест је извођен у микротитарским плочама са 96 места. Непосредно пре извођења теста, узорци свињског и говеђег хемоглобина су разблажени у 0,9% NaCl до концентрација од 0,1, 1 и 10 μ M. По 10 μ L узорка хемоглобина додавано је у 290 μ L радног раствора ABTS радикала, а затим је реакциона смеша инкубирана на 37°C, 15 min. Негативну контролу је представљала смеша 10 μ L дестиловане воде и 290 μ L радног раствора ABTS. Након инкубације, апсорбанца реакционог производа очитана је на 405 nm на Wallac 1420 Victor2 читачу за микротитарске плоче (PerkinElmer, Финска).

Процент инхибиције ABTS^{•+} израчунат је према формули (једначина 2) (Olszowy & Dawidowicz, 2018):

$$I(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{узорка}}}{A_{\text{ABTS}}}\right) \times 100 \quad (2)$$

где је $A_{\text{узорка}}$ апсорбанца реакционог производа (умањена за вредност апсорбанце физиолошког раствора), а A_{ABTS} апсорбанца негативне контроле.

3.5.1.8. Испитивање садржаја хемоглобина у ћелијским културама

У супернатантима културама ПК-ММЋ и МНЋ анализирана је промена садржаја свињског и говеђег хемоглобина током култивације. У ту сврху, МНЋ су засејаване у плочама са 24 бунарића у концентрацији $1,5 \times 10^6$ ћелија/mL у RPMI/10% FCS медијуму без индикаторске боје, фенол ред. Хемоглобини су додавани у концентрацијама од 1 и 10 μ M, а МНЋ су гајене 48 h са или без митогена (РНА). На дан почетка експеримента хемоглобини растворени у медијуму у наведеним концентрацијама су замрзнути и чувани до краја култивације. По завршетку третмана, супернатанти из бунарића прикупљани су и центрифугирани 5 min на 20000xg. Након центрифугирања, супернатанти су прикупљени разблажени 10 пута у дестилованој води и очитана је апсорбанца на 415 nm UV-1800 UV-VIS спектрофотометром (Shimadzu, Јапан). Узорци хемоглобина који су замрзнути пре култивације, и који су коришћени за одређивање почетне концентрације хемоглобина (t_0), такође су разблажени 10 пута у дестилованој води и очитана им је апсорбанца на 415 nm.

У циљу испитивања садржаја хемоглобина у култури ПК-ММЋ, ове ћелије су засејаване у плоче са 6 бунарића у концентрацији 1×10^5 /mL и гајене у DMEM/10% FCS, 48 или 96 h, са или без хемоглобина (0,1, 1 и 10 μ M). На дан почетка експеримента хемоглобини растворени у медијуму у наведеним концентрацијама су замрзнути и чувани до краја култивације. Након третмана, супернатанти ћелијских култура су прикупљени и центрифугирани 5 min на 20000xg, а затим је очитана апсорбанца на 540 nm UV-1800 UV-VIS спектрофотометром (Shimadzu, Јапан). Узорци хемоглобина који су замрзнути пре култивације, и који су коришћени за одређивање почетне концентрације хемоглобина (t_0), су такође разблажени 10 пута у дестилованој води и очитана им је апсорбанца на 415 nm.

Резултати су приказани као проценат промене садржаја хемоглобина (Хб) након 48 или 96 h, за сваку анализирану концентрацију, према једначини (3):

$$\text{Промена садржаја Хб (\%)} = \frac{A_{\text{супернатанта}}}{A_{\text{раствора Хб у } t_0}} \quad (3)$$

где је $A_{\text{супернатанта}}$ апсорбанца супернатанта ћелија инкубираних са хемоглобином, а $A_{\text{раствора Хб у } t_0}$ апсорбанца раствора хемоглобина који су припремљени на дан започињања експеримента, из којих је одређена запремина сипана у бунариће плоча са ћелијама и који су након тога замрзнути.

3.5.2. Анализа ћелијских функција

3.5.2.1. Испитивање утицаја хемоглобина на вијабилност ћелија

3.5.2.1.1. Одређивање вијабилности ћелија МТТ тестом

МТТ тестом испитан је утицај свињског и говеђег хемоглобина на вијабилност ПК-ММЋ, АТDC5, МС3Т3-Е1, 3Т3Л1, С2С12 и МНЋ. Тест се заснива на редукцији жуто обојене тетразолијумове соли, МТТ, до тамно плавог формаза, каталитичким деловањем ензима сукцинат дехидрогеназе која је активна у живим ћелијама (Mosmann, 1983).

У циљу испитивања утицаја свињског и говеђег хемоглобина на вијабилност МНЋ, ћелије су засејаване у плоче са 96 места у концентрацији 1×10^5 ћелија/бунарићу и инкубиране са растворима хемоглобина концентрација од 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 и 16 μM у току 5 дана. Као контрола служиле су културе МНЋ култивисане само у стандардном медијуму.

У циљу испитивања утицаја свињског и говеђег хемоглобина на вијабилност мезенхимских ћелија МТТ тестом, ПК-ММЋ су засејаване у концентрацији 5×10^3 ћелија/бунарићу, а АТDC5, МС3Т3-Е1, 3Т3Л1 и С2С12 ћелије у концентрацији 8×10^3 ћелија/бунарићу, у плоче са 96 места и остављене преко ноћи да адхерирају. Следећег дана хемоглобини су додавани у концентрацијама од 0,1, 1 и 10 μM и ћелије су култивисане у стандардним условима 24, 48 или 72 h.

Након третмана, МТТ је додат у финалној концентрацији од 0,5 mg/mL и инкубиран са ћелијама 2-3h. Формирани кристали формаза растварани су у 10% SDS са 10 mM HCl. Апсорбанца обојеног производа на 540 nm измерена је аутоматским читачем микротитарских плоча Multiskan PLUS (Labsystem, Финска).

3.5.2.1.2. Одређивање вијабилности применом Hoechst ДНК обележивача

Утицај свињског и говеђег хемоглобина на вијабилност ПК-ММЋ испитан је применом Hoechst 33258 обележивача који се везује за дволанчану ДНК, према модификованом протоколу описаном у раду Singh и сарадника (2010). ПК-ММЋ су засејаване у концентрацији 5×10^3 ћелија/бунарићу у плоче са 96 места и остављене да адхерирају преко ноћи. Следећег дана у ћелијске културе додавани су свињски и говеђи хемоглобини у концентрацијама од 0,1, 1 и 10 μM након чега су ћелије култивисане у стандардним условима следећих 24, 48 или 72 h. Након третмана, Hoechst 33258 је додаван у финалној концентрацији од 5 $\mu\text{g/mL}$ и инкубиран са ћелијама 15 min. По завршеној инкубацији, медијум је уклоњен, ћелије испране два пута раствором PBS и лизирани пufferом радиоимунопреципитацијског есеја (енг. *radioimmunoprecipitation assay buffer*, RIPA) (1% NP-40, 0,5% натријум деокси холат, 0,1% SDS у раствору PBS) 30 min у мраку на собној температури. Ћелијски лизати су пребачени у црне плоче са 96 места и флуоресценца је мерена Wallac 1420 Victor2 читачем за микротитарских плоча (PerkinElmer, Финска) коришћењем 355 nm/460 nm филтера за ексцитацију и емисију.

3.5.2.1.3. Одређивање броја вијабилних ћелија бојењем трипан плавим

Да би се одредио број вијабилних ћелија, у ћелијску суспензију је додаван раствор трипан плавог и непосредно након тога ћелије су бројане у хемотометру. Због нарушавања интегритета ћелијске мембране, мртве ћелије су пропустљиве за ову боју, па се под светлосним микроскопом уочавају као плаве, за разлику од вијабилних ћелија које не пропуштају боју у цитоплазму, остају необојене, и под светлосним микроскопом се уочавају као светле.

Непосредно пре одређивања броја/концентрације ћелија, ћелије су помешане са 0,4% раствором боје трипан плаво у односу 1:9 и затим бројане у хемотометру. Концентрација ћелија израчуната је по формули (једначина 4):

$$C = N/n \times R \times 10000 \quad (4)$$

где је С концентрација ћелија изражена као број ћелија/mL, N број пребројаних ћелија у пољима плочице, n број поља на плочици у којима су бројане ћелије и R разблажење ћелија у трипан плаво боји.

Вијабилност (% живих ћелија) израчуната је по формули (једначина 5):

$$\text{Вијабилност (\%)} = (n * 100)/N \quad (5)$$

Где је n број вијабилних ћелија, а N укупан број ћелија.

3.5.2.2. Испитивање утицаја хемоглобина на функцијске карактеристике леукоцита периферне крви човека

3.5.2.2.1. Анализа адхезије леукоцита за полистирен

Утицај свињског и говеђег хемоглобина на адхезију МНЋ и ПМЋ периферне крви човека испитиван је тестом који су описали Оез и сарадници (1990) и прилагодили Vlaški и сарадници (2004). МНЋ и ПМЋ изоловане су по протоколу описаном у одељку 3.3.3., ресуспендоване у стандардном медијуму за култивацију леукоцита и засађене у бунариће (у концентрацији 5×10^5 ћелија/бунарићу) у плоче са 96 места. Тест адхезије извођен је са и без пре-адхезије. У тесту са пре-адхезијом, МНЋ и ПМЋ инкубиране су 30 min у стандардним условима, након чега су додавани раствори свињског и говеђег хемоглобина, а затим је инкубација настављена следећих 45 min. У експериментима без пре-адхезије, МНЋ и ПМЋ су у бунариће плоча додаване истовремено са растворима хемоглобина и инкубиране 45 min. Као контрола (мера нивоа спонтане адхезивности) служиле су МНЋ и ПМЋ гајене у стандардном медијуму. Као позитивна контрола теста коришћене су ћелије стимулисане РМА (50 ng/mL). По завршеној инкубацији ћелије које се нису залепиле за пластику уклањане су испирањем раствором PBS, а затим су адхерентне ћелије фиксиране 10 min на собној температури метанолом претходно охлађеним на -20°C и бојене 0,1% раствором кристал виолет, 10 min на собној температури. Након бојења, ћелије су испране водом из водовода и плоче су остављене преко ноћи да се осуше. Сутрадан је додаван раствор 33% сирћетне киселине (100 μL по бунарчићу), а интензитет ослобођене боје, који одражава број адхерентних ћелија, одређен је мерењем апсорбанце на 540 nm на аутоматском читачу за микротитарске плоче (Multiskan PLUS, Labsystem, Финска).

3.5.2.2.2. Анализа продукције ROS у леукоцитима

Утицај свињског и говеђег хемоглобина на продукцију ROS у МНЋ и ПМЋ периферне крви човека испитан је NBT тестом. Овај тест се заснива на редукцији NBT соли

супероксид анионом (O_2^-) који се генерише током респираторног праска, као резултат активности NADPH оксидазе леукоцита (Monboisse et al., 1991). Тест је извођен по методи описаној у (Vlaški et al., 2004). У циљу извођења овог теста, МНЋ и ПМЋ засејаване су у плоче са 96 места у концентрацији 5×10^5 ћелија/бунарићу у RPMI/10% FCS. Свињски и говеђи хемоглобин додавани су у концентрацијама од 0,1, 1 и 10 μ M. Ћелије су затим инкубиране 55 min у стандардним условима, након чега је у културе које су служиле као позитивна контрола додат РМА (50 ng/mL) а затим су плоче инкубиране још 5 min. Након тога, додат је NBT у финалној концентрацији од 5 mg/mL и инкубиран са ћелијама 30 min под стандардним условима. Проудуковани супероксид доводи до конверзије NBT супстрата до плаво/љубичасто обојеног формазана, а формиран кристали овог једињења растворени су у 10% SDS са 10 mM HCl и апсорбанца је мерена на 540 nm коришћењем аутоматског читача за микротитарске плоче (Multiskan PLUS, LabSystem, Финска).

3.5.2.2.3. Анализа пролиферације/диференцијације одређених матичних ћелија хематопоезе периферне крви

Како би се испитао утицај свињског и говеђег хемоглобина на пролиферацију/диференцијацију одређених матичних ћелија хематопоезе периферне крви човека, коришћен је CFC тест (Freshney et al., 1994). Свака колонија настаје као резултат пролиферације или диференцијације једне матичне ћелије, а број формираних колонија у CFC тесту указује на број хематопоеетских прогениторских ћелија у анализираном узорку. CFC тест подразумева култивацију хематопоеетских ћелија у полуврстом медијуму MethoCult H4434 (метилцелулоза у IMDM медијуму са додатком FCS) и који садржи рекомбинатне хумане цитокине (50 ng/mL фактора матичних ћелија (енг. *stem cell factor*, SCF), 10 ng/mL IL-3, 3 U/mL еритропоетина и 10 ng/mL фактора стимулације гранулоцитно-макрофагних колонија (енг. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), албумин из говеђег серума и β -меркаптоетанол.

За извођење CFC теста, МНЋ су изоловане по протоколу описаном у одељку 3.3.3., ресуспендоване у IMDM медијуму са 2% FCS са или без хемоглобина у концентрацијама 0,1, 1 и 10 μ M. Суспензијае МНЋ у запремини од 25 μ L које су садржале 1×10^5 ћелија су додате у епрувете са 250 μ L MethoCult H4434 полуврстог медијума, суспензија је снажно промешана и пренета у бунарић плоче са 24 места. Културе без хемоглобина служиле су као контроле. Тест је рађен у дупликату. Након 14 дана култивације број формираних колонија одређен је бројањем под светлосним микроскопом (Olympus BX51, Јапан). На основу морфолошких карактеристика колонија идентификовани су еритроидни прекурсори (BFU-E), прекурсори гранулоцитно-моноцитне лозе (CFU-GM) и прекурсори заједнички за гранулоците, еритроците, макрофаге и мегакариоците (CFU-GEMM).

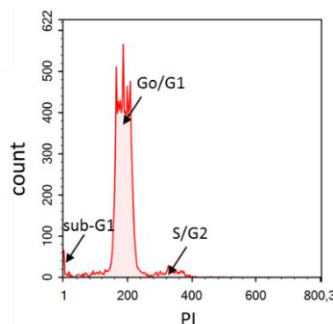
3.5.2.3. Испитивање утицаја хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија

3.5.2.3.1. Анализа ћелијског циклуса ПК-ММЋ

За анализу ћелијског циклуса, коришћено је бојење ћелија пропидијум јодидом који се стехиометријски везује за нуклеинске киселине тако да је емисија флуоресценце пропорционална садржају ових молекула у ћелији. Да би емитована флуоресценца рефлектовала количину ДНК у ћелијама, молекули РНК морају бити уклоњени током припреме узорака. Након бојења раствором PI, ћелије су анализиране проточним цитометром. На хистограму зависности броја ћелија од интензитета флуоресценце (енг. *cell count/PI fluorescence*), апоптотске ћелије формирају хиподиплоидни (sub-G₁) пик који се лако може разликовати од уског пика ћелија са нормалним (диплоидним) ДНК садржајем

(Riccardi & Nicoletti, 2006) (слика 3.4). Сходно томе, овај метод коришћен је у овој докторској дисертацији за испитивање утицаја хемоглобина на прогресију ћелија кроз фазе ћелијског циклуса, као и на број апоптотских ћелија у суспензији.

Анализа је рађена са ПК-ММЋ које су 24 h или 48 h култивисане у стандардном медијуму за култивацију ћелија у присуству свињског и говеђег хемоглобина (0,1 μM). Након инкубације, ћелије су одлепљиване 0,25% раствором трипсин/EDTA и фиксирани 4% раствором формалдехида. Након испирања у раствору PBS, ћелије су обојене (40 min на 37°C) раствором пропидијум јодида (50 $\mu\text{g/ml}$ PI, 0,1% Triton X-100 и 0,1 mg/ml РНКазе А у раствору PBS) и до анализе држане на леду. Прогресија кроз ћелијски циклус анализирана је на проточном цитометру Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, САД).



Слика 3.4. Графички приказ резултата анализе ћелијског циклуса проточном цитометријом ћелија обојених пропидијум јодидом. Приказ процента од укупног садржаја ДНК који потиче од апоптотских ћелија (sub-G1 пик) и ћелија у Go/G1 и S/G2 фази ћелијског циклуса.

3.5.2.3.2. Анализа клоногеног потенцијала ПК-ММЋ

Утицај свињског и говеђег хемоглобина на клоногени капацитет ПК-ММЋ испитан је CFU-F тестом (Trivanović et al., 2013a). ПК-ММЋ су засејаване у концентрацији од 40 ћелија/бунарићу и гајене две недеље у присуству свињског или говеђег хемоглобина (0,1, 1 и 10 μM) у стандардним условима. Као контрола служиле су ПК-ММЋ гајене у стандардном медијуму. Након третмана, ћелије су испирани раствором PBS, фиксирани 10 min на собној температури, метанолом претходно охлађеним на -20°C, бојене 0,1% раствором кристал виолет боје, 10 min на собној температури, и испирани дестилованом водом. Број CFU-F колонија ПК-ММЋ одређен је бројањем светлосним микроскопом (Olympus BX51, Јапан).

3.5.2.3.3. Анализа способности миграције мезенхимских ћелија

Утицај свињског и говеђег хемоглобина на способност миграције ПК-ММЋ, ATDC5, MC3T3-E1, 3T3L1 и C2C12 ћелија испитан је „Scratch“ тестом. У циљу извођења овог теста ћелије су засејаване у плоче са 24 места и пуштане да расту у стандардном медијуму за култивацију ћелија до постизања конфлуентности. Након тога, врхом стерилног наставка за пипете повучена је линија по средини бунарића како би се формирао простор без ћелија (тзв. огреботина, енг. *scratch*), након чега су одлепљене ћелије уклањане испирањем раствором PBS. По прављењу „огреботине“, ћелије су култивисане додатних 24 h у присуству различитих концентрација свињског и говеђег хемоглобина (0,1, 1 и 10 μM) у DMEM/1 % FCS. Одмах по додавању раствора хемоглобина, „огреботина“ је снимана светлосним микроскопом како би се забележила њена почетна површина (површина у нулто време, t_0). Након третмана, ћелије су фиксирани леденим метанолом (10 min на собној температури) и бојене 0,3% раствором кристал виолет боје (10 min на собној температури), а затим су „огреботине“ снимане светлосним микроскопом (Olympus BX51, Јапан). Добијене микрографије анализирани су програмом TScratch (Computational Science and

Engineering Laboratory, Swiss Federal Institute of Technology, ETH Zürich, Швајцарска) како би се одредио проценат ћелија које су мигрирале у област огреботине (Kocić et al., 2012).

3.5.2.3.4. Анализа диференцијационог потенцијала мезенхимских ћелија

Утицај свињског и говеђег хемоглобина на диференцијациони потенцијал мезенхимских ћелија испитиван је након инкубације ћелија у медијумима за хондрогену (ПК-ММЋ и АТDC5), остеогену (ПК-ММЋ и МС3Т3-Е1), адипогену (ПК-ММЋ и 3Т3-Л1) или миогену диференцијацију (ПК-ММЋ и С2С12). Степен диференцијације ћелија одређиван је хистохемијским методима за детекцију активности ALP ензима и минерализације ванћелијског матрикса (остеогена диференцијација), присуства гликозаминогликана (ГАГ) (хондрогена диференцијација), липидних тела (адипогена диференцијација) или миотуба (миогена диференцијација). Диференцијација мезенхимских ћелија ка одређеном типу ткива, додатно је потврђена анализом експресије гена специфичних за одређени тип диференцијације RT-PCR-методом. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на диференцијацију мезенхимских ћелија квантификован је дензитометријском анализом експресије гена специфичних за одређени тип диференцијације.

3.5.2.3.4.1. Хондрогена диференцијација

У циљу индукције хондрогене диференцијације ПК-ММЋ и АТDC5 ћелија, ћелије су засејаване у плоче са 96 места у концентрацијама од 5×10^3 (ПК-ММЋ) и 8×10^3 (АТDC5) ћелија/бунарићу и гајене у стандардном медијуму под стандардним условима до постизања конфлуентности од 80%. Након достизања субконфлуентности, ћелије су даље култивисане у хондрогеном диференцијационом медијуму (ХМ) који се састојао од DMEM медијума са додатком 5% FCS, 100 U/ml пеницилина/стрептомицина, 2 ng/mL TGF- β , 50 μ M аскорбинске киселине и 10 nM дексаметазона (модификован протокол по Nikolić и сарадници (2011). Свињски или говеђи хемоглобини додавани су у ХМ у концентрацији од 0,1 μ M. ПК-ММЋ су у ХМ инкубирани 14 дана, док је инкубација АТDC5 ћелија трајала 10 дана. Као контроле служиле су културе ПК-ММЋ и АТDC5 ћелија у ХМ, без хемоглобина. Медијум је мењан сваког другог дана. Након третмана ћелије су фиксиране 3,7% раствором формалина у 90% метанолу, а затим бојене 0,1% раствором сафранин О боје, 5 min на собној температури. Сафранин О боји ГАГ карактеристичне за ванћелијски матрикс хрскавичавог ткива и њихово присуство детектовано је након овог бојења посматрањем под светлосним микроскопом (Olympus BX51, Јапан). Интензитет боје у ћелијама, обојених сафранин О анализиран је дензитометријски, коришћењем софтвера TotalLab TL120 (TotalLab Ltd, Велика Британија).

У циљу испитивања утицаја хемоглобина на експресију специфичних маркера хондрогене диференцијације, ПК-ММЋ и АТDC5 ћелије засејаване су у плоче са 6 места и гајене у стандардном медијуму под стандардним условима. Након постизања субконфлуентности (80%), ПК-ММЋ и АТDC5 су гајене у ХМ 11 и 7 дана, респективно. Свињски и говеђи хемоглобин додаван је у ХМ у концентрацији од 0,1 μ M. Контролним нивоом експресије гена сматран је онај код ћелија гајених у ХМ без хемоглобина. Након култивације, иРНК изолована је из ћелија по протоколу описаном у 3.5.3.1. одељку, комплементарна ДНК (кДНК) синтетисана је по протоколу описаном у 3.5.3.2. одељку, а ланчана реакција полимеразе (енг. *polymerase chain reaction*, PCR) је извођен по протоколу описаном у одељку 3.5.3.3. коришћењем прајмера за гене специфичне хондрогену диференцијацију: *SOX9*, *COL1A1* и *COL2A1* за ПК-ММЋ и *Sox9*, *Col2a1* и *Coll1a1* за АТDC5 ћелије.

3.5.2.3.4.2. Остеогена диференцијација

Како би се индуковала остеогена диференцијација ПК-ММЋ и МС3Т3-Е1 ћелија, ћелије су до достигања субконфлуентности (конфлуентност од 80%) гајене под стандардним условима, у стандардном медијуму, у плочама са 96 места у које су засејаване у концентрацији од 5×10^3 (ПК-ММЋ) и 8×10^3 (МС3Т3-Е1) ћелија/бунарићу. Остеогени диференцијациони медијум (ОМ) за ПК-ММЋ садржао је DMEM са 5% FCS, 100 U/ml пеницилина/стрептомицина, 10 mM β -глицерофосфата, 10 nM дексаметазона и 50 μ M аскорбинске киселине (модификован протокол по Nikolić и сарадници (2011)). Индукција остеогене диференцијације МС3Т3-Е1 постигнута је гајењем ових ћелија у ОМ који се састојао од 10 mM β -глицерофосфата и 50 μ M аскорбинске киселине и садржао 10 nM дексаметазона (Birmingham et al., 2012) или је био без дексаметазона (Yazid et al., 2010). Свињски и говеђи хемоглобин додавани су у ОМ у концентрацији од 0,1 μ M и медијум је мењан сваког другог дана. Културе ПК-ММЋ и МС3Т3-Е1 у ОМ без хемоглобина служиле су као контроле.

Рана фаза остеогене диференцијације одређивана је детекцијом активности ензима ALP након 7 дана култивације ПК-ММЋ и МС3Т3-Е1 ћелија у одговарајућим ОМ. Активност ALP детектована је хистохемијским бојењем коришћењем раствора NBT/BCIP. Ћелије су након одговарајућег третмана фиксирале 3,7% раствором формалина у 90% метанолу, испиране у раствору PBS, а затим је додат раствор који се састојао од BCIP у финалној концентрацији 0,165 mg/mL и NBT у финалној концентрацији 0,3 mg/mL. Услед активности ензима ALP, долази до хидролизе супстрата NBT/BCIP и настанка интермедијерног једињења чијом се димеризацијом ослобађају јони водоника који даље доводе до редукције NBT, што води стварању нерастворног NBT-формаза, једињења љубичасте боје. Тамна боја која се развија у бунарићима са ћелијама чија је активност ALP ензима повишена, омогућава визуелизацију ране фазе остеогене диференцијације.

Како би се испитао утицај хемоглобина на касну фазу остеогене диференцијације, испитивана је способност депонована јона калцијума у ванћелијски матрикс, односно способност минерализације. Ћелије су гајене у ОМ на већ описан начин да би након две недеље биле фиксирале, а затим бојене 2% воденим раствором ализарин црвено боје током 30 min, на собној температури. Како се ова боја везује за депое калцијума у ванћелијском матриксу, степен минерализације детектован је посматрањем под светлосним микроскопом (Olympus BX51, Јапан). Интензитет боје у ћелијама обојеним NBT/BCIP хромогеном или ализарин црвено бојом анализиран је дензитометријски, коришћењем софтвера TotalLab TL120 (TotalLab Ltd, Велика Британија).

Како би се испитао утицај хемоглобина на експресију специфичних маркера остеогене диференцијације, ПК-ММЋ и МС3Т3-Е1 ћелије засејаване су у плоче са 6 места и гајене у CM под стандардним условима до постизања конфлуентности од 80%. Након тога, ПК-ММЋ и су гајене у одговарајућем ОМ 7 и 14 дана, док су МС3Т3-Е1 ћелије гајене у ОМ са или без дексаметазона 5 дана. Хемоглобин је додаван у одговарајуће остеогене медијуме у концентрацији од 0,1 μ M. Контролним нивоима експресије гена сматрани су они у ћелијама гајеним у ОМ без хемоглобина. По завршеном третману, иРНК је изолована из ћелија по протоколу описаном у 3.5.3.1. одељку, кДНК је синтетисана по протоколу описаном у 3.5.3.2. одељку, а PCR је извођен по протоколу описаном у одељку 3.5.3.3. коришћењем прајмера за гене специфичне остеогену диференцијацију: *RUNX2*, *ALPL*, *BGLAP* и *COL1A1* за ПК-ММЋ и *Runx2*, *Alpl* и *Bglap* за МС3Т3-Е1 ћелије.

3.5.2.3.4.3. Адипогена диференцијација

Како би се индуковала адипогена диференцијација ПК-ММЋ су до субконфлуентности (70%) гајене у СМ, а затим у адипогеном диференцијационом медијуму (АМ) који се састојао од DMEM са 5% FCS, 100 U/ml пеницилина/стрептомицина, 100 µg/ml IBMX, 1 µM дексаметазона и 10 µg/ml инсулина (Nikolić et al., 2011). Медијум је мењан сваког другог дана, а свињски и говеђи хемоглобин додати су у АМ у концентрацији од 0,1 µM. Као контроле служиле су културе ПК-ММЋ у АМ без хемоглобина.

У циљу индукције адипогене диференцијације 3T3-L1 ћелија, ћелије су засејаване у плоче са 96 места у концентрацији од 8×10^3 и гајене у стандардном медијуму до конфлуентности од 80%. Након тога, ћелије су инкубиране у индукционом медијуму (DMEM са 5% FCS, 0,5 mM IBMX, 1 µM дексаметазона и 10 µg/mL инсулина) током три дана, затим у инсулинском медијуму (DMEM са 5% FCS и 10 µg/mL инсулина) у току четири дана и коначно у стандардном медијуму још три додатна дана (Reed & Lane, 1980). Свињски и говеђи хемоглобин додати су почев од култивације у индукционом или инсулинском медијуму, како би се испитао њихов ефекат на различите фазе адипогенезе. Као контроле служиле су културе 3T3-L1 ћелије гајене у ОМ без хемоглобина.

Након 28 (ПК-ММЋ), односно 10 дана (3T3-L1 ћелије) третмана, ћелије су фиксиране 3,7% раствором формалина у 90% метанолу. Унутарћелијска липидна тела, показатељ процеса адипогене диференцијације, детектоване су бојењем oil Red бојом (0,5% раствор oil Red у изопропанолу, диспергован у дестилованој води у односу 3:2, v:v) (Merck, Немачка) и посматрањем под светлосним микроскопом (Olympus BX51, Јапан).

Како би се испитао утицај хемоглобина на експресију специфичних маркера адипогене диференцијације, ПК-ММЋ и 3T3-L1 ћелије засејаване су у плоче са 6 места и гајене у СМ под стандардним условима. Након постизања конфлуентности од 80%, ПК-ММЋ и су гајене у одговарајућем АМ 7 и 14 дана и хемоглобин је додаван у овај медијум у концентрацији од 0,1 µM. 3T3-L1 ћелије гајене су у одговарајућем АМ 10 дана, а хемоглобин је додаван у концентрацији од 0,1 µM почев од индукционе, или инсулинске фазе адипогене диференцијације. Контролним нивоима експресије гена сматрани су они у ћелијама гајеним у АМ без хемоглобина. По завршеном третману, иРНК је изолована из ћелија по протоколу описаном у 3.5.3.1. одељку, кДНК је синтетисана по протоколу описаном у 3.5.3.2. одељку, а PCR је извођен по протоколу описаном у одељку 3.5.3.3. коришћењем прајмера за гене специфичне адипогену диференцијацију: *PPARG*, *ADIPOQ* и *LPL* за ПК-ММЋ и *Pparg* и *Adipoq* за 3T3-L1 ћелије.

3.5.2.3.4.4. Миогена диференцијација

У циљу индукције миогене диференцијације, ПК-ММЋ су засејаване у плоче са 24 места у концентрацији од 1×10^4 ћелија/бунарићу и гајене у стандардном медијуму до постизања конфлуентности од 80%. Затим су ПК-ММЋ инкубиране у миогеном диференцијационом медијуму (ММ) који се састојао од DMEM са 2% FCS, 5% HS, 0,1 µM дексаметазона и 50 µM хидрокортизона (Nikolić et al., 2011). Ћелије су инкубиране 16 дана, медијум је замењиван сваког другог дана, а свињски и говеђи хемоглобин додати су у ММ у концентрацијама од 0,1, 1 и 10 µM. Као контроле служиле су културе ПК-ММЋ у ММ без хемоглобина.

Након третмана, ћелије су фиксиране леденим метанолом и бојене 0,3% раствором кристал виолет боје (на начин описан у 3.5.2.2.1). Индукција миогена диференцијације би била потврђена само ако су у културама, посматрањем под светлосним микроскопом (Olympus BX51, Јапан), уочене миотубе, ћелије са три или више једара.

Како би се индуковала миогена диференцијација C2C12 ћелија, ћелије су засејаване у плоче са 24 места у концентрацији од 8×10^3 ћелија/бунарићу и гајене до постизања конфлуентности (80%) у стандардном медијуму. Након тога, C2C12 ћелије су гајене 6 дана у ММ. ММ за C2C12 састојао се од DMEM/ 2% HS (Kocić et al., 2012). Као контроле служиле су културе C2C12 ћелија у ММ без хемоглобина. Након завршеног третмана, формиране миотубе визуелизоване су на исти начин описан за ПК-ММЋ.

Индекс сферичности формираних миотуба одређен је по протоколу Јех и сарадника (Yeh et al., 2014). Микрографије ћелије обојених кристал виолет бојом направљене су под увеличањем објектива 10x, а коришћењем софтвера Image J (НИН, САД) одређене су површина, дужина и просечна ширина усликаних миотуба. Индекс сферичности израчунат је као количник дужине и просечне ширине миотуба. За сваки узорак анализирано је најмање 20 миотуба.

У циљу испитивања утицаја хемоглобина на експресију специфичних маркера миогене диференцијације C2C12 ћелије су гајене до постизања субконфлуентности (80%) у СМ, при стандардним условима, а затим у ММ још 6 дана. Свињски и говеђи хемоглобин додаван је у ММ у концентрацији од 0,1 μM . Нивои експресије гена у ћелијама гајеним у ММ без хемоглобина сматрани су контролним нивоима. Након третмана, иРНК је изолована из ћелија по протоколу описаном у 3.5.3.1. одељку, кДНК је синтетисана по протоколу описаном у 3.5.3.2. одељку, а PCR је извођен по протоколу описаном у одељку 3.5.3.3. коришћењем прајмера за гене специфичне миогену диференцијацију: *Myog* и *Skm*.

3.5.2.3.5. Анализа имуномодулаторног капацитета ПК-ММЋ

Утицај свињског и говеђег хемоглобина на имуномодулаторни потенцијал ПК-ММЋ испитан је анализом ефекта ПК-ММЋ на ћелијски циклус и апоптозу алогених МНЋ бојењем пропидијум јодидом и анализом ефекта ПК-ММЋ на пролиферацију алогених МНЋ CFSE тестом. Утицај хемоглобина на експресију неких од имуномодулаторних гена од значаја за ову функцију ММЋ (*HLA-A*, *HLA-G*, *HLA-DR*, *TGF- β* , *IDO-1*, *PTGS2*, *IL-6*, *HOMX1*) испитан је применом RT-PCR метода.

3.5.2.3.5.1. Испитивање модулаторног ефекта ПК-ММЋ на ћелијски циклус и апоптозу алогених МНЋ

Утицај хемоглобина на модулаторни ефекат ПК-ММЋ на ћелијски циклус и апоптозу алогених МНЋ, анализиран је тестом обележавања пропидијум јодидом. У ту сврху, ПК-ММЋ су засејаване у плоче са 24 места у концентрацији од $2 \times 10^4/\text{mL}$ и остављене да адхерирају преко ноћи. Следећег дана МНЋ су изоловане из периферне крви здравих давалаца по протоколу описаном у одељку 3.3.3.. Пре додавања МНЋ и хемоглобина пролиферација ПК-ММЋ заустављена је третманом митомицином С (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30 min, на 37°C). У бунариће са ПК-ММЋ додато је по 1×10^6 МНЋ у стандардном RPMI медијуму са 10% FCS. Хемоглобини су додати у концентрацији од 0,1 μM . МНЋ у одређеном броју бунарића биле су стимулисане са РНА (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ћелије су инкубиране 72 h. МНЋ култивисане у стандардном медијуму, без митогена, и без хемоглобина служиле су као контроле. Након инкубације, МНЋ су сакупљене из бунарића и бројане у раствору трипан плавог по протоколу описаном у одељку 3.5.2.1.3.. Суспензије у којима се налазило 5×10^5 вијабилних нестимулисаних или РНА стимулисаних МНЋ пренете су у нове епрувете и центрифугиране на 400xg у току 8 min. Ћелијски талог је ресуспендован у раствору PBS, а затим је у ћелијску суспензију у свакој епрувети додато по 2,5 mL апсолутног етанола. Етанол је додаван, кап по кап, низ зидове епрувете. Током додавања етанола, ћелије су држане на леду и вортексоване како би се спречила агрегација током фиксације. Ћелије су

инкубиране на леду 15 минута, а затим испране у раствору PBS центрифугирањем на 400xg, 5 min. Након центрифугирања ћелије су ресуспендоване у 0,5 mL раствора PBS и 0,5 mL хипоосмотског ДНК екстракционог пуфера и инкубиране 5 min на собној температури. По завршеној инкубацији, ћелије су центрифугиране (400xg, 5 min) и ресуспендоване у 0,5 mL PI раствора који је припремљен растварањем 20 µg/mL PI у раствору PBS. Ћелије су у PI раствору инкубиране 30 min на собној температури, у мраку. Након инкубације, МНЋ су испране у раствору PBS, ресуспендоване у 0,5 mL раствора PBS и анализирани на проточном цитометру Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, САД).

3.5.2.3.5.2. Испитивање модулаторног ефекта ПК-ММЋ на пролиферацију алогених МНЋ

CFSE тест, примењен за одређивање утицаја ПК-ММЋ на пролиферацију алогених МНЋ у присуству хемоглобина заснива се на ковалентном везивању флуоресцентне боје CFSE преко сукцинимидил група за аминокиселинске групе унутарћелијских молекула (Parish & Warren, 2001). Карбокси-флуоресцеин диацетат сукцинимидил естар (енг. *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*, CFDA-SE) је нефлуоресцентно и липофилно једињење које брзо улази у ћелије, али их брзо и напушта. Међутим, када се нађе у ћелији, унутарћелијске естеразе уклањају ацетатне групе овог једињења чиме настаје CFSE - флуоресцентно једињење смањене липофилности које споро излази из ћелија, чиме се продужава време да ковалентно одреагује са унутарћелијским молекулима. Због ових особина CFSE се дуго задржава у ћелијама, што га чини погодним агенсом за праћење пролиферације у реалном времену. Након сваке ћелијске деобе, CFSE се равномерно распоређује на две новонастале ћерке ћелије, па је смањење интензитета флуоресценце које се читава проточним цитометром директно пропорционално броју деоба, односно степену пролиферације испитиваних ћелија. Овом методом могуће је анализирати до 8 ћелијских деоба пре него што ниво флуоресценце достигне ниво аутофлуоресценце необележених ћелија.

У циљу извођења овог теста, ПК-ММЋ су засејаване у плоче са 24 места у концентрацији од 2×10^4 /mL и остављене да адхерирају, након чега им је заустављена пролиферација третманом митомицином С (25 µg/mL; 30 min на 37°C), непосредно пре додавања МНЋ и хемоглобина. МНЋ су изоловане из периферне крви здравих даваоца по протоколу описаном у одељку 3.3.3. У сваки бунарић додато је по 1×10^6 МНЋ ресуспендованих у RPMI/10% FCS, претходно обележених CFSE бојом у финалној концентрацији од 5 µM. Нестимулисани и РНА (2,5 µg/mL) стимулисани МНЋ обележени CFSE бојом, култивисани су 5 дана у присуству свињског и говеђег хемоглобина (0,1 µM). Нестимулисани МНЋ и МНЋ стимулисани РНА, култивани без ПК-ММЋ коришћени су као контроле реактивности МНЋ. Необојени МНЋ и МНЋ које су обојене CFSE и којима је након тога пролиферација заустављена митомицином С (25 µg/mL; 30 min на 37°C) коришћени су као контрола самог метода. Након 5 дана у култури, ћелије су испране два пута у раствору PBS и ресуспендоване у 500 µL 4% раствора формалина у раствору PBS и чуване у мраку, на 4°C, до анализе на проточном цитометру Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, САД). Популације ћелија раздвајане су на основу величине и гранулираности, а затим је мерен ниво флуоресценце. Интензитет неспецифичне флуоресценце одређен је анализом необојених МНЋ. Максималну флуоресценцу давале су обојене МНЋ третиране митомицином С, тј. ћелије чија је деоба заустављена. У културама МНЋ које су пролиферисале, интензитет флуоресценце био је између максималне флуоресценце (ћелије које се нису делиле) и интензитета аутофлуоресценце необојених ћелија. Индекс пролиферације за сваки узорак, израчунат је по формули датој у студији Parish и Warren (2001). Индекс пролиферације нестимулисаних МНЋ култивисаних у RPMI/10% FCS медијуму без хемоглобина арбитрарно је означен као 1.

3.5.2.3.5.3. Анализа експресије имуномодулаторних гена ПК-ММЋ

У циљу испитивања утицаја хемоглобина на експресију имуномодулаторних гена ПК-ММЋ, ове ћелије засејаване су у плоче са 6 места и инкубиране са свињским и говеђим хемоглобином у току 24 или 48 h. Хемоглобин је био растворен у DMEM/5% FCS у концентрацији 0,1 μ M, а као контролним је сматран ниво експресије гена у ПК-ММЋ гајеним у DMEM/5% FCS без хемоглобина. Након култивације, иРНК је изолована из ПК-ММЋ по протоколу описаном у 3.5.3.1. одељку, кДНК је синтетисана по протоколу описаном у 3.5.3.2. одељку, а PCR је извођен по протоколу описаном у одељку 3.5.3.3. коришћењем прајмера за гене специфичне за имуномодулаторне функције ММЋ: *HLA-A*, *HLA-G*, *HLA-DRA*, *TGFB1*, *IDO1*, *PTGS2*, *IL6*, *HOMX1*.

3.5.3. Анализа експресије гена

Утицаја свињског и говеђег хемоглобина на промену експресије гена ПК-ММЋ, ATDC5, MC3T3-E1, 3T3-L1 и C2C12 праћен је на нивоу молекула иРНК. Након изолације укупне иРНК из ћелија, синтетисани су молекули кДНК, да би се затим у PCR реакцији умножили гени од интереса.

3.5.3.1. Изолација укупне РНК

У циљу изолације укупне РНК, ћелије (ПК-ММЋ, ATDC5, MC3T3-E1, 3T3-L1 и C2C12) култивисане су у плочама са 6 места. Након одређеног третмана, ћелије су испране раствором PBS, а затим је додаван хладан TRIzol (1 mL/бунарићу). Инкубација је трајала 5 min, током које је, да би се обезбедила потпуна лиза ћелија, суспензија пропуштана кроз наставак пипете. Лизат је пребациван у епрувете запремине 1,5 mL где је сваком узорку додато по 0,2 mL хлороформа. Након снажног мешања у трајању од 15 секунди, узорци су инкубирани 10 min на собној температури, а затим центрифугирани на 12000xg, 15 min на 4°C. Центрифугирањем су издвојене три фазе: црвена доња, фенол-хлороформ фаза у којој су се налазили протеини и липиди, бела интерфаза у којој су се налазили ДНК молекули и горња, безбојна, водена фаза у којој су се налазили РНК молекули. Пажљивим пипетирањем једнаке запремине водене фазе пребациване су у нове епрувете. РНК је преципитирана додавањем по 500 μ L изопропанола и исталожена центрифугирањем на 12000xg, 20 min на 4°C. По уклањању изопропанола, на талог РНК је додавано 1 mL 75% етанола. Узорци су вортексовани и центрифугирани на 7500xg, 5 min на 4°C. Након центрифугирања, супернатант је одливан, талог РНК остављан да се осуши на собној температури, и растворен у 20 μ L DEPC воде. Концентрација РНК у сваком узорку мерена је на спектрофотометру NanoPhotometer P300 (Implen, Немачка) након чега је чувана на -70°C.

3.5.3.2. Реверзна транскрипција

Како би се из укупне изоловане РНК, само иРНК превела у кДНК коришћени су олиго dT прајмери који се у реакцији реверзне транскрипције везују за поли(А)-репове и омогућавају умножавање еукариотских иРНК. За извођење реверзне транскрипције коришћен је комерцијални комплет *RevertAid TM Hminus First Strand cDNA Synthesis Kit*, а реакција је извођена *Mastercycler personal* апаратом (Eppendorf, Немачка). Пратећи упутства произвођача реагенаса, припремана је реакциона смеша која се састојала од 2 μ g узорка РНК, 1 μ L олиго dT прајмера и 6,5 μ L DEPC воде. Ова смеша инкубирана је 5 min на 65°C како би се омогућила хибридизација олиго dT прајмера за поли(А) репове иРНК. У следећем кораку, температура реакције је снижена на 25°C током 7 min, за време којих је

реакционој смеши додаван основни микс реагенаса који се састојао од 5 пута концентрованог пуфера за реверзну транскрипцију (4 μL), инхибитора рибонуклеазе (0,5 μL), смеше дезоксинуклеотида (енг. *deoxynucleotide*, dNTP) (2 μL) и *RevertAid* ензима реверзне транскриптазе (1 μL). На овај начин припремљени узорци су додатно инкубирани 60 min на температури од 42°C која је оптимална за активност реверзне транскриптазе, а затим 10 min на 70°C како би се реакција прекинула. Добијена кДНК чувана је на -70°C или је употребљавана одмах у реакцији ланчане реакције полимеразе.

3.5.3.3. Ланчана реакција полимеразе

Како би се добио довољан број копија гена од интереса, коришћен је PCR метод коришћењем прајмера специфичних за одређене секвенце кДНК у одговарајућем температурном програму. PCR производи добијени су инкубацијом 200 ng кДНК, 1 μL пара специфичних прајмера, 9 μL DEPC воде, 10 μL главне MasterMix смеше (садржи Taq L (50 U/ml), dNTP (500 μM) и два пута концентрован пуфер за PCR са MgCl_2). Узорци припремљени на овај начин инкубирани су у термоблоку *Mastercycler personal* апарата по програму који се састојао од три фазе:

- 1) иницијална денатурација: 5 min на температури од 94°C;
- 2) 20 – 40 циклуса:
 - а) денатурација: 45 sec на температури од 94°C,
 - б) хибридизација прајмера: 30 sec на температури датој у табели 3.1 или 3.2,
 - в) елонгација прајмера: 1,5 min на температури од 72°C;
- 3) финална елонгација прајмера: 10 min на температури од 72°C.

Број циклуса у фази 2), као и температуре хибридизације прајмера у фази б) прилагођавани су коришћењем сету прајмера и дати су у табелама 3.1 и 3.2. За референтни ген одабран је ген за дехидрогеназу глицералдехид 3-фосфата (енг. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH) који је високо конзервиран, конститутивно експримиран ген у свакој живој ћелији, па се сматра „housekeeping“ геном.

Табела 3.1. Хумани прајмери коришћени за PCR; Fw - *forward* прајмер, Rev - *reverse* прајмер, bp - базни пар, T – температура хибридизације.

Ген	Секвенца	Величина продукта (bp)	T (°C)	Број циклауса
<i>GAPDH</i>	Fw: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' Rev: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	452	51	33
<i>BGLAP</i>	Fw: 5'-TCACACTCCTCGCCCTATTGG-3' Rev: 5'-GGGCAAGGGGAAGAGGAAAGA-3'	330	51	33
<i>RUNX2</i>	Fw: 5'-ATGCTTCATTCGCCTCACAAAC-3' Rev: 5'-CCAAAAGAAGTTTTGCTGACATGG-3'	261	48	33
<i>ALPL</i>	Fw: 5'-CCCAAAGGCTTCTTCTTG-3' Rev: 5'-CTGGTAGTTGTTGTGAGC-3'	300	43	33
<i>ADIPOQ</i>	Fw: 5'-GCTGGAGTTCAGTGGTGTGA-3' Rev: 5'-ACCAACCTGACGAATGTGGT-3'	164	48	33
<i>PPARG</i>	Fw: 5'-GCTGTTATGGGTGAAACTCTG-3' Rev: 5'-ATAAGGTGGAGATGCAGGCTC-3'	351	48	33
<i>SOX9</i>	Fw: 5'-GAGGAAGTCGGTGAAGAACG-3' Rev: 5'-ATCGAAGGTCTCGATGTTGG-3'	300	48	33
<i>COL2A1</i>	Fw: 5'-TTCAGCTATGGAGATGACAATC-3' Rev: 5'-AGAGTCCTAGAGTACTGAG-3'	472	47	36
<i>COL1A1</i>	Fw: 5'-GAGAGCATGACCGATGGATT-3' Rev: 5'-CCTTCTTGAGGTTGCCAGTC-3'	178	52	33
<i>LPL</i>	Fw: 5'-AAAGCCCTGCTCGTGCTGAC-3' Rev: 5'-TAAACCGGGCCACATCCTGT-3'	472	31	33
<i>MYOG</i>	Fw: 5'-GGTGCCAGCGAATGC-3' Rev: 5'-TGATGCTGTCCACGATGGA-3'	155	46	35
<i>CKM</i>	Fw: 5'-GCATCTGGCACAATGAC-3' Rev: 5'-GATGACCCGGAGGTGATC-3'	68	45	33
<i>HLA-A</i>	Fw: 5'-GACGACACGCAGTTCGTGC-3' Rev: 5'-CATGTCCGCGCGGTCCAA-3'	331	47	33
<i>HLA-DRA</i>	Fw: 5'-CGAGTTCTCTATCTGAATCCTG-3' Rev: 5'-GTTCTGCTGCATTGCTTTTGC-3'	644	52	33
<i>HLA-G</i>	Fw: 5'-GGAAGAGGAGACACGGAACA-3' Rev: 5'-CCTTTTCAATCTGAGCTCTTCTTT-3'	771	47	33
<i>IDO1</i>	Fw: 5'- ATCACCATGGCATATGTGTGGG -3' Rev: 5'- GTGAAACACTTGAAGGGCTTTCTC -3'	390	51	33
<i>IL6</i>	Fw: 5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAG-3' Rev: 5'-AGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3'	626	53	33
<i>TGFB1</i>	Fw: 5'-GGGACTATCCACCTGCAAGA-3' Rev: 5'-CCTCCTTGGCGTAGTAGTCG-3'	239	50	33
<i>PTGS2</i>	Fw: 5'-CCTTCCTCCTGTGCCTGATG-3' Rev: 5'-CTGGCCCTCGCTTATGATCT-3'	203	51	33
<i>HMOX1</i>	Fw: 5'-ATGACACCAAGGACCAGAGC-3' Rev: 5'-GTGTAAGGACCCATCGGAGA-3'	115	49	35
<i>HIF1A</i>	Fw: 5'-CAGAGCAGGAAAAGGAGTCA-3' Rev: 5'-AGTAGCTGCATGATCGTCTG-3'	234	47	33

Табела 3.2. Мишји прајмери коришћени за PCR; Fw - forward прајмер, Rev - reverse прајмер, бр - базни пар, Т – температура хибридизације.

Ген	Секвенца	Величина продукта (бр)	Т (°C)	Број циклауса
<i>Gapdh</i>	Fw: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' Rev: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	452	51	33
<i>Bglap</i>	Fw: 5'-GACAAAGCCTTCATGTCCAAGC-3' Rev: 5'-AAAGCCGAGTGCCAGAGTTTG-3'	240	52	38
<i>Col2a1</i>	Fw: 5'-GCCTCGCGGTGAGCCTGATC-3' Rev: 5'-CTCCATCTCTGCACGGGGT-3'	ПА 472; ПВ 268	57	33
<i>Coll1a1</i>	Fw: 5'-GGAAAGATGGGCTACCAGGACA-3' Rev: 5'-GGACGTCTGGCAAACCAATTG-3'	412	52	33
<i>Runx2</i>	Fw: 5'-AGGGACTATGGCGTCAAACA-3' Rev: 5'-GGCTCACGTCGCTCATCTT-3'	98	48	35
<i>Sox9</i>	Fw: 5'-ATCGGTGAAGTGAAGCAGCGAC-3' Rev: 5'-GCCTGCTGCTTCGACATCCA-3'	159	51	33
<i>Pparg</i>	Fw: 5'-GCTGTTATGGGTGAAACTCTG-3' Rev: 5'-ATAAGGTGGAGATGCAGGTTC-3'	351	47	33
<i>Adipoq</i>	Fw: 5'-CCCAAGGGAAGTGTGCAGGTTGGATG-3' Rev: 5'-GTTGGTATCATGGTAGAGAAGAAAGCC-3'	585	55	33
<i>Alpl</i>	Fw: 5'-GTTGCCAAGCTGGGAAGAACAC-3' Rev: 5'-CCCACCCCGCTATTCCAAAC-3'	121	47	35
<i>Myog</i>	Fw: 5'-TTTCTACCAGGAGCCCCACTT-3' Rev: 5'-TGATGGCTTTTGACACCAAC-3'	707	54	35
<i>Ckm</i>	Fw: 5'-CAATAAGCTTCGCGATAAGGAG-3' Rev: 5'-AGGAAGCTTTTGTTGTCGTTG-3'	561	56	35
<i>Hmox1</i>	Fw: 5'-AGGCTAAGACCGCCTTCCT-3' Rev: 5'-TGTGTTCTCTGTCAGCATCA-3'	31	48	35
<i>Hif1a</i>	Fw: 5'-TGCTTGTTGCTGATTTGTGA-3' Rev: 5'-GGTCAGATGATCAGAATCCA-3'	170	45	35

3.5.3.4. Визуелизација PCR производа електрофорезом у агарозном гелу

Добијени PCR производи раздвајани су у 1,5% агарозном гелу у Tris-ацетатном-EDTA (енг. *Tris-acetate-EDTA*, TAE) пуферу (40 mM Tris, 20 mM сирћетна киселина, 1 mM EDTA). Агароза је растварана кувањем, а након кувања и делимичног хлађења, а пре гелирања, у њу је додаван етидијум-бромид у концентрацији од 0,01%. Агароза је изливана у кадице за гелове и остављена да се охлади и полимеризује на собној температури. PCR производи мешани су са пуфером за наношење узорка (10 mM Tris-HCl (pH 7,6) 0,03% бромфенол плаво, 0,03% ксилен цијанол FF, 60% глицерол, 60 mM EDTA) у односу 5:1. У сваком гелу је као контрола наношен ДНК маркер који чини смешу ДНК фрагмената познате молекулске масе од 100 до 1000 bp (*Gene Ruler plus Prestained DNA Ladder*). Електрофореза је извођена у апарату за хоризонталну електрофорезу (Biorad, САД) у TAE пуферу, при напону од 100 V, јачини струје од 400 mA и у трајању од 40-60 min (зависно од величине PCR продукта). PCR производи развојени у агарозном гелу детектовани су осветљавањем гела UV светлосћу у трансилуминатору. Гел је сниман, након чега су интензитет сигнала и број базних парова PCR производа (на основу поређења са ДНК маркером) анализирани дензитометријски програмом *ImageMaster TotalLab TL120* (GE HealthCare Life Science, САД). Релативна експресија иРНК за специфичне гене одређивана је као однос оптичких густина трака добијених за ген од интереса и GAPDH у датом узорку.

3.6. Статистичка анализа података

Резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације анализирани су стандардним статистичким методама коришћењем Microsoft Office 2016 Excel (Microsoft Corporation, САД) програма. Приказани су средње вредности \pm стандардна девијација најмање три поновљена експеримента. За процену статистичке значајности средњих вредности контролне и хемоглобином третиране групе, прво је утврђивана разлика између варијанси два скупа F тестом, а затим је примењиван неупарени, двосмерни Студентов *t*-тест. За оба теста, вредност вероватноће p мања од 0,05 сматрана је статистички значајном ($p < 0.05$).

РЕЗУЛТАТИ

4. Резултати

4.1. Изолација, пречишћавање и физичко-хемијска карактеризација свињског и говеђег хемоглобина

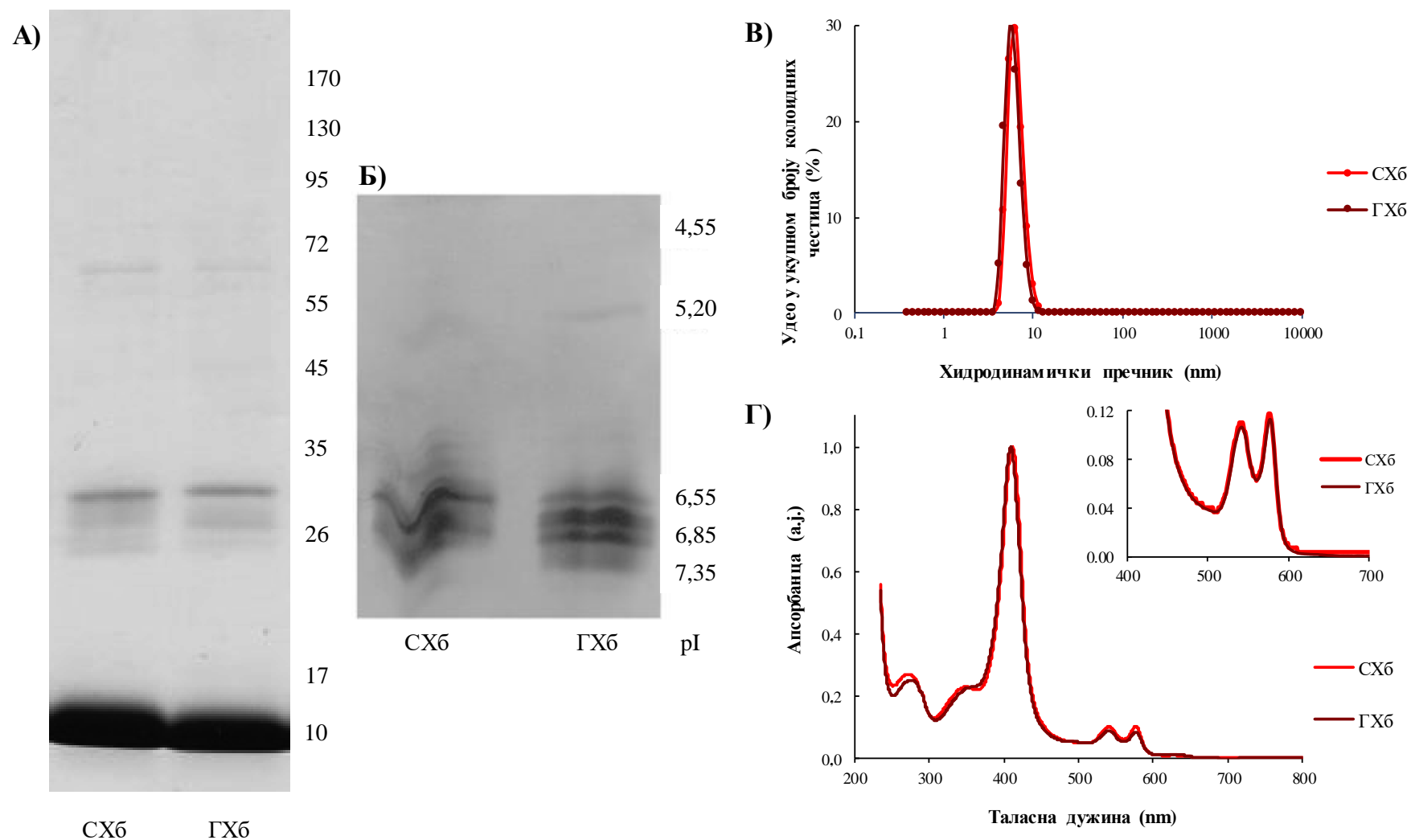
Свињски и говеђи хемоглобин изоловани су градуалном хипотоничном хемолизом из суспензије пакованих еритроцита свињске и говеђе кланичне крви. Након градуалне хемоллизе лизати су пречишћени тангенцијалном ултрафилтрацијом. Концентрација хемоглобина у делимично пречишћеним изолатима кретала се у распону од 30 до 70 g/L, а садржај метхемоглобина није прелазио 2%.

У сваком појединачном изолату испитан је садржај протеина и липида, одређена је просечна величина колоидних честица, снимљени су апсорпциони UV-Vis спектри и испитана је способност хемоглобина да редукује ABTS радикал.

Протеински садржај изолата анализиран је редукујућом SDS-PAGE и изоелектричним фокусирањем. Резултати SDS-PAGE показали су да и у свињским и у говеђим изолатима више од 90% протеина чине протеини који по молекулској маси од 16 kDa одговарају потпуно редукованим глобинским ланцима (Sakai et al., 2002) (слика 4.1. А). Поред ових фракција, уочене су и протеинске фракције слабог интензитета, молекулских маса од 25, 26, 30 и 70 kDa (слика 4.1. А). Раздвајањем изолата на гелу изоелектричним фокусирањем уочене су две интензивне и неколико мање изражених протеинских трака, које су чиниле више од 90% детектованих протинских фракција, и које су по вредностима pI од 6,55 до 7,35 одговарале хемоглобину (Sakai et al., 2002) (слика 4.1. Б). Поред ових трака, детектована је и једна трака слабог интензитета која по својој pI вредности од 5,9 одговара карбоанхидрази говеђих еритроцита (Montich, 2000).

Фотон корелационом спектроскопијом показано је да је просечан хидродинамички пречник колоидних честица у изолатима свињског и говеђег хемоглобина износио 7 nm, што одговара хидродинамичком пречнику нативног молекула хемоглобина (Domingues-Hamdi et al., 2014) (слика 4.1. В).

Апсорпциони спектри изолата свињског и говеђег хемоглобина анализирани су UV-Vis апсорпционом спектроскопијом којом су у свим узорцима идентификовани апсорпциони максимуми карактеристични за нативни оксихемоглобин: 275, 350, 413-415, 541, 576 nm (Sherif & Amal, 2010; Zijlstra et al., 1991). Апсорпциони максимум на 630 nm, који потиче од метхемоглобина, био је слабо изражен (слика 4.1. Г).



Слика 4.1. Физичко-хемијска карактеризација изолата свињског (CX6) и говеђег (GX6) хемоглобина добијених градуалном хипотоничном лизом еритроцита из кланичне свињске и говеђе крви након пречишћавања тангенцијалном ултрафилтацијом. Анализа протеина SDS-PAGE (A) и изоелектрофокусирањем (B). Величина колоидних честица, одређена фотон корелационом спектроскопијом (C). Репрезентативни UV-Vis апсорпциони спектри (D).

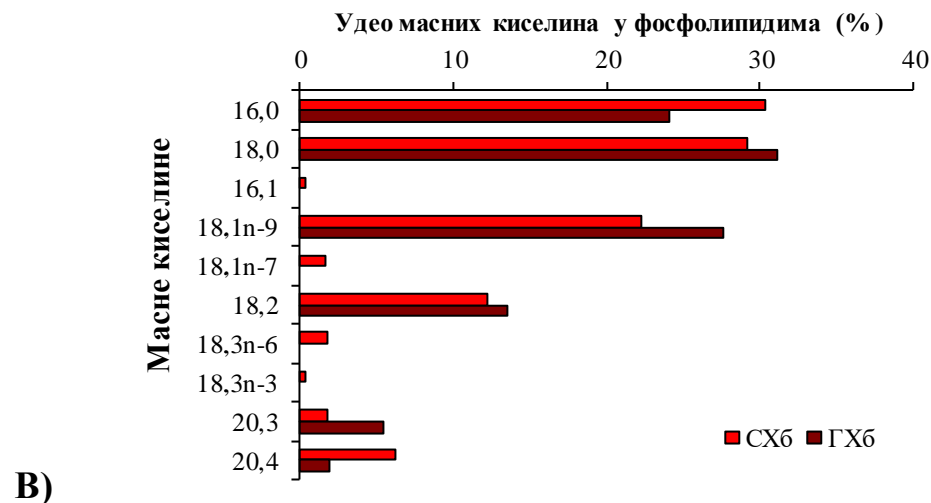
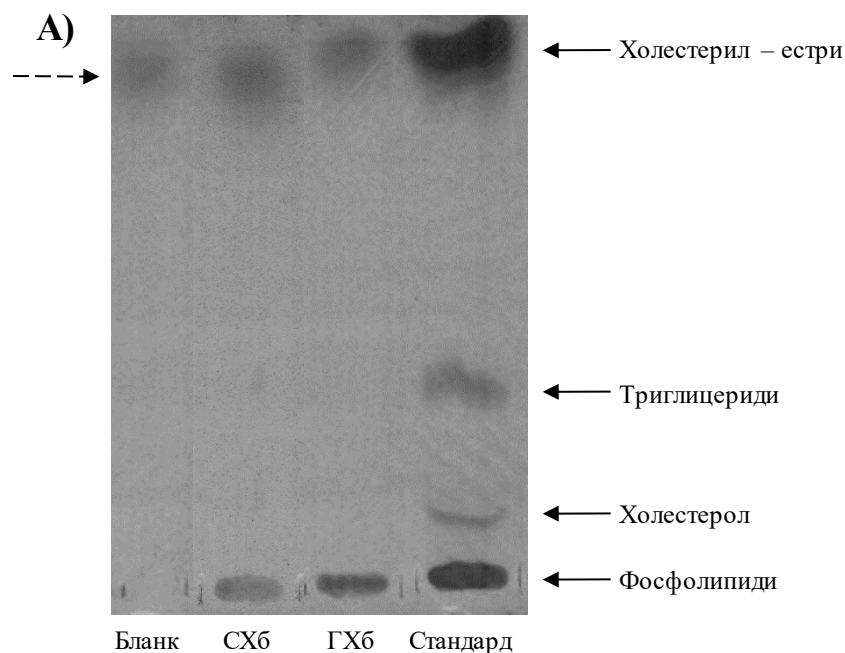
Хроматографијом липида на танком слоју силика гела испитано је присуство неутралних липида (холестерил-естара, триглицерида, холестерола) и фосфолипида у свињским и говеђим изолатима. Након хроматографског раздвајања у изолатима обе животињске врсте детектовани су само фосфолипиди (слика 4.2. А). Садржај фосфора у изолатима свињског хемоглобина износио је 0,42 mol/mol хемоглобина и био је већи од садржаја фосфора у изолатима говеђег хемоглобина који је износио 0,28 mol/mol хемоглобина (слика 4.2. Б).

У фосфолипидима изолата свињског хемоглобина детектовано је 10 масних киселина, а у фосфолипидима изолата говеђег хемоглобина 6 (слика 4.2. В). У присутним фосфолипидима у изолатима хемоглобина обе животињске врсте најзаступљеније су биле засићене масне киселине (>50%), али су детектоване и мононезасићене и полинезасићене масне киселине. Од засићених масних киселина детектоване су палмитинска и стеаринска киселина. Палмитинска киселина била је заступљенија у узорцима свињског хемоглобина у односу на узорке говеђег хемоглобина, док је проценат стеаринске киселине у хемолизатима обе врсте био приближно једнак. Од мононезасићених масних киселина у изолатима свињског хемоглобина детектоване су палмитолеинска, олеинска (најзаступљенија) и вакценска киселина, док је у изолатима говеђег хемоглобина детектована само олеинска киселина. У узорцима свињског хемоглобина детектовано је и 5 полинезасићених масних киселина (линолна, γ -линоленска, α -линоленска, дихомо- γ -линоленска и арахидонска), од којих су линолна и арахидонска биле најзаступљеније. У узорцима говеђег хемоглобина детектоване су 3 полинезасићене масне киселине (линолна, дихомо- γ -линоленска и арахидонска), од којих су најзаступљенија била линолна киселина.

С обзиром да је хемоглобин у свим анализираним изолатима представљао доминантан протеин, и да су липиди, који потичу од мембрана еритроцита као главни контаминанти изолата били присутни у ниским концентрацијама, у наредним деловима текста ове дисертације термин „изолат“ замењен је термином „хемоглобин“.

ABTS тестом показано је да изоловани свињски и говеђи хемоглобин, захваљујући присуству очуваног двовалентног гвожђа у хему, на дозно зависан начин редукују ABTS радикал. Способност редукације ABTS радикала хемоглобина изолованих из ове две животињске врсте није се разликовала (слика 4.3).

Како је физичко-хемијска карактеризација узорака свињског и говеђег хемоглобина показала минималне варијације између јединки исте врсте, за испитивања утицаја хемоглобина на функцијске карактеристике ћелија коришћени су збирни узорци свињског и збирни узорци говеђег хемоглобина, припремљени мешањем истих запремина узорака хемоглобина изолованих из еритроцита две животиње.

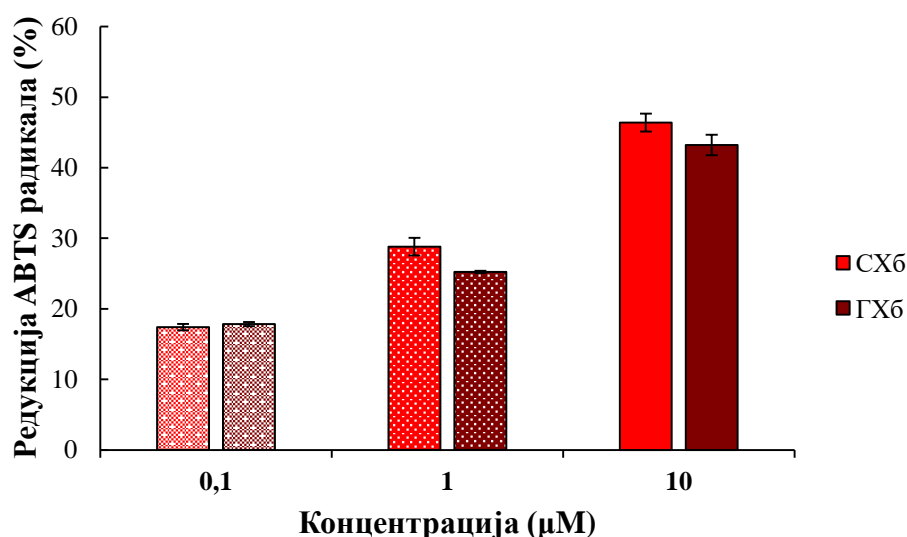


Б)

	Садржај фосфора		
	mmol/L	mmol/g Хб	mmol/mmol Хб
Свињски Хб	0,72 ± 0,20	0,007 ± 0,000	0,42 ± 0,01
Говеђи Хб	0,98 ± 0,07	0,004 ± 0,000	0,28 ± 0,02

	Масне киселине	Број С атома	CX6	GX6
Засићене масне киселине	Палмитинска	16,0	30,4 ± 0,4	24,1 ± 1,0
	Стеаринска	18,0	29,2 ± 5,2	31,2 ± 3,7
Мононезасићене масне киселине	Палмитолеинска	16,1	0,4 ± 0,1	/
	Олеинска	18,1n-9	22,2 ± 1,0	27,6 ± 2,5
	Вакценска	18,1n-7	1,6 ± 0,1	/
Полинезасићене масне киселине	Линолна	18,2	12,2 ± 1,4	13,6 ± 1,3
	γ-линоленска	18,3n-6	1,7 ± 0,1	/
	α-линоленска	18,3n-3	0,3 ± 0,1	/
	Дихомо-γ-линоленска	20,3	1,7 ± 0,1	5,4 ± 0,1
	Арахидонска	20,4	6,3 ± 0,1	1,9 ± 0,1

Слика 4.2. Анализа садржаја липида у изолатима свињског (CX6) и говеђег (GX6) хемоглобина хроматографијом на танком слоју силика гела (А). Стрелица представља неспецифично обојење које потиче од бутил-хидрокси-толуена. Концентрација фосфора у узорцима свињског и говеђег хемоглобина (Б). Процентни удео масних киселина у фосфолипидима изолата свињског и говеђег хемоглобина одређен гасном хроматографијом (В). Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација.



Слика 4.3. Редукција АВТS радикала свињским (CX6) и говеђим (GX6) хемоглобином. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација.

4.2. Потврда биолошке активности свињског и говеђег хемоглобина

Пре започињања експеримената у којима је анализиран утицај ванћелијског хемоглобина ксеногеног порекла на функцијска својства мезенхимских ћелија *in vitro* урађен је низ експеримената којима су испитани промена садржаја свињског и говеђег хемоглобина у културама ћелија, њихова цитотоксичност и капацитет модулације функција леукоцита периферне крви човека.

Промена садржаја свињског и говеђег хемоглобина испитана је у културама нестимулисаних и митогеном стимулисаних МНЋ и ПК-ММЋ човека. Цитотоксичност свињског и говеђег хемоглобина испитана је на моделу хуманих МНЋ. Додатно, испитано је да ли хемоглобини утичу на пролиферацију/диференцијацију одређених матичних ћелија хематопоезе периферне крви човека, и да ли модулишу адхезивност и продукцију ROS у МНЋ и ПМЋ.

4.2.1. Садржај свињског и говеђег хемоглобина у културама хуманих ћелија

Праћењем промене концентрације свињског и говеђег хемоглобина у 48-сатним културама нестимулисаних и митогеном стимулисаних МНЋ и 48- и 96-сатним културама ПК-ММ испитали смо да ли у овим културама долази до „потрошње“ хемоглобина.

Резултати приказани у табели 4.1 показали су да је концентрација хемоглобина у култури нестимулисаних МНЋ опадала на дозно зависан начин. При почетној концентрацији од 1 µM, у култури нестимулисаних МНЋ, концентрација свињског хемоглобина опала је на 83%, а концентрација говеђег хемоглобина на 75% почетне концентрације. Када су хемоглобини били додавани у почетној концентрацији од 10 µM, у културама нестимулисаних МНЋ након 48 h, концентрација свињског хемоглобина опала је на 91%, а концентрација говеђег на 83% почетне концентрације. Стимулација РНА није додатно утицала на потрошњу хемоглобина у културама МНЋ.

Након 48 h у култури са ПК-ММЋ, концентрација свињског хемоглобина у супернатантима ових култура опала је на 88% почетне концентрације када је овај хемоглобин додаван у концентрацији од 0,1 и 1 µM, и на 92% када је додаван у

концентрацији од 10 μM . Након 48 h, концентрација говеђег хемоглобина опала је на 90%, 92% и 94% од почетних 0,1, 1 и 10 μM , респективно. Након 96 h проценат „потрошеног“ хемоглобина је повећан за додатних 20% (табела 4.1).

Наши резултати показују да је уочено снижење концентрације хемоглобина у ћелијским културама било последица његове „потрошње“ од стране ћелија, а не последица његовог неспецифичног лепљења за површину плоча за ћелијску културу.

Табела 4.1. Промена концентрације свињског и говеђег хемоглобина у ћелијским културама испитана на хуманим МНЋ и ПК-ММЋ. Вредности приказане у табели представљају проценат од почетне концентрације хемоглобина у ћелијским културама. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација.

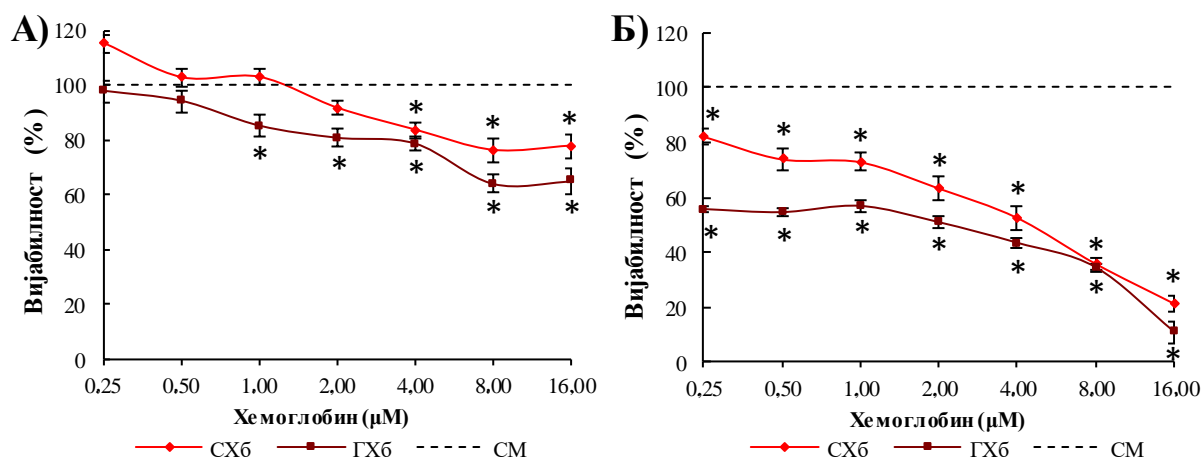
%	Свињски хемоглобин			Говеђи хемоглобин		
	0,1 μM	1 μM	10 μM	0,1 μM	1 μM	10 μM
МНЋ (48h)	/	83 \pm 5	91 \pm 7	/	75 \pm 4	83 \pm 7
МНЋ + РНА (48h)	/	79 \pm 7	89 \pm 9	/	77 \pm 10	89 \pm 11
ПК-ММЋ (48h)	88 \pm 1	88 \pm 2	92 \pm 1	90 \pm 2	92 \pm 2	94 \pm 2
ПК-ММЋ (96h)	68 \pm 3	70 \pm 3	79 \pm 2	77 \pm 2	74 \pm 1	81 \pm 3

4.2.2. Испитивање цитотоксичности свињског и говеђег хемоглобина на моделу МНЋ периферне крви човека

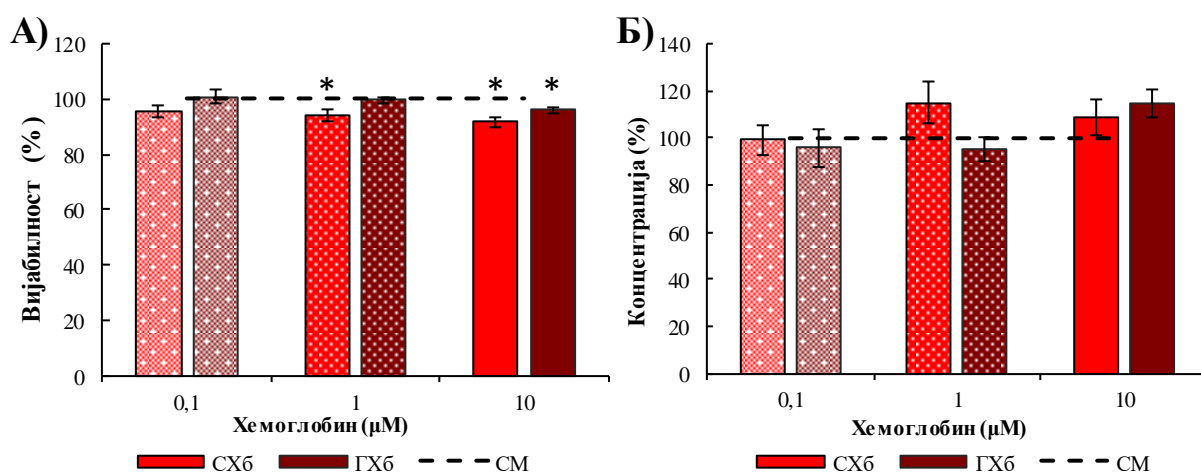
Могући цитотоксични ефекат свињског и говеђег хемоглобина на МНЋ испитан је МТТ тестом и бојењем трипан плавим.

МТТ тест је показао да је свињски хемоглобин значајно смањивао вијабилности нестимулисаних МНЋ у концентрацијама вишим од 4 μM , док је овај ефекат говеђи хемоглобин показао у концентрацијама вишим од 1 μM (слика 4.4. А). У културама МНЋ стимулираним РНА и свињски и говеђи хемоглобин су значајно, на дозно зависан начин, смањивали вијабилности ових ћелија у свим испитиваним концентрацијама (слика 4.4. Б).

Бојењем ћелија трипан плавим и бројањем у хемоцитометру показано је да хемоглобини у концентрацији од 0,1 μM не утичу на вијабилност нестимулисаних МНЋ након пет дана култивације (слика 4.5.А). Свињски хемоглобин је у концентрацијама од 1 и 10 μM смањивао вијабилности нестимулисаних МНЋ, док је овакав ефекат за говеђи хемоглобин запажен само у концентрацији од 10 μM . Ни у једној испитиваној концентрацији, ни свињски ни говеђи хемоглобин нису довели до промене концентрације (броја) нестимулисаних МНЋ (слика 4.5.Б). Стимулисане МНЋ у култури са свињским и говеђим хемоглобином није било могуће бројати овом методом због великих кластера (ћелијских агрегата) који су се формирали као резултат стимулације митогеном.



Слика 4.4. Вијабилност нестимулисаних (А) и митогеном стимулисаних (Б) МНЋ након 5 дана у култури са свињским (СХ6) и говеђим (ГХ6) хемоглобином, одређена МТТ тестом. Вијабилност МНЋ са хемоглобином изражена је као проценат вијабилности нестимулисаних (А) или митогеном стимулисаних (Б) МНЋ у стандардном медијуму за гајење ћелија без хемоглобина (СМ) (додељена вредност 100%; испрекидана линија). Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација. (*) означава статистички значајну разлику у вијабилности МНЋ култивисаних са хемоглобином у односу на МНЋ гајене у СМ.



Слика 4.5. Вијабилност (А) и концентрација (Б) нестимулисаних МНЋ након 5 дана у култури са свињским (СХ6) и говеђим (ГХ6) хемоглобином, одређена бојењем ћелија трипан плавим и бројањем у хемоцитометру. Вијабилност и концентрација изражене су као проценат вијабилности и концентрације МНЋ гајених у стандардном медијуму за гајење ћелија (СМ) без хемоглобина (100%; испрекидана линија). Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација. (*) означава статистички значајну разлику у вијабилности МНЋ култивисаних са хемоглобином у односу на МНЋ гајене у СМ.

4.2.3. Утицај свињског и говеђеог хемоглобина на пролиферацију/диференцијацију одређених матичних ћелија хематопоезе периферне крви човека

Утицај хемоглобина на пролиферацију/диференцијацију одређених матичних ћелија хематопоезе периферне крви човека испитиван је СFC тестом.

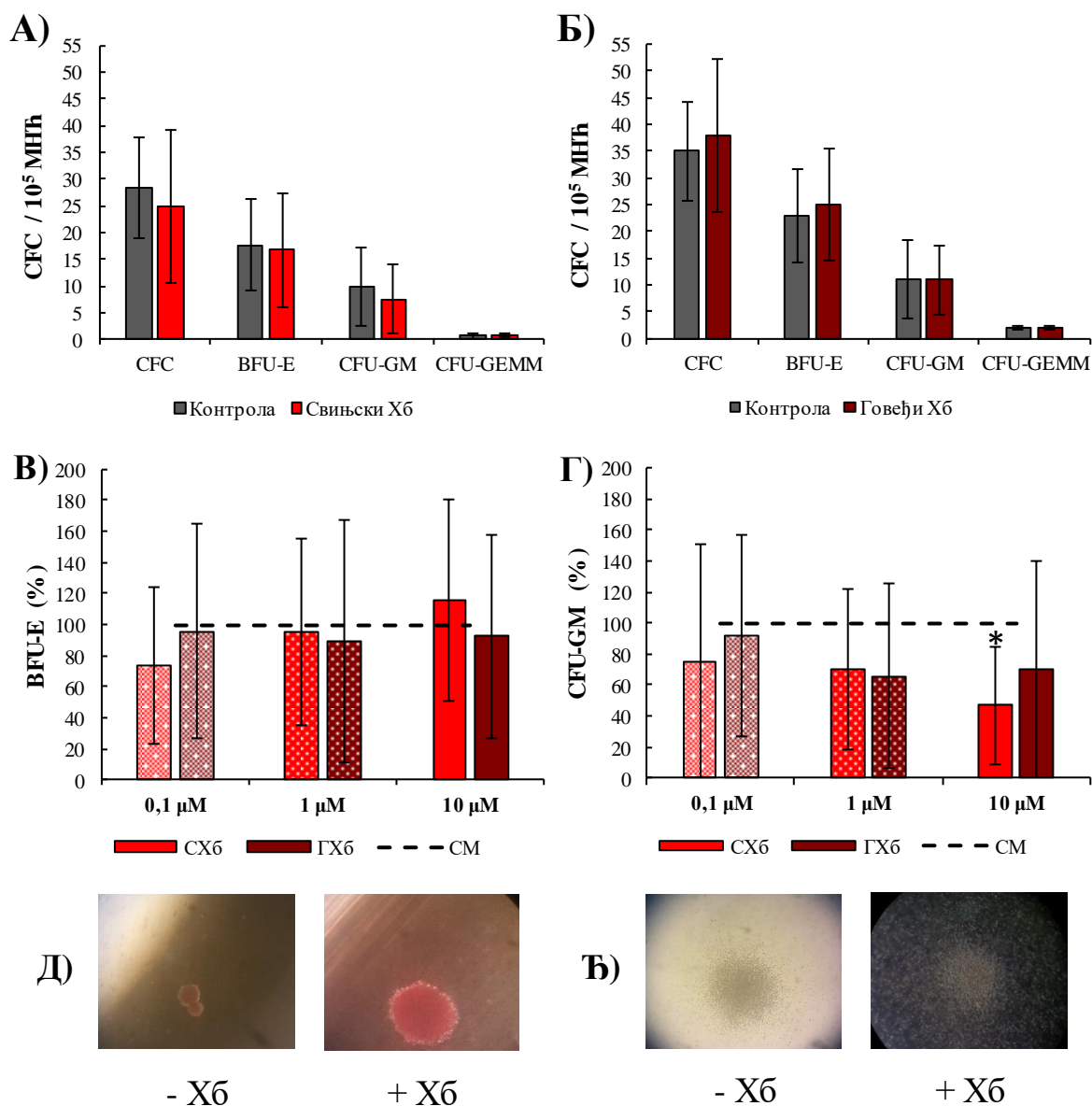
Статистичка анализа свих добијених података показала је да ни свињски ни говеђи хемоглобин у концентрацији од 1 μM нису доводили до значајне разлике средње вредности броја укупних колонија (СFC), као ни појединих типова колонија формираних од

еритроидних прекурсора, (BFU-E), прекурсора гранулоцитно-моноцитних (CFU-GM) и прекурсора заједничких за ћелије еритроидне и мијелоидне лозе (еритроците, гранулоците, моноците и мегакариоците; CFU-GEMM) (слика 4.6).

Овакви резултати статистичке обраде података су били последица великих индивидуалних варијација у броју колонија хематопоетских прекурсора која је постојала између самих давалаца (табела 4.2). Сходно ефекту који су свињски и говеђи хемоглобин остварили на број BFU-E и CFU-GM колонија код одређених давалаца, даваоци су подељени у седам група. Прву групу чинили су даваоци код којих су свињски и говеђи хемоглобин повећавали број и BFU-E, и CFU-GM. Другу групу чине даваоци код којих су свињски и говеђи хемоглобин смањивали број ових колонија. Код треће групе давалаца, хемоглобин је повећавао број BFU-E и смањивао број CFU-GM, док је код четврте групе давалаца ефекат хемоглобина био супротан: смањивао је број BFU-E и повећавао број CFU-GM. Код пете групе давалаца, хемоглобин није мењао број BFU-E, док је повећао или смањивао број CFU-GM. Ни свињски, ни говеђи хемоглобин нису остварили ефекат на број CFC-GM код давалаца шесте групе, док су смањивали број BFU-E. Код само једног испитиваног даваоца (сврстаног у седму групу) хемоглобини нису утицали на број BFU-E ни CFU-GM колонија.

У циљу детаљнијег испитивања ефекта хемоглобина на пролиферацију/диференцијацију опредељених матичних ћелија хематопоезе, МНЋ три давалаца инкубиране су са хемоглобинима у ширем опсегу концентрација (0,1, 1, и 10 μM) и анализиран је број формираних CFC. Резултати су потврдили постојање великих индивидуалних варијација у одговору хематопоетских прекурсора периферне крви на суплементацију хемоглобином. Тако ни свињски ни говеђи хемоглобин нису утицали на способност формирања BFU-E колонија ни у једној од испитиваних концентрација (слика 4.6. В). Значајно смањење у броју CFC-GM колонија забележено је само код МНЋ гајених у присуству 10 μM свињског хемоглобина (слика 4.6. Г). С обзиром да је број CFU-GEMM код свих испитиваних давалаца био изразито мали (≤ 2), ови резултати нису приказани.

Иако је су показане велике интериндивидуалне варијације у квантитативном одговору опредељених ћелија хематопотезе на 1 μM хемоглобин обе анализиране врсте (табела 4.2), код свих давалаца је запажено да је присуство хемоглобина, без обзира какав је утицај имало на број CFC, снажно утицало је на морфологију колонија, тако да су колоније формиране у присуству хемоглобина биле крупније од оних формираних у CM без додатка хемоглобина (слика 4.6. Д, Ђ).



Слика 4.6. Број колонија одређених матичних ћелија хематопоезе периферне крви човека гајених у присуству 1 μМ свињског (СХ6) (А) или 1 μМ говеђега хемоглобина (ГХ6) (Б). CFC – укупан број колонија, BFU-E (еритроидни прекурсори), CFU-GM (прекурсори гранулоцитно-моноцитне лозе), CFU-GEMM (прекурсори заједнички за еритроидну и мијелоидну лозу). Резултати су приказани као број CFC по броју засејаних МНТ. Број BFU-E (В) и CFU-GM колонија (Г) формираних у присуству 0,1, 1 и 10 μМ свињског и говеђега хемоглобина. Број BFU-E и CFU-GM колонија гајених у стандардном медијуму без хемоглобина (СМ) означен је као 100% и приказан испрекиданом линијом. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација. (*) означава статистички значајну разлику у броју CFU-GM МНТ са хемоглобином у односу на број CFU-GM МНТ гајених у СМ. Репрезентативне микрографије BFU-E (Д) и CFU-GM (Ђ) формираних у СМ (-Х6) или у присуству 1 μМ хемоглобина (+Х6).

Табела 4.2. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на пролиферацију/диференцијацију одређених матичних ћелија хематопоезе периферне крви човека; Преглед по даваоцима МНТ. CFC – укупан број колонија, BFU-E (еритроидни прекурсор), CFU-GM (прекурсор гранулоцитно-моноцитне лозе), CFU-GEMM (прекурсор заједнички за еритроидну и мијелоидну лозу). Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација.

I група: повећање броја BFU-E, повећање броја CFU-GM (↑ ↑)

Колоније	ИМДМ				Свињски хемоглобин			
	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC
Давалац 1	22±1	19±1	1±1	42±1	33±7	23±4	2,5±1	58±10

Колоније	ИМДМ				Говеђи хемоглобин			
	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC
Давалац 1	54±3	7±1	7±1	68±5	75±3	22±2	7±1	104±7
Давалац 12	29±3	11±1	4±1	44±4	46±4	22±3	3±1	71±6

II група: смањење броја BFU-E, смањење броја CFU-GM (↓ ↓)

Колоније	ИМДМ				Свињски хемоглобин			
	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC
Давалац 3	26±1	13±1	/	39±1	12±1	3±1	1±1	15±1
Давалац 4	12±1	4±1	/	16±2	8±1	2±1	/	11±2
Давалац 10	6±1	20±2	/	26±2	3±1	15±4	/	18±5

Колоније	ИМДМ				Говеђи хемоглобин			
	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC
Давалац 3	26±2	13±1	/	39±3	13,5±1	9,5±1	1±1	24±2
Давалац 5	2±1	20±1	/	23±2	/	16±1	/	16±1
Давалац 7	21±2	4±1	1±1	26±3	14±1	2±1	/	16±2

III група: повећање броја BFU-E, смањење броја CFU-GM (↑ ↓)

Колоније	ИМДМ				Свињски хемоглобин			
	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC
Давалац 5	2±1	20±1	/	23±2	1±1	9±3	/	10±3
Давалац 7	21±1	4±1	1±1	26±3	27±2	3±1	/	30±3

Колоније	ИМДМ				Говеђи хемоглобин			
	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC
Давалац 1	22±2	19±3	1±1	42±4	28±1	12±4	2±1	42±4
Давалац 4	12±1	4±1	N,D,	16±2	13±1	1±1	1±1	15±1

IV група: смањење броја BFU-E, повећање броја CFU-GM (↓ ↑)

Колоније	ИМДМ				Свињски хемоглобин			
	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC
Давалац 8	21±1	1±1	1±1	23±1	18±2	4±1	1±1	23±3

Табела 4.2. Наставак.

V група: VFU-E без промене, смањење/повећање броја CFU-GM (= ↓)

Колоније	IMDM				Свињски хемоглобин			
	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC
Давалац 2	23±2	7±1	4±1	34±4	23±2	4±1	2±1	29±4

Колоније	IMDM				Говеђи хемоглобин			
	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC
Давалац 13	46±3	8±1	2±1	56±4	46±6	15±2	3±1	64±6
Давалац 10	6±1	20±2	/	26±3	6±1	6±1	/	12±1

VI група: смањење броја VFU-E, CFU-GM без промене (↓ =)

Колоније	IMDM				Свињски хемоглобин			
	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC
Давалац 9	14±1	1±1	1±1	15±2	12±1	2±1	/	14±2

Колоније	IMDM				Говеђи хемоглобин			
	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC
Давалац 9	14±1	1±1	/	15±1	10±1	1±1	/	11±1

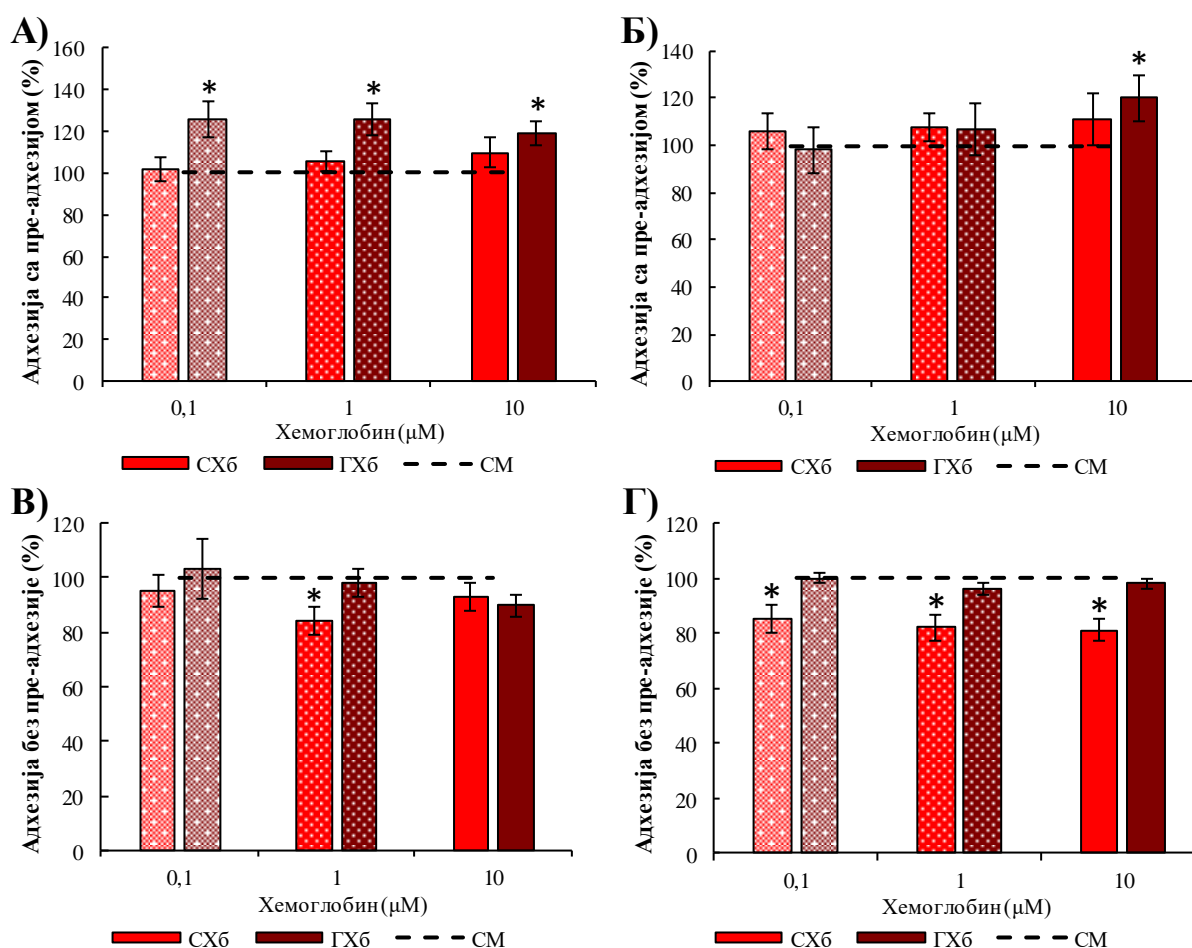
VII група: VFU-E без промене, CFU-GM без промене (= =)

Колоније	IMDM				Свињски хемоглобин			
	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC	BFU-E	CFC-GM	CFC-GEMM	CFC
Давалац 6	31±3	8±1	1±1	40±3	29±5	10±2	2±1	41±3

4.2.4. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на адхезивност леукоцита периферне крви човека

Испитивање утицаја хемоглобина на адхезивност леукоцита периферне крви човека рађено је на два начина: са и без пре-адхезије, а ефекат хемоглобина испитиван је на МНЂ и ПМЂ (слика 4.7, прилози 1 и 2). Када су МНЂ остављене да адхерирају пре инкубације са хемоглобином (пре-адхезија), свињски хемоглобин није имао утицаја на адхезивност ових ћелија, док ју је говеђи хемоглобин стимулисао у свим испитиваним концентрацијама (0,1, 1 и 10 μM) (слика 4.7. А). Свињски хемоглобин није имао ефекта ни на адхезивност ПМЂ у тесту са пре-адхезијом, док је говеђи хемоглобин статистички значајно стимулисао адхезивност ових ћелија само у концентрацији од 10 μM (слика 4.7.Б).

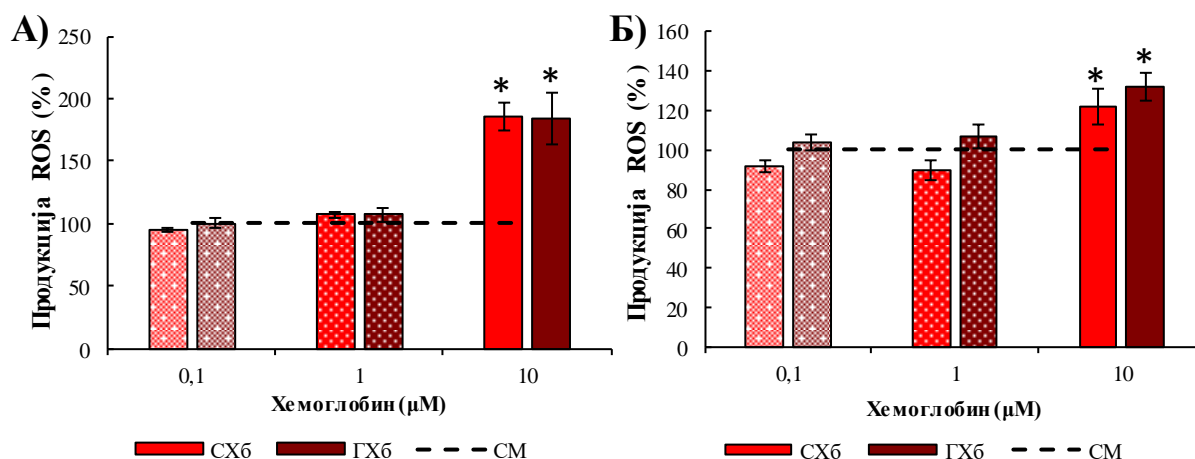
Свињски хемоглобин доводио је до смањења адхезивности МНЂ у тесту без пре-адхезије у концентрацији од 1 μM (слика 4.7. В). Исти ефекат остварен је на ПМЂ инкубираним са свињским хемоглобином у свим испитиваним концентрацијама (слика 4.7. Г). За разлику од свињског, говеђи хемоглобин није остварио ефекат на адхезивност МНЂ и ПМЂ у тесту без пре-адхезије (слика 4.7. В, Г).



Слика 4.7. Утицај свињског (CX6) и говеђег (GX6) хемоглобина на адхезивност МНЂ (А, В) и ПМЂ (Б, Г) испитана у тесту са пре-адхезијом (А, Б) или тесту без пре-адхезије (В, Г). Резултати су приказани као проценат адхезивности МНЂ или ПМЂ гајених у стандардном медијуму за гајење ћелија без хемоглобина (СМ) чија је вредност означена као 100% и која је приказана испрекиданом линијом. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација. (*) означава статистички значајну разлику у адхезивности ћелија култивисаних са хемоглобином у односу на ћелије гајене у СМ.

4.2.5. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на продукцију ROS у леукоцитима периферне крви човека

NBT тестом је показано да су и свињски и говеђи хемоглобин стимулисали продукцију ROS у МНЂ и ПМЂ само у највишој испитиваној концентрацији од 10 μM (слика 4.8. А, Б, прилог 3), при чему је стимулаторни ефекат на МНЂ био израженији.



Слика 4.8. Утицај свињског (CX6) и говеђег (GX6) хемоглобина на продукцију ROS у МНЂ (А) и ПМЂ (Б). Резултати су приказани као проценат продукције ROS у МНЂ/ПМЂ гајених у стандардном медијуму за гајење ћелија без хемоглобина (CM) чија је вредност означена као 100% и која је приказана испрекиданом линијом. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација. (*) означава статистички значајну разлику у продукцији ROS од стране МНЂ/ПМЂ култивисаних са хемоглобином у односу на МНЂ/ПМЂ гајене у CM.

4.3. Испитивање утицаја свињског и говеђег хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија

Утицај свињског и говеђег хемоглобина на функцијске карактеристике примарних мезенхимских матичних ћелија испитан је анализом ефекта хемоглобина на вијабилност, капацитет формирања колонија, ћелијски циклус и апоптозу, миграцију и диференцијацију ПК-ММЂ ка хондрогеној, остеогеној, адипогеној и миогеној лози. Поред ефекта ксеногених хемоглобина на примарне хумане мезенхимске ћелије, испитан је и њихов ефекат на вијабилност, миграторни и диференцијациони потенцијал ка хондрогеној, остеогеној, адипогеној и миогеној лози четири мишје ћелијске линије: ATDC5, MC3T3-E1 и 3T3-L1 и C2C12.

Утицај хемоглобина на имуномодулаторни ефекат ПК-ММЂ испитан је анализом утицаја ПК-ММЂ на апоптозу, ћелијски циклус и пролиферацију алогених МНЂ, као и на експресију гена за неке од имуномодулаторних протеина ММЂ.

4.3.1. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на вијабилност мезенхимских ћелија

Утицај хемоглобина на вијабилност ПК-ММЂ током тродневне култивације испитан је МТТ тест и Ноеchst бојењем, док је утицај хемоглобина на вијабилност ћелијских линија испитан МТТ тестом. Пре испитивања ефекта хемоглобина, МТТ тестом је показано да се вијабилност свих испитиваних ћелија спонтано повећавала током 72 h култивације, али да је динамика повећања била специфична за сваки тип ћелија (слика 4.9. А, слика 4.10. А, Г и слика 4.11. А, Г).

Резултати МТТ теста показали су да ни свињски ни говеђи хемоглобин нису утицали на вијабилност ПК-ММЂ након 24 и 48 h. Након 72 h, хемоглобини обе врсте у

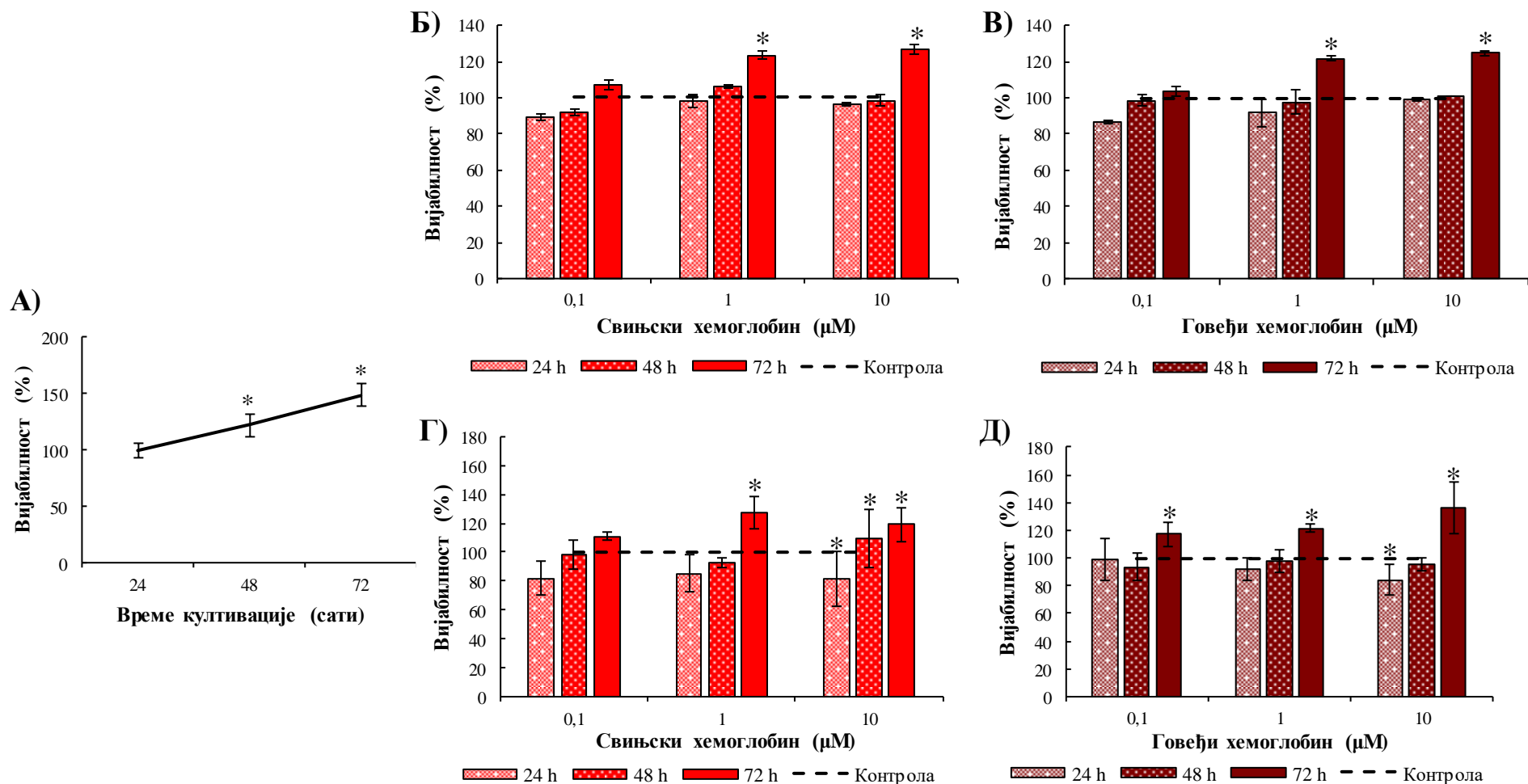
концентрацијама од 1 и 10 μM стимулисали су вијабилност ПК-ММЋ, док у најнижој концентрацији (0,1 μM) нису показали ефекат (слика 4.9. Б, В). Сличан тренд запажен је и при анализи вијабилности ПК-ММЋ Ноеchst бојењем. И свињски и говеђи хемоглобин су након 72 h значајно повећавали вијабилности ПК-ММЋ у концентрацијама од 1 и 10 μM , али је овим тестом показан и значајан стимулаторни ефекат говеђег хемоглобина у концентрацији од 0,1 μM након 72 h, који свињски хемоглобин није имао. Додатно, показано је да су хемоглобини обе врсте смањивали вијабилност ПК-ММЋ након 24 h у концентрацији од 10 μM . У истој концентрацији свињски хемоглобин је повећавао вијабилност ПК-ММЋ и након 48 h.

Свињски и говеђи хемоглобин су у свим испитиваним концентрацијама смањивали вијабилност АТDC5 ћелија након 48 и 72 h. Након 24 h инхибиторни ефекат показан је само за говеђи хемоглобин у концентрацији од 10 μM (слика 4.10. Б, В).

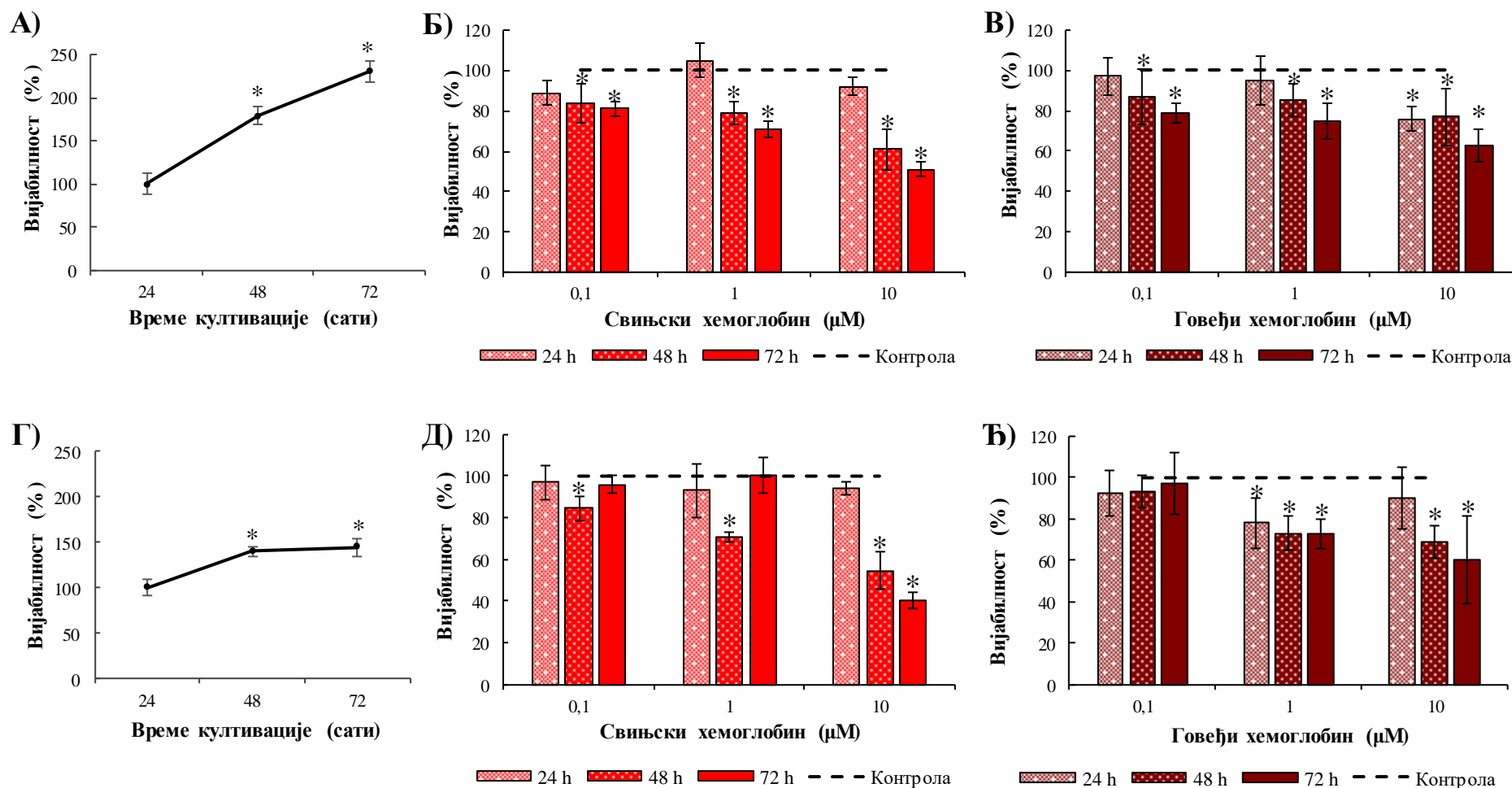
Хемоглобини обе животињске врсте су у концентрацији од 10 μM смањивали вијабилност МС3Т3-Е1 ћелија након 48 и 72 h. Након 48 h свињски хемоглобин је смањивао вијабилност ових ћелија у концентрацијама од 0,1 и 1 μM (слика 4.10. Д). Говеђи хемоглобин је испољио исти инхибиторни ефекат на вијабилност МС3Т3-Е1 ћелија у концентрацији од 1 μM у сва три испитивана термина (слика 4.10. Ђ).

Свињски хемоглобин је у концентрацијама од 0,1 и 1 μM након 48 и 72 h повећавао вијабилност 3Т3-Л1 ћелија, док је концентрација од 10 μM доводила до смањења вијабилности у свим испитиваним терминима (слика 4.11. Б). Вијабилност 3Т3-Л1 ћелија култивисаних са говеђим хемоглобином била је повећана при свим испитиваним концентрацијама хемоглобина и терминима, изузев концентрације 10 μM која је након 24 h доводила до израженог смањења вијабилности (слика 4.11. В).

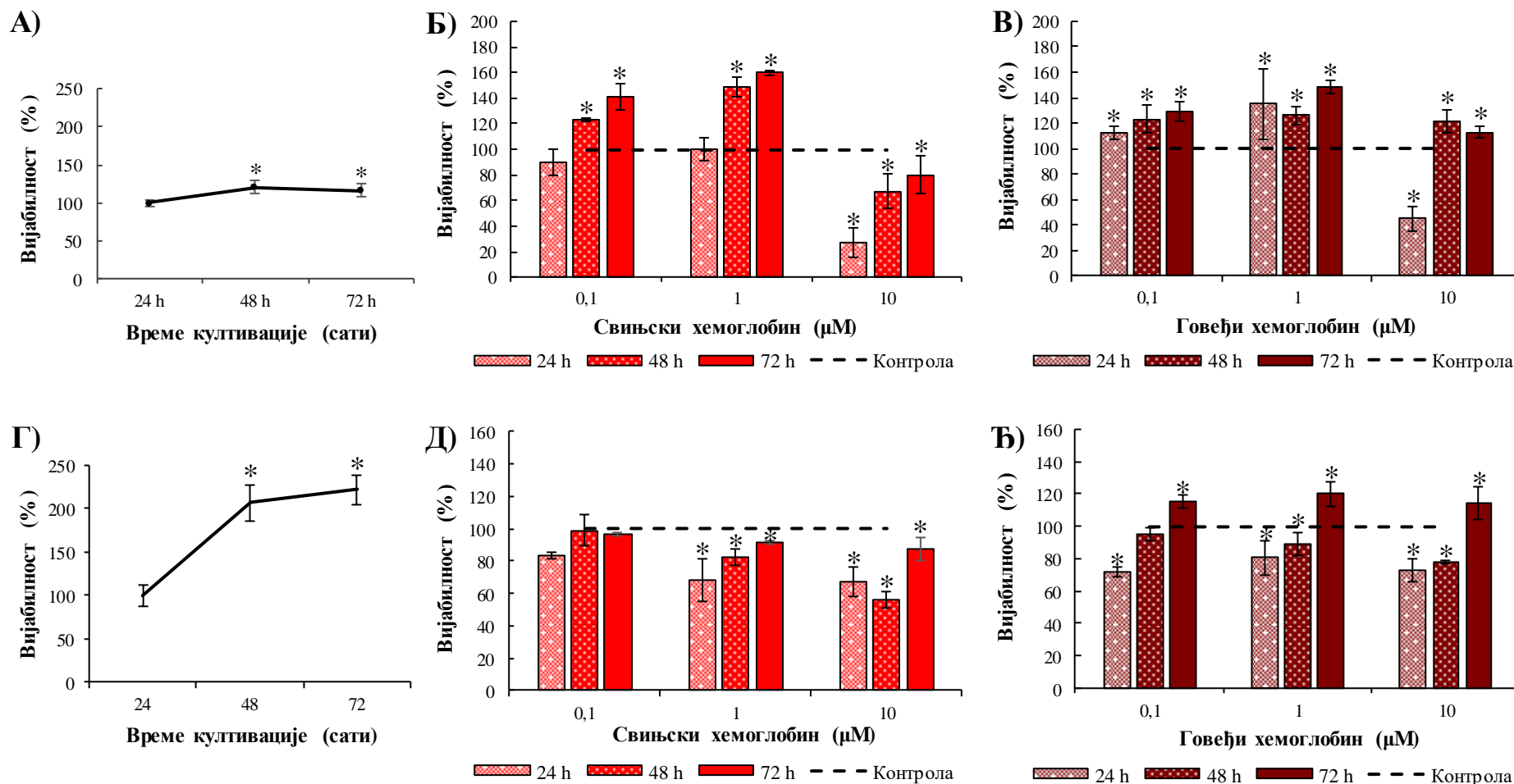
Свињски хемоглобин је значајно смањивао вијабилност С2С12 ћелија у концентрацијама од 1 и 10 μM у свим испитиваним терминима, док у концентрацији од 0,1 μM није имао ефекта (слика 4.11. Д). Говеђи хемоглобин је у све три испитиване концентрације смањивао вијабилност С2С12 ћелија након 24 h, док је након 48 h овај инхибиторни ефекат испољио само при концентрацијама од 1 и 10 μM . Након 72 h говеђи хемоглобин је у све три испитиване концентрације повећавао вијабилност С2С12 ћелија (слика 4.11. Ђ).



Слика 4.9. Утицај говеђе и свињског хемоглобина на вијабилност ПК-МНЋ. Спонтанна вијабилност ПК-ММЋ (А). Утицај свињског (Б,Г) и говеђе (В,Д) хемоглобина на вијабилност ПК-ММЋ анализиран МТТ тестом (Б, В) и Ноечст бојењем (Г, Д). Резултати су приказани као проценат вијабилности ПК-ММЋ гајених у стандардном медијуму за гајење ћелија (СМ) чија је вредност означена као 100% и приказана испрекиданом линијом. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација. (*) означава статистички значајну разлику у вијабилности ПК-ММЋ култивисаних са хемоглобином у односу на ПК-ММЋ гајене у СМ.



Слика 4.10. Утицај говеђег и свињског хемоглобина на вијабилност ATDC5 и MC3T3-E1 ћелија. Спонтана вијабилност ATDC5 (А) и MC3T3-E1 (Г) ћелија. Утицај свињског (Б) и говеђег (В) хемоглобина на вијабилност ATDC5 ћелија. Утицај свињског (Д) и говеђег (Ђ) хемоглобина на вијабилност MC3T3-E1 ћелија. Резултати су приказани као проценат вијабилности ATDC5 и MC3T3-E1 ћелија гајених у стандардном медијуму за гајење ћелија (CM) чија је вредност означена као 100% и приказана испрекиданом линијом. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација. (*) означава статистички значајну разлику у вијабилности ATDC5 и MC3T3-E1 ћелија култивисаних са хемоглобином у односу на ATDC5 и MC3T3-E1 ћелије гајене у CM.



Слика 4.11. Утицај говеђег и свињског хемоглобина на вијабилност 3Т3-Л1 и C2C12 ћелија. Спонтаност вијабилност 3Т3-Л1 (А) и C2C12 (Г) ћелија. Утицај свињског (Б) и говеђег (В) хемоглобина на вијабилност 3Т3-Л1 ћелија. Утицај свињског (Д) и говеђег (Е) хемоглобина на вијабилност C2C12 ћелија. Резултати су приказани као проценат вијабилности 3Т3-Л1 и C2C12 ћелија гајених у стандардном медијуму за гајење ћелија (СМ) чија је вредност означена као 100% и приказана испрекиданом линијом. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација. (*) означава статистички значајну разлику у вијабилности 3Т3-Л1/C2C12 ћелија култивисаних са хемоглобином у односу на 3Т3-Л1 и C2C12 ћелије гајене у СМ.

4.3.2. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на ћелијски циклус и апоптозу мезенхимских ћелија

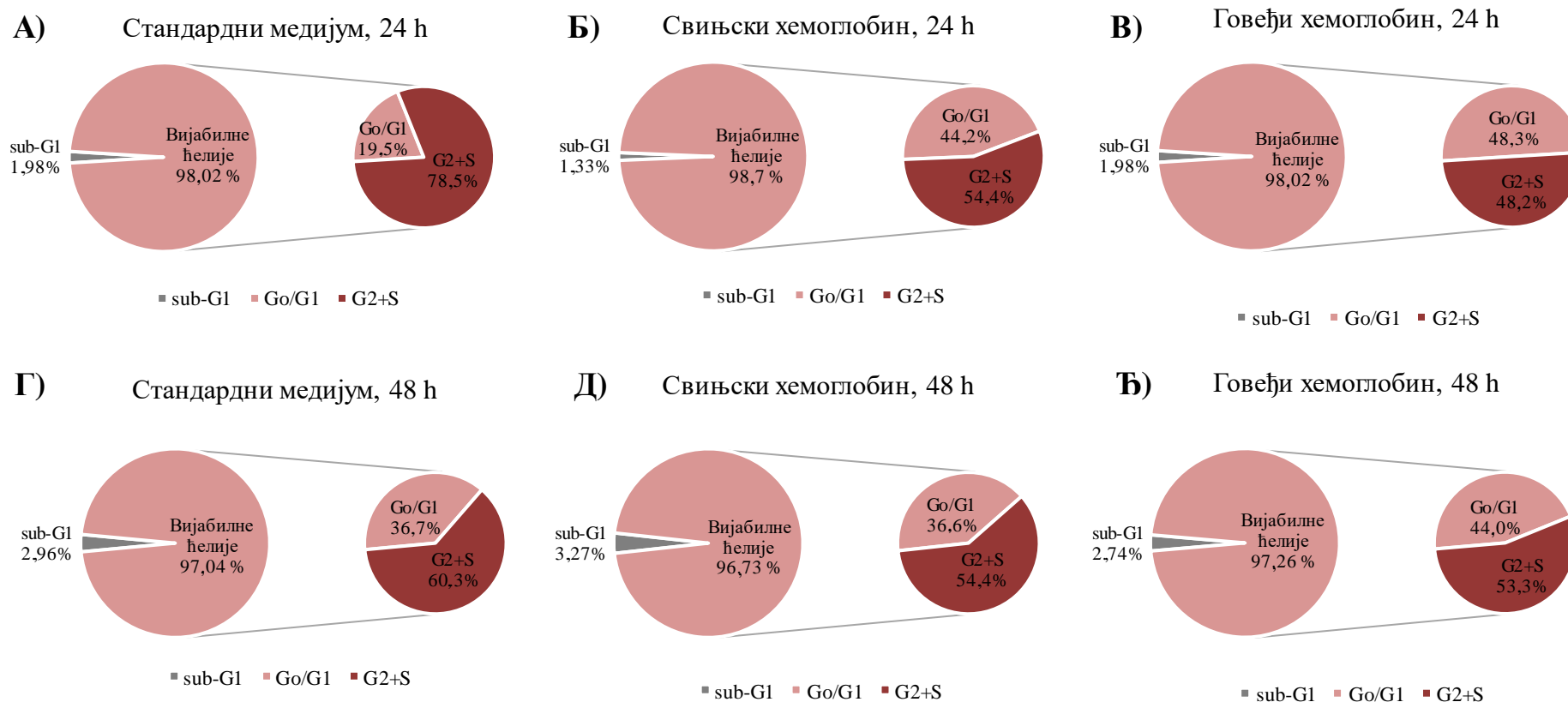
Утицај свињског и говеђег хемоглобина у концентрацији од 0,1 μM на ћелијски циклус ПК-ММЋ анализиран је у 24 и 48 h културама (слика 4.12). Проточна цитометрија ПК-ММЋ обојених пропидијум јодидом показала је да присуство свињског и говеђег хемоглобина није значајно утицало на број апоптотских ћелија. Међутим, број ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса у културама са хемоглобином је након 24 h био двоструко већи од њиховог броја у контролним културама (слика 4.12. А, Б, В). Након 48 h у култури овај ефекат се изгубио, тако да се проценат ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса у културама са додатком хемоглобина и културама гајеним само у стандардном медијуму није значајно разликовао (слика 4.12. Г, Д, Ђ).

4.3.3. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на клоногени потенцијал мезенхимских ћелија

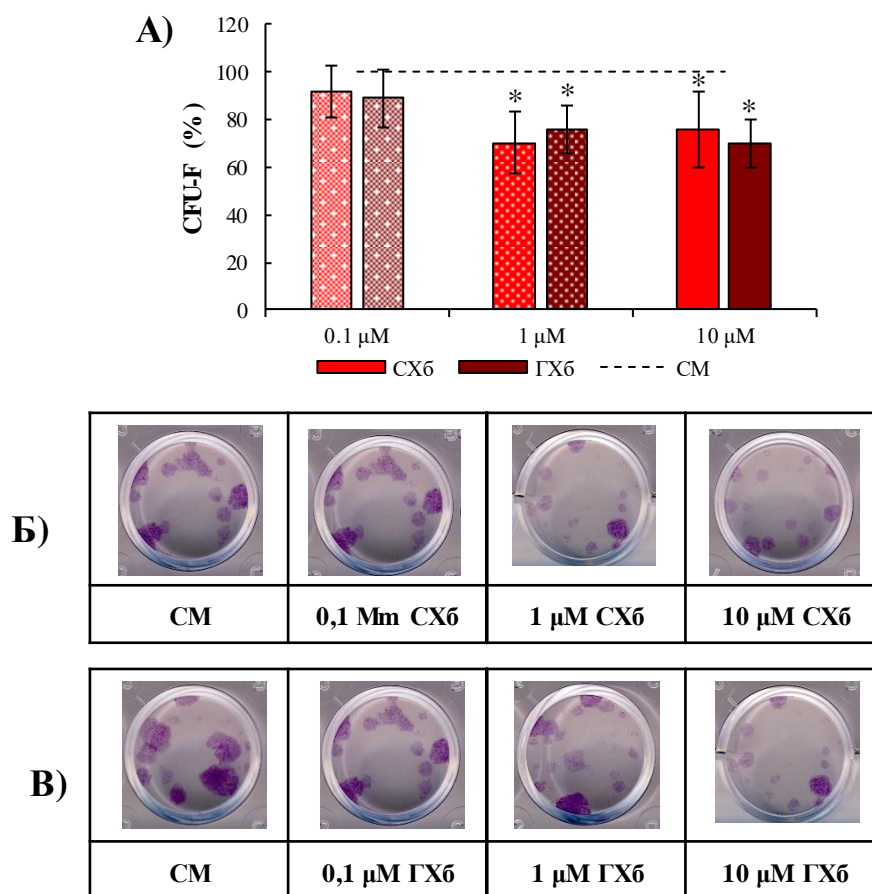
Клоногени потенцијал ПК-ММЋ анализиран је CFU-F тестом. Резултати теста су показали да су и свињски и говеђи хемоглобин у концентрацијама од 1 и 10 μM смањивали број CFU-F колонија, док у концентрацији од 0,1 μM нису утицали на клоногени потенцијал ПК-ММЋ (слика 4.13. А).

4.3.4. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на миграторни потенцијал мезенхимских ћелија

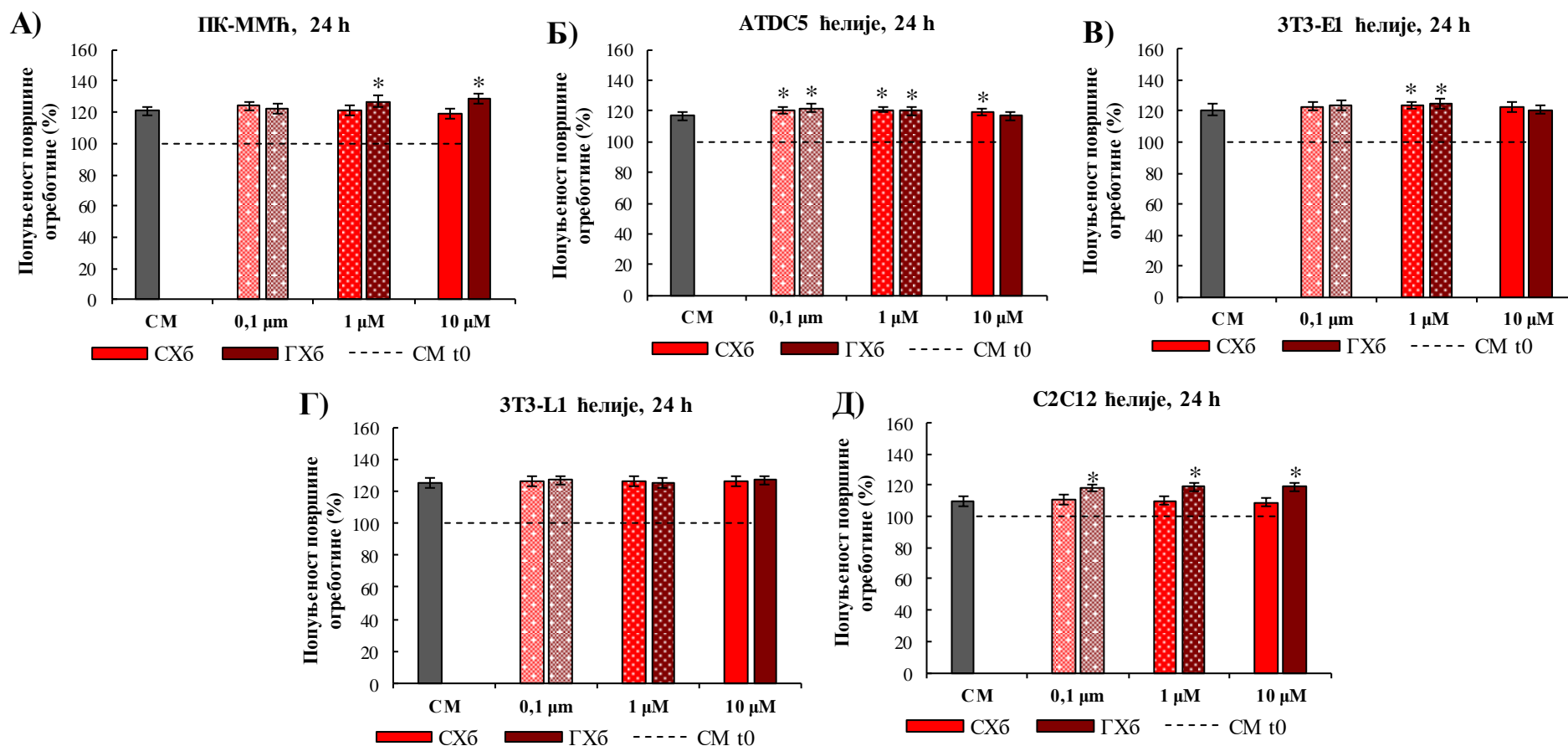
Утицај свињског и говеђег хемоглобина у концентрацијама од 0,1, 1 и 10 μM на миграторни потенцијал мезенхимских ћелија анализиран је „*scratch*” тестом (слика 4.14., прилог 4). Добијени резултати показали су да су након 24 h све анализирани мезенхимске ћелије, примарне хумане ПК-ММЋ и мишје ћелијске линије (ATDC5, MC3T3-E1, 3T3-L1 и C2C12), имале способност спонтане миграције и да су хемоглобини благо модулисали миграцију ових ћелија (слика 4.14., прилог 4). Ефекат хемоглобина зависио је од врсте из које је изолован и типа анализираних ћелија. Свињски хемоглобин није утицао на миграцију ПК-ММЋ ни у једној испитиваној концентрацији, док ју је говеђи хемоглобин стимулисано само у вишим концентрацијама (1 и 10 μM) (слика 4.14. А). Миграција ATDC5 ћелија била је стимулисана у присуству све три испитиване концентрације свињског хемоглобина (0,1, 1 и 10 μM) и у присуству 0,1 и 1 μM говеђег хемоглобина (слика 4.14. Б). Свињски и говеђи хемоглобин стимулисали су миграцију MC3T3-E1 ћелија само у концентрацији од 1 μM (слика 4.14. В). 3T3-L1 ћелије имале су изражену способност спонтане миграције која је након 24 h резултовала у потпуном затварању „огреботине“. Због овако високог нивоа спонтане миграције, стимулаторни утицај хемоглобина није могао бити примећен, али је сигурно да хемоглобини нису смањивали миграторни потенцијал ових ћелија (слика 4.14. Г). Након 24 h у култури са свињским хемоглобином, миграторни потенцијал C2C12 ћелија остао је непромењен, док је говеђи хемоглобин стимулисао миграцију ових ћелија у свим испитиваним концентрацијама (слика 4.14. Д).



Слика 4.12. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на апоптозу и ћелијски циклус ПК-ММЋ. Процент вијабилних и апоптотичних (sub-G1) ПК-ММЋ у стандардном медијуму за гајење ћелија без хемоглобина (СМ) након 24 h у култури (А) и 48 h у култури (Г). Утицај свињског (Б, Д) и говеђег (В, Ђ) хемоглобина на проценат апоптотских ПК-ММЋ и ћелијски циклус вијабилних ПК-ММЋ након 24 h у култури (Б, В) и 48 h у култури (Д, Ђ).



Слика 4.13. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на клонотени потенцијал (број CFU-F) ПК-ММЋ (А). Резултати су приказани као проценат укупног броја колонија ПК-ММЋ гајених у стандардном медијуму за гајење ћелија без хемоглобина (СМ) чија је вредност означена као 100% и приказана испрекиданом линијом. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација. (*) означава статистички значајну разлику у броју колонија ПК-ММЋ култивисаних са хемоглобином у односу на број колонија ПК-ММЋ гајених у СМ. Репрезентативне микрографије CFU-F формираних у присуству различитих концентрација свињског (Б) и говеђег (В) хемоглобина.



Слика 4.14. Утицај свињског (CX6) и говеђег (GX6) хемоглобина на миграциони потенцијал ПК-ММћ (А), АТДС5 (Б), МС3Т3-Е1 (В), 3Т3-Л1 (Г) и С2С12 ћелија (Д) након 24 h у култури. Резултати су приказани као проценат попуњености површине огреботине у култури одговарајућих ћелија у односу на површину огреботине у почетном тренутку (CM t₀) којој је додељена вредност 100% и приказана је испрекиданом линијом. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација. (*) означава статистички значајну разлику у попуњености површине огреботине ћелија култивисаних са хемоглобином у односу на попуњеност површине огреботине у култури ћелија гајених у стандардном медијуму за култивацију ћелија (CM).

4.3.5. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на диференцијациони потенцијал мезенхимских ћелија

Утицај свињског и говеђег хемоглобина на диференцијациони потенцијал мезенхимских ћелија испитиван је и на хуманим примарним ћелијама (ПК-ММЋ) и ћелијским линијама миша (АТDC5, МС3Т3-Е1, 3Т3-Л1 и С2С12). Диференцијација ових ћелија ка одређеној лози (хондрогена, остеогена, адипогена и миогена) прво је детектована хистохемијским методима, а затим потврђена анализом експресије гена специфичних за одређени тип диференцијације, методом RT-PCR.

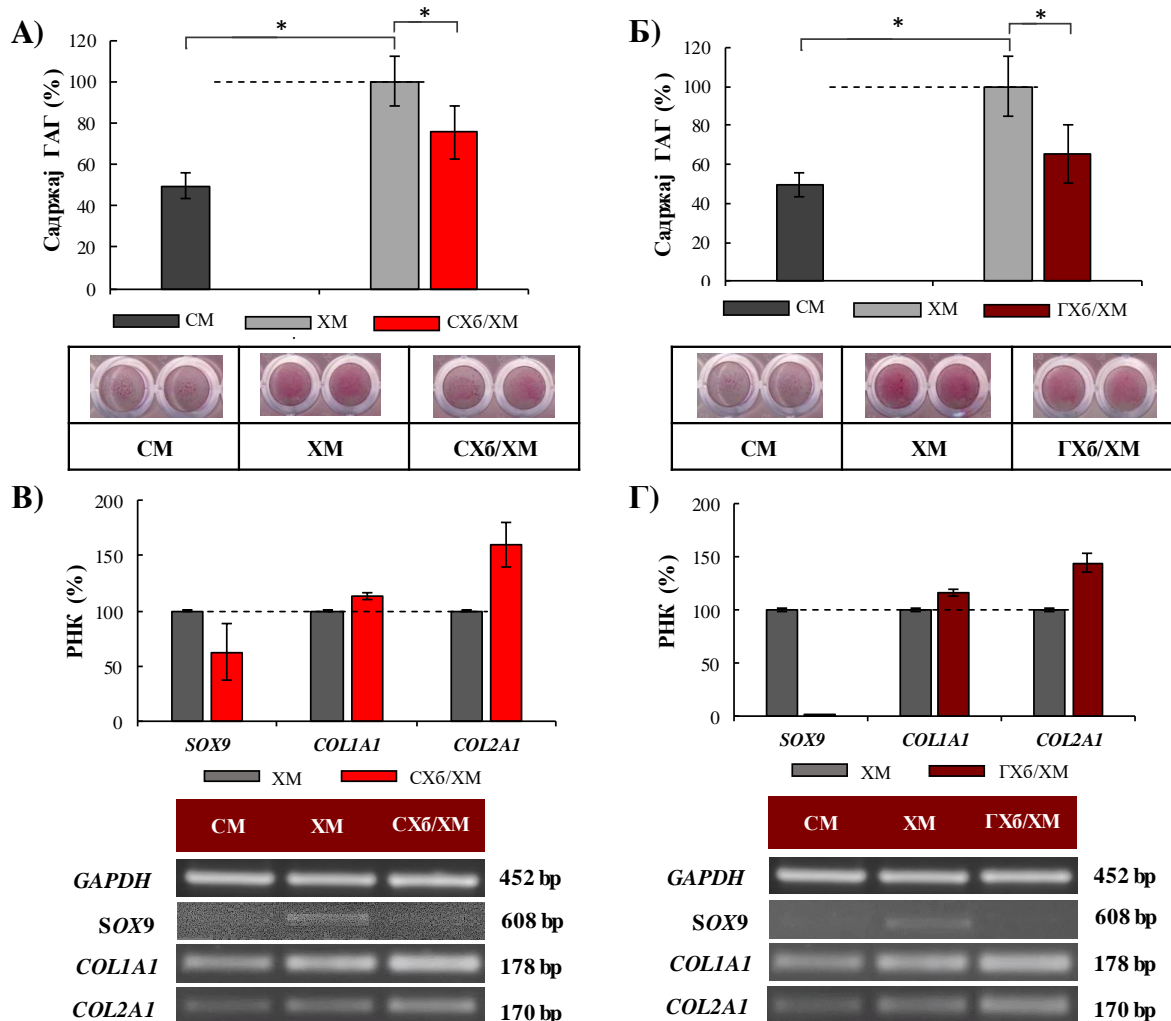
Како је хемоглобин у концентрацији од 0,1 μ M показао најмање изражене ефекте на вијабилност и миграцију мезенхимских ћелија, утицај свињског и говеђег хемоглобина на диференцијацију ПК-ММЋ и ћелијских линија испитан је у овој концентрацији. Наши прелиминарни резултати показали су да хемоглобин не утиче на диференцијацију мезенхимских ћелија уколико се додају у стандардни медијум за култивацију ћелија (D'MEM са 10% FCS; прилог 5), тако да је ефекат хемоглобина на диференцијациони потенцијал мезенхимских ћелија испитан додавањем хемоглобина у одговарајући диференцијациони медијум.

4.3.5.1. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на хондрогену диференцијацију мезенхимских ћелија

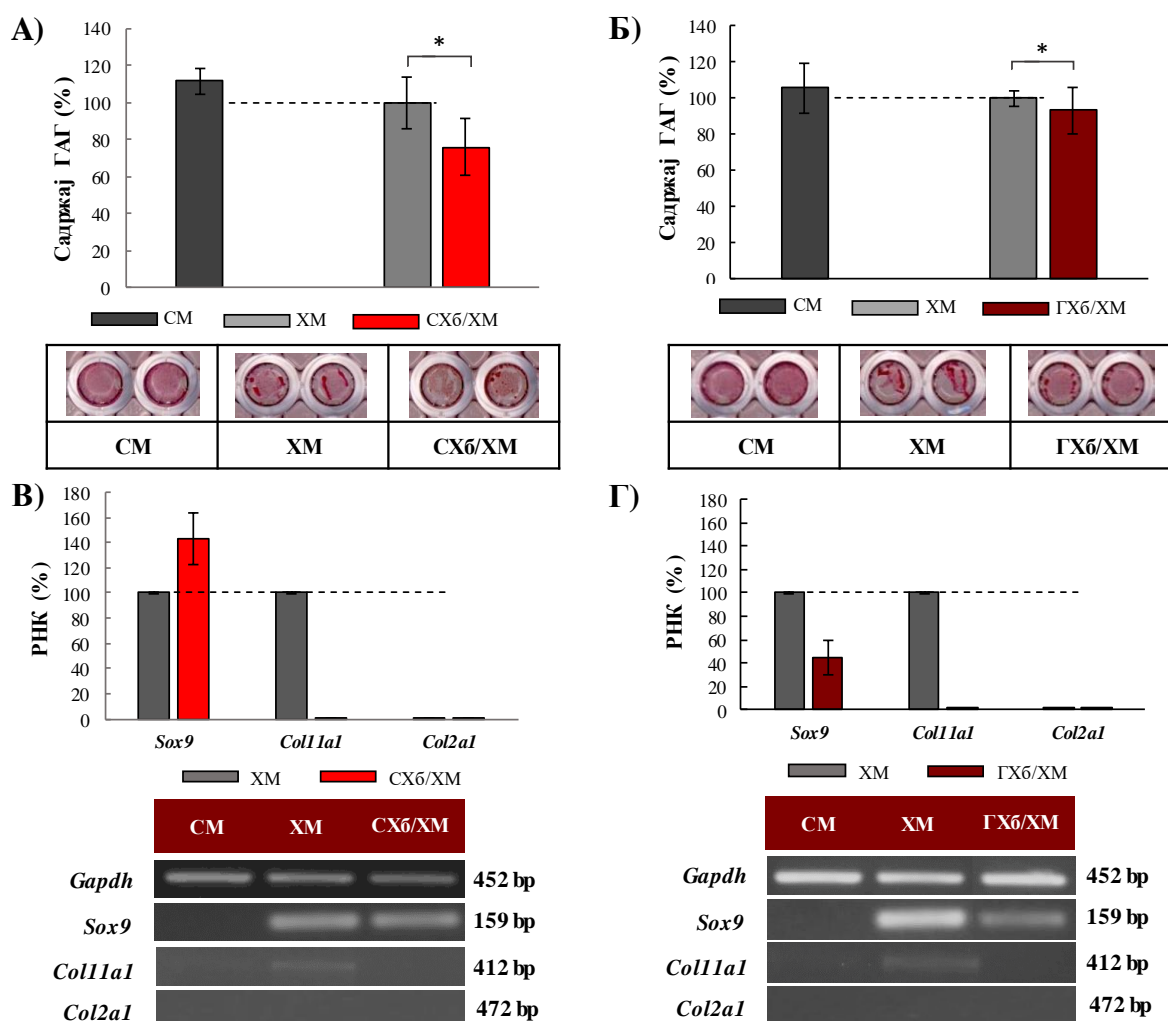
Имунохистохемијским бојењем сафранином О показано је да ПК-ММЋ и АТDC5 ћелије након култивације у хондрогеном диференцијационом медијуму (ХМ) експримирају ГАГ, маркер хондрогене диференцијације (слике 4.15 и 4.16).

Дензитометријском анализом интензитета боје након бојења сафранином О, показано је да присуство хемоглобина обе врсте у ХМ смањује садржај ГАГ у ПК-ММЋ за приближно 30% (слика 4.15. А, Б). RT-PCR анализа експресије хондрогених маркера у ПК-ММЋ показала је да свињски хемоглобин доводи до снижења експресије *SOX9* гена за приближно 40%, док говеђи хемоглобин снижава ниво експресије поменутог маркера испод нивоа детекције (слика 4.15. Б, Г). За разлику од *SOX9*, експресија *COL1A1* и *COL2A1* гена у присуству хемоглобина била је повишена (слика 4.15. Б, Г).

Хемоглобини обе врсте инхибирали су и хондрогену диференцијацију АТDC5 ћелија. И свињски и говеђи хемоглобин смањивали су садржаја ГАГ ових ћелија, али је степен инхибиције зависио од врсте хемоглобина. Тако је свињски хемоглобин смањивао садржаја ГАГ за приближно 25%, а говеђи за 10% (слика 4.16. А, Б). Говеђи хемоглобин је у АТDC5 ћелијама, као и у ПК-ММЋ, доводио до снижења експресије *Sox9* гена за приближно 55%, док је свињски хемоглобин стимулисао експресију овог маркера. И свињски и говеђи хемоглобин снижавали су експресију *Coll1a1* гена испод нивоа детекције RT-PCR методом, док *Col2a1* иРНК није детектована ни под којим условима култивације.



Слика 4.15. Утицај свињског (CX6) и говеђег (GX6) хемоглобина на хондрогену диференцијацију ПК-ММЋ. Дензитометријска анализа садржаја ГАГ детектованих бојењем сафранин О након 14 дана у култури у хондрогеном диференцијационом медијуму (XM) или XM суплементисаним са 0,1 μ M свињским (А) и говеђим хемоглобином (Б). Резултати су приказани као проценат садржаја ГАГ у култури ПК-ММЋ култивисаних у XM (100%, испрекидана линија) и као средња вредност \pm стандардна девијација. (*) означава статистички значајну разлику у садржају ГАГ ($p < 0,05$). Дензитометријска анализа трака добијених RT-PCR методом гена специфичних за хондрогену диференцијацију након 11 дана у култури у XM или XM суплементисаним са 0,1 μ M свињским (В) и говеђим хемоглобином (Г). Приказане су репрезентативне RT-PCR траке анализираних гена и трака GAPDH као контрола количине узорка нанетих на гел. Резултати су приказани као проценат експресије одговарајућег маркера у ПК-ММЋ гајених у XM (100%, приказани испрекиданом линијом) и као средња вредност \pm стандардна девијација.



Слика 4.16. Утицај свињског (CX6) и говеђег (GX6) хемоглобина на хондрогену диференцијацију ATDC5 ћелија. Дензитометријска анализа садржаја гликозаминогликана (ГАГ) детектованих бојењем Сафранин О након 7 дана у култури у хондрогеном диференцијационом медијуму (XM) или XM суплементисаним са 0,1 μ M свињским (А) и говеђим хемоглобином (Б). Резултати су приказани као проценат садржаја ГАГ у култури ATDC5 ћелија култивисаних у XM (100%, испрекидана линија) и као средња вредност \pm стандардна девијација. (*) означава статистички значајну разлику у садржају ГАГ ($p < 0,05$). Дензитометријска анализа трака добијених RT-PCR методом гена специфичних за хондрогену диференцијацију након 7 дана у култури у XM или XM суплементисаним са 0,1 μ M свињским (В) и говеђим хемоглобином (Г). Приказане су репрезентативне RT-PCR траке анализираних гена и трака GAPDH као контрола количине узорка нанетих на гел. Резултати су приказани као проценат експресије одговарајућег маркера у ATDC5 ћелијама гајених у XM (100%, приказани испрекиданом линијом) и као средња вредност \pm стандардна девијација.

4.3.5.2. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на остеогену диференцијацију мезенхимских ћелија

Након култивације у остеогеном диференцијационом медијуму (OM), остеогена диференцијација ПК-ММТ и МС3Т3-Е1 ћелија потврђена је детекцијом активности раног маркера остеогене диференцијације, ALP ензима, имунохистохемијским бојењем раствором NBT/BCIP, и присуством минерализације, као касног маркера остеогене диференцијације, детектоване бојењем раствором ализарин црвено боје.

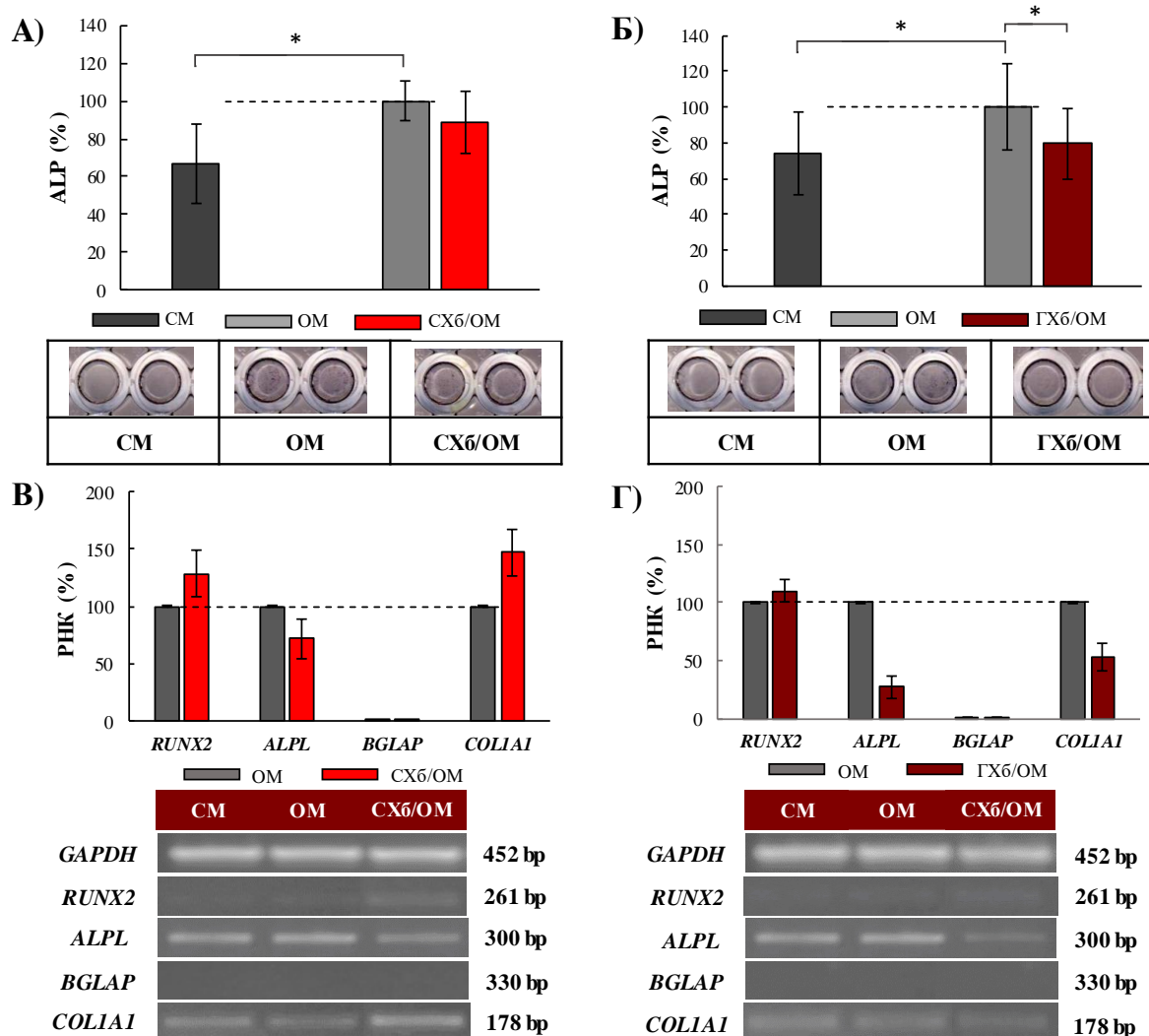
Након 7 дана у култури, присуство свињског и говеђег хемоглобина снижавало је активности ALP у ПК-ММЋ, и експресију гена који кодира овај ензим (слика 4.17. А, Б). Овај инхибиторни ефекат био је израженији код ПК-ММЋ култивисаних са говеђим хемоглобином. Експресија *RUNX2* била је благо стимулирана у присуству хемоглобина обе животињске врсте, али је ефекат свињског хемоглобина био израженији. Експресија гена за колаген тип I била је стимулирана у присуству свињског, а снижена у присуству говеђег хемоглобина (слика 4.17. В, Г). иРНК за остеокалцин (касни маркер остеогене диференцијације) није била детектована RT-PCR методом.

Након 14 дана у култури, количина депозита калцијума у ПК-ММЋ гајених у присуству и свињског и говеђег хемоглобина била је статистички значајно снижена, при чему је овај инхибиторни ефекат говеђег хемоглобина био израженији у односу на свињски хемоглобин (слика 4.18. А, Б). Свињски хемоглобин је снижавао експресију свих детектованих иРНК: *RUNX2*, *ALPL*, *COL1A1* (слика 4.18. В). Иако су експерименти са свињским и говеђим хемоглобином рађени истовремено, са ПК-ММЋ у истој пасажу, у ПК-ММЋ које су коришћене за експерименте са говеђим хемоглобином експресија *RUNX2* није индукована култивацијом у ОМ или у ОМ са говеђим хемоглобином. Говећи хемоглобин је како и свињски, снижавао експресију *ALP* и *COL1A1* (слика 4.18. Г). Експресија остеокалцина није детектована у ПК-ММЋ RT-PCR методом ни након 14 дана у култури (слика 4.18. В, Г).

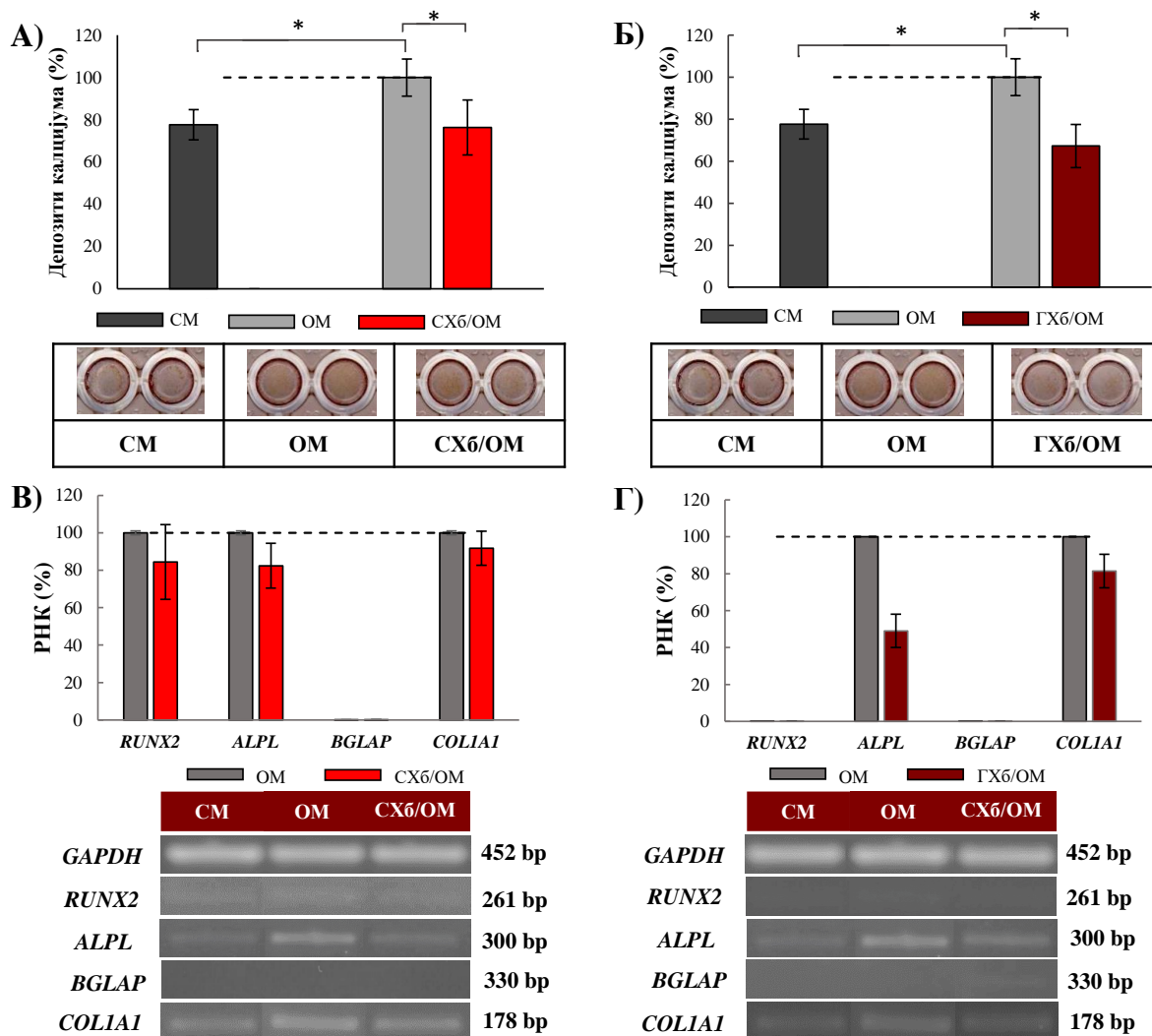
Утицај свињског и говеђег хемоглобина као модулатора остеогене диференцијације МС3Т3-Е1 ћелија испитан је у две експерименталне поставке: индукцијом остеогене диференцијације у остеогеном медијуму са или без дексаметазона. У ОМ без дексаметазона детектована је знатно виша активност ALP ензима у односу на ћелије гајене у ОМ са дексаметазоном након једнаког броја дана у култури (7 дана) (слике 4.19. А и 4.20. А). Супротно, у остеогеном медијуму са дексаметазоном количина депозита калцијума у МС3Т3-Е1 ћелијама била је већа у односу на ћелије гајене у ОМ без дексаметазона након 14 дана у култури (слике 4.19. Б и 4.20. Б).

У ОМ без дексаметазона и свињски и говеђи хемоглобин су снижавали активност ALP, али је ефекат говеђег хемоглобина био израженији (слика 4.19. А, Г). Свињски хемоглобин није утицао на количину депозита калцијума, док ју је говеђи снижавао (слика 4.19. Б, Д). Свињски хемоглобин стимулисао је експресију *RUNX2* и *ALPL* маркера остеогене диференцијације (слика 4.19. В), док је исти ефекат говеђег хемоглобина показан само за *ALPL* ген (слика 4.19. Ђ). С друге стране, говеђи хемоглобин је снижавао конститутивно ниску експресију *RUNX2* испод нивоа детекције RT-PCR методом. Ни свињски ни говеђи хемоглобин нису у значајнијој мери утицали на експресију *BGLAP* гена (слика 4.19. Ѓ).

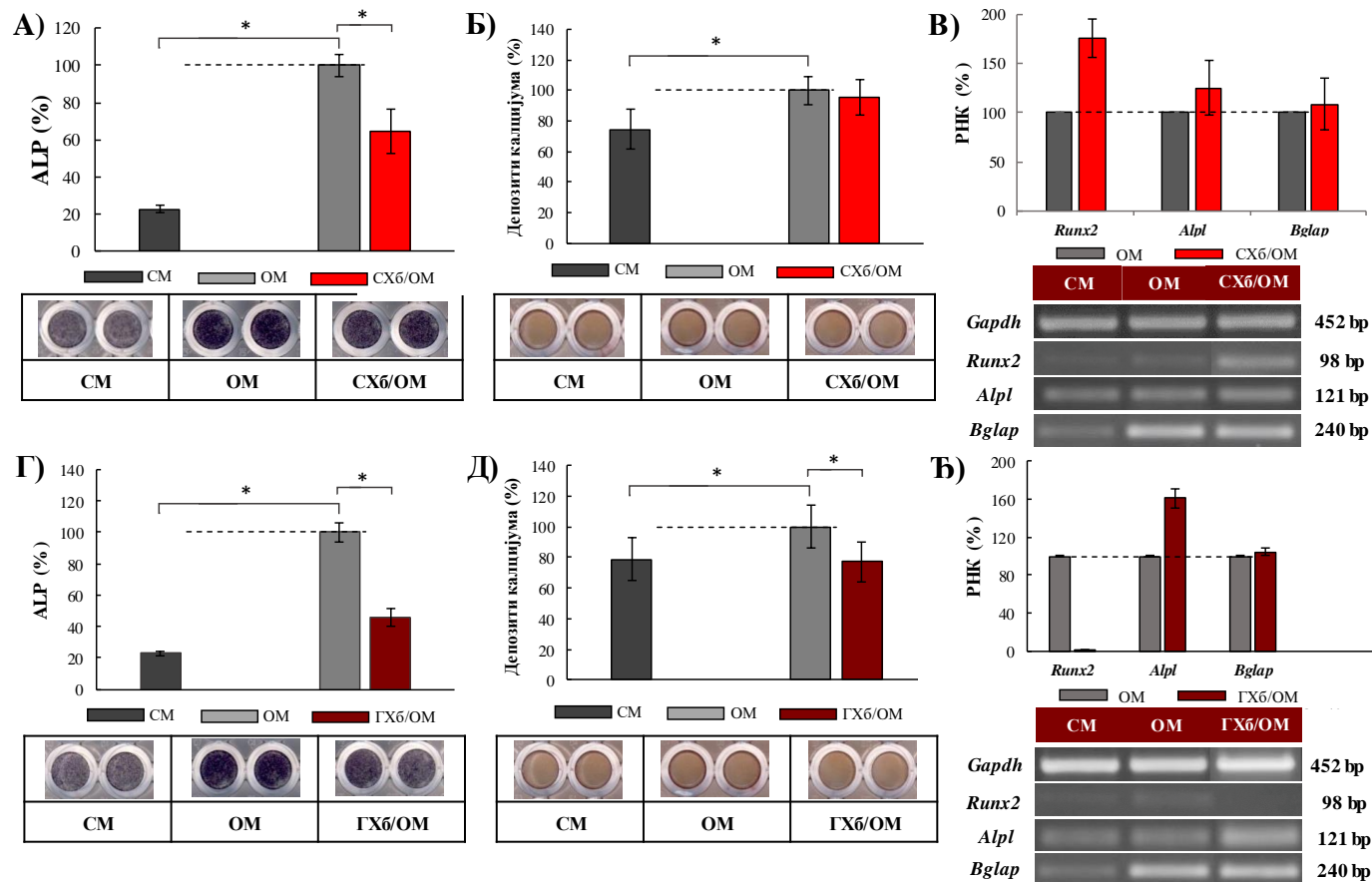
У ОМ са дексаметазоном, ни свињски ни говеђи хемоглобин нису утицали на активност ALP (слика 4.20. А, Г), као ни на количину депозита калцијума у МС3Т3-Е1 ћелијама (слика 4.20. Б, Д), али су оба хемоглобина снижавали експресију *ALPL* гена (слика 4.20. В, Ђ). Свињски хемоглобин није утицао на ниво експресије *BGLAP* гена (слика 4.20. В), док је говеђи хемоглобин доводио до благог снижења експресије овог маркера остеогене диференцијације (слика 4.20. Ђ). Експресија *RUNX2* гена у МС3Т3-Е1 ћелијама гајеним у ОМ са дексаметазоном није била детектована RT-PCR методом (слика 4.19. В, Ѓ).



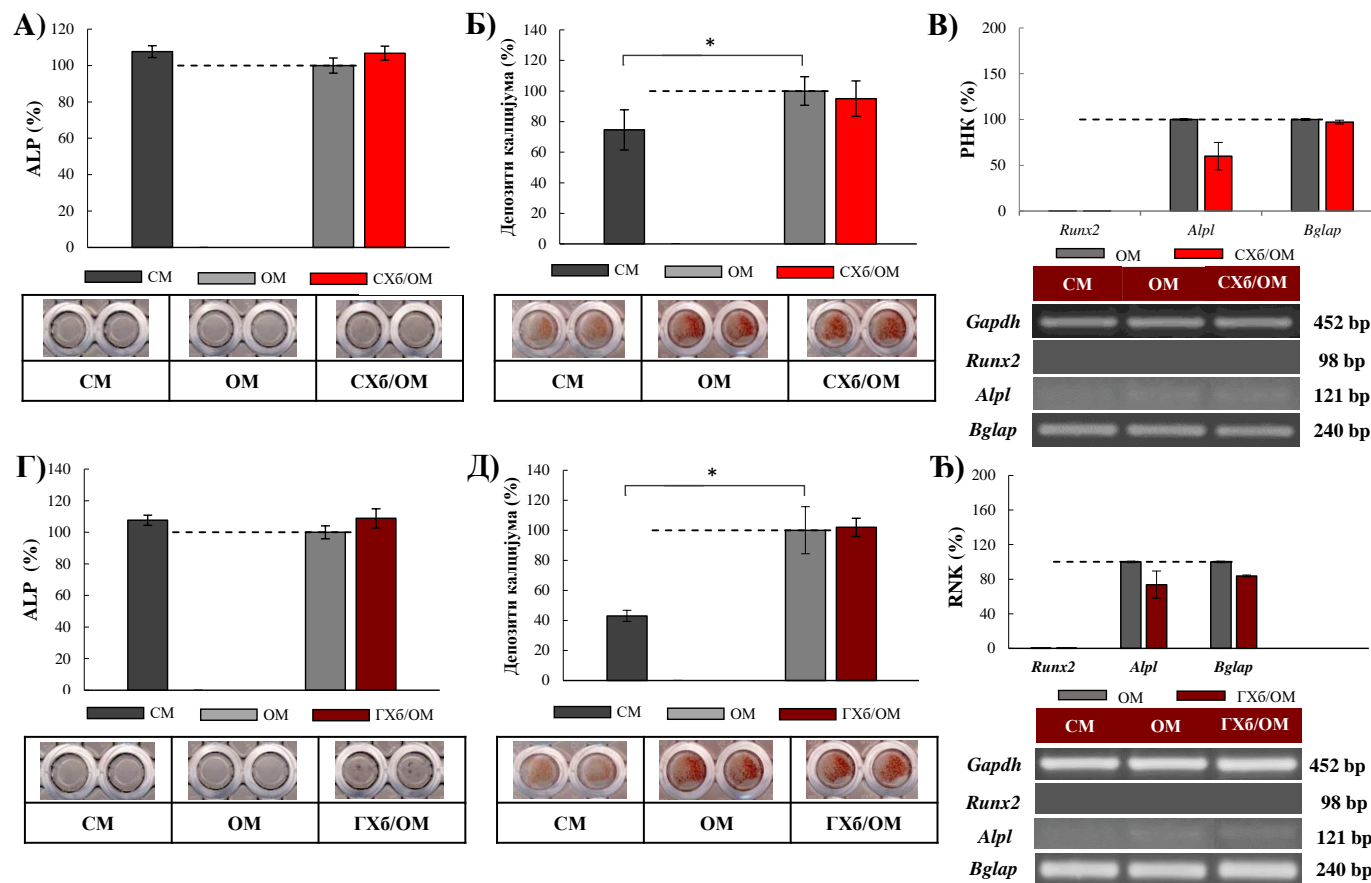
Слика 4.17. Утицај свињског (CX6) и говеђег (GX6) хемоглобина на остеогену диференцијацију ПК-ММЋ након 7 дана у култури. Дензитометријска анализа активности ALP ензима детектоване NBT/BCIP бојењем након 7 дана у култури у остеогеном диференцијационом медијуму (OM) или OM суплементисаним са 0,1 μ M свињским (A) и говеђим хемоглобином (Б). Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација процента активности ALP у култури ПК-ММЋ култивисаних у OM (100%, испрекидана линија). (*) означава статистички значајну разлику у активности ALP ($p < 0,05$). Дензитометријска анализа трака добијених RT-PCR методом гена специфичних за остеогену диференцијацију након 7 дана у култури у OM или OM суплементисаним са 0,1 μ M свињским (B) и говеђим хемоглобином (Г). Приказане су репрезентативне RT-PCR траке анализираних гена и трака GAPDH као контрола количине узорка нанетих на гел. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација процента експресије одговарајућег маркера у ПК-ММЋ гајених у OM (100%, испрекидана линија).



Слика 4.18. Утицај свињског (CX6) и говеђег (ГХ6) хемоглобина на остеогену диференцијацију ПК-ММЋ након 14 дана у култури. Дензитометријска анализа депозита калцијума детектованих бојењем ализарин црвеним након 14 дана у култури у остеогеном диференцијационом медијуму (OM) или OM суплементисаним са 0,1 μ M свињским (А) и говеђим хемоглобином (Б). Резултати су приказани као вредност \pm стандардна девијација процента количине депозита калцијума у култури ПК-ММЋ култивисаних у OM (100%, испрекидана линија). (*) означава статистички значајну разлику у активности ALP ($p < 0,05$). Дензитометријска анализа трака добијених RT-PCR методом гена специфичних за остеогену диференцијацију након 14 дана у култури у OM или OM суплементисаним са 0,1 μ M свињским (В) и говеђим хемоглобином (Г). Приказане су репрезентативне RT-PCR траке анализираних гена и трака GAPDH као контрола количине узорка нанетих на гел. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација процента експресије одговарајућег маркера у ПК-ММЋ гајених у OM (100%, испрекидана линија).



Слика 4.19. Утицај свињског (CX6) и говеђег (GX6) хемоглобина на остеогену диференцијацију MC3T3-E1 у остеогеном медијуму (OM) без дексаметазона. Дензитометријска анализа активности ALP ензима детектоване NBT/BCIP бојењем након 7 дана у култури у OM или OM са додатком 0,1 μ M свињског (А) или говеђег хемоглобина (Г). Дензитометријска анализа депозита калцијума детектованих бојењем ализарин црвеним након 14 дана у култури у OM или OM са додатком 0,1 μ M свињског (Б) или говеђег хемоглобина (Д). Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација процента активности ALP/депозита калцијума у култури MC3T3-E1 култивисаних у OM (100%, испрекидана линија). (*) означава статистички значајну разлику у активности ALP/проценту депозита калцијума ($p < 0,05$). Дензитометријска анализа трака добијених RT-PCR методом гена специфичних за остеогену диференцијацију након 5 дана у култури у OM или OM са 0,1 μ M свињским (В) или говеђим хемоглобином (Е). Приказане су репрезентативне RT-PCR траке анализираних гена и трака GAPDH као контрола количине узорка нанетих на гел. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација процента експресије одговарајућег маркера у MC3T3-E1 гајених у OM (100%, испрекидана линија).



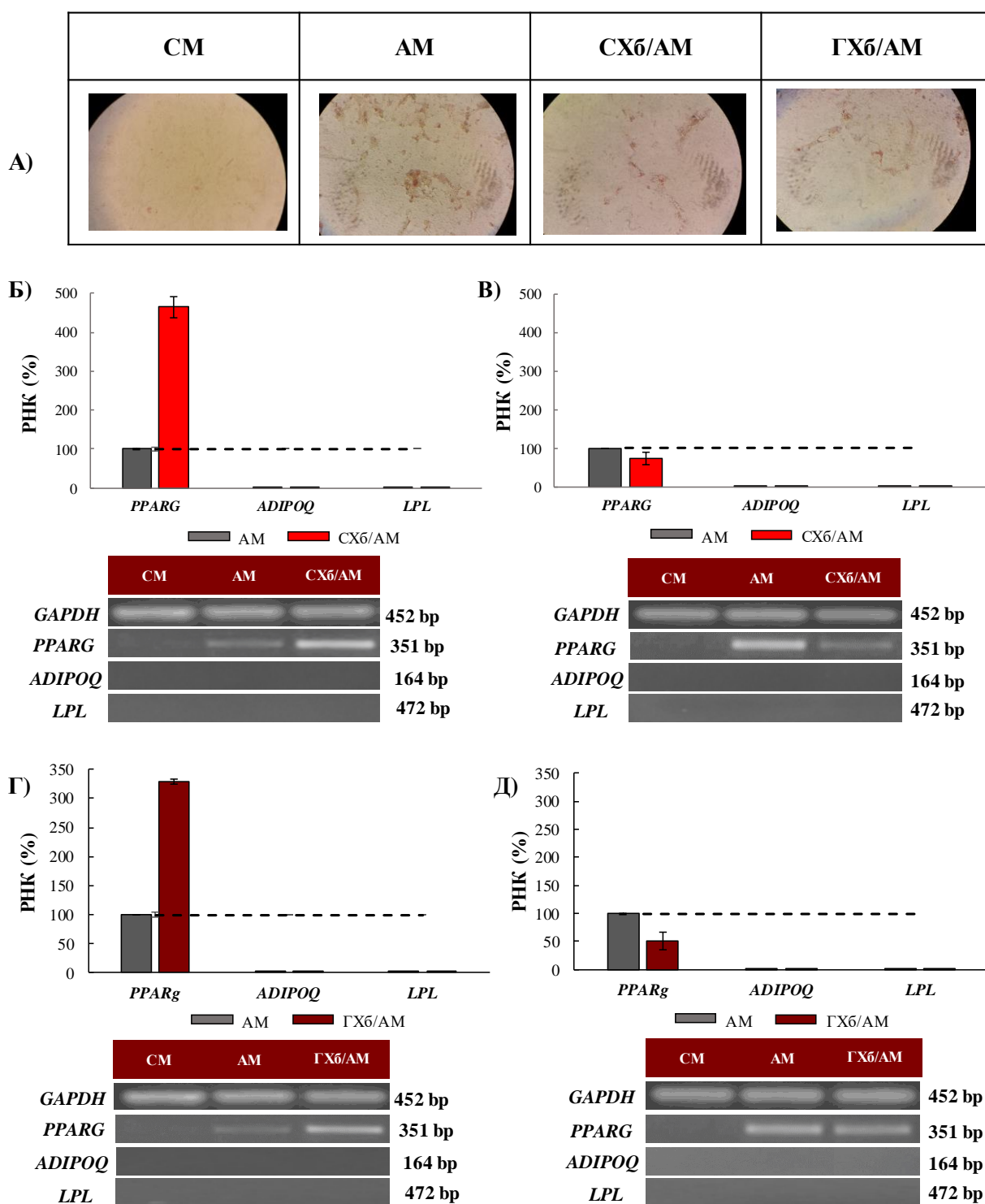
Слика 4.20. Утицај свињског (CX6) и говеђег (GX6) хемоглобина на остеогену диференцијацију MC3T3-E1 у остеогеном медијуму (OM) са дексаметазоном. Дензитометријска анализа активности ALP ензима детектоване NBT/BCIP бојењем након 7 дана у култури у OM или OM са додатком 0,1 μ M свињског (А) или говеђег хемоглобина (Г). Дензитометријска анализа депозита калцијума детектованих бојењем ализарин црвеним након 14 дана у култури у OM или OM са додатком 0,1 μ M свињског (Б) или говеђег хемоглобина (Д). Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација процента активности ALP/депозита калцијума у култури MC3T3-E1 култивисаних у OM (100%, испрекидана линија). (*) означава статистички значајну разлику у активности ALP/проценту депозита калцијума ($p < 0,05$). Дензитометријска анализа трака добијених RT-PCR методом гена специфичних за остеогену диференцијацију након 5 дана у култури у OM или OM + 0,1 μ M свињски (В) или говеђи хемоглобин (Ђ). Приказане су репрезентативне RT-PCR траке анализираних гена и трака GAPDH као контрола количине узорка нанетих на гел. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација процента експресије одговарајућег маркера у MC3T3-E1 гајених у OM (100%, испрекидана линија).

4.3.5.3. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на адипогену диференцијацију мезенхимских ћелија

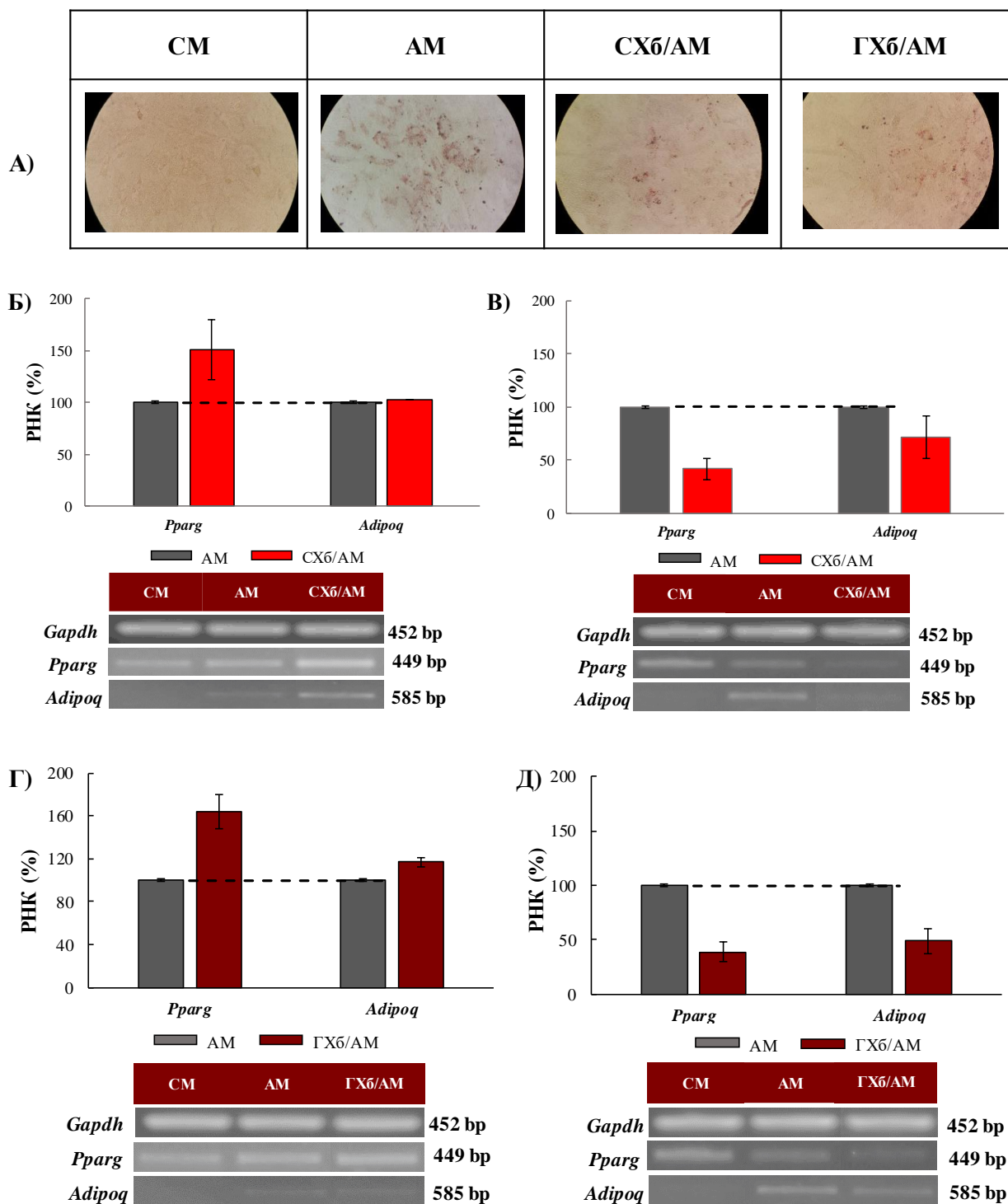
Способност ПК-ММЋ и 3Т3-Л1 ћелија да се диферентују у правцу адипогене лозе потврђена је детекцијом липидних тела у ПК-ММЋ након 21 дана у култури (слика 4.21. А) и у 3Т3-Л1 ћелијама након 10 дана у култури (слика 4.22. А). Липидна тела детектована су и у културама ПК-ММЋ и 3Т3-Л1 ћелија гајеним у адипогеним медијумима у присуству хемоглобина, али је њихов број био мањи у односу на број липидних тела у медијумима без хемоглобина (слика 4.21. А; слика 4.22. А).

Анализа експресије маркера адипогене диференцијације у ПК-ММЋ показала је да и свињски и говеђи хемоглобин значајно стимулишу експресију PPAR γ гена након 7 дана у култури (слика 4.21. Б, Г). Међутим, након 14 дана у култури оба испитивана хемоглобина снижавала су експресију овог маркера (слика 4.21. В, Д). Експресија гена за адипонектин и липопротеин липазу у ПК-ММЋ није детектована RT-PCR методом ни након 7 ни након 14 дана у култури (слика 4.21. Б-Д).

У циљу индукције адипогене диференцијације 3Т3-Л1 ћелија, примењиван је протокол који подразумева гајење ћелија у индукционом, затим инсулинском и коначно – стандардном медијуму за гајење ћелија, током 10 дана. Утицај хемоглобина на различите фазе адипогене диференцијације 3Т3-Л1 ћелија, испитан је коришћењем две експерименталне поставке у којима су хемоглобини додавани у културу ћелија 1) почев од индукционог медијума или 2) почев од инсулинског медијума. Добијени резултати показали су да је експресија PPAR γ маркера била повишена у 3Т3-Л1 ћелијама у присуству свињског и говеђег хемоглобина када су они додавани почев од индукционог медијума (слика 4.22. Б, Г). Супротно, када су хемоглобини додавани почев од инсулинског медијума експресија PPAR γ маркера је била снижена (слика 4.22. В, Д). Додавање свињског хемоглобина почев од индукционог медијума у културу 3Т3-Л1 ћелија није имало утицаја на експресију адипонектина (слика 4.22. Б), док је говеђи хемоглобин у истој експерименталној поставци благо стимулисао експресију овог маркера адипогене диференцијације (слика 4.22. Г). И свињски и говеђи хемоглобин снижавали су експресију адипонектина када је суплементација адипогеног медијума вршена у последњој фази – додавањем у инсулински медијум (слика 4.21. В, Д).



Слика 4.21. Утицај свињског (CX6) и говеђег (ГХ6) хемоглобина на адипогену диференцијацију ПК-ММЋ. Репрезентативне микрографије ПК-ММЋ након додавања свињског или говеђег хемоглобина у адипогени медијум; бојење Oil Red бојом (А). Дензитометријска анализа трака добијених RT-PCR методом гена специфичних за адипогену диференцијацију након 7 дана (Б, Г) и 14 (В, Д) дана у култури у адипогеном медијуму (АМ) или АМ са 0,1 μМ свињским (Б, В) или говеђим хемоглобином (Г, Д). Приказане су репрезентативне RT-PCR траке анализираних гена и трака GAPDH као контрола количине узорка нанетих на гел. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација процента експресије одговарајућег маркера у ПК-ММЋ гајених у ОМ (100%, испрекидана линија).



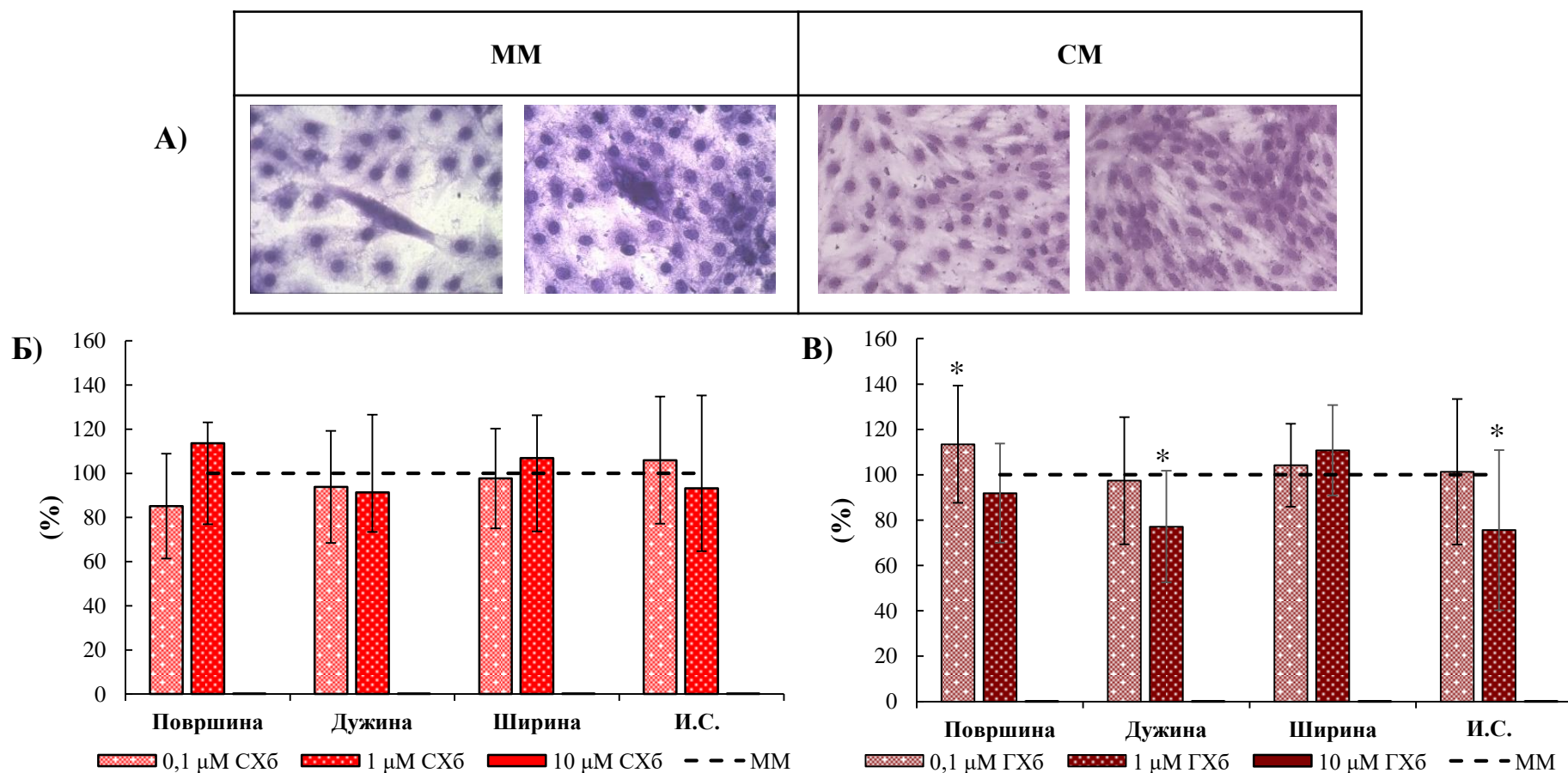
Слика 4.22. Утицај свињског (CX6) и говеђег (ГХ6) хемоглобина на адипогену диференцијацију 3Т3-Л1 ћелија. Репрезентативне микрографије 3Т3-Л1 ћелија након додавања свињског или говеђег хемоглобина почев од инсулинског медијума; бојење Oil Red бојом (А). Дензитометријска анализа трака добијених RT-PCR методом гена специфичних за адипогену диференцијацију након додавања 0,1 μМ свињског (Б, В) или говеђег хемоглобина (Г, Д) у адипогени медијум (АМ) почев од индукционог (Б, Г) или инсулинског (В, Д) медијума. Приказане су репрезентативне RT-PCR траке анализираних гена и трака GAPDH као контрола количине узорка нанетих на гел. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација процента експресије одговарајућег маркера у 3Т3-Л1 ћелија гајених у АМ (100%, испрекидана линија).

4.3.5.4. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на миогену диференцијацију мезенхимских ћелија

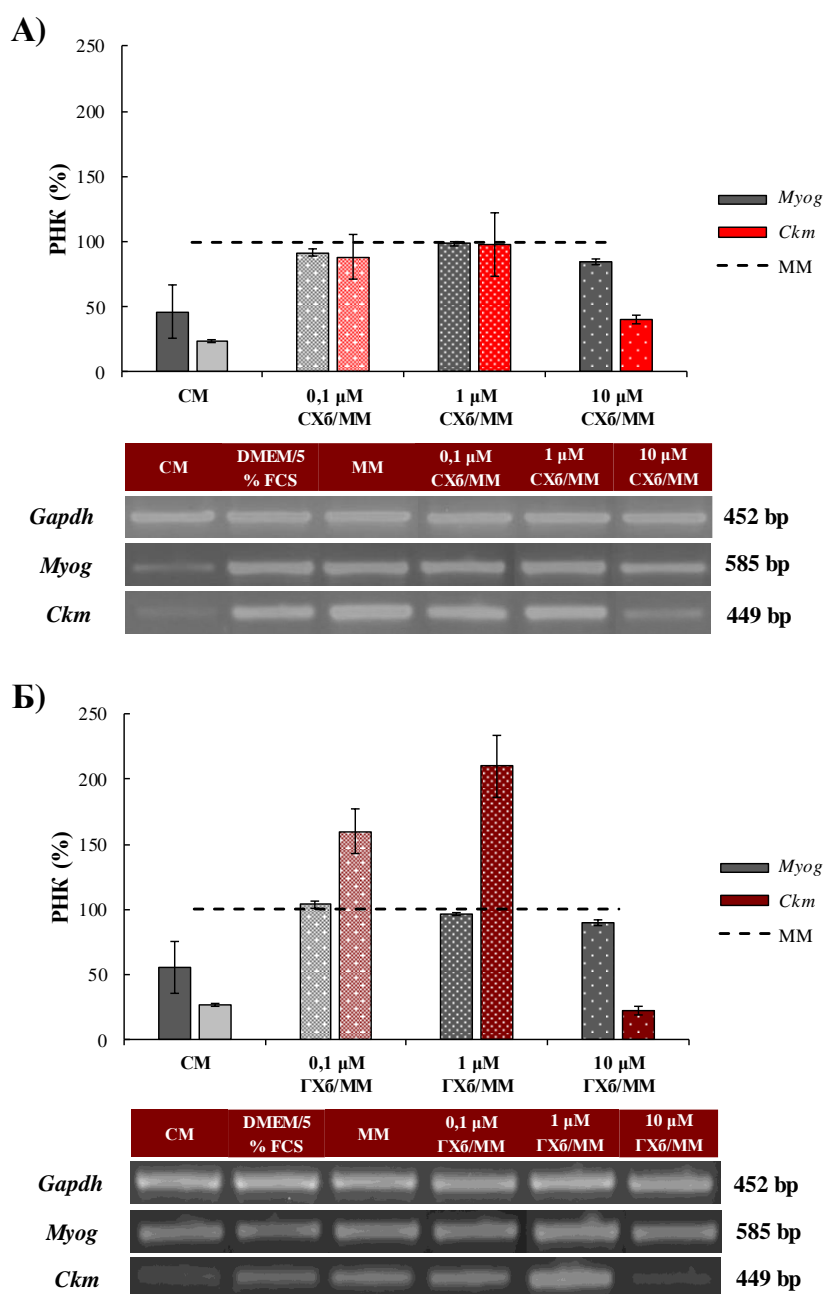
Миогена диференцијација детектована је на основу формирања миотуба у култури ћелија гајеним у миогеном медијуму. Како у ПК-ММТ нисмо могли да индукујемо овај тип диференцијације (миотубе нису запажене након култивације у одговарајућем миогеном медијуму), утицај свињског и говеђег хемоглобина на миогену диференцијацију испитан је само на С2С12 ћелијама. При концентрацији хемоглобина од 0,1 μM (концентрација у којој је испитан ефекат хемоглобина на хондрогену, остеогену и адипогену диференцијацију) није уочен модулаторни ефекат ниједне врсте хемоглобина на миогену диференцијацију С2С12 ћелија, односно на способност формирања миотуба, па је ефекат хемоглобина на миогену диференцијацију испитан у ширем опсегу концентрација: 0,1, 1 и 10 μM . Код С2С12 ћелија гајених у присуству хемоглобина, миотубе су уочене у културама суплементисаним са 0,1 и 1 μM хемоглобином, док је хемоглобин у највишој примењеној концентрацији (10 μM) у потпуности инхибирао формирања миотуба.

Морфометријска анализа формираних миотуба показала је да свињски хемоглобин не мења значајно површину, дужину, просечну ширину и индекс сферичности формираних миотуба (слика 4.23. Б). Говеђи хемоглобин је у најмањој испитиваној концентрацији (0,1 μM) повећавао површину миотуба, а у концентрацији од 1 μM снижавао дужину и индекс сферичности миотуба (слика 4.23. В).

Анализа експресије маркера миогене диференцијације у С2С12 ћелијама гајеним у миогеном медијуму суплементисаним са хемоглобином показала је да ни свињски ни говеђи хемоглобин у концентрацијама од 0,1 и 1 μM не доводе до промене експресије миогенина, док у концентрацији од 10 μM долази до благог снижења експресије овог маркера (слика 4.24. А, Б). Свињски хемоглобин није доводио до промене експресије гена за креатин киназу специфичну за мишићно ткиво у концентрацијама од 0,1 и 1 μM (слика 4.24. А), док су исте концентрације говеђег хемоглобина стимулисале експресију овог маркера (слика 4.23. Б). Хемоглобини обе животињске врсте су у концентрацији од 10 μM значајно снижавали експресију гена за мишићну креатин киназу (слика 4.24. А, Б).



Слика 4.23. Утицај свињског (CX6) и говеђег (GX6) хемоглобина на миогену диференцијацију C2C12 ћелија. Репрезентативне микрографије ћелија гајених у миогеном медијуму (MM) и стандардном медијуму (CM) након бојења кристал виолетом (А). Морфометријска анализа миотуба C2C12 ћелија гајених у MM без или са свињским (Б) и говеђим (В) хемоглобином. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација процента одговарајућег параметра миотуба C2C12 ћелија гајених у MM (100%, испрекидана линија). И.С. – индекс сферичности миотуба.



Слика 4.24. Утицај свињског (CX6) и говеђег (GX6) хемоглобина на миогену диференцијацију C2C12 ћелија. Дензитометријска анализа трака добијених RT-PCR методом гена специфичних за миогену диференцијацију након додавања свињског (А) или говеђег (Б) хемоглобина у миогени медијум (ММ). Приказане су репрезентативне RT-PCR траке анализираних гена и трака GAPDH као контрола количине узорка нанетих на гел. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација процента експресије одговарајућег маркера у C2C12 ћелијама гајених у ММ (100%, испрекидана линија).

4.3.6. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на имуномодулаторни потенцијал мезенхимских матичних ћелија

Да би се утврдило да ли свињски и говеђи хемоглобин утичу на имуномодулаторни потенцијал ПК-ММЋ, ови хемоглобини су додавани у кокултуре ПК-ММЋ и алогених МНЋ, након чега су анализирани апоптоза, ћелијски циклус и индекс пролиферације МНЋ. Додатно, испитан је утицај хемоглобина на спонтану експресију специфичних имуномодулаторних гена у ММЋ (*HLA-A*, *HLA-G*, *HLA-DR*, *TGF- β* , *IDO-1*, *PTGS2*, *IL-6*, *HOMX1*).

4.3.6.1. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на модулаторни ефекат ПК-ММЋ на ћелијски циклус и апоптозу алогених МНЋ

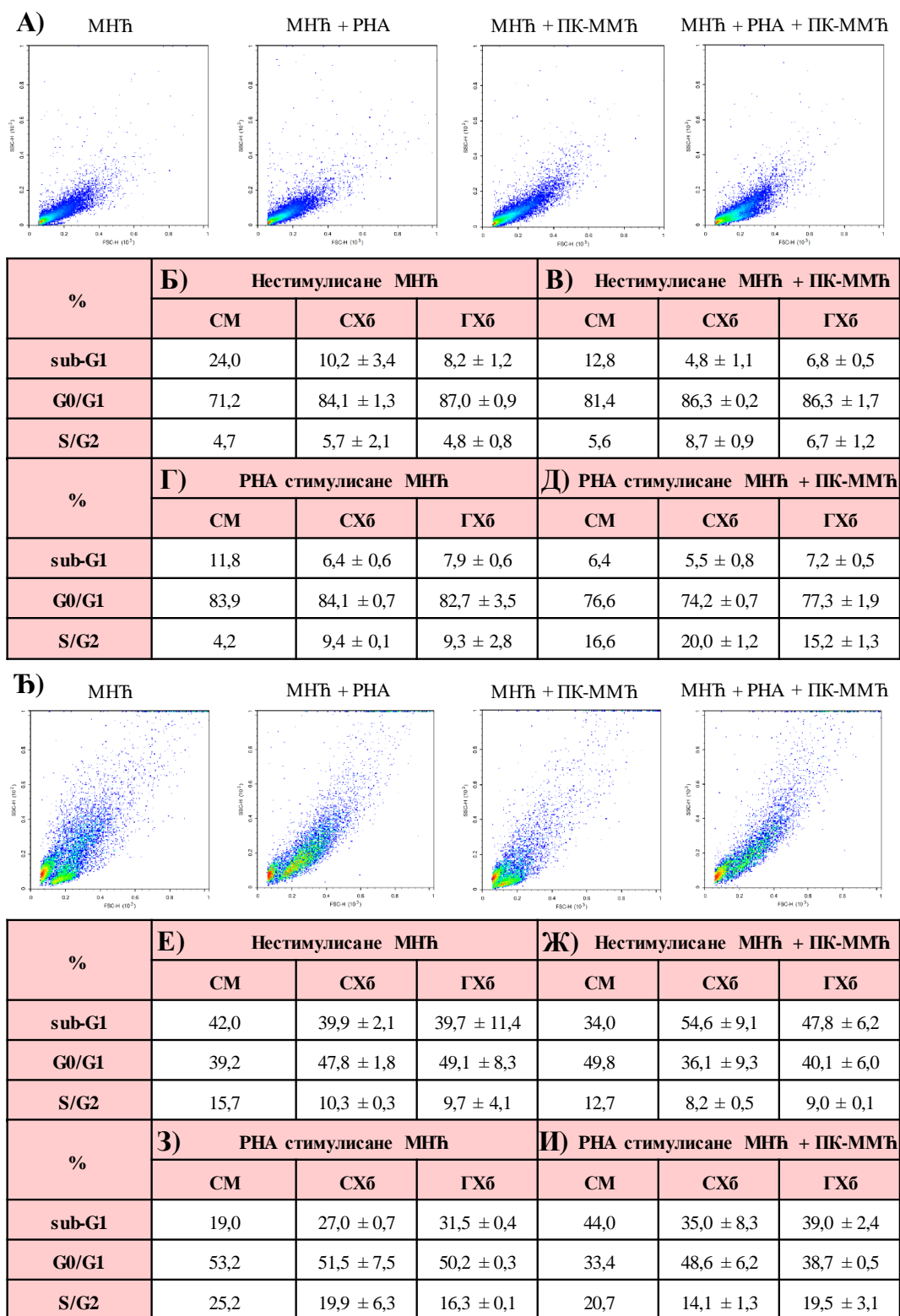
Утицај хемоглобина на модулаторни ефекат ПК-ММЋ на ћелијски циклус и апоптозу алогених МНЋ испитан је на већем броју давалаца МНЋ. МНЋ ових давалаца нису једнако реаговали на тродневну стимулацију митогеном (РНА) и у односу на разлике у овом одговору, даваоце је било могуће поделити на слабе и добре респондере. У културама МНЋ добрих респондера проценат ћелија у деоби, односно у S/G2 фазама ћелијског циклуса, али и број апоптотских ћелија, био је већи у односу на број ових ћелија код МНЋ слабих респондера, независно од стимулације митогеном и присуства ПК-ММЋ (слика 4.25).

У културама нестимулисаних МНЋ слабих респондера хемоглобин обе врсте је изразито снижавао број апоптотских ћелија, док је број ћелија у G0/G1 фази био повећан, а број ћелија у деоби (S/G2 фаза) остао непромењен (слика 4.25. Б). У кокултури нестимулисаних МНЋ и ПК-ММЋ, број апоптотских ћелија био је двоструко мањи у односу на њихов број у култури нестимулисаних МНЋ без ПК-ММЋ, а свињски и говеђи хемоглобини су додатно смањивали проценат апоптотских ћелија. Додатно, хемоглобин изолован из обе животињске врсте је благо повећавао је број ћелија и у G0/G1 и у S/G2 фази, али је стимулаторни ефекат свињског хемоглобина на број ћелија у деоби био нешто израженији (слика 4.25. В).

И свињски и говеђи хемоглобин смањивали су проценат апоптотских ћелија у култури МНЋ слабих респондера и након стимулације митогеном, док је број ћелија у G0/G1 фази остао непромењен, а проценат ћелија у S/G2 фази био двоструко већи (слика 4.25 Г). У кокултури стимулисаних МНЋ слабих респондера и ПК-ММЋ, хемоглобини нису значајно мењали број апоптотских ћелија и нису утицали на број ћелија у G0/G1 фази, а само је свињски хемоглобин повећавао број ћелија у деоби (слика 4.25. Д).

У културама нестимулисаних МНЋ добрих респондера хемоглобин изолован из обе животињске врсте није значајно утицао на број апоптотских ћелија, смањивао је проценат ћелија у деоби, а повећавао проценат ћелија у G0/G1 фази (слика 4.25. Е). У кокултури нестимулисаних МНЋ и ПК-ММЋ, проценат апоптотских ћелија био је мањи у односу на њихов број у култури нестимулисаних МНЋ без ПК-ММЋ. Свињски и говеђи хемоглобини додатно су повећавали проценат апоптотских ћелија и смањивали проценат ћелија у G0/G1 и S/G2 фази у односу на проценат ћелија гајених без ПК-ММЋ (слика 4.25. Ж).

У културама стимулисаних МНЋ добрих респондера хемоглобин обе животињске врсте повећавао је проценат апоптотских ћелија, а смањивао проценат ћелија у S/G2 фази ћелијског циклуса, док на број ћелија у G0/G1 фази није имао неки значајнији утицај (слика 4.25. З). У кокултури стимулисаних МНЋ добрих респондера са ПК-ММЋ, оба хемоглобина су смањивали број апоптотских ћелија, повећавали број ћелија у G0/G1 и смањивали проценат ћелија у S/G2 фази, при чему је ефекат свињског хемоглобина био нешто израженији (слика 4.25. И).



Слика 4.25. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на модулаторни ефекат ПК-ММЋ на ћелијски циклус и апоптозу алогених МНЋ давалаца чије су МНЋ слабо реаговале на стимулацију митогеном (А-Д) и давалаца су чије МНЋ добро реаговале на стимулацију митогеном (Ђ-И). (А, Ђ): Репрезентативна расподела величине и гранулираности МНЋ добијена проточном цитометријом (FSC/SSC дијаграм). Процент ћелија у апоптози (sub-G1), и G0/G1 и S/G2 фазама ћелијског циклуса, у култури нестимулисаних МНЋ (Б, В, Е, Ж) или РНА стимулираних (Г, Д, З, И) МНЋ, гајених само стандардном медијуму (Б, Г, Е, З) или у кокултури са ПК-ММЋ (Б, Д, Ж, И). Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација.

4.3.6.2. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на модулаторни ефекат ПК-ММЋ на пролиферацију алогених МНЋ

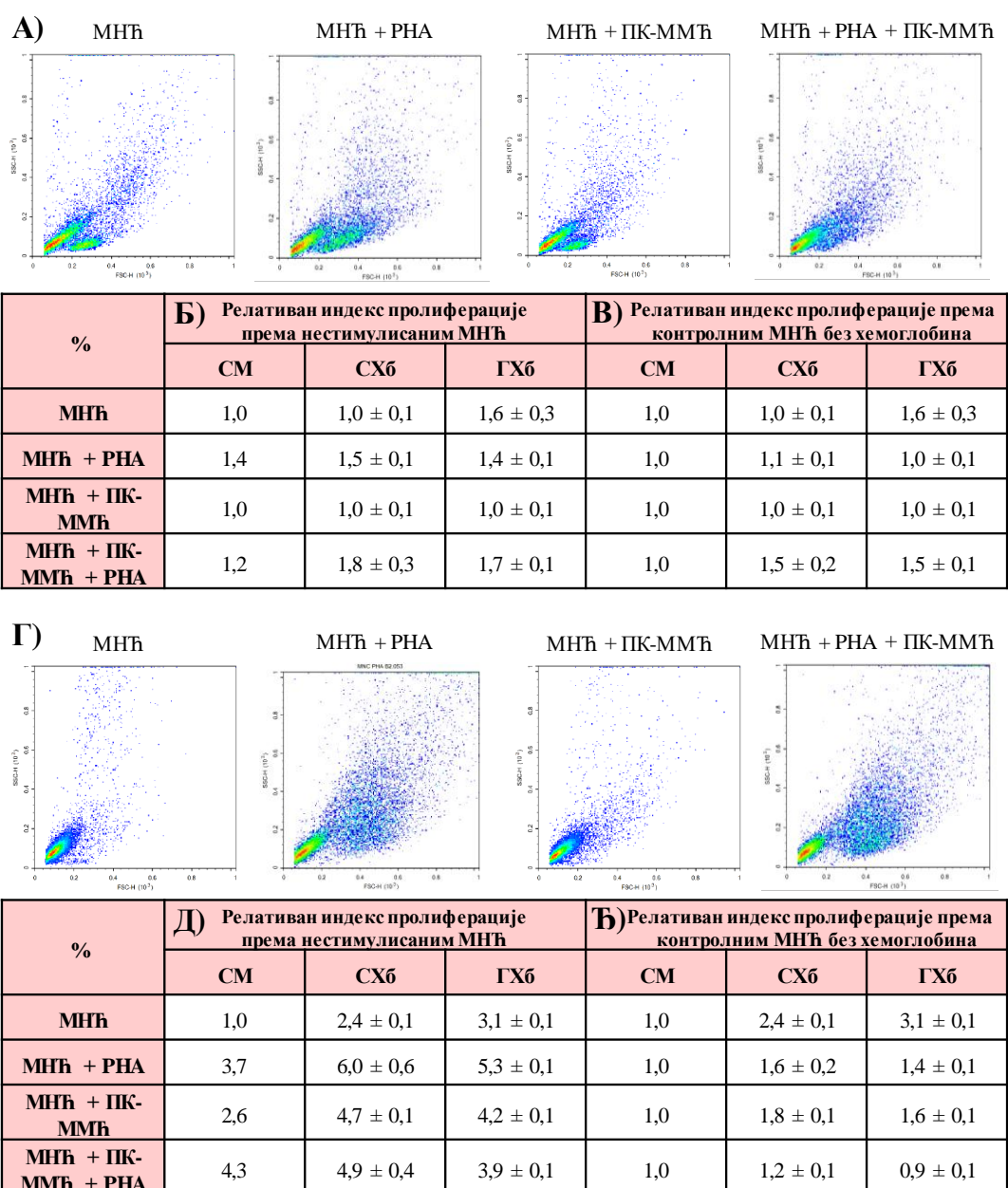
Утицај хемоглобина на модулаторни ефекат ПК-ММЋ на пролиферацију нестимулисаних и митогеном стимулираних алогених МНЋ испитан је на већем броју здравих давалаца МНЋ. Запажено је да су МНЋ давалаца који су на тродневну стимулацију митогеном (РНА) реаговали повећањем процента ћелија у деоби (добри респондери), тј. у S/G2 фазама ћелијског циклуса (описано у делу 4.3.6.2), реаговали и повећаном пролиферацијом у одговору на петодневну стимулацију митогеном. Због оваквог одговора на стимулацију митогеном подела на слабе и добре респондере је задржана и код испитивања утицаја хемоглобина на пролиферацију МНЋ.

Код слабих респондера, (слика 4.26. А-В) свињски хемоглобин није мењао индекс пролиферације нестимулисаних МНЋ, док га је говеђи хемоглобин повећавао (слика 4.26. Б, В). Ни свињски ни говеђи хемоглобин нису доводили до значајније промене индекса пролиферације стимулираних МНЋ, као ни нестимулисаних МНЋ у кокултури са ПК-ММЋ. Међутим, хемоглобин обе животињске врсте је повећавао индекс пролиферације стимулираних МНЋ у култури са ПК-ММЋ (слика 4.26. Б, В).

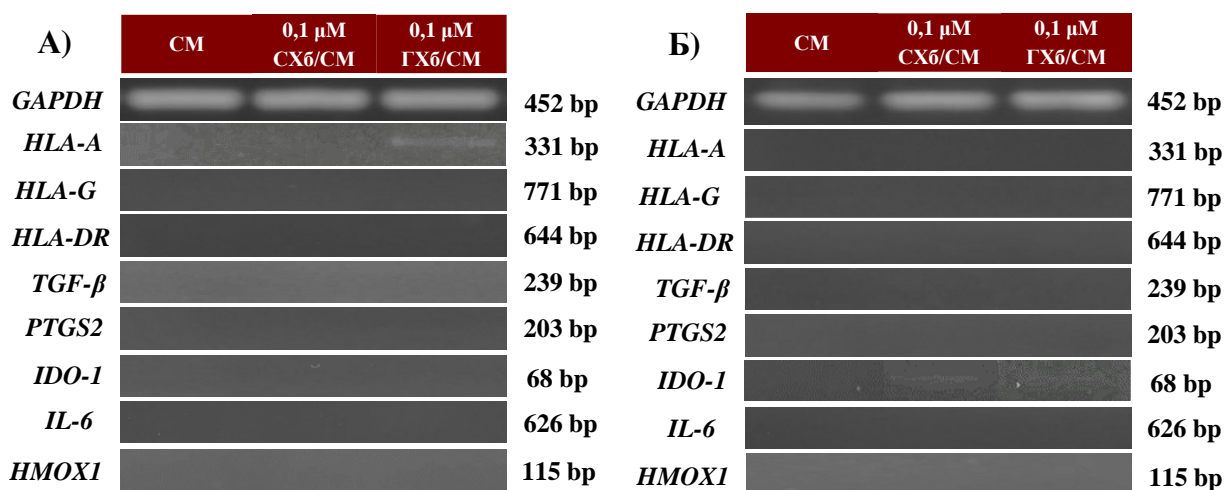
Код добрих респондера, (слика 4.26. Г-Ћ) и свињски и говеђи хемоглобин су повећавали индекс пролиферације нестимулисаних и стимулираних МНЋ, као и нестимулисаних МНЋ у кокултури са ПК-ММЋ. За разлику од лоших респондера, хемоглобини нису имали значајнији утицај на пролиферацију МНЋ добрих респондера у кокултури са ПК-ММЋ.

4.3.6.3. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на експресију имуномодулаторних гена ПК-ММЋ

Анализа конститутивне експресије имуномодулаторних гена ММЋ након 24 и 48 h у култури показала је да је експресија *HLA-G*, *HLA-DR*, *TGF- β* , *PTGS2*, *IL-6* и *HMOX1* била испод нивоа детекције RT-PCR методом (слика 4.27). Експресија *HLA-A* детектована је након 24 h у култури са говеђим хемоглобином (слика 4.27. А), док је исти ефекат изостао код ћелија које су биле култивисане са свињским хемоглобином. Након 48 h у култури хемоглобин изолован из обе животињске врсте довео је до благе стимулације експресије *IDO-1* гена која није детектована у ПК-ММЋ гајеним у стандардном медијуму без хемоглобина (слика 4.27. Б).



Слика 4.26. Утицај свињског (СХб) и говеђејг (ГХб) хемоглобина на модулаторни ефекат ПК-ММЋ на пролиферацију алогених МНЋ давалаца чије су МНЋ слабо реаговале на стимулацију митогеном (А-В) и давалаца су чије МНЋ јаче реаговале на стимулацију митогеном (Г-Ђ). (А, Г): Репрезентативна расподела величине и гранулираности МНЋ добијена проточном цитометријом (FSC/SSC дијаграм). Релативан индекс пролиферације МНЋ гајених само стандардном медијуму (Б, Д) или у кокултури са ПК-ММЋ (В, Ђ). Резултати су приказани као промена вредности индекса пролиферације у односу на нестимулисане МНЋ (вредност 1), или контролне МНЋ без хемоглобина (вредност 1). Резултати три експеримента су изражени као средња вредност ± стандардна девијација



Слика 4.27. Утицај свињског и говеђег хемоглобина на експресију имуномодулаторних гена у ПК-ММЋ. Траке добијене RT-PCR методом гена укључених у имуномодулацију након додавања 0,1 μ M свињског или говеђег хемоглобина у стандардни медијум за култивацију ћелија (CM) након 24 h (A) и 48 h (B). Приказане су репрезентативне RT-PCR траке анализираних гена и трака *GAPDH* као контрола количине узорка нанетих на гел.

ДИСКУСИЈА

5. Дискусија

Хемоглобин, протеин присутан у свим царствима живих организама и високо конзервисан међу кичмењацима чини основу аеробног живота на планети Земљи. Унутарћелијски хемоглобин еритроцита има физиолошки јединствену улогу преноса кисеоника чиме доприноси одржавању биоенергетске хомеостазе организма. Поред кисеоника, хемоглобин може да веже, транспортује или модулише функције и других гасова, CO₂, CO и NO (Quaye, 2015; Coates & Decker, 2016; Olson, 2020). Ванћелијски хемоглобин, настао интра- или екстраваскуларном хемоллизом, као и његови деградациони производи, могу да испоље и бројне друге биолошке функције. Ванћелијски хемоглобин је молекул са високим потенцијалом за стварање реактивних врста кисеоника преко којих остварује своје прооксидативно дејство (Igarashi & Sun, 2006; Jeney et al., 2013; Schaer et al., 2013). Захваљујући овом механизму, данас се сматра да је ванћелијски хемоглобин укључен у етиологију и патофизиологију бројних болести попут пароксизмалне ноћне хемоглобинурије, анемије српастих еритроцита, Алцхајмерове болести, мултипле склерозе, церебралне интравентрикуларне хеморагије, прееклампсије и других (Pandav et al., 2004; Rifkind et al., 2015; Rother et al., 2015; Vamm et al., 2017). Додатно, хемоглобин делује и проинфламаторно, везујући се за рецепторе за препознавање образаца (нпр. рецепторе сличне *Toll-y*) или LPS, активирајући макрофаге, неутрофиле и ендотелске ћелије и амплификујући инфламаторни одговор (Lara et al., 2009; Widmer et al., 2010; Jeney et al., 2013). Међутим, резултати појединих истраживања показују да хидролизати хемоглобина могу испољити и антиоксидативно, антиинфламаторно и антимикубно дејство. Антимикубни пептиди, односно хемоцидини настали од хемоглобина помажу у одбрани имунског система домаћина од различитих микроорганизама (Mak et al., 2007, 2008; Bochenska et al., 2013).

Ксеногени хемоглобини представљају битан предмет биотехнолошких истраживања као потенцијални заменици за крв (Alayash, 1999; Chen et al., 2009), као додаци производима који се користе у исхрани људи и животиња (González-Rosendo et al., 2010; Норре et al., 2013), за испитивање токсичности синтетичких боја (Kamaljeet et al., 2017), интеракције са лековима (Yan et al., 2013; Liu & Liu, 2015; Xu et al., 2019), испитивање ефеката наночестица (Soto Méndez & Caballero Pérez, 2011; Aliakbari et al., 2019), итд. Осим тога, како сваки молекул хемоглобина кичмењака садржи четири атома гвожђа у облику хемског гвожђа, ксеногени хемоглобини су посебно интересантни у истраживањима као потенцијална основа препарата за превенцију или лечење анемија узрокованих дефицитом гвожђа (Simoni et al., 2014; Abuchowski, 2017). Недостаци уочени код заменика за крв на бази хуманог и говеђег хемоглобина (вазоконстрикција и оксидативно оштећење), превазиђени су коришћењем природног полимерног хемоглобина изолованог из морске полихете *Arenicola marina*. Иста истраживачка група развила је НЕМО2Life[®] (Mallet et al., 2014), НЕМОХУCarrier[®] (Rousselot et al., 2006) и НЕМОХСCell[®] (Le Pape et al., 2015; Le Pape et al., 2017a) који су намењени за презервацију ткива и органа *ex vivo*, као преносиоци кисеоника засновани на хемоглобину и као оксигенацијски адитиви у ћелијској култури, респективно. У поређењу са престарелом хуманом крви која се може искористити у случају да се није употребила за трансфузију, кланична крв представља практично непресушан извор молекула хемоглобина, што подржава њену економичност и погодност за широку употребу. Свињска и говеђа крв су, у поређењу са живинском, пожељнији извори хемоглобина јер су свиње и говеда сисари чији еритроцити, за разлику од еритроцита птица, не садрже једра, што олакшава експерименталну манипулацију и изолацију хемоглобина из ових ћелија. Додатно, и свињски (Yang et al., 2019) и говеђи хемоглобин (Wang et al., 2017a) показују висок степен хомологије хуманом хемоглобину (84,4% и 85%, респективно).

5.1. Хемоглобин изолован из кланичне крви има одлике нативног хемоглобина

У сарадњи Института за медицинска истраживања и Технолошко-металуршког факултет Универзитета у Београду, развијен је и оптимизован ефикасан процес за изолацију високо пречишћеног хемоглобина из кланичне крви заснован на градуалној хипотоничној хемолизи (Kostić et al., 2014; Stojanović et al., 2012) и који је у изради ове докторске дисертације коришћен за изолацију свињског и говеђег хемоглобина. Електрофоретским техникама доказан је висок степен пречишћености протеина (>90%) у изолатима свињског и говеђег хемоглобина. Главни контаминант у изолатима хемоглобина на основу молекулске тежине (30 kDa) и изолетричне тачке (5,9) одговара карбонилној анхидрази (Tanis et al., 1970; Lecoeur et al., 2011). Анализа UV-Vis спектра и просечне величине колоидних честица показали су да се хемоглобин налази у нативној форми, као тетрамер глобинских ланаца који садржи хем групу. UV-Vis спектралном анализом потврђено је да изоловани хемоглобини имају апсорпционе максимуме карактеристичне за оксихемоглобин (Zijlstra et al., 1991; Sherif & Amal, 2010). Додатно, урађена је анализа садржаја укупних липида и фосфолипида у узорцима хемоглобина, а затим и детаљно испитивање удела масних киселина у детектованим фосфолипидима. Показано је да је садржај фосфолипида био већи у узорцима свињског хемоглобина у односу на узорке говеђег. Такође, састав масних киселина се разликовао у узорцима свињског и говеђег хемоглобина, али је одговарао оном који литературни подаци показују за фосфолипиде свињских (Malovrh et al., 2014) и говеђих (Sako et al., 1989) еритроцита. Познато је да хем група има антиоксидативна својства (Giulivi & Davies, 1990; Tang et al., 2015). Дозно зависна редукција ABTS радикала у присуству свињског и говеђег хемоглобина показала је да је хем у овим молекулима у феро облику (Fe^{2+}), што указује да хемоглобин који смо користили у нашим експериментима има очувану функцију везивања кисеоника.

5.2. Ефекат ванћелијског хемоглобина испитан је на одговарајућим ћелијским моделима

С обзиром да су експерименти физичко-хемијске карактеризације потврдили да се хемоглобин након процеса изолације и делимичног пречишћавања налазио у форми нативног тетрамера оксихемоглобина, приступили смо тестирању ефеката свињског и говеђег хемоглобина у ћелијској култури како би потврдили његову биолошку активност, а затим испитали и његов ефекат на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија. Према нашим сазнањима, подаци о директном или индиректном утицају хемоглобина пореклом из свињске и говеђе крви на функцијска својства имунских ћелија и ММЋ не постоје. У изради ове докторске дисертације примењено је неколико ћелијских модела. С обзиром на бројне поменуте имуномодулаторне и имунорегулаторне функције које ванћелијски хемоглобин испољава, утицај два ксеногена хемоглобина у првом делу истраживања испитан је на моделу хуманих мононуклеарних ћелија (МНЋ) и гранулоцита (полиморфонуклеарних ћелија, ПМЋ) периферне крви здравих давалаца. Додатно, ефекат свињског и говеђег хемоглобина испитан је на ММЋ изолованим из периферне крви (ПК-ММЋ), као типу ММЋ који, у поређењу са ММЋ из других извора, у случају интраваскуларне хемолIZE може први доћи у контакт са ванћелијским хемоглобином. Предност коришћења овог типа ММЋ представља и то што је процес изолације мање инвазиван у односу на процес изолације ММЋ из других ткива које могу бити извори ових ћелија, а по успешној изолацији, њихова пропација је дуга и стабилна. Иако ММЋ адекватније одражавају *in vivo* услове у тестовима *in vitro* у поређењу са трансформисаним или имортализованим ћелијским линијама, ММЋ представљају хетерогену популацију ћелија, чије карактеристике зависе од даваоца, броја пасажа и бројних других фактора (He et al., 2007; McLeod & Mauck, 2017; Arnhold et al., 2019). Како ксеногени хемоглобини и сами представљају хетероген биолошки материјал (различите молекулске форме, молекулске структуре, контаминанти...) утицај свињског и говеђег хемоглобина додатно је испитан и на четири ћелијске линије, које представљају униформније модел системе у

односу на ММЋ као примарне ћелије, и одликују се, као и све ћелијске линије, брзом пролиферацијом, високом експанзивношћу и стабилношћу. Због тога је утицај ванћелијског хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија испитан и на четири мишје ћелијске линије: АТДС5, МС3Т3-Е1, 3Т3-Л1 и С2С12 које представљају адекватне *in vitro* моделе за проучавање миогенезе, хондрогенезе, остегенезе и адипогенезе, респективно.

5.3. Индиректни докази потврђују да је структура хемоглобина очувана у ћелијским културама

У првом сету експеримената испитали смо да ли се свињски и говеђи хемоглобин „троше“, односно да ли долази до промене њихове концентрације у супернатантима култура МНЋ и ПК-ММЋ након 48 h и 96 h. Ова два временска термина изабрана су пошто је у свим експериментима са ћелијама, хемоглобин у медијумима за одговарајуће ћелијске културе (RPMI за неадхерентне и DMEM за адхерентне ћелије) био мењан у просеку на два до три дана. Највеће забележено снижење концентрације хемоглобина у култури ћелија након 48h износило је 25%, односно 32% након 96 h. Урађена UV-Vis спектрална анализа супернатаната ћелијских култура (*подаци нису приказани*) није довољна да бисмо са сигурношћу знали да ли је хемоглобин у њима и даље био у форми нативног молекула или је дошло до његове делимичне деградације. Међутим, други резултати, приказани у оквиру ове докторске дисертације, индиректно су указали на то да је структура хемоглобина ипак била очувана. Наиме, показано је да се експресија HO-1 може индуковати како у МНЋ (Mo et al., 2005; Habtezion et al., 2011; Fagone et al., 2013), тако и у ММЋ (Vanella et al., 2011, 2012; Li et al., 2017; Nowak et al., 2017) под утицајем различитих стимулуса, укључујући хемоглобин и његове деривате У нашим експериментима на ћелијским културама, ни у једном експерименталном дизајну нисмо успели да детектујемо експресију HO-1 RT-PCR методом. Једно од потенцијалних објашњења може бити да чак и да је слободан хем постојао у културама ћелија, његова концентрација није била довољна да индукује експресију овог ензима. Иако се медијуму за ћелијске културе рутински додају различити пуферски системи (у нашим експериментима коришћен је HEPES), неминовно са растом и одвијањем метаболичких функција ћелија долази до закишељавања медијума у коме се ћелије налазе, посебно при вишенедељним ћелијским културама у оквиру индуковања различитих типова диференцијација. Сходно томе, у нашим експериментима се, пре замене старог медијума свежим, хемоглобин у DMEM или RPMI медијуму бар неко време налази у средини где су рН вредности испод неутралних/физиолошких, а показано је да при таквим нижим рН вредностима тетрамер хемоглобина дисосује на димере, а затим, са додатним снижењем рН вредности и на мономере (Huang et al., 2013). С обзиром на све наведено, највећи удео забележних функција хемоглобина приписујемо мономерном, димерном или тетрамерном молекулу хемоглобина, иако се без додатних истраживања стабилности хемоглобина у ћелијским културама не може искључити директан утицај хема (хемина), пептида пореклом од хемоглобина или слободног гвожђа на ћелије.

5.4. Хемоглобин смањује вијабилност МНЋ

Литературни подаци о утицају хемоглобина (Ortegon et al., 2002; Chen & Palmer, 2010; Le Pape et al., 2017a; Kuck et al., 2018), хемина (Yang et al., 2017), хема (Lara et al., 2009) и пептида пореклом од хемоглобина (Wang et al., 2017b; Lueangsakulthai et al., 2018) на пролиферацију/вијабилност различитих ћелија су бројни, али неконзистентни. Ефекат хемоглобина на вијабилност ћелија зависи од врсте организма из ког је хемоглобин изолован, примењене концентрације хемоглобина и типа ћелија на којима је ефекат испитиван, што су показали и резултати добијени у овој докторској дисертацији. Наши резултати испитивања цитотоксичности хемоглобина у ширем опсегу концентрација (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 и 16 μM , односно 0,016, 0,031, 0,06, 0,125, 0,25, 0,5 и 1 g/L) на хуманим МНЋ показали су да након 5 дана инкубације свињски хемоглобин значајно снижава вијабилност

МНЋ у концентрацијама вишим од 4 μM , док говеђи хемоглобин испољава исти ефекат при концентрацијама вишим од 1 μM . Све испитиване концентрације хемоглобина обе животињске врсте испољиле су цитотоксичан ефекат на МНЋ стимулисане митогеном. Подаци из литературе о испитивању утицаја хемоглобина на вијабилност макрофагних ћелијских линија показују да хумани хемоглобин не утиче на вијабилност ТНР-1 макрофага у концентрацијама од 0,05, 0,1, 0,5 и 1 mg/mL , које одговарају онима које смо и ми користили, али је време инкубације у студији других аутора било краће: 6 h наспрот 5 дана у нашим експериментима (Bahl et al., 2014). Показано је и да хемоглобин сијамског крокодила (*Crocodylus siamensis*), као и четири пептида настала хидролизом овог молекула нису утицали на вијабилност мишје макрофагне ћелијске линије RAW 264.7 у концентрацијама од 62–500 $\mu\text{g/mL}$ након инкубације од 24 h (Lueangsakulthai et al., 2018). Fischer-Fodor и сарадници (2011) испитали су ефекат нативног 1mM говеђег хемоглобина на културу хуманих лимфоцита у току 24, 48 и 72 h и показали да тек после инкубације од 72 h долази до благог смањења вијабилности ових ћелија гајених у медијуму који је био суплементисан хемоглобином. Хемоглобин инкапсулиран у наночестице од блок полимера млечне киселине и полиетилен гликола (енг. *poly(lactic acid)–poly(ethylene glycol)*, PLA-PEG), није у већој мери мењао вијабилност (промена између 75% и 115% у односу на контролу) мишјих перитонеалних макрофага у концентрацијама које одговарају онима које смо и ми користили у нашим истраживањима (0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, и 1 mg/mL) након 48 h у култури (Sheng et al., 2009).

Међутим, иако је МТТ тестом детектован пад метаболичке активности МНЋ у присуству хемоглобина (у концентрацијама вишим од 4 μM и 1 μM у културама са свињским и говеђим хемоглобином, респективно), директним бојењем ћелија трипан плавим није уочена разлика у концентрацији МНЋ гајених са хемоглобином, док је вијабилност била незнатно снижена само у културама са вишим концентрацијама хемоглобина. Дискрепанца између реалног броја вијабилних ћелија и вијабилности као резултата МТТ теста није неуобичајена појава у експериментима са ћелијским културама (Pagliacci et al., 1993; Gordon et al., 2018). Како се МТТ тест заснива на мерењу апсорбанце формазана, нерастворног производа насталог дејством митохондријског ензима сукцинат дехидрогеназе (Fotakis & Timbrell, 2006), промене у броју или функцији митохондрија могу бити одговорне за „пад вијабилности“ детектован МТТ тестом у ситуацијама када није забележена промена броја ћелија одређена директним бројањем под светлосним микроскопом (Pagliacci et al., 1993). Но, како би се стекао дубљи увид у молекулске механизме којим хемоглобин остварује ефекат на вијабилност МНЋ неопходни су додатни експерименти.

5.5. Хемоглобин модулише адхезивност и продукцију ROS од стране хуманих МНЋ и ПМЋ

Фагоцити играју кључну улогу током локалне инфламације која може бити покренута у одговору на инфекцију, или узрокована аутоимунским реакцијама. Централни догађај који омогућава овим ћелијама да из циркулације доспеју на место инфекције јесте екстравазација која се одвија кроз низ фаза укључујући котрљање по ендотелним ћелијама, стабилну адхезију за ове ћелије и дијапедезу. Главну улогу у овим процесима играју интегрини и селектини, молекули експримирани на леукоцитима и ендотелским ћелијама, респективно (Souto et al., 2011; Alvarez-Zarate et al., 2015; Lavoie & Levy, 2017). У овој докторској дисертацији испитан је ефекат свињског и говеђег хемоглобина на адхезију МНЋ и ПМЋ у две експерименталне поставке: 1) са пре-адхезијом, када је ћелијама пре додавања хемоглобина омогућено да адхерирају за пластику чиме су покренути сигнали који доводе до активације ћелија (Taylor & Weinberg, 2009; Abbas et al., 2016) и 2) без пре-адхезије, када су ћелије и хемоглобин истовремено додавани у културе. Наши резултати показали су да хемоглобин остварује другачији ефекат на адхезивност претходно активираних МНЋ и ПМЋ у односу на неактивираних ћелија. Свињски хемоглобин није

остварио утицај на адхезивност претходно активираних ћелија, док је говеђи стимулисао. Обрнуто, у тесту без пре-адхезије говеђи хемоглобин није остварио утицај на адхезивност МНЋ и ПМЋ, док ју је свињски хемоглобин снижавао.

Литературни подаци такође показују да хемоглобин може остварити дихотом ефекат на ову функцијску карактеристику леукоцита. Нау и сарадници (1981) показали су да додатак хемоглобина у интраперитонеални инокулум пацова (модел експерименталног перитонитиса) спречава нормалан инфлукс ПМЋ у перитонеалну шупљину. Исти аутори показали су да хемоглобин дозно зависно снижава хемотаксични одговор ПМЋ, док не утиче на спонтану миграцију како ПМЋ, тако ни МНЋ (Нау et al., 1977). Додатно, супресија хемотаксе била је повећана када се хемоглобин додавао директно на место где су ћелије биле присутне (а не на место где се налазио хемоатрактант), тако да су ови аутори претпоставили да хемоглобин остварује овај свој ефекат, инхибирајући експресију рецептора за хемоатрактант или сигнализацију путем њега. Freischlag и сарадници (1985) показали су да хемоглобин доводи до снижења адхезивности ПМЋ и здравих зечева и зечева код којих је индукован перитонитис. Ови истраживачи користили су ПМЋ изоловане из перитонеума, али и из крви. Постоје истраживања чији резултати говоре о улози хемоглобина као хемоатрактанта за МНЋ и дендритске ћелије крви, као и да овај молекул стимулише адхезију са ендотелским ћелијама и трансендотелску миграцију моноцита, чиме се претпоставља да остварује улогу у етиологији и прогресији атеросклерозе (Buttari et al., 2007, 2011).

Истраживања о утицају хемоглобина на адхезивност леукоцита периферне крви спроведена седамдесетих и осамдесетих година прошлог века пратила су она у којима је анализиран ефекат овог молекула на фагоцитозу и продукцију ROS у фагоцитима. Нау и Simmons (1980) показали су да хемоглобин инхибира фагоцитозу и унутарћелијско убијање микроба у ПМЋ. Да хемоглобин снижава бактерицидну активност ових ћелија потврдили су и Welch и сарадници (1982). Студије Lee и сарадника (1979) потврдиле су да запажен ефекат хемоглобина на хемотаксу, адхезивност, фагоцитозу и способност убијања бактерија зависи од дела протеина који садржи гвожђе. Наши резултати показују да и свињски и говеђи хемоглобин доводе до повећања продукције ROS у МНЋ и ПМЋ на дозно зависан начин, што је у складу са резултатима испитивања ефекта хуманог хемоглобина на продукцију ROS код HT-29, хумане ћелијске линије канцера колона (Lee et al., 2006). Abe и сарадници (2001) показали су да нео црвене ћелије (енг. *neo red cells*) које представљају хемоглобин инкапсулиран у липозоме стимулишу продукцију супероксида у ПМЋ. McFaul и сарадници (1994) показали су да хемоглобин стимулише хемотаксу и адхеренцу ПМЋ за хумане ендотелне ћелије умбиликалне вене (енг. *human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) и да се овај ефекат поништава када се у медијум додају неутралишућа антитела за IL-8 и TNF- α , што говори о потенцијалном механизму дејства хемоглобина.

5.6. Хемоглобин модулише пролиферацију/диференцијацију опредељених матичних ћелија хематопоезе периферне крви човека

Да хемоглобин утиче на еритропоезу познато је још од пионирских експеримената који су показали да инфузија хемоглобина у глодаре и људе стимулише еритропоезу (Okamura et al., 1971). Међутим тачан механизам којим се остварује овај ефекат још увек није у потпуности разјашњен, иако се претпоставља да укључује сигнализацију преко хема или гвожђа, односно повећања синтезе еритропоетина (Okamura et al., 1971). Mueller и сарадници (1997) показали су да хемоглобин може остварити и директан утицај на еритроидне прогениторе. У истраживању које су спровели хемоглобин је доводио до повећања раста и диференцијације хематопоетских прогенитора, односно колоније су постајале веће и „интензивније црвене“ у присуству хемоглобина (Mueller et al., 1997). Исти аутори показали су да CD34⁺ хематопоетски прогенитори експремирају CD163, молекул за који се претходно мислило да се екпримира искључиво на макрофагима и моноцитима, и

да се највероватније везивањем за овај молекул остварује утицај слободног хемоглобина на еритроидне прекурсоре (Matthews et al., 2006). Додатно, показано је да сигнална трансдукција са овог рецептора резултује у синтези IL-6, IL-1 β и GM-CSF за које је познато да имају хематопоетску активност (Van den Heuvel et al., 1999).

Међутим, како су Tanaka и сарадници (2019) истакли, при екстраполацији података добијених *in vitro* и *in vivo* треба бити пажљив, јер у условима *in vivo* ћелије микросредине хематопоетских органа највероватније штите хематопоетске ћелије од прекомерне концентрације гвожђа. Такође, код пацијената са хемохроматозом (прекомерним складиштењем гвожђа у организму), до повишења концентрације гвожђа долази постепено како болест напредује, тако да организам има времена да развије адаптивне заштитне механизме (Tanaka et al., 2019). Tanaka и сарадници (2019) испитали су утицај гвожђа на хематопоетске ћелије *in vitro* и показали да су и пролиферација и диференцијација ових ћелија снижене у присуству гвожђа, што је највероватније последица акумулације ROS. Је и сарадници (2018) показали су исто на мишјем моделу мијелодиспластичног синдрома. Lu и сарадници (2013) показали су да хемохроматоза доводи до смањења броја CFU-E, BFU-E, CFU-GM и CFU-GEMM, као и да је овај ефекат највероватније посредован продукцијом ROS. Примена хелирајуће терапије и антиоксиданаса успела је да повећа број поменутих колонија хематопоетских прогенитора код пацијената након 6 месеци (Lu et al., 2013).

Како се у нашим експериментима радило о дуготрајним културама (14 дана), а хемоглобин је због природе медијума MethoCult додат једанпут када су ћелије засејане, уочен ефекат хемоглобина у нашим експериментима може се приписати повишеној концентрацији гвожђа у ћелијској микросредини, сходно томе да је за време инкубације највероватније дошло до деградације протеина и хема. Међутим, за утврђивање тачног механизма којим хемоглобин остварује запажени ефекат неопходна су додатна истраживања. Због великих индивидуалних варијација у броју колонија хематопоетских прекурсора између давалаца које су показали наши резултати, даваоце смо поделили у седам група на основу тога да ли хемоглобин доводи до смањења, повећања или не мења броја BFU-E и CFU-GM колонија. Због овакве варијабилности, статистички значајне разлике у укупном броју колонија (CFC) или броју појединачних BFU-E, CFU-GM и CFU-GEMM колонија између култура третираних хемоглобином и контролних култура нису уочене, иако су наши резултати показали промену морфологије колонија формираних у присуству хемоглобина, што је у складу са резултатима студије Mueller и сарадника (1997).

5.7. Хемоглобин модулише вијабилност мезенхимских ћелија

Познато је да када се нађе ван ћелија, хемоглобин може да утиче на функцију ћелија и карактеристике ткива (Schaer et al. 2013; Coates and Decker 2016). Из тог разлога је и у оквиру ове докторске дисертације испитиван ефекат ксеногених хемоглобина на различите ћелије мезодермалног порекла. Испитан је ефекат хемоглобина на раст, миграторни, диференцијациони и имуномодулаторни потенцијал ПК-ММ H , које су коришћене као модел систем примарних мезенхимских ћелија. Главну предност коришћења примарних хуманих ћелија за *in vitro* анализу биоактивних једињења, у односу на традиционално коришћене трансформисане или имортализоване ћелијске линије представља чињеница да примарне ћелије веродостојније осликавају *in vivo* услове (Scanu et al., 2011; Uysal et al., 2017). Имајући у виду да хемоглобин из кланичне крви представља модел систем за симулацију отпуштања ванћелијског хемоглобина услед хемолize у физиолошким и патолошким условима (Schaer et al. 2013; Coates and Decker 2016), ПК-ММ H представљају погодан модел систем за изучавање ових процеса. Међутим, као што је већ речено у поглављу 5.2. мезенхимске матичне ћелије, независно од извора из ког су изоловане представљају хетерогену ћелијску популацију чије карактеристике зависе од бројних фактора, укључујући даваоца, број пасажа у ћелијској култури, итд. (He et al., 2007; McLeod & Mauck, 2017; Arnhold et al., 2019). Из тог разлога, испитали смо утицај хемоглобина на

функцијске карактеристике мезенхимских ћелија користећи као модел и четири ћелијске линије мезодермалног порекла које представљају униформније модел системе у поређењу са примарним ћелијама. Мишје ћелијске линије: АТDC5, МС3Т3-Е1, 3Т3-Л1 и С2С12 коришћене су за испитивање утицаја хемоглобина на вијабилност, миграцију и способност диференцијације ка хондроеној, остеоеној, адипоеној и миоеној лози, респективно.

У истраживањима анализе утицаја хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија одлучили смо се за три концентрације (0,1, 1 и 10 μM) пошто су наши први експерименти показали да су се све анализирани мезенхимске ћелије „одлепљивале“ од подлоге када су биле култивисане у медијуму који је садржао хемоглобин у концентрацији вишој од 10 μM . Према нашим сазнањима, у истраживањима урађеним у оквиру ове докторске дисертације, по први пут је анализиран ефекат хемоглобина пореклом из било које биолошке врсте на функцијске карактеристике мезенхимских ћелијских линија, АТDC5, МС3Т3-Е1, 3Т3-Л1 и С2С12. Додатно, у литератури нису забележени подаци о утицају хемоглобина сисара на пролиферацију/вијабилност ММЋ човека, већ само хемоглобина пореклом из анелида (Le Pape et al., 2017a; (Le Pape et al., 2017b). У студијама у којима је испитиван утицаја хемоглобина анелида на вијабилност ММЋ изолованих из косне сржи човека показано је да комерцијално доступан производ НЕМОХСелл® у концентрацији од 0,025 g/L доводи до смањења времена потребног да се број ових ћелија удвостручи. Другим речима, НЕМОХСелл® је у концентрацији од 0,025 g/L доводио је до стимулације пролиферације ММЋ након 13 дана у култури (Le Pape et al., 2017a), при чему су ћелије задржавале своју типичну морфологију сличну фибробластима. Концентрација од 0,05 g/L је повећала време потребно да се број ММЋ из косне сржи удвостручи. Неке од ћелија култивисаних са овом концентрацијом НЕМОХСелл® почеле су да задобијају округлао облик, што је указало на губљење својства адхеренце за пластику. Исти аутори показали су да 0,025 g/L НЕМОХСелл® стимулише пролиферацију ММЋ из косне сржи и у остеоеном диференцијационом медијуму (Le Pape et al., 2017b).

Резултати добијени у овој докторској дисертацији показују да свињски и говеђи хемоглобин у нижим концентрацијама (0,1 μM) не утичу на вијабилност ПК-ММЋ, док у вишим концентрацијама (1 и 10 μM) стимулишу вијабилност ПК-ММЋ након 72 h инкубације (најдуже време инкубације примењене у овој студији). Наши резултати у којима смо анализирали ефекат нативног хемоглобина изолованих из еритроцита две врсте сисара, се не могу директно поредити са резултатима експеримената у којим је испитиван утицај хемоглобина морских анелида, јер је хемоглобин анелида огроман полимерни ванћелијски протеин, другачије структуре и функционалних карактеристика у поређењу са хемоглобином кичмењака (Zal & Rousselot, 2014).

Већи број истраживачких група испитао је ефекат хемоглобина на вијабилност како нормалних, тако и туморских ћелија. Lee и сарадници (2006) показали су да хумани хемоглобин стимулише пролиферацију ћелија канцера колоне (HT-29 и Lovo) и нормалних фибробласта колоне (CCL-33Co ћелијске линије) на дозно зависан начин. У концентрацијама од 0,25, 0,5 и 1 mg/mL хумани хемоглобин није утицао на вијабилност HUVEC ћелија након 18 h инкубације (Kuck et al., 2018), али је дужа инкубација (24, 48 и 72 h) доводила до смањења вијабилности ових ћелија култивисаних са хемоглобином (Fischer-Fodor et al., 2011). Roth и сарадници (2014) испитали су утицај хуманог, говеђег и хемоглобина кишне глисте на вијабилност ћелија глиома у концентрацијама од 1-5 g/L и показали да само хумани хемоглобин доводи до значајног смањења вијабилности ових ћелија, али искључиво у условима хипоксије (концентрација кисеоника мања од 5%). Иако није доводио до промене вијабилности С3А ћелија (ћелијска линија хуманог хепатома), принос ћелија гајених у биореактору са медијумом суплментисаним говеђим хемоглобином (15 g/L) био је дупло већи у односу на ћелије гајене у стандардном медијуму без хемоглобина након 14 дана (Chen & Palmer, 2010). Испитивања утицаја НЕМОХСелл® у ћелијској култури започета су анализом утицаја овог производа у ширем концентрацијском

опсегу (0,125-2 g/L) на вијабилност ћелијске линије CHO-S у вишедневним културама. Тако је показано да је НЕМОХСелл® не остварује значајан утицај на lag фазу раста ових ћелија у култури, док амплификује експоненцијалну (log) фазу на дозно зависан начин. Тек су више концентрације (1 и 2 g/L) доводиле до смањења вијабилности ових ћелија (Le Pape et al., 2015). Пептид пореклом од говеђег хемоглобина испољио је слабу цитотоксичност на МIАРaCa-2 ћелијску линију канцера панкреаса у концентрацијама од 0,1 до 0,4 mg/mL након инкубације од 72 h (Wang et al., 2017b).

Група истраживача из Шангаја испитивала је утицај хемоглобина и његових деградационих производа на ћелије нервног система. Тако су показали да хемин након 24 h (и 6 h претретмана са хемоглобином) доводи до дозно зависног смањења вијабилности примарних пацовских астроцита у концентрацијама од 0-60 μM (Yang et al., 2017). Исти аутори показали су да говеђи хемоглобин у концентрацијама од 0-30 μM на дозно зависан начин повећава вијабилност примарних пацовских астроцита након 24 h (Yang et al., 2018). Ова студија потврдила је резултате до којих су претходно дошли Laga и сарадници (2009) који су показали већу осетљивост неурона на токсичност хемоглобина и хема (по 10 $\mu\text{mol/L}$ током 12 h) у односу на астроците: пацовски хемоглобин и хем су смањивали вијабилност нервних ћелија и нису испољили ефекат на астроците пацова. Слично, Ortega и сарадници (2002) показали су да хумани хемоглобин доводи до смањења вијабилност феталних нервних ћелија пацова у концентрацијама од 2 и 6,5 g/dL након 24 h инкубације.

Резултати приказани у овој докторској дисертацији показују да је утицај хемоглобина на вијабилност мезенхимских ћелија зависио од типа мезенхимских ћелија и порекла хемоглобина. Тако, након пролазног смањења, говеђи хемоглобин доводи до повећања вијабилности ПК-ММЋ, 3Т3-Л1 и С2С12 ћелија након 72 h, али смањује вијабилност АТDC5 и МС3Т3-Е1 ћелија. Свињски хемоглобин је пратио овај образац утицаја на вијабилност ПК-ММЋ, АТDC5 и МС3Т3-Е1, али се његов ефекат на вијабилност 3Т3-Л1 и С2С12 ћелија разликовао од ефекта говеђег хемоглобина. Свињски хемоглобин је смањивао вијабилност С2С12 ћелија у вишим концентрацијама (1 и 10 μM), док је утицај свињског хемоглобина на вијабилност 3Т3-Л1 био дихотом, у највишој испитиваној концентрацији је смањивао вијабилност, док је испољио стимулаторни ефекат у концентрацијама од 0,1 и 1 μM након 48 и 72 h. Смањење степена пролиферације ПК-ММЋ након 24 h било је у сагласности са резултатима утицаја хемоглобина на ћелијски циклус ових ћелија који су показали да долази до пролазног застоја у G0/G1 фази након 24 h у култури са хемоглобином. Овај ефекат је почео да слаби након 48 h у култури ћелија са говеђим хемоглобином и био у потпуности поништен у културама ћелија са свињским хемоглобином за исто време. Додатно, број апоптотских ћелија у културама ПК-ММЋ са хемоглобином био је низак и на нивоу оног у културама ћелија гајених у стандардном медијуму. Ни свињски ни говеђи хемоглобин у концентрацији од 0,1 μM нису довели до промене клоногеног потенцијала ПК-ММЋ, док су у вишим (1 и 10 μM) концентрацијама смањивали број CFU-F колонија. Сходно свему наведеном и чињеници да је концентрација од 0,1 μM довела до промена ћелијске вијабилности најмањег интензитета, ова концентрација је изабрана за даље испитивање утицаја хемоглобина на диференцијациони капацитет мезенхимских ћелија.

5.8. Хемоглобин модулише миграторни капацитет мезенхимских ћелија

Подаци из литературе показују да ПК-ММЋ највероватније воде порекло од ММЋ из косне сржи које у одговору на различите сигнале микросредине оштећеног ткива мигрирају кроз ендотел и бивају привучене на место инфламације или повреде где могу остварити своју регенеративну улогу (Bianco et al., 2008; Trivanović et al., 2013a; Álvarez-Viejo, 2015; González-Garza et al., 2018). Иако још увек нису познати сви фактори укључени у овај процес, зна се да микросредина производи цитокине, хемокине и друге хемоатрактанте који стимулишу миграцију ММЋ (Nakamizo et al., 2005; Son et al., 2006).

Подаци из литературе о утицају хемоглобина и његових деградационих производа на миграторну способност мезенхимских ћелија су ретки. Во и сарадници (2015) показали су да HbA1c (гликозиловани хемоглобин изолован из крви пацијената оболелих од дијабетес мелитус тип 2) доводи до инхибиције миграције HUVEC ћелија у свим испитиваним концентрацијама. Roth и сарадници (2014) испитали су утицај хуманог, говеђег и хемоглобина кишне глисте (опсег концентрација 1-5 g/L) на миграторну способност ћелија глиома при различитим концентрацијама кисеоника (19%, 5% и 1%). У свим експерименталним поставкама, хемоглобин ниједне врсте није доводио до промене миграторне способности ћелија глиома у „scratch“ тесту, изузев говеђег хемоглобина који је у концентрацији од 0,5 g/L, при концентрацији кисеоника од 5%, стимулисао миграцију ових ћелија (Roth et al., 2014). С друге стране, хемоглобин кишне глисте је у истој концентрацији при 1% O₂ значајно смањивао миграторни капацитет. Wang и сарадници (2017b) показали су да два од пет тестираних пептида пореклом од говеђег хемоглобина инхибирају миграцију MIAPaCa-2 ћелија у „scratch“ тесту за 50% и 30% у односу на контролну групу након 72 h у култури. Како је показано и при анализи утицаја на вијабилност ћелија, поново је ефекат хемоглобина зависио од врсте из које је изолован, примењене концентрације, времена инкубације и типа ћелија. Наши подаци показују да је ефекат свињског и говеђег хемоглобина био преодминантно благо стимулаторан, што значи да хемоглобини нису повећавали миграторни капацитет ПК-ММЋ, ATDC5, MC3T3-E1, 3T3-L1 и C2C12 ћелија за више од 10%. Овај преодминантно стимулаторан ефекат је у складу са резултатима добијеним у студијама Roth и сарадника (2014). Испољвавање овог стимулаторног ефекта у нашим експериментима је такође зависило од типа ћелија, врсте из које је хемоглобин изолован и примењене концентрације. Тако су хемоглобини обе животињске врсте стимулисали миграцију ATDC5 ћелија, док је само говеђи хемоглобин остварио овај ефекат на миграцију C2C12. Сличан тренд запажен је у експериментима са ПК-ММЋ: свињски хемоглобин није остварио утицај на миграцију ових ћелија, док ју је говеђи хемоглобин стимулисао у вишим концентрацијама. Стимулаторни ефекат на миграторни потенцијал MC3T3-E1 ћелија остварила су оба хемоглобина у концентрацији од 1 μM. Потенцијални стимулаторни ефекат хемоглобина на миграцију 3T3-L1 није могао бити уочен у примењеној експерименталној поставци сходно томе да су ове ћелије имале изражену способност спонтане миграције и након 24 h спонтано затварале „огреботину“.

5.9. Хемоглобин смањује диференцијациони капацитет мезенхимских ћелија

Вероватно најважнија и највише проучавана функцијска карактеристика ММЋ јесте њихова способност диференцијације. Како носе реч „мезенхимске“ у свом називу, било је очекивано претпоставити, а затим је и доказано, да се могу диференцирати у ћелије ткива мезодермалног порекла, укључујући масно, коштано, хрскавичаво и мишићно ткиво (Pittenger et al., 1999; He et al., 2007; Cesselli et al., 2009; Gao et al., 2014). Међутим, показано је да потенцијал за диференцијацију ММЋ превазилази границе ткива мезенхимског порекла и да се ове ћелије могу диференцирати и у ћелије ектодерма и ендодерма, укључујући хепатоците (Petersen et al., 1999; Schwartz et al., 2002), неуроне (Tropel et al., 2006) и кардиомиоците (Pijnappels et al., 2008; Ayuningtyas et al., 2020). Један од критеријума прописаних од стране Међународног друштва за ћелијску терапију за карактеризацију изолованих ћелија као ММЋ јесте и потенцијал за мултипотентну диференцијацију. То подразумева диференцијацију у правцу најмање три лозе, остеогене, адипогене и хондрогене под стандардним условима за диференцијацију *in vitro* и тај потенцијал се у нашим лабораторијама рутински испитује. Сходно томе, одлучили смо да тестирамо утицај свињског и говеђег хемоглобина на способност ПК-ММЋ да се диференцирају ка остеогеном, хондрогеном и адипогеном ткиву и додатно, покушали смо да индукујемо миогену диференцијацију ових ћелија. Паралелно са одређеним типом диференцијације ПК-ММЋ, индукован је исти тип диференцијације код одговарајуће ћелијске линије: остеогена диференцијација MC3T3-E1 ћелија, хондрогена диференцијација ATDC5 ћелија,

адипогена диференцијација 3T3-L1 ћелија и миогена диференцијација C2C12 ћелија. У оквиру ове докторске дисертације успели смо да индукујемо све наведене типове диференцијације свих испитиваних ћелија, са изузетком миогене диференцијације ПК-ММЋ. Познато је да микросредина ММЋ, односно извор из ког су изоловане, утичу на њихов диференцијациони и укупан регенеративни потенцијал (Kukolj et al., 2018, 2019; Obradovic et al., 2019), тако да није неочекивано што су ПК-ММЋ изгубиле способност диференцијације ка мишићном ткиву. Како су наши резултати показали да свињски и говеђи хемоглобин не утичу на диференцијацију ПК-ММЋ када се додају у стандардни медијум за култивацију ћелија, утицај хемоглобина је испитан додавањем свињског или говеђег хемоглобина у одговарајући диференцијациони медијум. У свим експериментима којима је испитиван утицај хемоглобина на способност диференцијације мезенхимских ћелија коришћени су свињски и говеђи хемоглобин у концентрацији од 0,1 μM . За ову концентрацију хемоглобина смо у претходним експериментима показали да има најмање изражене ефекте на вијабилност и миграцију мезенхимских ћелија.

5.10. Хемоглобин супримира хондрогену диференцијацију мезенхимских ћелија

Током ембрионалног развића, ММЋ се диференцирају у хондробласте и хондроците, пролазећи кроз процес хондрогенезе. Хондрогенеза се дешава као резултат груписања мезенхимских ћелија које експримирају колаген типа I, III и V и диференцијације хондрогениторских ћелија које експримирају колагене специфичне за хрскавичаво ткиво – колаген типа II, IX и XI (Xu et al., 2008; Yue, 2014; Tiruvannamalai Annamalai et al., 2016). Пре почетка хондрогенезе, ММЋ су окружене ванћелијским матриксом који се одликује значајном количином хијалурона који омогућава покретање следећег корака хондрогенезе – фазе груписања. Током ове фазе, ММЋ мењају облик, губе наставке, постају округласте, приближавају се једна другој и успостављају међусобне контакте (Goldring, 2012). У ћелијским мембранама ових ћелија, присутни су N-кадхерини, синдекан, адхезивни молекули нервних ћелија (енг. *neural cell adhesion molecule*, N-CAM) и интегрини, док се у ванћелијском матриксу који испуњава просторе између ћелија налазе фибронектин, ламинин, версикан, тенасцин и хондроитин-сулфатни протеоглици. Посредством интегрина, ћелије успостављају контакт са гликопротеинским компонентама матрикса. Актински филаменти који успостављају контакте са хијалуронаном и тенасцином преко версиканских молекула, доводе до промене облика ћелија чиме их подстичу да крену ка следећој фази хондрогенезе – диференцирању прехондрогених ћелија у хондробласте и хондроците. Током ове фазе долази до промене количине и састава ванћелијског матрикса. Количина матрикса се повећава, па ћелије постају удаљеније једне од других. Фибронектин, версикан и ламинин се постепено замењују компонентама матрикса хрскавице, пре свега колагеном типа II и агреканом (Šerban, 2007; Yue, 2014). Ове процесе контролишу TGF- β , фактор раста фибробласта (енг. *fibroblast growth factor*, FGF) и морфогенетски протеин кости (енг. *bone morphogenetic protein*, BMP) (Kobayashi et al., 2005; Yoon et al., 2006; Geurts et al., 2011).

У овој докторској дисертацији добијени су резултати који показују да је ниво ГАГ (имунохемијски детектован сафранин О бојењем) био нижи након индукције хондрогене диференцијације ПК-ММЋ и ATCD5 у хондрогеном диференцијацијом медијуму са додатком свињског или говеђег хемоглобина. Овакав резултат указује да ова два хемоглобина смањују капацитет хондрогене диференцијације анализираних ћелија. Ефекат хемоглобина на експресију гена који представљају маркере хондрогене диференцијације зависио је од хомогености ћелијске популације, као и од фазе хондрогене диференцијације. Наиме, Xu и сарадници (2008) су користећи RT-PCR описали временске промене у експресији гена укључених у хондрогену диференцијацију ММЋ *in vitro* и на основу својих резултата развили шему фаза хондрогене диференцијације. Према овим ауторима, хондрогени маркери имају специфичан временски образац експресије који дефинишу сваку од четири фазе хондрогене диференцијације. У првој фази (0-6 дана) колаген типа I и VI,

као и Sox 4 и BMP-2 показују највише степене експресије. Друга фаза (6-12 дана) одликује се максимумима експресија гена за олигомерни матриксни протеин хрскавице, везни протеин хијалурона и протеогликана (енг. *hyaluronan and proteoglycan link protein*, HAPLN1), колаген тип XI и Sox9, док је генска експресија матрилина 3, „*homeobox 7*“ гена, хондроадхерина и WNT 11 протеина највећа у фази III (12–18 дана). Ћелије у четвртој фази хондрогене диференцијације (18–24 дана) максимално експримирају гене за агрекан, колаген тип IX, II и X, остеокалцин, фибромодулин, протеин повезан са паратиroidним хормоном (енг. *parathyroid hormone-related protein*, PTHrP) и ALP. Од свих наведених маркера, ми смо у нашим експериментима анализе утицаја хемоглобина на способност хондрогене диференцијације ПК-ММЋ и ATDC5 испитали експресију SOX9 у ПК-ММЋ и ATDC5 као главног транскрипционог фактора који регулише развој хрскавичавог ткива, и који је активан током целог процеса хондрогене диференцијације (Lefebvre & Dvir-Ginzberg, 2017), као и колагена тип XI, који по моделу Xu и сарадника (2008) представљају маркере друге фазе хондрогене диференцијације. Такође, анализирали смо обрасце експресије колагена тип I у ПК-ММЋ као маркера прве фазе хондрогене диференцијације и колагена типа II у ATDC5 ћелијама као маркера IV фазе. Наши резултати показују да паралелно са смањењем садржаја ГАГ у ПК-ММЋ и свињски и говеђи хемоглобин доводе до снижења експресије SOX9 гена (маркер II фазе хондрогене диференцијације), док стимулишу експресију гена оба анализирана колагена, колагена тип I (маркер I фазе) и колагена тип II (маркер IV фазе). Ефекат говеђег хемоглобина на експресију главног регулатора хондрогене диференцијације (SOX9) био је потентнији у односу на ефекат свињског хемоглобина, док је свињски хемоглобин у поређењу са говеђим доводио до веће стимулације експресије гена COL2A1. Како ПК-ММЋ представљају хетерогену популацију ћелија (Uysal et al., 2017), очекивано је да утицај хемоглобина на експресију хондрогених маркера може бити различит у различитим фазама хондрогене диференцијације ових примарних ћелија. Насупрот ПК-ММЋ, експресија гена за касне хондрогене маркере у ATDC5 ћелијама није детектована RT-PCR методом, што је указало на то да су ове ћелије, као хомоген модел систем и генетички идентична популација (Carter & Shieh, 2015) биле у II фази процеса хондрогене диференцијације. Наши резултати показали су да након 7 дана у култури, говеђи хемоглобин доводи до смањења нивоа експресије свих детектованих гена (Sox9 и Col1a1) у ATDC5 ћелијама, што је у складу са резултатима добијеним сафранин O бојењем. Међутим, иако је садржај ГАГ у ATDC5 ћелијама култивисаним у присуству свињског хемоглобина био смањен у односу на ћелије гајене у медијуму без хемоглобина, свињски хемоглобин је довео до стимулације експресије Sox9 гена, док је ефекат на експресију Col1a1 био идентичан ефекту говеђег хемоглобина.

Литературни подаци о директном утицају хемоглобина или хема на хондрогену диференцијацију ММЋ или мезенхимских ћелијских линија не постоје. Две студије испитале су утицај различитих једињења гвожђа на хондрогени капацитет ММЋ пореклом из косне сржи, у циљу развоја различитих ћелијских обележивача. Papadimitriou и сарадници (2014) показали су да гвожђе-сахароза доводи до померања фазе експресије SOX9 и COL2A1 гена. У присуству овог једињења, у односу на необележене ћелије истог дана хондрогене диференцијације, детектује се снижен ниво експресије испитиваних маркера који се касније постепено повећава. Roeder и сарадници (2014) добили су сличне резултате у експериментима обележавања ММЋ са суперпарамагнетним гвожђе-оксидом које је на дозно зависан начин снижавао експресију хондрогених маркера. Међутим, додатна истраживања неопходна су да бисмо потврдили да је ефекат хемоглобина показан у нашим експериментима био последица утицаја хемског гвожђа.

5.11. Хемоглобин супримира остеогену диференцијацију мезенхимских ћелија

У току ембрионалног развића, скелет се развија од три различите линије: од сомита настаје аксијални скелет, од мезодерма латералне плоче настаје скелет удова и од кранијалне неуралне кресте настају бронхијални лук и краниофацијалне кости и хрскавица.

Постоје два главна начина формирања костију и оба укључују трансформацију постојећег мезенхимског ткива у коштаног ткиво. Директна конверзија мезенхимског ткива у коштаног ткиво, означена је као интрамембранска осификација и на овај начин настају пласнате кости. Дуге кости настају процесом унутархрскавичавог окоштавања које се често назива и индиректним окоштавањем (Gilbert, 2000; Šerban, 2007).

Прва назнака да је процес интрамембранског окоштавања започео је приближавање и груписање мезенхимских ћелија, током ког ћелије мењају своје морфолошке одлике од звездolikих ћелија са дугим и танким цитоплазматским наставцима, до коцкастих ћелија. На овај начин ћелије образују једну врсту острвца, унутар ког веома брзо долази до депоновања органских компоненти матрикса – протеогликанских молекула удружених са структурним гликопротеинима, као и проколагенских молекула који ће се удружити у колагене фибриле. Након тога могуће је констатовати почетак процеса минерализовања матрикса. Паралелно са њим, наставља се груписање и приближавање нових ММЋ које се постављају на површини овако формиране коштане спикеле и успостављају контакте са оним ћелијама које су остале заробљене матриксом у формирању. Процес директног окоштавања одиграва се истовремено на многим местима и коштане спикеле настале на тај начин се накнадно повезују захваљујући ММЋ које се налазе између њих. Тако се образује јединствена коштаног маса пласнате кости. Унутармембранско окоштавање подразумева директну трансформацију ММЋ у остеоласте који постају остеоцити у тренутку када су окружени минерализованим матриксом. Овај процес је под контролом TGF β , FGF, као и „*hedgehog*“ протеина и протеина за које кодирају *WNT* гени (Birmingham et al., 2012; Asserson et al., 2019).

Ендохондрално окоштавање подразумева делимично уклањање хрскавичавог ткива и појаву новог коштаног ткива на његовом месту. Хрскавичави модел дуге кости својим обликом подсећа на финалну форму коју ће кост имати по окончању процеса осификације. На спољашњој површини хрскавице присутан је перихондријум, посебно развијен у области која одговара каснијој дијафизи. Ово је област у којој се одигравају прве промене које доводе до окоштавања и у којој се налазе ММЋ од којих ће постепено настати коштаног ткиво. Процес ендохондралне осификације подељен је у 5 фаза. У првој фази, под утицајем паракриних фактора, околне ММЋ експримирају два транскрипциона фактора (*Rax1* и *Scleraxis*) који активирају гене специфичне за хрскавичаво ткиво. Друга фаза подразумева груписање опредељених ММЋ у нодуле и диференцијацију у хондроците, који ће у трећој фази брзо пролиферисати како би направили модел кости. Како се деле, хондроцити секретују екстраћелијски матрикс специфичан за хрскавицу. У четвртој фази, хондроцити престају са деобама, повећавају свој волумен и постају хипертрофирани хондроцити. Ови измењени хондроцити почињу да мењају матрикс који продукују (додајући колаген X и фибронектин) како би омогућили минерализацију калцијум карбонатом. Пета фаза укључује инвазију хрскавичавог модела кости од стране крвних судова. Хипертрофирани хондроцити умиру апоптозом и простор који остаје за њима постаће косна срж. Како ћелије хрскавичавог ткива умиру, ћелије које су окружиле хрскавичави модел почињу да се диференцирају у остеоласте, док се коначно хрскавица не замени коштаног ткивом. Замена хондроцита ћелијама коштаног ткива зависи од минерализације екстраћелијског матрикса. Калцијум неопходан за овај процес се допрема путем крвних судова. Низ догађаја води хипертрофији и минерализацији хондроцита, укључујући иницијални прелаз на анаеробну респирацију која мења метаболизам ћелија и енергетски потенцијал митохондрија. Хипертрофирани хондроцити секретују бројне ситне мембранске везикуле у ванћелијски матрикс које садрже ензиме активне у генерисању јона калцијума и фосфата и иницијацији процеса минерализације у оквиру хрскавичавог матрикса (Gilbert, 2000; Šerban, 2007; Birmingham et al. 2012; Asserson et al., 2019).

Резултати приказани у овој докторској дисертацији су показали да свињски и говеђи хемоглобин показују супресиван ефекат како на рану, тако и на касну фазу остеогене

диференцијације примарних ПК-ММЋ и МС3Т3-Е1 ћелијске линије. Huang и сарадници (2007) поделили су остеогену диференцијацију ММЋ *in vitro* на три фазе. Прву фазу (1-4 дана) одликује максимум у броју ћелија. Другу фазу, фазу ране ћелијске диференцијације (5-14 дана) одликују максимуми експресије гена за алкалну фосфатазу и колаген тип I који учествују у формирању ванћелијског матрикса у који се депонују протеини карактеристични за коштаног ткиво. Трећу и последњу фазу (14-28 дана) карактеришу високи нивои експресије остеокалцина и остеоопонтина, праћени депозицијом калцијума и фосфата у ванћелијски матрикс (Huang et al., 2007). RUNX2 је препознат као главни транскрипциони регулатор одређења ММЋ ка остеогеној линији током остеогене пролиферације, с обзиром на то да позитивно утиче на различите фазе диференцијације остеобласта (Lian & Stein, 2005). Током остеогене диференцијације, RUNX2 је укључен у експресију колагена типа I, остеоопонтина и остеокалцина, али за даљу матурацију кости, експресија овог транскрипционог фактора мора бити угашена (Bruderer et al., 2014). Наши резултати показују конзистеност у ефекту свињског и говеђег хемоглобина у хистохемијским тестовима. Наиме, активност ALP ензима (мерена NBT/BCIP бојењем) и количина депоа калцијума (мерено ализарин црвеним бојењем) у ПК-ММЋ гајеним у присуству хемоглобина обе животињске врсте биле су смањене у односу на ћелије гајене у медијуму без хемоглобина. Међутим, анализа генске експресије RT-PCR методом показала је незнатне разлике у ефектима свињског и говеђег хемоглобина на остеогену диференцијацију ПК-ММЋ на генском нивоу. Док су након 7 дана оба хемоглобина стимулисала експресију *RUNX2*, након 14 дана свињски хемоглобин је снижавао експресију овог маркера. Конститутивна експресија *RUNX2* је у ПК-ММЋ била ниска, скоро на граници детекције RT-PCR методом, због чега ефекат говеђег хемоглобина није могао бити уочен. Како се ради о хетерогеној популацији ћелија, ниска експресија *RUNX2* маркера могла би бити последица њиховог бржег проласка кроз одређене фазе остеогене диференцијације. Експресија остеокалцина (кодиран *BGLAP* геном) није детектована у ПК-ММЋ ни након 14 дана што је у складу са прихваћеним моделом остеогене диференцијације ових ћелија *in vitro* (Huang et al., 2007; Birmingham et al., 2012). Хемоглобини су снижавали експресију *ALPL* гена и након 7 и након 14 дана, с тим што је говеђи хемоглобин остварио потентнији ефекат на овај маркер. Међутим, док су незнатно снижавали експресију гена за колаген тип I након 14 дана у култури, ефекат свињског и говеђег хемоглобина на експресију овог маркера се након 7 дана у култури разликовао, свињски хемоглобин ју је стимулисао, док је говеђи хемоглобин константно имао инхибиторан ефекат. Разлике у обрасцима експресије остеогених маркера ових ћелија се поново могу објаснити диверзитетом те ћелијске популације. Наиме, ткиво из ког потичу ММЋ изоловане из периферне крви још увек није једнозначно одређено, али се претпоставља да воде порекло из косне сржи. Додатно, треба узети у обзир како потенцијалну контаминацију при прикупљању узорка и периваскуларну локализацију ових ћелија, тако и чињеницу да ПК-ММЋ представљају стромалне/прогениторске ћелије на различитим ступњевима зрелости (Bianco et al., 2008; Trivanović et al., 2013a; Álvarez-Viejo, 2015; González-Garza et al., 2018).

Да би испитали ефекат хемоглобина на остеогену диференцијацију на униформнијем ћелијском моделу, експерименте смо наставили са МС3Т3-Е1 ћелијама, остеобластном ћелијском линијом. Познато је да промене у експерименталном протоколу на истом *in vitro* моделу за испитивање утицаја и механизма дејства ванћелијског хемоглобина могу утицати на добијене резултате (Lara et al., 2009). Стога, смо са циљем да уочимо fine разлике индуковане хемоглобином, специфичне за сваку фазу остеогене диференцијације, искористили два протокола за припрему медијума за индукцију остеогене диференцијације МС3Т3-Е1 ћелија, остеогени медијум без дексаметазона (Yazid et al., 2010; Jie et al., 2018) и остеогени медијум са дексаметазоном (Birmingham et al., 2012; Li et al., 2019b). МС3Т3-Е1 ћелије гајене у остеогеном медијуму са дексаметазоном су брже пролазиле кроз фазе остеогене диференцијације у односу на ћелије гајене у остеогеном медијуму без

дексаметазона, што су показали резултати хистохемијских бојења, а затим потврдили и резултати добијени RT-PCR методом. Наиме, MC3T3-E1 ћелије гајене у остеогеном медијуму са дексаметазоном су се интензивније бојиле ализарин црвеном, указујући на повећане депое калцијума у њима (касног маркера остеогене диференцијације), док су се MC3T3-E1 ћелије култивисане у остеогеном медијуму без дексаметазона интензивније бојиле NBT/BCIP бојењем, указујући на повишену активност ALP ензима (раног маркера остеогене диференцијације). И свињски и говеђи хемоглобин доводили су до снижења активност ALP ензима у MC3T3-E1 ћелијама гајеним у остеогеном медијуму без дексаметазона. Говеђи хемоглобин је задржао инхибиторан ефекат и на садржај депоа калцијума у овим ћелијама, док свињски није доводио до промене овог параметра. Додатно, свињски хемоглобин је стимулисао експресију *Runx2* и *Alpl* и није доводио до значајније промене експресије *Bglap* маркера у MC3T3-E1 ћелијама гајеним у остеогеном медијуму без дексаметазона. Говеђи хемоглобин је снижавао експресију *Runx2* испод нивоа детекције и имао исти ефекат као и свињски хемоглобин на експресију *Alpl* и *Bglap* гена. Иако свињски и говеђи хемоглобин нису доводили до промене параметра детектабилних хистохемијским бојењима код MC3T3-E1 ћелија култивисаних у остеогеном медијуму са дексаметазоном, ефекат хемоглобина обе животињске врсте на експресију остеогених маркера ових ћелија био је униформнији. Наиме, експресија *Runx2* у овим ћелијама није детектована, што говори о њиховом бржем проласку кроз фазе остеогене диференцијације у поређењу са ћелијама гајеним у медијуму без дексаметазона. Додатно, свињски и говеђи хемоглобин снижавали су експресију *Alpl* и *Bglap* маркера у овим ћелијама. Како прихваћени модел остеогене диференцијације ММЋ претпоставља да мора доћи до гашења експресије RUNX2 за прогрес кроз касније фазе које одликује снижење експресије *Alpl* гена и стимулација експресије гена за остеокалцин, једно од могућих објашњења за добијене резултате било би да хемоглобин изазива померања фазе, односно „кашњење“ остеогене диференцијације у односу на остеогену диференцијацију ћелија које су култивисане у медијуму без хемоглобина (Aubin, 2001; Huang et al., 2007).

Иако су подаци о утицају хемоглобина и његових деградационих производа на остеогену диференцијацију оскудни, ипак је његов утицај на овај тип диференцијације, у поређењу са осталим типовима, највише проучаван. Hashemi и сарадници (2020) показали су да микросфере од хидроксиапатита које садрже глобинске ланце, пиперидин и наночестице гвожђа значајно стимулишу остеогену диференцијацију ММЋ косне сржи и експресију RUNX2, ALP и остеокалцина након 21 дана у култури. Група кинеских аутора показала је на мишјем моделу са индукованом хеморагијском анемијом да ММЋ изоловане из њихове косне сржи имају повећану способност остеогене диференцијације (и у исто време смањену способност адипогене диференцијације) (Wu et al., 2014). Показано је да BMP9 протеин истовремено индукује и остеогену и адипогену диференцијацију ММЋ, али да NO-1 игра кључну улогу у одлучивању о даљој судбини ћелије, јер стимулише BMP9 зависну индукцију ка остеогеној линији и истовремено смањује BMP9 индукцију ка адипогеној линији (Liu et al., 2018). За хем оксигеназу је показано и да учествује у сигнализацији укљученој у остеогену диференцијацију ћелија периодонталног лигамента (Cho et al., 2010), ембрионалних матичних ћелија (Sim et al., 2016) и ММЋ изолованих из косне сржи (Barbagallo et al., 2010; Zhang et al. 2014).

Утицај гвожђа на остеогену диференцијацију доста је проучаван са аспекта коришћења наночестица гвожђе-оксида и статичког магнетног поља за које је показано да у различитим варијантама које подразумевају додатно облагање честица различитим једињењима, по правилу стимулишу остеогену диференцијацију како ММЋ, тако и MC3T3-E1 ћелија (Jiang et al., 2016; Wang et al., 2016; Zhuang et al., 2018; Xia et al., 2019). Међутим, постоје и литературни подаци који показују да гвожђе може инхибирати остеогену диференцијацију и минерализацију ММЋ пореклом из косне сржи (Zhang et al., 2015). Ови аутори претпостављају да је у основи овог ефекта гвожђа повећање продукције ROS. Овај

резултат (инхибицију диференцијације ММТ из косне сржи у остеобласте и спречавање минерализације) потврдили су Borriello и сарадници (2016), али нису успели да детектују повећање продукције ROS у овим ћелијама.

5.12. Хемоглобин супримира адипогену диференцијацију мезенхимских ћелија

Масно ткиво је динамичан орган који обавља важне физиолошке улоге. Код сисара постоје две врсте масног ткива које се разликују по својој структури и функцији, бело и мрко масно ткиво. Код људи бело масно ткиво је преодминатно у адултном организму и има улогу у енергетској хомеостази, инсулинским сигналним путевима и лучењу супстанци које могу имати ендокрино, паракрино и аутокрينو дејство (лептин и адипонектин). Мрко масно ткиво одговорно је за недрхтећу термогенезу, која је посредована UCP-1 протеином (енг. *uncoupling protein-1*). Код људи највише га има код фетуса и новорођенчади, док је код одраслог организма присутно у веома малој количини (Sarjeant & Stephens, 2012; Ruiz-Ojeda et al., 2016).

Масно ткиво чине различити ћелијски типови, укључујући ендотелне ћелије, ћелије крви, фибробласте, пероците, макрофаге и друге ћелије имунског система, док зрели адипоцити представљају преодминатне ћелије овог ткива. Ћелије белог, беж и мрког масног ткива воде порекло од резидентних мезенхимских матичних ћелија, присутних у масном ткиву. Иако наглашена разлика у морфологији ових ММТ не постоји (Ruiz-Ojeda et al., 2016), показано је да постоје минималне разлике на нивоу генске експресије у ММТ од којих воде порекло ова три типа адипоцита (Wang et al., 2016). У прилог томе говори и чињеница да је транскрипциони регулаторни протеин PPAR γ неопходан за развој обе врсте масног ткива. Адипоцити настају од мезенхимских ћелија које се диференцирају у липобласте. Липобласти белог масног ткива су вретенасте ћелије у чијој цитоплазми почињу да се нагомилавају све бројнија липидна тела малог пречника, која ће се постепено сјединити у једно једино липидно тело. Овај процес помажу виментински филаменти. Паралелно са повећањем броја липидних тела, долази до промене облика нуклеуса који постаје српаст и бива потиснут на периферију ћелије, док цела ћелија постаје лоптаста. Липобласте мрког масног ткива одликује полиедрична форма и будући да су сконцентрисани један уз други, образују групације које имају епителоидни изглед. У њима долази до постепеног нагомилавања липидних тела које се не уједињују у једно тело већих димензија (Sarjeant & Stephens, 2012; Wafer et al., 2017). У регулацију развоја зрелих адипоцита од прекурсорских ћелија укључен је читав низ различитих транскрипционих фактора. У случају настанка адипоцита белог масног ткива, низ догађаја започиње активацијом активаторског протеина-1 (енг. *activating protein 1*, AP-1), а затим се наставља експресијом PPAR γ . Други транскрипциони фактори олакшавају сазревање адипоцита, попут сигналних трансдусера и активатора транскрипције (енг. *signal transducer and activator of transcription*, STATs), фамилије протеина сличних Krüppel-у (енг. *Krüppel-like factors*, KLF), протеина 1 који се везује за елемент одговора на стерол (енг. *sterol response element-binding protein-1*, SREBP-1) и чланови фамилије протеина који се везују за ССААТ енхансер (енг. *ССААТ-enhancer-binding proteins*, C/EBP) (Sarjeant & Stephens, 2012; Wafer et al., 2017).

У циљу испитивања ефекта хемоглобина на способност адипогене диференцијације, ПК-ММТ су коришћене као модел примарних ћелија и 3T3-L1 као хомогенији и униформнији модел систем. Како би запазили потенцијалне fine разлике између различитих фаза овог процеса, испитали смо експресију адипогених маркера у ПК-ММТ у два временска интервала и утицај додатка хемоглобина у медијум за индукцију адипогене диференцијације 3T3-L1 ћелија почев од индукционог или инсулинског медијума. Главни регулатор процеса адипогене диференцијације код сисара је PPAR γ и сматра се и довољним и неопходним фактором (Wafer et al., 2017). И свињски и говеђи хемоглобин су стимулисали експресију овог маркера након 7 дана у култури и снижавали је након 14 дана. Експресија

других адипогених маркера није забележена с обзиром на то да је дужа инкубација у адипогеном медијума вероватно била неопходна како би се експримирали. Није било разлика ни у ефекту свињског и говеђег хемоглобина на способност адипогене диференцијације 3T3-L1 ћелија, а исти је зависио од фазе адипогене диференцијације у којој је хемоглобин додат. Након додатка почев од индукционог медијума, хемоглобин је стимулисао експресију PPAR γ и адипонектина и инхибирао експресију ових маркера након додавања почев од инсулинског медијума.

Оскудне су студије о утицају хемоглобина и/или његових деградационих производа на адипогену диференцијацију ћелија. Puri и сарадници (2012) показали су да хем стимулише адипогену диференцијацију ММЋ, као и 3T3-L1 ћелија и да се ови ефекти поништавају у присуству миметика супероксид дисмутазе (темпола). Додатно, показано је да су патофизиолошки процеси повезани са оксидативним стресом, као што су стања са повећаном продукцијом денатурираних хем-протеина, повезани са појачаним адипогеним одговором. Овај ефекат се предоминантно манифестује као хипертрофија адипоцита која се карактерише дисфункционалним, проинфламаторним адипоцитима који имају снижену експресију антиинфламаторног хормона, адипонектина (Gesta et al., 2007; Skurk et al., 2007).

5.13. Хемоглобин супримира миогену диференцијацију мезенхимских ћелија

Током ембриогенезе процес формирања мишићног ткива, означен као миогенеза, одвија се под утицајем транскрипционих фактора, миогенских базичних хеликс-петља-хеликс протеина (енг. *basic helix-loop-helix proteins*, bHLH) који су укључени у регулацију експресије гена специфичних за мишићне ћелије. Ћелије латералног дела сомита деле се како би формирале два слоја ћелија означених као дермамиотом и миотом од којих ће настати мишићи. Ћелије миотома које продукују основне хеликс-петља-хеликс протеине (енг. *basic helix-loop-helix proteins*, bHLH) означене су као миобласти – одређени прекурсори мишићних ћелија. Експерименти на културама миобласти, показали су да ове ћелије пролазе кроз процес поравнања, а затим и фузије како би формирале мултинуклеарне ћелије означене као миотубе. Миотубе су дакле производи спајања и губљења ћелијске мембране неколико миобласти (Wakelam, 1985; Burattini et al., 2004). Све док су присутни одређени фактори раста, пре свега FGF, миобласти ће пролиферисати и неће улазити у диференцијацију (Huang et al., 2019). Када се ови фактори раста нађу у недостатку, миобласти престају са деобом, секретују фибронектин у екстраћелијски матрикс и везују се за њега посредством $\alpha 5\beta 1$ интегрин (главног рецептора за фибронектин) (Menko & Voettiger, 1987). Други корак подразумева поравнање миотуба и овај процес посредован је гликопротеинима, укључујући кадherine и ћелијске адхезивне молекуле (енг. *cell adhesion molecule*, CAMs) (Knudsen et al., 1990). Трећи корак подразумева саму фузију ћелија. Као и при било којој другој фузији мембране, у овим процесима главну улогу имају јони калцијума и може се покренути калцијумским јонофорама које преносе јоне калцијума кроз мембрану (David et al., 1981). Фузија је регулисана сетом металопротеина означених као мелтрини. Ови протеини откривени су током потраге за протеинима миобласти који би били хомологи фертилину (протеину са улогом у фузији мембране јајне ћелије и сперматозоида). Yagami-Hiromasa и сарадници (1995) показали су да се један тип мелтрин (мелтрин- α) експримира у миобластима у скоро исто време када почиње фузија и да додавања антисенс-РНК за мелтрин- α инхибира процес фузије када се дода миобластима. Поред описаних ембрионалних миогених ћелија, постоје и адултне миогене ћелије укључене у процесе репарације и регенерације скелетног мишићног ткива након оштећења насталих услед физиолошких процеса (старење, вежбање) или патолошких стања (мишићне дистрофије, кахексија, саркопенија). У процес регенерације скелетног мишићног ткива укључени су различити типови ћелија попут сателитских ћелија, специјализованих миогених ћелија које се појављују током касног феталног развића и налазе се између базалне ламине и сарколеме мишићног влакна, мезенхимске матичне ћелије активне током постнаталног развоја и регенерације мишића, перипити и помоћничке мишићне ћелије (Burattini et al., 2004;

Klimczak et al., 2018). По тренутном опште прихваћеном становишту, у одговору на повреду, помоћничке мишићне ћелије се активирају, отпуштају хемокине и различите проинфламаторне цитокине и привлаче моноците и макрофаге на место повреде. Активирани помоћничке мишићне ћелије пролиферишу, мигрирају на место повреде и генеришу миобласте који се или фузионишу са оштећеним мишићним влакнима или формирају миотубе које сазревају и формирају нова мишићна влакна. Резидентне ММЋ обезбеђују подршку помоћничким мишићним ћелијама у регенерацији мишићног ткива (Joe et al., 2010; Uezumi et al., 2011; Judson et al., 2013), мада постоје подаци да се и саме могу диференцирати у ћелије мишићног ткива (Wakitani et al., 1995; Ferrari et al., 1998; Meligy et al., 2012). Ипак веза између ММЋ и других прогениторских мишићних ћелија још увек није најбоље проучена.

Новоформирани, млади миобласти су миогенин негативне ћелије, што спречава њихову диференцијацију у мишићна влакна или фузију са постојећим старим влакнима, односно доприноси повећању њиховог броја. Када миобласти достигну одређен број, започиње експресија миогенина који је одговоран за даље кораке и усмеравање миогене диференцијације (Yin et al., 2013). С обзиром на то, миогенин се у индукцији миогене диференцијације *in vitro* сматра њеним раним маркером. За разлику од њега МСК означена је као касни маркер миогене диференцијације и укључена је у биоенергетску хомеостазу мишићних ћелија (Van Deursen et al., 1994).

Како у овом раду нисмо успели да индукујемо миогену диференцијацију ПК-ММЋ, ефекат свињског и говеђег хемоглобина на способност ове диференцијације испитан је на С2С12 ћелијској линији. И свињски и говеђи хемоглобин доводили су до инхибиције формирања миотуба у концентрацијама од 10 μM . RT-PCR анализа потврдила је инхибиторни ефекат ове концентрације хемоглобина на мишићну диференцијацију С2С12 ћелија јер је запажено снижење експресије како раног (миогенин) тако и касног маркера миогене диференцијације (МСК). Свињски хемоглобин није утицао на морфометријске параметре формираних миотуба у концентрацијама од 0,1 и 1 μM , док је говеђи хемоглобин у концентрацији од 1 μM смањивао просечну дужину миотуба и индекс сферичности. Литературни подаци о директном утицају хемоглобина, хема или гвожђа на миогену диференцијацију ових ћелија, или било којих других ћелија не постоје. У том смислу, ово је прво истраживање утицаја хемоглобина и/или његових деградационих продуката на миогену диференцијацију ћелија *in vitro* и додатна истраживања су неопходна како би се објаснили механизми уочених ефеката.

5.14. HIF-1 може имати улогу у запаженим ефектима хемоглобина на диференцијацију мезенхимских ћелија

У циљу стицања бар делимичног увида у молекулске механизме који леже у основи уочених ефеката хемоглобина, испитали смо улогу два сигнална молекула, хем оксигеназе (НО-1) и хипоксија индуцибилног фактора (HIF-1), у диференцијацијама индукованим како у културама ПК-ММЋ тако и у културама коришћених ћелијских линија (прилог 6). НО-1 је традиционално препознат као ензим са кључном улогом у катаболизму хема (разграђује овај молекул на СО и билирубин). Међутим, последњих година све је више података који говоре о сигналној улози овог ензима у пролиферацији, апоптози, диференцијацији ћелија и имунском одговору, као и о укључености у патофизиологију многих болести (Cho et al., 2010; Wu et al., 2019; Canesin et al., 2020). НО-1 се сматра и протеином топлотног стреса (енг. *heat shock protein*) и његова експресија је индукована различитим агенсима као што су реактивне кисеоничне врсте, нитрозо једињења, полифенолска једињења или деградациони продукти хемоглобина (Yeh & Alayash, 2004). Regan и сарадници (2000) показали су да индуцибилна форма хем оксигеназе (НО-1) остварује протективан ефекат против штетног дејства хемоглобина у културама астроцита. Заштитна улога НО-1 од хема и хемоглобина доказана је и у културама зечјих ендотелских ћелија микро крвних судова (Abraham et al.,

1995) и фибробласта хрчка (Dennerly et al., 1997). У нашим експериментима, у различитим експерименталним дизајнима, нисмо успели да индукујемо експресију HO-1 што говори о томе да молекули свињског и говеђег хемоглобина у ћелијским културама нису били деградовани у значајном степену.

Транскрипциони активатор HIF-1 је глобални и главни регулатор O₂ хомеостазе у организму, укључен у сигналну трансдукцију и експресију гена који даље регулишу ангиогенезу, проток крви и метаболизам (Yeh & Alayash, 2004; Semenza, 2009). Као и HO-1, ни експресија HIF-1 није детектована ни у једном експерименталном дизајну у ПК-ММЋ, али је детектована у ћелијским линијама. Експресија HIF-1 у ћелијским линијама разликовала се у различитим типовима диференцијације. И свињски и говеђи хемоглобин гасили су експресију HIF-1 код ATDC5 ћелија гајених у хондрогеном медијуму. У MC3T3-E1 ћелијама гајеним у остеогеном медијуму без дексаметазона и свињски и говеђи хемоглобин су снижавали експресију HIF-1, док је овај инхибиторни ефекат био мање изражен у медијуму са дексаметазоном. Код 3T3-L1 ћелија гајених у адипогеном медијуму са додатком хемоглобина почев од индукционе фазе, и свињски и говеђи хемоглобин су незнатно снижавали експресију HIF-1 и благо је стимулисали када је хемоглобин био додаван у адипогени медијум почев од инсулинске фазе. Ове промене биле су у опсегу ± 20% у односу на ниво експресије овог маркера у ћелијама гајеним у адипогеном медијуму без хемоглобина.

Више студија показало је да хипоксија преко HIF сигналног пута остварује кључну улогу у регулација развоја артикуларне хрскавице (Robins et al., 2005; Amarilio et al., 2007; Thoms et al., 2013). Градијент концентрације кисеоника унутар зачетка удова у току развића, који се одржава у адултном остео-хондралном ткиву, доприноси развоју хрскавице и посредован је, бар делом активношћу HIF транскрипционог фактора (Schirani et al., 2001). Додатно, показано је да HIF-1 α остварује важну улогу у диференцијацији мезенхимских прогениторских ћелија у хондроците везивањем за промоторски регион *SOX9* гена и последичним активирањем његове експресије (Robins et al., 2005). Ови подаци у сагласности су и са резултатима наших истраживања у којима смо показали како смањење способности хондрогене диференцијације испитиваних ћелија, тако и снижену експресију HIF.

HIF-1 α је важан фактор и у одржавању хомеостазе коштаног ткива (Wang et al., 2007; Shomento et al., 2010; Rankin et al., 2012). Инактивација овог гена доводи до смањења коштане масе и броја остеобласта. У остеобластима је такође експримиран и HIF-2 α , али експерименти на „knock-out“ мишевима за овај ген показали су само незнатно смањење у волумену трабекуларне кости (Rankin et al., 2012). Сходно томе, утицај који су свињски и говеђи хемоглобин остварили на експресију овог транскрипционог фактора могао би објаснити, бар делимично, ефекат остварен и на остеогену диференцијацију испитаних ћелија.

5.15. Хемоглобин утиче на имуномодулаторни капацитет ПК-ММЋ

Поред улоге које имају у репарацији ткива, опште је прихваћено становиште да ММЋ имају и способност модулације имунског одговора, односно да превасходно остварују имуносупресивно дејство (Shi et al., 2011; Soleymaninejadian et al., 2012). Механизми путем којих ММЋ супримирају имунски одговор укључују супресију пролиферације Т и Б лимфоцита, индукцију регулаторних Т ћелија, инхибицију функција НК ћелија, као и инхибицију диференцијације и експресије стимулаторних молекула на дендритским ћелијама (Hass et al., 2011; Trivanović et al., 2013b). Имуномодулаторна активност ММЋ зависиће од микросредине у којој се ове ћелије нађу. Да би могле остварити улогу имуномодулатора, ММЋ морају и саме бити активирани у чему главну улогу остварују IL-1, TNF- α и IFN- γ (Newman et al., 2009; De Miguel et al., 2012; Ling et al., 2014). Од различитих имуномодулаторних гена које ММЋ могу експримирају, ми смо

испитали ефекат хемоглобина на експресију *HLA-A*, *HLA-G*, *HLA-DRA*, *TGFBI*, *IDO1*, *PTGS2*, *IL6* и *HMOX1* (Hass et al., 2011; Trivanović et al., 2013b). ПК-ММЋ коришћене у нашим истраживањима конститутивно нису експримирали ниједан ген од значаја за њихову имуномодулаторну функцију, што је очекивано јер је показано да у поређењу са ММЋ из других извора, ПК-ММЋ имају конститутивно слабу експресију ових гена (Trivanović et al., 2013b). Наши резултати показују да и свињски и говеђи хемоглобин индукују експресију *IDO1*, док је само говеђи индуковао експресију *HLA-A*. Ogasawara и сарадници (2009) показали су да хемоглобин, али не и хем и апопротеин хемоглобина, индукује експресију овог ензима, што је још једна у низу потврда да највероватније није дошло до деградације овог молекула у култури ћелија у нашим експериментима. *IDO* продукују ћелије имунског система укључујући макрофаге и дендритске ћелије, као и различите туморске ћелије. *IDO* представља први и ограничавајући ензим у деградацији триптофана и претпоставља се да супресорну улогу имунског одговора остварује прањњем депоа ове аминокиселине и акумулацијом метаболита триптофана, укључујући кинуренин, 3-хидроксиантранилну киселину и квинолиничну киселину (Ling et al., 2014). Индукујући експресију *IDO-1* свињски и говеђи хемоглобин стимулишу имуносупресорску функцију ПК-ММЋ.

Иако има података да ММЋ из различитих извора могу експримирати гене главног комплекса хистокомпатибилности (Shi et al., 2011; De Miguel et al., 2012; Berglund et al., 2017), за ПК-ММЋ је показано да не експримирају ове гене (Trivanović et al., 2013b). Исти аутори показали су да ПК-ММЋ у директном међућелијском контакту са алогеним МНЋ инхибирају пролиферацију ових ћелија у одговору на РНА стимулацију и алоантигене (Trivanović et al., 2013b).

У овој докторској дисертацији испитиван је утицај хемоглобина на имуномодулаторну улогу ПК-ММЋ анализом њиховог ефекта на апотозу, ћелијски циклус и пролиферацију алогених МНЋ у кокултури са ПК-ММЋ. Резултати су показали да ПК-ММЋ утичу на апотозу, ћелијски циклус и пролиферацију алогених МНЋ, а да присуство хемоглобина мења капацитет ПК-ММЋ да модулише ове функције МНЋ. Међутим ефекат хемоглобина није био униформан, и преодоминантно је зависио од тога да ли су МНЋ биле добри или слаби респондери на стимулацију РНА. Ова разлика у способности МНЋ да одговоре на присуство хемоглобина је последица тога што су оне пре свега хетерогена популација ћелија (Т и Б лимфоцити, моноцити, дендритске ћелије, НК ћелије) и да иако су сви даваоци МНЋ били здраве особе, њихов имунски систем је у сталној интеракцији са антигенима из спољашње средине, што се одражава на функционално стање популација МНЋ и способност да одговоре на стимулацију и РНА и/или хемоглобином. Објашњење ових разлика свакако превазилази оквире ове докторске дисертације и резултати указују на потребу за новим истраживањем у којима ће се прецизно дефинисати ћелије имунског система на које хемоглобин делује директно или индиректно, модулишући функцију популација МНЋ.

5.16. Завршни коментар резултата

Збирно, приказани резултати показују да свињски и говеђи хемоглобин, као ксеногени хемоглобини, остварују ефекат на пролиферативни, миграторни, диференцијациони и имуномодулаторни капацитет различитих мезенхимских ћелија. Ова истраживања доприносе бољем разумевању биолошких ефеката ванћелијског хемоглобина кроз модел свињског и говеђег хемоглобина. Наши резултати указују на то да чак и у условима који индукују различите типове диференцијације ММЋ (гајење у одређеним диференцијационим медијумима), хемоглобин има могућност да супримира/инхибира или одложи диференцијацију ММЋ, односно да очува њихову матичност. Уочене разлике у ефектима свињског и говеђег хемоглобина на функционалне карактеристике ММЋ могу бити последица разлика у примарној (Hardison, 2012; Gaudry et al., 2014) или вишим нивоима структуре ових протеина. Такође, наши резултати показали су присуство укупно

10 масних киселина у узорцима свињског и говеђег хемоглобина, у траговима. Дистрибуција и процентуална заступљеност ових масних киселина разликовале су се у узорцима различитих животињских врсти. Бројни су литературни подаци који говоре о утицају различитих масних киселина на функцијске карактеристике ММЋ. Тако је показано да арахидонска киселина индукује адипогену диференцијацију ММЋ док инхибира остеобластогенезу (Casado-Díaz et al., 2013; Antonio Casado-Díaz et al., 2019). Поред тога што може да стимулише покретљивост ММЋ (Jung et al., 2015), олеинска киселина може да стимулише и експресију неуралних маркера код ММЋ изолованих из хуманог ендометријума (Kojour et al., 2017). Супротно ефекту арахидонске, линоленска киселина стимулише остеогену и инхибира адипогену диференцијацију ММЋ (Platt & El-Sohemy, 2009; Kim et al., 2013, 2014). Међутим, има података који показују да линоленска и α -линоленска киселина снижавају експресију *RUNX2* у ММЋ и стимулишу експресију *PPARG*, као и да доводе до повећане акумулације липидних тела у овим ћелијама на дозно зависан начин (Riera-Heredia et al., 2019). Сличан резултат, повећање акумулације липидних тела у ММЋ у току адипогене диференцијације, добили су Yanting и сарадници (2018) при култивацији ММЋ са линоленском, олеинском и палмитинском киселином. Liu и сарадници (2019) показали су да стеаринска киселина може стимулирати миграцију ММЋ и убрзати зацељивање хрскавице, као и да доводи до повећања броја колонија ових ћелија. Додатно, показано је да стеаринска киселина може да стимулише експресију различитих цитокина од стране ММЋ (IL-6, васкуларни ендотелни фактор раста (енг. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) и моноцитни хемоатрактантни протеин-1 (енг. *monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1)) модулишући на тај начин њихову имуномодулаторну улогу (Yaghooti et al., 2019). Сходно овим подацима, разлике у ефектима свињског и говеђег хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија описане у овој докторској дисертацији могле би се, бар делом, објаснити разликама у заступљености појединачних масних киселина у коришћеним узорцима свињског и говеђег хемоглобина. Међутим, без додатних и детаљнијих анализа утицаја сваке од тих компоненти понаособ, а затим и у синергији, о утицају масних киселина присутним у траговима у коришћеним узорцима хемоглобина на уочене промене функцијских карактеристика ММЋ, могуће је једино спекулисати.

Додатно, предложена испитивања су основа примењеним започетим биотехнолошким истраживањима о потенцијалној употреби/безбедности употребе ове две врсте ксеногених хемоглобина као дијететских суплемената или саставних компоненти медијума за пропацију или конзервацију ћелија. Таква потенцијална примена подразумева добијање хемоглобина на индустријском нивоу, из лако доступног материјала, без високе цене коштања и употребе органских растварача, односно управо на начин описан у оквиру ове докторске дисертације.

ЗАКЉУЧЦИ

6. Закључци

На основу изложених циљева и представљених резултата, изведени су следећи закључци:

6.1. Изолација, пречишћавање и физичко-хемијска карактеризација свињског и говеђег хемоглобина показали су да:

- Свињски и говеђи хемоглобин је могуће изоловати из еритроцита кланичне крви методом градуалне хипотоничне хемоллизе и пречистити тангенцијалном ултрафилтрацијом;
- Изолати хемоглобина добијени и пречишћени на овај начин имају висок садржај хемоглобина (више од 90% укупних протеина);
- У изолатима хемоглобина су присутни фосфолипиди. Њихов садржај је већи у изолатима свињског хемоглобина у односу на изолате говеђег хемоглобина. Процентни удео и састав масних киселина у фосфолипидима изолата хемоглобина ове две животињске врсте се разликује;
- Просечан хидродинамички пречник колоидних честица у изолатима свињског и говеђег хемоглобина одговара хидродинамичком пречнику нативног молекула хемоглобина;
- Апсорпциони спектри изолата свињског и говеђег хемоглобина одговарају апсорпционом спектру нативног оксихемоглобина;
- Структура хем групе у изолатима свињског и говеђег хемоглобина је очувана и двовалентно гвожђе у оквиру ње има способност редукције ABTS радикала.

2. Испитивање цитотоксичности свињског и говеђег хемоглобина и његове биолошке активности показало је да:

- Концентрација свињског и говеђег хемоглобина у 48-сатним културама нестимулисаних и митогеном стимулисаних МНЋ и 48- и 96-сатним културама ПК-ММ се благо снижава;
- У квантитативном одговору опредељених матичних ћелија хематопоезе периферне крви човека на стимулацију свињским и говеђим хемоглобином постоје велике интериндивидуалне варијације. Свињски и говеђи хемоглобин снажно утичу на морфологију колонија опредељених матичних ћелија хематопоезе периферне крви човека;
- У тесту без пре-адхезије свињски хемоглобин смањује адхезивност МНЋ и ПМЋ док говеђи хемоглобин не утиче на адхезивност МНЋ и ПМЋ. У тесту са пре-адхезијом свињски хемоглобин не утиче на адхезивност МНЋ и ПМЋ, док је говеђи хемоглобин стимулише;
- Свињски и говеђи хемоглобин стимулишу продукцију ROS у МНЋ и ПМЋ у концентрацији од 10 μM .

3. Испитивање утицаја свињског и говеђег хемоглобина на функцијске карактеристике мезенхимских ћелија показало је да:

- Свињски и говеђи хемоглобин модулишу вијабилност мезенхимских ћелија у зависности од типа ћелија, концентрације хемоглобина и животињске врсте из које је хемоглобин изолован, као и времена инкубације са ћелијама;
- Свињски и говеђи хемоглобин не утичу на број апоптотских ћелија и доводе до краткорайног заустављања ПК-ММЋ у G0/G1 фази ћелијског циклуса;
- Свињски и говеђи хемоглобин смањују број CFU-F колонија ПК-ММЋ у концентрацијама од 1 и 10 μM ;

- Свињски и говеђи хемоглобин модулишу миграторни капацитет мезенхимских ћелија у зависности од типа ћелија, концентрације хемоглобина и животињске врсте из које је хемоглобин изолован;
- Свињски и говеђи хемоглобин смањују способност хондрогене диференцијације ПК-ММЋ и АТDC5 ћелија:
 - Свињски и говеђи хемоглобин смањују садржај ГАГ у ПК-ММЋ и АТDC5 ћелијама;
 - Свињски и говеђи хемоглобин снижавају експресију *SOX9* гена и стимулишу експресију *COL1A1* и *COL2A1* гена у ПК-ММЋ;
 - Свињски хемоглобин стимулише, док говеђи хемоглобин снижава експресију *Sox9* гена у АТDC5 ћелијама; Хемоглобини обе животињске врсте снижавају експресију *Coll1a1* гена у АТDC5 ћелијама.
- Свињски и говеђи хемоглобин смањују способност остеогене диференцијације ПК-ММЋ и МС3Т3-Е1 ћелија:
 - Свињски и говеђи хемоглобин снижавају активност ензима ALP и количину депозита калцијума у ПК-ММЋ ћелијама и након 7 и након 14 дана у култури;
 - Свињски и говеђи хемоглобин стимулишу експресију *RUNX2* гена у ПК-ММЋ ћелијама након 7 дана, а свињски је снижава након 14 дана у култури;
 - Свињски и говеђи хемоглобин снижавају експресију *ALPL* гена у ПК-ММЋ ћелијама након 7 и 14 дана у култури;
 - Свињски хемоглобин стимулише експресију *COL1A1* гена у ПК-ММЋ ћелијама након 7 дана, али је снижава након 14 дана у културу. Говеђи хемоглобин снижава експресију *COL1A1* гена у ПК-ММЋ ћелијама и након 7 и након 14 дана у култури;
 - Експресија *BGLAP* остеогеног маркера није детектована у културама ПК-ММЋ ни након 7, ни након 14 дана;
 - Свињски и говеђи хемоглобин снижавају активност ензима ALP након 7 дана у култури и количину депозита калцијума у МС3Т3-Е1 ћелијама након 14 дана у култури када се додају у остеогени медијум без дексаметазона;
 - У остеогеном медијуму без дексаметазона, свињски хемоглобин стимулише експресију *Runx2* маркера у МС3Т3-Е1 ћелијама након 5 дана у култури, док је говеђи хемоглобин снижава;
 - У остеогеном медијуму без дексаметазона, свињски и говеђи хемоглобин стимулишу експресију *Alpl* и *Bglap* маркера у МС3Т3-Е1 ћелијама након 5 дана у култури;
 - Свињски и говеђи хемоглобин не остварују ефекат на активност ензима ALP у МС3Т3-Е1 ћелијама након 7 дана у култури у остеогеном медијуму са дексаметазоном, док смањују количину депозита калцијума након 14 дана у култури у истом медијуму;
 - У остеогеном медијуму са дексаметазоном, свињски и говеђи хемоглобин снижавају експресију *Alpl* маркера у МС3Т3-Е1 ћелијама након 5 дана у култури;
 - У остеогеном медијуму са дексаметазоном, свињски хемоглобин не утиче на експресију *Bglap* маркера у МС3Т3-Е1 ћелијама након 5 дана у култури, док је говеђи хемоглобин снижава;
 - У остеогеном медијуму са дексаметазоном у МС3Т3-Е1 ћелијама није детектована експресија *Runx2* маркера.
- Свињски и говеђи хемоглобин смањују способност адипогене диференцијације ПК-ММЋ и 3Т3-Л1 ћелија:
 - Свињски и говеђи хемоглобин стимулишу експресију *PPARG* гена у ПК-ММЋ након 7 и 14 дана у културу;
 - Експресија *ADIPOQ* и *LPL* маркера у ПК-ММЋ након 7 и 14 дана у култури није детектована.

- Свињски и говеђи хемоглобин стимулишу експресију *Pparg* гена у 3T3-L1 ћелијама уколико се додају у адипогени медијум почев од индукционог медијума и снижавају је уколико се додају почев од инсулинског медијума;
- Свињски хемоглобин не остварује ефекат на експресију *Adipoq* у 3T3-L1 ћелијама када се дода у адипогени медијум почев од индукционог медијума, док је говеђи благо стимулише. Када се хемоглобини додају у адипогени медијум почев од инсулинског медијума доводе до снижења експресије *Adipoq* у 3T3-L1 ћелијама;
- Миогена диференцијација ПК-ММЋ није индукована у примењеном експерименталном дизајну.
- Свињски и говеђи хемоглобин смањују способност миогене диференцијације C2C12 ћелија у вишим концентрацијама:
 - Свињски хемоглобин не остварује ефекат на морфометријске параметре формираних миотуба C2C12 ћелија, док говеђи хемоглобин модулише површину, дужину и индекс сферичности миотуба у зависности од концентрације.
 - Свињски и говеђи хемоглобин снижавају експресију *Myog* гена у C2C12 ћелијама након 6 дана у концентрацији од 10 μM ;
 - Свињски и говеђи хемоглобин снижавају експресију *Skm* гена у C2C12 ћелијама након 6 дана у концентрацији од 10 μM , док је говеђи хемоглобин стимулише у концентрацијама од 0,1 и 1 μM .
- Свињски и говеђи хемоглобин модулишу имуномодулаторни потенцијал ПК-ММЋ:
 - Ефекат хемоглобина на модулаторни ефекат ПК-ММЋ на ћелијски циклус, апоптозу и пролиферацију алогених МНЋ зависи од даваоца МНЋ и животињске врсте из које је хемоглобин изолован;
 - Експресија специфичних имуномодулаторних маркера ММЋ: *HLA-G*, *HLA-DRA*, *TGFB1*, *PTGS2*, *IL6* и *HMOX1* није детектована у ПК-ММЋ гајеним ни у медијуму без, ни у медијуму са хемоглобином;
 - Говеђи хемоглобин индукује експресију *HLA-A* гена у ПК-ММЋ након 24 h у култури, док свињски хемоглобин не остварује овај ефекат;
 - Свињски и говеђи хемоглобин индукују експресију *IDO-1* гена у ПК-ММЋ након 24 h у култури.

ЛИТЕРАТУРА

7. Литература

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2016). *Osnovna imunologija* (5th ed.). Data Status.
2. Abe, H., Ikebuchi, K., Niwa, K., Inanami, O., Kuwabara, M., Fujihara, M., Hirayama, J., & Ikeda, H. (2001). Superoxide generation from human polymorphonuclear leukocytes by liposome-encapsulated hemoglobin. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology*, 29 (4), 275–283. <https://doi.org/10.1081/BIO-100104230>
3. Abraham, N. G., Lavrosky, Y., Schwartzman, M. L., Stoltz, R. A., Levere, R. D., Gerristen, M. E., Shibahara, S. & Kappas, A. (1995). Transformation of the human heme oxygenase gene into rabbit microvessel endothelial cells: protective effect against heme and hemoglobin toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 6798–6802. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.6798>
4. Abuchowski, A. (2017). SANGUINATE (PEGylated Carboxyhemoglobin Bovine): Mechanism of Action and Clinical Update. *Artificial Organs*, 41 (4), 346–350. <https://doi.org/10.1111/aor.12934>.
5. Adair, G. S. (1925). The osmotic pressure of hæmoglobin in the absence of salts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 109 (750), 292–300. <https://doi.org/10.1098/rspb.1925.0055>
6. Alam, M. Z., Devalaraja, S., & Haldar, M. (2017). The heme connection: Linking erythrocytes and macrophage biology. *Frontiers in Immunology*, 8, 6–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00033>
7. Alayash, A. I. (1999). Hemoglobin-based blood substitutes: Oxygen carriers, pressor agents, or oxidants? *Nature Biotechnology*, 17 (6), 545–549. <https://doi.org/10.1038/9849>.
8. Aliakbari, F., Haji Hosseinali, S., Khalili Sarokhalil, Z., Shahpasand, K., Akbar Saboury, A., Akhtari, K., & Falahati, M. (2019). Reactive oxygen species generated by titanium oxide nanoparticles stimulate the hemoglobin denaturation and cytotoxicity against human lymphocyte cell. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 37 (18), 4875–4881. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1568305>
9. Altinoz, M. A., Guloksuz, S., Schmidt-Kastner, R., Kenis, G., Ince, B., & Rutten, B. P. F. (2019). Involvement of hemoglobins in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*, 126, 110680. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110680>
10. Álvarez-Viejo, M. (2015). CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture. *World Journal of Stem Cells*, 7 (2), 470. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i2.470>
11. Alvarez-Zarate, J., Matlung, H. L., Matozaki, T., Kuijpers, T. W., Maridonneau-Parini, I., & Van Den Berg, T. K. (2015). Regulation of phagocyte migration by signal regulatory protein-alpha signaling. *PLoS ONE*, 10 (6), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127178>
12. Amano, M. T., & Camara, N. O. (2013). The immunomodulatory role of carbon monoxide during transplantation. *Medical Gas Research*, 3, 1. <https://doi.org/10.1186/2045-9912-3-1>
13. Amarilio, R., Viukov, S. V., Sharir, A., Eshkar-Oren, I., Johnson, R. S., & Zelzer, E., (2007). HIF1alpha regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 134 (21), 3917–3928. <https://doi.org/10.1242/dev.008441>
14. Anderson, U. D., Jälmy, M., Faas, M. M., & Hansson, S. R. (2018). The hemoglobin degradation pathway in patients with preeclampsia – Fetal hemoglobin, heme, heme oxygenase-1 and hemopexin – Potential diagnostic biomarkers? *Pregnancy Hypertension*, 14, 273–278. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.02.005>
15. Andrews, N. C. (2009). Iron deficiency and related disorders. In Greer, J. P., Foerster, J., Rodgers, G. M., Paraskevas, F., Glader, B., Arber, D. A., Means, R. T. Jr. (Eds.), *Wintröbe's clinical hematology* (12th ed., p 810–834). Lippincott Williams & Wilkins.
16. Anjos-Afonso, F., Siapati, E. K., & Bonnet, D. (2004). *In vivo* contribution of murine

- mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *Journal of Cell Science*, 117 (23), 5655–5664. <https://doi.org/10.1242/jcs.01488>
17. Arenberger, P., Engels, P., Arenbergerova, M., Gkalpakiotis, S., García Luna Martínez, F. J., Villarreal Anaya, A., & Jimenez Fernandez, L. (2011). Clinical results of the application of a hemoglobin spray to promote healing of chronic wounds. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär*, 6 (1), Doc05. <https://doi.org/10.3205/dgkh000162>
18. Arnhold, S., Elashry, M. I., Klymiuk, M. C., & Wensch, S. (2019). Biological macromolecules and mesenchymal stem cells: Basic research for regenerative therapies in veterinary medicine. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 889–899. <https://doi.org/doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.158>
19. Asserson, D. B., Orbay, H., & Sahar, D. E. (2019). Review of the pathways involved in the osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *Journal of Craniofacial Surgery*, 30 (3), 703–708. <https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000005447>
20. Aubin, J. E. (2001). Regulation of osteoblast formation and function. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2 (1), 81–94. <https://doi.org/10.1023/A:1010011209064>
21. Autelitano, D. J., Rajic, A., Smith, A. I., Berndt, M. C., Ilag, L. L., & Vadas, M. (2006). The cryptome: a subset of the proteome, comprising cryptic peptides with distinct bioactivities. *Drug Discovery Today*, 11 (7-8), 306-314. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.02.003>
22. Ayuningtyas, F.D., Kim, M.H., & Kino-Oka, M. (2020). Muscle lineage switching by migratory behaviour-driven epigenetic modifications of human mesenchymal stem cells on a dendrimer-immobilized surface. *Acta Biomaterialia*, 106, 170-180. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.02.026>
23. Bae, J. S., Han, H. S., Youn, D. H., Carter, J. E., Modo, M., Schuchman, E. H., & Jin, H. K. (2007). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote neuronal networks with functional synaptic transmission after transplantation into mice with neurodegeneration. *Stem Cells*, 25 (5), 1307–1316. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0561>
24. Bah, C. S. F., 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. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12013>
25. Bahl, N., Du, R., Winarsih, I., Ho, B., Tucker-Kellogg, L., Tidor, B., & Ding, J. L. (2011). Delineation of lipopolysaccharide (LPS)-binding sites on hemoglobin: from *in silico* predictions to biophysical characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 37793–37803. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.245472>
26. Bahl, N., Winarsih, I., Tucker-Kellogg, L., & Ding, J. L. (2014). Extracellular haemoglobin upregulates and binds to tissue factor on macrophages: Implications for coagulation and oxidative stress. *Thrombosis and Haemostasis*, 111 (1), 67–78. <https://doi.org/10.1160/TH13-03-0220>
27. Ball, S. G., Shuttleworth, C. A., & Kielty, C. M. (2007). Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. *Journal of Cell Biology*, 177 (3), 489–500. <https://doi.org/10.1083/jcb.200608093>
28. Balla, G., Jacob, H. S., Eaton, J. W., Belcher, J. D., & Vercellotti, G. M. (1991). Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 11 (6), 1700-1711. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.11.6.1700>
29. Bamm, V. V., Henein, M. E. L., Sproul, S. L. J., Lanthier, D. K., & Harauz, G. (2017). Potential role of ferric hemoglobin in MS pathogenesis: Effects of oxidative stress and extracellular methemoglobin or its degradation products on myelin components. *Free Radical Biology and Medicine*, 112, 494–503. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.022>
30. Bamm, V. V., Lanthier, D. K., Stephenson, E. L., Smith, G. S. T., & Harauz, G. (2015). *In vitro* study of the direct effect of extracellular hemoglobin on myelin components. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852 (1), 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.10.009>

31. Barbagallo, I., Vanella, A., Peterson, S. J., Kim, D. H., Tibullo, D., Giallongo, C., Vanella, L., Parrinello, N., Palumbo, G.A., Di Raimondo, F., Abraham, N. G., & Asprinio, D. (2010). Overexpression of heme oxygenase-1 increases human osteoblast stem cell differentiation. *Journal of Bone and Miner Metabolism*, 28 (3), 276–88. <https://doi.org/10.1007/s00774-009-0134-y>.
32. Beard, C. M., Kokmen, E., O'Brien, P. C., Ania, B. J., & Melton, L. J. (1997). Risk of Alzheimer's disease among elderly patients with anemia: Population-based investigations in Olmsted County, Minnesota. *Annals of Epidemiology*, 7 (3), 219–224. [https://doi.org/10.1016/S1047-2797\(97\)00015-X](https://doi.org/10.1016/S1047-2797(97)00015-X)
33. Belcher, J. D., Chen, C., Nguyen, J., Abdulla, F., Zhang, P., Nguyen, H., Nguyen, P., Killeen, T., Miescher, S. M., Brinkman, N., Nath, K. A., Steer, C. J., & Vercellotti, G. M. (2018). Haptoglobin and hemopexin inhibit vaso-occlusion and inflammation in murine sickle cell disease: Role of heme oxygenase-1 induction. *PLoS ONE*, 13 (4), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196455>
34. Bellos, I., Pergialiotis, V., Loutradis, D., Papapanagiotou, A., & Daskalakis, G. (2020). The role of hemoglobin degradation pathway in preeclampsia: A systematic review and meta-analysis. *Placenta*, 92, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2020.01.014>
35. Berglund, A. K., Fortier, L. A., Antczak, D. F., & Schnabel, L. V. (2017). Immunoprivileged no more: Measuring the immunogenicity of allogeneic adult mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 8 (1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0742-8>
36. Bhaskaran, M., Chen, H., Chen, Z., & Liu, L. (2005). Hemoglobin is expressed in alveolar epithelial type II cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333 (4), 1348–1352. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.042>
37. Biagioli, M., Pinto, M., Cesselli, D., Zaninello, M., Lazarevic, D., Roncaglia, P., Simone, R., Vlachouli, C., Plessy, C., Bertin, N., Beltrami, A., Kobayashi, K., Gallo, V., Santoro, C., Ferrer, I., Rivella, S., Beltrami, C. A., Carninci, P., Raviola, E., & Gustincich, S. (2009). Unexpected expression of α - and β -globin in mesencephalic dopaminergic neurons and glial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (36), 15454–15459. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813216106>
38. Bialas, C., Moser, C., & Sims, C. A. (2019). Artificial oxygen carriers and red blood cell substitutes: A historic overview and recent developments toward military and clinical relevance. *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 87 (1), S48–S58. <https://doi.org/10.1097/TA.0000000000002250>
39. Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell*, 2 (4), 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.03.002>
40. Birmingham, E., Niebur, G. L., Mchugh, P. E., Shaw, G., Barry, F. P., & McNamara, L. M. (2012). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *European Cells and Materials*, 23 (353), 13–27. <https://doi.org/10.22203/eCM.v023a02>
41. Blalock, E. M., Chen, K. C., Sharrow, K., Herman, J. P., Porter, N. M., Foster, T. C., & Landfield, P. W. (2003). Gene microarrays in hippocampal aging: Statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *Journal of Neuroscience*, 23 (9), 3807–3819. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-09-03807.2003>
42. Bo, J., Guan, Y., Guo, Y., Xie, S., Zhang, C., Zhang, H., Chen, Z., Lu, J., & Meng, Q. H. (2015). Impairment of endothelial cell function induced by hemoglobin A1C and the potential mechanisms. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 123 (9), 529–535. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1554622>
43. Bochenska, O., Rapala-Kozik, M., Wolak, N., Braś, G., Kozik, A., Dubin, A., Aoki, W., Ueda, M., & Mak, P. (2013). Secreted aspartic peptidases of *Candida albicans* liberate bactericidal

- hemocidins from human hemoglobin. *Peptides*, 48, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.07.023>
44. Bohr, C., Hasselbalch, K., & Krogh, A. (1904). Ueber einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt. *Skandinavisches Archiv Für Physiologie*, 16 (2), 402–412. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1904.tb01382.x>
45. Bolton, W., & Perutz, M. (1970). Three dimensional fourier synthesis of horse deoxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution. *Nature*, 228, 551–552. <https://doi.org/10.1038/228551a0>
46. Borriello, A., Caldarelli, I., Speranza, M. C., Scianguetta, S., Tramontano, A., Bencivenga, D., Stampone, E., Negri, A., Nobili, B., Locatelli, F., Perrotta, S., Oliva, A., & Della Ragione, F. (2016). Iron overload enhances human mesenchymal stromal cell growth and hampers matrix calcification. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1860 (6), 1211–1223. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.01.025>
47. Bronzan, R. N., Taylor, T. E., Mwenechanya, J., Tembo, M., Kayira, K., Bwanaisa, L., Njobvu, A., Kondowe, W., Chalira, C., Walsh, A. L., Phiri, A., Wilson, L. K., Molyneux, M. E., & Graham, S. M. (2007). Bacteremia in malawian children with severe malaria: prevalence, etiology, hiv coinfection, and outcome. *The Journal of Infectious Diseases*, 195 (6), 895–904. <https://doi.org/10.1086/511437>
48. Brown, N., Alkhayer, K., Clements, R., Singhal, N., Gregory, R., Azzam, S., Li, S., Freeman, E., & McDonough, J. (2016). Neuronal Hemoglobin Expression and Its Relevance to Multiple Sclerosis Neuropathology. *Journal of Molecular Neuroscience*, 59 (1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0711-6>
49. Bruderer, M., Richards, R. G., Alini, M., & Stoddart, M. J. (2014). Role and regulation of *RUNX2* in osteogenesis. *European Cells and Materials*, 28, 269–286. <https://doi.org/10.22203/eCM.v028a19>
50. Buehler, P. W., D'Agnillo, F., Hoffman, V., & Alayash, A. I. Effects of endogenous ascorbate on oxidation, oxygenation, and toxicokinetics of cell-free modified hemoglobin after exchange transfusion in rat and guinea pig. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 323 (1), 49–60. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.126409>
51. Bugarski, B., Dovezenski, N., Stojanovic, N., & Bugarski, D., (2003). *Emulsion containing hydrophobic nanodrops with bound hemoglobin molecules in a hydrophilic phase as a blood substitute* (DE Patent 10209860). World intellectual property organization. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=DE103594917&tab=NATIONALBIBLIO>
52. Bullard, W., Kieft, R., Capewell, P., Veitch, N. J., Macleod, A., & Hajduk, S. L. (2012). Haptoglobin-hemoglobin receptor independent killing of African trypanosomes by human serum and trypanosome lytic factors. *Virulence*, 3 (1), 72–76. <https://doi.org/10.4161/viru.3.1.18295>
53. Burattini, S., Ferri, R., Battistelli, M., Curci, R., Luchetti, F., & Falcieri, E. (2004). C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: Morpho-functional characterization. *European Journal of Histochemistry*, 48 (3), 223–233. <https://doi.org/10.4081/891>
54. Burr, A. H. J., Hunt, P., Wagar, D. R., Dewilde, S., Blaxter, M. L., Vanfleteren, J. R., & Moens, L. (2000). A hemoglobin with an optical function. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (7), 4810–4815. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.4810>
55. Buttari, B., Profumo, E., Di Cristofano, C., Pietraforte, D., Lionetti, V., Capoano, R., Salvati, B., Businaro, R., Di Giammarco, G., & Riganò, R. (2011). Haemoglobin triggers chemotaxis of human monocyte-derived dendritic cells: Possible role in atherosclerotic lesion instability. *Atherosclerosis*, 215 (2), 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.12.032>
56. Buttari, B., Profumo, E., Petrone, L., Pietraforte, D., Siracusano, A., Margutti, P., Delunardo, F., Ortona, E., Minetti, M., Salvati, B., & Riganò, R. (2007). Free hemoglobin: A dangerous signal for the immune system in patients with carotid atherosclerosis? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1107, 42–50. <https://doi.org/10.1196/annals.1381.005>

57. Canesin, G., Hejazi, S. M., Swanson, K. D., & Wegiel, B. (2020). *Heme-Derived Metabolic Signals Dictate Immune Responses*. 11, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00066>
58. Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9 (5), 641450. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
59. Caplan, A. I. (2017). Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem Cells Translational Medicine*, 6 (6), 1445–1451. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>
60. Carrick, J. B., & Begg, A. P. (2008). Peripheral Blood Leukocytes. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 24 (2), 239–259. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2008.05.003>
61. Carter, E. P., Hartsfield, C. L., Miyazono, M., Jakkula, M., Morris, K. G. Jr., & McMurtry, I. F. (2002). Regulation of heme oxygenase-1 by nitric oxide during hepatopulmonary syndrome. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 283 (2), L346-53. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00385.2001>
62. Casado-Díaz, A., Santiago-Mora, R., Dorado, G., & Quesada-Gómez, J. M. (2013). The omega-6 arachidonic fatty acid, but not the omega-3 fatty acids, inhibits osteoblastogenesis and induces adipogenesis of human mesenchymal stem cells: Potential implication in osteoporosis. *Osteoporosis International*, 24 (5), 1647–1661. <https://doi.org/10.1007/s00198-012-2138-z>
63. Casado-Díaz, Antonio, Dorado, G., & Quesada-Gómez, J. M. (2019). Influence of olive oil and its components on mesenchymal stem cell biology. *World Journal of Stem Cells*, 11 (12), 1045–1064. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i12.1045>
64. Caspary, E. A., Sewell, F., & Field, E. J. (1967). Red Blood Cell Fragility in Multiple Sclerosis. *British Medical Journal*, 2 (5552), 610–611. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5552.610>
65. Centlow, M., Carninci, P., Nemeth, K., Mezey, E., Brownstein, M., & Hansson, S.R. (2008) Placental expression profiling in preeclampsia: local overproduction of hemoglobin may drive pathological changes. *Fertility and Sterility*, 90, 1834-1843. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.09.030>
66. Cesselli, D., Beltrami, A. P., Rigo, S., Bergamin, N., D'Aurizio, F., Verardo, R., Piazza, S., Klaric, E., Fanin, R., Toffoletto, B., Marzinotto, S., Mariuzzi, L., Finato, N., Pandolfi, M., Leri, A., Schneider, C., Beltrami, C. A., & Anversa, P. (2009). Multipotent progenitor cells are present in human peripheral blood. *Circulation Research*, 104 (10), 1225–1234. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.195859>
67. Chen, G., & Palmer, A. F. (2010). Hemoglobin regulates the metabolic, synthetic, detoxification, and biotransformation functions of hepatoma cells cultured in a hollow fiber bioreactor. *Tissue Engineering: Part A*, 16 (10), 3231–3240. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0058>
68. Chen, J. Y., Scerbo, M., & Kramer, G. (2009). A review of blood substitutes: Examining the history, clinical trial results, and ethics of hemoglobin-based oxygen carriers. *Clinics*, 64 (8), 803–813. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322009000800016>
69. Cheng, C., & Juul, S. (2011). Iron balance in the neonate. *NeoReviews*, 12 (3), e148-e158. <https://doi.org/10.1542/neo.12-3-e148>
70. Cheng, D. C. H., Mazer, C. D., Martineau, R., Ralph-Edwards, A., Karski, J., Robblee, J., Finegan, B., Hall, R. I., Latimer, R., & Vuylsteke, A. (2004). A phase II dose-response study of hemoglobin raffimer (Hemolink) in elective coronary artery bypass surgery. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 127 (1), 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2003.08.024>
71. Chiabrando, D., Vinchi, F., Fiorito, V., & Tolosano, E. (2011). Haptoglobin and hemopexin in heme detoxification and iron recycling. In Veas, F. (Ed.), *Acute Phase Proteins - Regulation and Functions of Acute Phase Proteins* (pp. 261–288). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/756>
72. Chintagari, N. R., Jana, S., & Alayash, A. I. (2016). Oxidized ferric and ferryl forms of hemoglobin trigger mitochondrial dysfunction and injury in alveolar type i cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 55 (2), 288–298. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0197OC>
73. Cho, J. H., Lee, S. K., Lee, J. W., & Kim, E. C. (2010). The role of heme oxygenase-1 in

- mechanical stress and lipopolysaccharide-induced osteogenic differentiation in human periodontal ligament cells. *Angle Orthodontist*, 80 (4), 740–747. <https://doi.org/10.2319/091509-520.1>
74. Christiansen, J., Douglas, C. G., & Haldane, J. S., (1914). The absorption and dissociation of carbon dioxide by human blood. *The Journal of Physiology*, 48 (4), 244–271. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1914.sp001659>
75. Christopherson, S. W., & Glass, R. L. (1969). Preparation of milk fat methyl esters by alcoholysis in an essentially nonalcoholic solution. *Journal of Dairy Science*, 52 (8), 1289–1290. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(69\)86739-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(69)86739-1)
76. Coates, C. J., & Decker, H. (2016). Immunological properties of oxygen-transport proteins: hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74 (2), 293–317. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2326-7>
77. Coates, M. L. (1975). Hemoglobin function in the vertebrates: An evolutionary model. *Journal of Molecular Evolution*, 6 (4), 285–307. <https://doi.org/10.1007/BF01794636>
78. Coburn, R. F., Williams, W. J., & Kahn, S. B. (1966). Endogenous carbon monoxide production in patients with hemolytic anemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 45 (4), 460–468. <https://doi.org/10.1172/JCI105360>
79. Conant, J. B., & Scott, N. D. (1926). The so called oxygen content of methemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 69, 575–587. <https://www.jbc.org/content/69/2/575.full.pdf>
80. Cummins, E. P., Selfridge, A. C., Sporn, P. H., Sznajder, J. I., & Taylor, C. T. (2014). Carbon dioxide-sensing in organisms and its implications for human disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71 (5), 831–845. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
81. Curtis, E., Hsu, L. L., Noguchi, A. C., Geary, L., & Shiva, S. (2012). Oxygen regulates tissue nitrite metabolism. *Antioxidants and Redox Signaling*, 17 (7), 951–961. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4242>
82. Da Silva, R. R., Agustini, B. C., Da Silva, A. L. L., & Frigeri, H. R. (2012). Luminol in the forensic science. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3 (4), 172–177. <https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v3n4.rogiskisilva>
83. Daoud, R., Dubois, V., Bors-Dodita, L., Nedjar-Arroune, N., Krier, F., Chihib, N-E., Mary, P., Kouach, M., Briand, G., & Guillochon, F. (2005). New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. *Peptides*, 26, 713–719. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.12.008>
84. David, J. D., See, W. M., & Higginbotham, C. A. (1981). Fusion of chick embryo skeletal myoblasts: Role of calcium influx preceding membrane union. *Developmental Biology*, 82, 297–307. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(81\)90453-x](https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90453-x)
85. Deisseroth, A., Nienhuis, A., Lawrence, J., Giles, R., Turner, P., & Ruddle, F. H. (1978). Chromosomal localization of human β globin gene on human chromosome 11 in somatic cell hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75 (3), 1456–1460. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.3.1456>
86. Deisseroth, A., Nienhuis, A., Turner, P., Velez, R., French Anderson, W., Ruddle, F., Lawrence, J., Creagan, R., & Kucherlapati, R. (1977). Localization of the human α -globin structural gene to chromosome 16 in somatic cell hybrids by molecular hybridization assay. *Cell*, 12 (1), 205–218. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90198-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90198-2)
87. Delivoria-Papadopoulos, M., Coburn, R. F., and Forster, R. E. (1974). Cyclic variation of rate of carbon monoxide production in normal women. *Journal of Applied Physiology*, 36, 49–51. <https://doi.org/10.1152/jappl.1974.36.1.49>
88. Dennery, P.K., Sridhar, K., Lee, C., Wong, H., Shokoohi, V., Rodgers, P. & Spitz, D. (1997). Heme oxygenase-mediated resistance to oxygen toxicity in hamster fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 14937-14942. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.23.14937>
89. Dessypris, E.N., Sawyer, S.T., (2009). The erythrocyte. In Greer, J.P., Foerster, J., Rodgers, G.M., Paraskevas, F., Glader, B., Arber, D.A., Means, R.T. Jr. (Eds.), *Wintrobe's clinical hematology*. (12th ed., pp. 106–169) Lippincott Williams & Wilkins.
90. Dev, S., & Babitt, J. L. (2017). Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodialysis International*, 21, S6–S20. <https://doi.org/10.1111/hdi.12542>

91. Dilung, I. I., & Kapinus, E. I. (1978). The photonics of porphyrin molecules. *Russian Chemical Reviews*, 47 (1), 83–100. <https://doi.org/10.1070/RC1978v047n01ABEH002202>
92. Domingues-Hamdi, E., Vasseur, C., Fournier, J. B., Marden, M. C., Wajcman, H., & Baudin-Creuzza, V. (2014). Role of α -globin H helix in the building of tetrameric human hemoglobin: Interaction with α -hemoglobin stabilizing protein (AHSP) and heme molecule. *PLoS ONE*, 9 (11), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111395>
93. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8 (4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
94. Doshi, N., Zahr, A. S., Bhaskar, S., Lahann, J., & Mitragotri, S. (2009). Red blood cell-mimicking synthetic biomaterial particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (51), 21495–21499. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907127106>
95. Drvenica, I. T., Stančić, A. Z., Kalušević, A., Marković, S., Dragišić Maksimović, J., Nedović, V. A., Bugarski, B. 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. <https://doi.org/10.2298/JSC190513067D>
96. Du, R., Winarsih, I., Ho, B., & Ding, J. L. (2012). Lipid-free apolipoprotein A-I exerts an antioxidative role against cell-free hemoglobin. *American Journal of Clinical and Experimental Immunology*, 1, 33–48. ISSN:2164-7712/AJCEI1205001. PMID: 23885313
97. Duan, L., Yan, X., Wang, A., Jia, Y., & Li, J. (2012). Highly loaded hemoglobin spheres as promising artificial oxygen carriers. *ACS Nano*, 6 (8), 6897–6904. <https://doi.org/10.1021/nn301735u>
98. Dupré-Crochet, S., Erard, M., & Nüße, O. (2013). ROS production in phagocytes: why, when, and where? *Journal of Leukocyte Biology*, 94 (4), 657–670. <https://doi.org/10.1189/jlb.1012544>
99. Durante, W., Kroll, M. H., Christodoulides, N., Peyton, K. J., & Schafer, A. I. (1997). Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 80, 557–564. <https://doi.org/10.1161/01.RES.80.4.557>
100. Dutheil, D., Rousselot, M., Hauet, T., & Zal, F. (2014). Organ-preserving composition and uses (USA Patent US 2014/0113274 A1). U.S. Patent and Trademark Office. <http://www.freepatentsonline.com/y2014/0113274.html>.
101. Dwyer, R. M., Potter-Beirne, S. M., Harrington, K. A., Lowery, A. J., Hennessy, E., Murphy, J. M., Barry, F. P., O'Brien, T., & Kerin, M. J. (2007). Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. *Clinical Cancer Research*, 13 (17), 5020–5027. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0731>
102. Eberhardt, R. T., McMahon, L., Duffy, S. J., Steinberg, M. H., Perrine, S. P., Loscalzo, J., Coffman, J. D., & Vita, J. A. (2003). Sick cell anemia is associated with reduced nitric oxide bioactivity in peripheral conduit and resistance vessels. *American Journal of Hematology*, 74 (2), 104–111. <https://doi.org/10.1002/ajh.10387>
103. Eisele, P., Alonso, A., Griebel, M., Szabo, K., Hennerici, M.G., Gass, A. (2016). Investigation of cerebral microbleeds in multiple sclerosis as a potential marker of blood-brain barrier dysfunction, *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 7, 61–64, <http://doi.org/10.1016/j.msard.2016.03.010>
104. Elg, F., & Hunt, S. (2018). Hemoglobin spray as adjunct therapy in complex wounds: Meta-analysis versus standard care alone in pooled data by wound type across three retrospective cohort controlled evaluations. *SAGE Open Medicine*, 6, 205031211878431. <https://doi.org/10.1177/2050312118784313>
105. Engelhard, J. F. (1825). Commentatio de vera materia sanguini purpureum colorem impertientis natura (in Latin). Göttingen: Dietrich.

106. Erdei, J., Tóth, A., Nagy, A., Nyakundi, B. B., Fejes, Z., Nagy, B., Novák, L., Bognár, L., Balogh, E., Paragh, G., Kappelmayer, J., Bácsi, A., & Jeney, V. (2020). The role of hemoglobin oxidation products in triggering inflammatory response upon intraventricular hemorrhage in premature infants. *Frontiers in Immunology*, 11, 228. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00228>
107. Fagone, P., Patti, F., Mangano, K., Mammana, S., Coco, M., Touil-Boukoffa, C., Chikovani, T., Di Marco, R., & Nicoletti, F. (2013). Heme oxygenase-1 expression in peripheral blood mononuclear cells correlates with disease activity in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 261 (1–2), 82–86. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.04.013>
108. Farrugia, G., & Szurszewski, J. H. (2014). Carbon monoxide, hydrogen sulfide, and nitric oxide as signaling molecules in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 147 (2), 303–313. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.04.041>
109. Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., & Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 279, 1528–1530. <https://doi.org/10.1126/science.279.5356.1528>
110. Ferreira, D. N., Boechi, L., Estrin, D. A., & Martí, M. A. (2013). The key role of water in the dioxygenase function of *Escherichia coli* flavohemoglobin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 119 (3), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.10.015>
111. Ferrer, I., Gómez, A., Carmona, M., Huesa, G., Porta, S., Riera-Codina, M., Biagioli, M., Gustincich, S., & Aso, E. (2011). Neuronal hemoglobin is reduced in Alzheimer's disease, argyrophilic grain disease, Parkinson's disease, and Dementia with Lewy bodies. *Journal of Alzheimer's Disease*, 23 (3), 537–550. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101485>
112. Fiedler, J., Röderer, G., Günther, K. P., & Brenner, R. E. (2002). BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 87 (3), 305–312. <https://doi.org/10.1002/jcb.10309>
113. Filina, V., Grinko, A., & Ermilova, E. (2019). Truncated hemoglobins 1 and 2 are implicated in the modulation of phosphorus deficiency-induced nitric oxide levels in *Chlamydomonas*. *Cells*, 8 (9), pii: E947. <https://doi.org/10.3390/cells8090947>
114. Fischer, H., & Zeile, K. (1929). Synthese des Hämatoporphyrins, Protoporphyrins und Hämins. *Justus Liebigs Annalen Der Chemie*, 468 (1), 98–116. <https://doi.org/10.1002/jlac.19294680104>
115. Fischer-Fodor, E., Mot, A., Deac, F., Arkosi, M., & Silaghi-Dumitrescu, R. (2011). Towards hemerythrin-based blood substitutes: Comparative performance to hemoglobin on human leukocytes and umbilical vein endothelial cells. *Journal of Biosciences*, 36 (2), 215–221. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9066-5>
116. Fogaca, A. C., Da Silva, P. I., Miranda, M. T. Bianchi, A. G., Miranda, A., Ribolla, P. E., & Daffre, S. (1999). Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (36), 25330–25334. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.36.25330>
117. Forget, B. G., & Hardison, R. C. (2009). The normal structure and regulation of human globin gene clusters. *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management, Second Edition*, 46–61. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511596582.007>
118. Forte, G., Minieri, M., Cossa, P., Antenucci, D., Sala, M., Gnocchi, V., Fiaccavento, R., Carotenuto, F., De Vito, P., Baldini, P. M., Prat, M., & Di Nardo, P. (2006). Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation. *Stem Cells*, 24 (1), 23–33. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0176>
119. Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160 (2), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>
120. Freischlag, J., Backstrom, B., Kelly, D., & Busuttill, R. W. (1985). Blood and peritoneal neutrophil (PMN) adherence in rabbits: The effects of hemoglobin, peritoneal fluid, and infection. *Journal of Surgical Research*, 38 (6), 635–640. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(85\)90086-1](https://doi.org/10.1016/0022-4804(85)90086-1)
121. Freitas, T. A. K., Hou, S., Dioum, E. M., Saito, J. A., Newhouse, J., Gonzalez, G., Gilles-

- Gonzalez, M. A., & Alam, M. (2004). Ancestral hemoglobins in Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (17), 6675–6680. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308657101>
122. Freshney, R. I., Pragnell, I. B., Freshney, M. G. (1994). Culture of hematopoietic cells (Vol. 2). Wiley-Liss.
123. Frey, A. D., & Kallio, P. T. (2003). Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: Versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology. *FEMS Microbiology Reviews*, 27 (4), 525–545. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00056-1](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00056-1)
124. Froidevaux, R., Krier, F., Nedjar-Arroume, N., Vercaigne-Marko, D., Kosciarz, E., Ruckebusch, C., Dhulster, P., Guillochon, D. (2001). Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *FEBS Letters*, 491, 159–163. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02171-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02171-8)
125. Fu, Y., Bak, K. H., Liu, J., De Gobba, C., Tøstesen, M., Hansen, E. T., Petersen, M. A., Ruiz-Carrascal, J., Bredie, W. L. P., & Lametsch, R. (2019). Protein hydrolysates of porcine hemoglobin and blood: Peptide characteristics in relation to taste attributes and formation of volatile compounds. *Food Research International*, 121, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.017>
126. Fuchs, O., Ponka, P., Borova, J., Neuwirt, J., & Travnicek, M. (1981). Effect of heme on globin messenger RNA synthesis in spleen erythroid cells. *Journal of Supramolecular and Cellular Biochemistry*, 15 (1), 73–81. <https://doi.org/10.1002/jssc.1981.380150108>
127. Gao, B., Yang, L., & Luo, Z. J. (2014). Transdifferentiation between bone and fat on bone metabolism. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7 (5), 1834–1841. PMID: 24966894
128. Gardner, P. R. (2012). Hemoglobin: a nitric-oxide dioxygenase. 2012, 34. <https://doi.org/10.6064/2012/683729>
129. Garlick, R. L. (1980). Structure of annelid high molecular weight hemoglobins (erythrocrurins). *Integrative and Comparative Biology*, 20 (1), 69–77. <https://doi.org/10.1093/icb/20.1.69>
130. Garton, T., He, Y., Garton, H., Keep, R., Xi, G., & Strahle, J. (2016). Hemoglobin-induced neuronal degeneration in the hippocampus after neonatal intraventricular hemorrhage. *Brain Research*, 1635, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.12.060>
131. 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. <https://doi.org/10.1007/s12975-017-0535-5>
132. Gaudry, M. J., Storz, J. F., Butts, G. T., Campbell, K. L., & Hoffmann, F. G. (2014). Repeated evolution of chimeric fusion genes in the β -globin gene family of laurasiatherian mammals. *Genome Biology and Evolution*, 6 (5), 1219–1233. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu097>
133. Gesta, S., Tseng, Y.H., & Kahn, C.R. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*, 131 (2), 242–256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.004>
134. Geurts, J., van den Brand, B. T., Wolf, A., Abdollahi-Roodsaz, S., Arntz, O. J., Kracht, M., van den Berg, W. B., & van de Loo, F. A. (2011). Toll-like receptor 4 signalling is specifically TGF-beta-activated kinase 1 independent in synovial fibroblasts. *Rheumatology*, 50 (7), 1216–1225. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ker021>
135. Gilbert, S. F. (2000). Osteogenesis: The development of bones. In Gilbert, S. F. (Ed.) *Developmental biology*. (6th ed.). Sunderland (MA): Sinauer Associates. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10056>
136. Giulivi, C., & Davies, K. J. A. (1990). An antioxidant role for hemoglobin. *Free Radical Biology and Medicine*, 9 (32), 10. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90200-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90200-3)
137. Glader, B. (2009). Destruction of Erythrocytes. In Greer, J. P., Foerster, J., Rodgers, G. M., Paraskevas, F., Glader, B., Arber, D. A., Means, R. T. Jr. (Eds.), *Wintrobe's clinical hematology*. (12th ed., pp. 156–169). Lippincott Williams & Wilkins.

138. Gladwin, M. T., Schechter, A. N., Ognibene, F. P., Coles, W. A., Reiter, C. D., Schenke, W. H., Csako, G., Waclawiw, M. A., Panza, J. A., & Cannon R. O. 3rd. (2003). Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease. *Circulation*, 107 (2), 271-278. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000044943.12533.a8>
139. Gloster, J., & Fletcher, R. (1966). Quantitative analysis of serum lipids with thin-layer chromatography. *Clinica Chimica Acta*, 13 (2), 235–240. [https://doi.org/doi.org/10.1016/0009-8981\(66\)90298-1](https://doi.org/doi.org/10.1016/0009-8981(66)90298-1)
140. Goldring, M. B. (2012). Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 4 (4), 269–285. <https://doi.org/10.1177/1759720X12448454>
141. González-Garza, M. T., Cruz-Vega, D. E., Cárdenas-Lopez, A., Maria, R., Rosa, D., & Moreno-Cuevas, J. E. (2018). Comparing stemness gene expression between stem cell subpopulations from peripheral blood and adipose tissue. *American Journal of Stem Cells*, 7 (2), 38–47. <http://ajsc.us/files/ajsc0075887.pdf>
142. González-Rosendo, G., Polo, J., Rodríguez-Jerez, J. J., Puga-Díaz, R., Reyes-Navarrete, E. G., & Quintero-Gutiérrez, A. G. (2010). Bioavailability of a heme-iron concentrate product added to chocolate biscuit filling in adolescent girls living in a rural area of Mexico. *Journal of Food Science*, 75 (3), H73-8. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01523.x>
143. Gordon, J., Brown, M., & Reynolds, M. (2018). Cell-based methods for determination of efficacy for candidate therapeutics in the clinical management of cancer. *Diseases*, 6 (4), 85. <https://doi.org/10.3390/diseases6040085>.
144. Gorman, D., Drewry, A., Huang, Y. L., & Sames, C. (2003). The clinical toxicology of carbon monoxide. *Toxicology*, 187, 25–38. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00005-2)
145. Gould, S. A., Moore, E. E., Hoyt, D. B., Burch, J. M., Haenel, J. B., Garcia, J., DeWoskin, R., & Moss, G. S. (1998). The first randomized trial of human polymerized hemoglobin as a blood substitute in acute trauma and emergent surgery. *Journal of the American College of Surgeons*, 187 (2), 113–120. [https://doi.org/10.1016/S1072-7515\(98\)00095-7](https://doi.org/10.1016/S1072-7515(98)00095-7)
146. Gram, M., Sveinsdottir, S., Cinthio, M., Sveinsdottir, K., Hansson, S. R., Mörgelin, M., Åkerström, B., & Ley, D. (2014). Extracellular hemoglobin - mediator of inflammation and cell death in the choroid plexus following preterm intraventricular hemorrhage. *Journal of Neuroinflammation*, 11 (1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0200-9>
147. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (25), 13625–13630. <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>
148. Haacke, E.M., Garbern, J., Miao, Y., Habib, C., & Liu, M. (2010). Iron stores and cerebral veins in MS studied by susceptibility weighted imaging, *International Journal of Angiology*, 29, 149–157. <https://doi.org/10.1155/2011/606807>
149. Haas, A. L., & Rose, I. A. (1981). Hemin inhibits ATP-dependent ubiquitin-dependent proteolysis: role of hemin in regulating ubiquitin conjugate degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78 (11), 6845-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.11.6845>
150. Habtezion, A., Kwan, R., Yang, A. L., Morgan, M. E., Akhtar, E., Wanaski, S. P., Collins, S. D., Butcher, E. C., Kamal, A., & Omary, M. B. (2011). Heme oxygenase-1 is induced in peripheral blood mononuclear cells of patients with acute pancreatitis: A potential therapeutic target. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300 (1), 12–20. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00231.2010>
151. Hahn, U. K., Bender, R. C., & Bayne, C. J. (2001). Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Parasitology*, 87 (4), 778–785. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0778:IONOIK\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0778:IONOIK]2.0.CO;2)
152. Halder, S. M., & Stamler, J. S. (2013). S-nitrosylation: integrator of cardiovascular

- performance and oxygen delivery. *Journal of Clinical Investigation*, 123 (1), 101–110. <https://doi.org/10.1172/JCI62854.heart>
153. Han, Y., Li, X., Zhang, Y., Han, Y., Chang, F., & Ding, J. (2019). Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Cells*, 8 (8), 886. <https://doi.org/10.3390/cells8080886>
154. Hardison, R. C. (1996). A brief history of hemoglobins: Plant, animal, protist, and bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (12), 5675–5679. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5675>
155. Hardison, R. C. (2012). Evolution of hemoglobin and its genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2 (12), 1–18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011627>.
156. Hashemi, N., Vaezi, Z., Khanmohammadi, S., Naderi Sohi, A., Masoumi, S., Hruschka, V., Wolbank, S., Redi, H., Marolt Presen, D., & Naderi-Manesh, H. (2020). A novel fluorescent hydroxyapatite based on iron quantum cluster template to enhance osteogenic differentiation. *Materials Science and Engineering: C*, 111, 110775. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110775>
157. Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, 9 (1), 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>
158. Hau, T., Lee, J. T. Jr., Simmons, R. L. (1981). Mechanisms of the adjuvant effect of hemoglobin in experimental peritonitis. IV. The adjuvant effect of hemoglobin in granulocytopenic rats. *Surgery*, 89 (2), 187-91. PMID: 7006133
159. Hau, T., Simmons, R.L. (1980). Mechanisms of the adjuvant effect of hemoglobin in experimental peritonitis. III. The influence of hemoglobin on phagocytosis and intracellular killing by human granulocytes. *Surgery*, 87 (5), 588-92. PMID: 6989005
160. Hau, T., Nelson, R. D., Fiegel, V. D., Levenson, R., & Simmons, R. L. (1977). Mechanisms of the adjuvant action of hemoglobin in experimental peritonitis. *Journal of Surgical Research*, 22 (3), 174–180. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(77\)90131-7](https://doi.org/10.1016/0022-4804(77)90131-7)
161. He, Q., Wan, C., & Li, G. (2007). Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells*, 25 (1), 69–77. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0335>
162. Helms, C., & Kim-Shapiro, D. B. (2013). Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, 61, 464–472. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.028>
163. Henderson, L. J. (1920). The equilibrium between oxygen and carbonic acid in blood. *Journal of Biological Chemistry*, 41, 401–430. <https://www.jbc.org/content/41/3/401.citation>
164. Hill, B. G., Dranka, B. P., Bailey, S. M., Lancaster, J. R., & Darley-Usmar, V. M. (2010). What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (26), 19699–19704. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.101618>
165. Hobson, D., & Hirsch, J.G. (1958). The antibacterial activity of hemoglobins. *Journal of Experimental Medicine*, 107 (2), 167–183. <https://doi.org/10.1084/jem.107.2.167>
166. Hoppe, M., Brün, B., Larsson, M. P., Moraeus, L., & Hulthén, L. (2013). Heme iron-based dietary intervention for improvement of iron status in young women. *Nutrition*, 29 (1), 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.04.013>
167. Hou, C., Song, X., Li, Z., Wang, W., Shen, Q., & Zhang, D. (2019). Arginine improves the color stability of hemoglobin powder during freeze-drying and storage. *Food Science and Nutrition*, 7 (5), 1677–1684. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1004>
168. Hoy, J. A., & Hargrove, M. S. (2008). The structure and function of plant hemoglobins. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46 (3), 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.016>
169. Huang, Y. X., Wu, Z. J., Huang, B. T., & Luo, M. (2013). Pathway and mechanism of pH dependent human hemoglobin tetramer-dimer-monomer dissociations. *PLoS ONE*, 8 (11), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081708>
170. Huang, Z., Nelson, E. R., Smith, R. L., & Goodman, S. B. (2007). The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors to osteoblasts *in vitro*. *Tissue*

- Engineering*, 13 (9), 2311–2320. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0423>
171. Hünefeld F. L. (1840). *Der Chemismus in der thierischen Organisation*. Brockhaus.
172. Igarashi, K., & Sun, J. (2006). The heme-bach1 pathway in the regulation of oxidative stress response and erythroid differentiation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8 (1–2), 107–118. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.107>
173. Iwasaki, H., Yokomaku, K., Kureishi, M., Igarashi, K., Hashimoto, R., Kohno, M., Iwazaki, M., Haruki, R., Akiyama, M., Asai, K., Nakamura, Y., Funaki, R., Morita, Y., & Komatsu, T. (2018). Hemoglobin–albumin cluster: physiological responses after exchange transfusion into rats and blood circulation persistence in dogs. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46 (3), S621–S629. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1505740>
174. Stankiewicz, J.M., Neema, M., & Ceccarelli, A., (2014). Iron and multiple sclerosis, *Neurobiology of Aging*, 35 S51–S58, <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.039>
175. Jahr, S. J., Moallempour, M., & Lim, C. J. (2008). HBOC-201, hemoglobin glutamer-250 (bovine), Hemopure (Biopure Corporation). *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8 (9), 1425–1433. <https://doi.org/10.1517/14712598.8.9.1425>
176. James, S. L., & Glaven, J. (1989). Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *Journal of Immunology*, 143 (12), 4208–4212. <https://www.jimmunol.org/content/143/12/4208.abstract>
177. Jeney, V., Balla, J., Yachie, A., Varga, Z., Vercellotti, G. M., Eaton, J. W., & Balla, G. (2002). Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood*, 100 (3), 879–887. <https://doi.org/10.1182/blood.v100.3.879>
178. Jeney, V. (2018). Pro-inflammatory actions of red blood cell-derived DAMPs. *Experientia supplementum*, 108, 211–233. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-89390-79>
179. Jeney, V., Eaton, J. W., Balla, G., & Balla, J. (2013). Natural history of the bruise: Formation, elimination, and biological effects of oxidized hemoglobin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 703571. <https://doi.org/10.1155/2013/703571>
180. Jervis, M., Huaman, O., Cahuascano, B., Bahamonde, J., Cortez, J., Arias, J.I., Torres, C.G., Peralta, O.A. (2019). Comparative analysis of *in vitro* proliferative, migratory and pro-angiogenic potentials of bovine fetal mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *Veterinary Research Communications*, 43 (3), 165–178. <https://doi.org/10.1007/s11259-019-09757-9>
181. Jiang, N., Tan, N. S., Ho, B., Ding, J. L. (2007) Respiratory protein-mediated reactive oxygen species as an antimicrobial strategy. *Nature Immunology*, 8 (10), 1114–22. <https://doi.org/10.1038/ni1501>
182. Jiang, P., Zhang, Y., Zhu, C., Zhang, W., Mao, Z., & Gao, C. (2016). Fe₃O₄/BSA particles induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells under static magnetic field. *Acta Biomaterialia*, 46, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.09.020>
183. Jie, Y., Li, X., Cai, Z., Ma, M., Jin, Y., Ahn, D. U., & Huang, X. (2018). Phosphorylation of phosvitin plays a crucial effects on the protein-induced differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1848–1854. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.029>
184. Joe, A.W., Yi, L., Natarajan, A., Le Grand, F., So, L., Wang, J., Rudnicki, M.A., & Rossi, F.M. (2010). Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Natural Cell Biology*, 12 (2), 153–163. <https://doi.org/10.1038/ncb2015>
185. Jorissen, K. (2019). *Erythrocytes: Structure, Functions and Clinical Aspects*. Nova Science Publishers, Inc. ISBN: 978-1-53615-914-1.
186. Judson, R. N., Zhang, R. H., & Rossi, F. M. (2013). Tissue-resident mesenchymal stem/progenitor cells in skeletal muscle: collaborators or saboteurs? *FEBS Journal*, 280 (17), 4100–8. <https://doi.org/10.1111/febs.12370>
187. Jung, Y. H., Lee, S. J., Oh, S. Y., Lee, H. J., Ryu, J. M., & Han, H. J. (2015). Oleic acid enhances the motility of umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells through EphB2-

- dependent F-actin formation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853 (8), 1905–1917. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.05.006>
188. Kaempfer, T., Duerst, E., Gehrig, P., Roschitzki, B., Rutishauser, D., Grossmann, J., Schoedon, G., Vallelian, F., & Schaer, D. J. (2011). Extracellular hemoglobin polarizes the macrophage proteome toward Hb-clearance, enhanced antioxidant capacity and suppressed HLA class 2 expression. *Journal of Proteome Research*, 10 (5), 2397–2408. <https://doi.org/10.1021/pr101230y>
189. Kamaljeet, Bansal, S., & Sen Gupta, U. (2017). A study of the interaction of bovine hemoglobin with synthetic dyes using spectroscopic techniques and molecular docking. *Frontiers in Chemistry*, 4, 50. <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00050>
190. Kaneda, S., Ishizuka, T., Goto, H., Kimura, T., Inaba, K., & Kasukawa, H. (2009). Liposome-encapsulated hemoglobin, TRM-645: Current status of the development and important issues for clinical application. *Artificial Organs*, 33 (2), 146–152. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2008.00699.x>
191. Kasai, S., Mimura, J., Ozaki, T., & Itoh, K. (2018). Emerging regulatory role of Nrf2 in iron, heme, and hemoglobin metabolism in physiology and disease. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00242>
192. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 24 (5), 1294–1301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>
193. Kim, J., Park, Y., & Park, Y. (2014). Trans-10,cis-12 CLA promotes osteoblastogenesis via SMAD mediated mechanism in bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Functional Foods*, 8 (1), 367–376. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.006>
194. Kim, J., Park, Y., Lee, S. H., & Park, Y. (2013). Trans-10,cis-12 Conjugated linoleic acid promotes bone formation by inhibiting adipogenesis by peroxisome proliferator activated receptor- γ -dependent mechanisms and by directly enhancing osteoblastogenesis from bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24 (4), 672–679. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.017>
195. Kim, N., & Cho, S. G. (2013). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean Journal of Internal Medicine*, 28 (4), 387–402. <https://doi.org/10.3904/kjim.2013.28.4.387>
196. Kleiveland, C. R. (2015). Peripheral blood mononuclear cells. In Verhoeckx, K. Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, S., Requena, T., Swiatecka, D., & Wichers, H. (Eds.), *The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models* (1st ed., pp. 1–327). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4>
197. Klimczak, A., Kozłowska, U., & Kurpisz, M. (2018). Muscle stem/progenitor cells and mesenchymal stem cells of bone marrow origin for skeletal muscle regeneration in muscular dystrophies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 66 (5), 341–354. <https://doi.org/10.1007/s00005-018-0509-7>
198. Knudsen, K. A., McElwee, S. A., & Myers, L. (1990). A role for the neural cell adhesion molecule, N-CAM, in myoblast interaction during myogenesis. *Developmental Biology*, 138 (1), 159–168. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(90\)90185-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(90)90185-1)
199. Kobayashi, T., Lyons, K. M., McMahan, A. P. & Kronenberg, H. M. (2005). BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (50), 18023–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503617102>
200. Kocić, J., Santibañez, J. F., Krstić, A., Mojsilović, S., Dordević, I. O., Trivanović, D., Ilić, V., & Bugarski, D. (2012). Interleukin 17 inhibits myogenic and promotes osteogenic differentiation of C2C12 myoblasts by activating ERK1,2. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823 (4), 838–849. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.01.001>
201. Kojour, M. A. M., Barough, S. E., Kouchesfehiani, H. M., Jalali, H., & Ebrahim, M. H. K. (2017). Oleic acid promotes the expression of neural markers in differentiated human endometrial stem cells. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 79, 51–57.

<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2016.11.004>

202. Kostić, I. T., Ilić, V. L., Đorđević, V. B., Bukara, K. M., Mojsilović, S. B., Nedović, V. A., Bugarski, D. S., Veljović, D. 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. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.06.043>
203. Koury, M. J., Mahmud, N., Rhodes, M. M. (2009). Origin and Development of Blood Cells. In Greer, J.P., Foerster, J., Rodgers, G.M., Paraskevas, F., Glader, B., Arber, D.A., Means, R.T. Jr., (Eds.), *Wintrobe's clinical hematology*. (12th ed., pp. 79–105). Lippincott Williams & Wilkins.
204. Kuck, J. L., Bastarache, J. A., Shaver, C. M., Fessel, J. P., Dikalov, S. I., May, J. M., & Ware, L. B. (2018). Ascorbic acid attenuates endothelial permeability triggered by cell-free hemoglobin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495 (1), 433–437. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.058>
205. Kukolj, T., Trivanović, D., Djordjević, I. O., Mojsilović, S., Krstić, J., Obradović, H., Janković, S., Santibanez, J. F., Jauković, A., & Bugarski, D. (2018). Lipopolysaccharide can modify differentiation and immunomodulatory potential of periodontal ligament stem cells via ERK1,2 signaling. *Journal of Cellular Physiology*, 233 (1), 447–462. <https://doi.org/10.1002/jcp.25904>
206. Kukolj, T., Trivanović, D., Mojsilović, S., Okić Djordjević, I., Obradović, H., Krstić, J., Jauković, A., & Bugarski, D. (2019). IL-33 guides osteogenesis and increases proliferation and pluripotency marker expression in dental stem cells. *Cell Proliferation*, 52 (1), 1–17. <https://doi.org/10.1111/cpr.12533>
207. Kumar, R. (1995). Recombinant hemoglobins as blood substitutes: a biotechnology perspective. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208 (2), 150–158. <https://doi.org/10.3181/00379727-208-43847>
208. Kuznetsov, S. A., Mankani, M. H., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P., & Robey, P. G. (2001). Circulating skeletal stem cells. *Journal of Cell Biology*, 153 (5), 1133–1139. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.5.1133>
209. La Fauci, G., Weiser, G., Steiner, I. P., & Shavit, I. (2012). Carbon monoxide poisoning in narghile (water pipe) tobacco smokers. *CJEM*, 14 (1), 57–59. <https://doi.org/10.2310/8000.2011.110431>
210. Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
211. Lamy, M. L., Daily, E. K., Brichant, J. F., Larbuisson, R. P., Demeyere, R. H., Vandermeersch, E. A., Lehot, J. J., Parsloe, M. R., Berridge, J. C., Sinclair, C. J., Baron, J. F., & Przybelski, R. J. (2000). Randomized trial of diaspirin cross-linked hemoglobin solution as an alternative to blood transfusion after cardiac surgery. *Anesthesiology*, 92 (3), 646–656. <https://doi.org/10.1097/00000542-200003000-0000>
212. Lara, F. A., Kahn, S. A., Da Fonseca, A. C. C., Bahia, C. P., Pinho, J. P. C., Graca-Souza, A. V., Houzel, J. C., De Oliveira, P. L., Moura-Neto, V., & Oliveira, M. F. (2009). On the fate of extracellular hemoglobin and heme in brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29 (6), 1109–1120. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.34>
213. Lavoie, P. M., & Levy, O. (2017). The mononuclear phagocyte system. In Polin, R., Abman, S., Rowitch, D., & Benitz, W. (Eds.), *Fetal and Neonatal Physiology* (5th ed., pp. 23–66). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1097/00006454-198611000-00056>
214. Le Blanc, K., & Ringdén, O. (2007). Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *Journal of Internal Medicine*, 262 (5), 509–525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01844.x>
215. Le Blanc, S., Garrick, M. D., & Arredondo, M. (2012). Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 302 (12), 1780–1786. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00080.2012>

216. Le Pape, F., Bossard, M., Dutheil, D., Rousselot, M., Polard, V., Férec, C., Leize, E., Delépine, P., & Zal, F. (2015). Advancement in recombinant protein production using a marine oxygen carrier to enhance oxygen transfer in a CHO-S cell line. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 43 (3), 186–195. <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1029632>
217. Le Pape, F., Cosnuau-Kemmat, L., Gaëlle, R., Dubrana, F., Férec, C., Zal, F., Leize, E., & Delépine, P. (2017a). HEMOXCell, a new oxygen carrier usable as an additive for mesenchymal stem cell culture in platelet lysate-supplemented media. *Artificial Organs*, 41 (4), 359–371. <https://doi.org/10.1111/aor.12892>.
218. Le Pape, F., Gaëlle, R., Porchet, E., Sourice, S., Dubrana, F., Férec, C., Polard, V., Pace, R., Weiss, P., Zal, F., Delépine, P., & Leize, E. (2017b). Adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of human MSCs cultured under perfusion with a marine oxygen carrier on an allogenic bone substitute. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46 (1), 95–107. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1365724>
219. Lecoeur, M., Goossens, J. F., Vaccher, C., Bonte, J. P., & Foulon, C. (2011). A multivariate approach for the determination of isoelectric point of human carbonic anhydrase isoforms by capillary isoelectric focusing. *Electrophoresis*, 32 (20), 2857–2866. <https://doi.org/10.1002/elps.201100219>
220. Lee, J. T., Ahrenholz, D. H., Nelson, R. D., & Simmons, R. L. (1979). Mechanisms of the adjuvant effect of hemoglobin in experimental peritonitis. V. The significance of the coordinated iron component. *Surgery*, 86 (1), 41–48. PMID: 377541
221. Lee, R. A., Kim, H. A., Kang, B. Y., & Kim, K. H. (2006). Hemoglobin induces colon cancer cell proliferation by release of reactive oxygen species. *World Journal of Gastroenterology*, 12 (35), 5644–5650. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i35.5644>
222. Lee, S. K., & Ding, J. L. (2013). A perspective on the role of extracellular hemoglobin on the innate immune system. *DNA and Cell Biology*, 32 (2), 36–40. <https://doi.org/10.1089/dna.2012.1897>
223. Lee, S. K., Goh, S. Y., Wong, Y. Q., & Ding, J. L. (2015). Response of neutrophils to extracellular haemoglobin and LTA in human blood system. *Ebiomedicine*, 2 (3), 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.01.003>
224. Lefebvre, V., & Dvir-Ginzberg, M. (2017). SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage. *Connective Tissue Research*, 58 (1), 2–14. <https://doi.org/10.1002/cncr.27633>
225. 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. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00230.2011>
226. Lewin, A., Hamilton, S., Witkover, A., Langford, P., Nicholas, R., Chataway, J., & Bangham, C. R. M. (2017). Free serum haemoglobin is associated with brain atrophy in secondary progressive multiple sclerosis. *Wellcome Open Research*, 1, 1–23. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.9967.1>
227. Ley, D., Romantsik, O., Vallius, S., Sveinsdóttir, K., Sveinsdóttir, S., Agyemang, A. A., Baumgarten, M., Mörgelin, M., Lutay, N., Bruschetini, M., Holmqvist, B., & Gram, M. (2016). High presence of extracellular hemoglobin in the periventricular white matter following preterm intraventricular hemorrhage. *Frontiers in Physiology*, 7, 330. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00330>
228. Li, D.L., Wu, B., Zhang, X., Li, M.Y., Cheng, J.R. & Tang, D. B. (2019a). Enhancing hemoglobin peptide production from chicken blood fermentation by food-grade nonionic surfactant. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 66 (5). <https://doi.org/10.1002/bab.1795>
229. Li, L., Du, G. P., Wang, D. J., Zhou, J., Jiang, G., & Jiang, H. (2017). Overexpression of heme oxygenase-1 in mesenchymal stem cells augments their protection on retinal cells in vitro and attenuates retinal ischemia/reperfusion injury in vivo against oxidative stress. *Stem Cells International*, 2017, 4985323. <https://doi.org/10.1155/2017/4985323>
230. Li, W., Zhang, S., Liu, J., Liu, Y., & Liang, Q. (2019b). Vitamin K2 stimulates MC3T3-E1

- osteoblast differentiation and mineralization through autophagy induction. *Molecular Medicine Reports*, 49 (5), 3676–3684. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10040>
231. Lian, J., & Stein, G. (2005). Runx2/Cbfa1: A Multifunctional Regulator of Bone Formation. *Current Pharmaceutical Design*, 9 (32), 2677–2685. <https://doi.org/10.2174/138161203345365>
232. Liebman, H. A., & Feinstein, D. I. (2003). Thrombosis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is associated with markedly elevated plasma levels of leukocyte-derived tissue factor. *Thrombosis Research*, 111 (4–5), 235–238. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2003.09.018>
233. Liepke, C., Baxmann, S., Heine, C., Breithaupt, N., Ständker, L., Forssmann, W. G. (2003). Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 791 (1), 345–356. [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(03)00245-9)
234. Lima, M. C. P., & Andrade, C. T. (2007). Stroma-free hemoglobin from bovine blood. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 35 (4), 431–447. <https://doi.org/10.1080/10731190701460333>
235. Ling, W., Zhang, J., Yuan, Z., Ren, G., Zhang, L., Chen, X., Rabson, A. B., Roberts, A. I., Wang, Y., & Shi, Y. (2014). Mesenchymal stem cells employIDO to regulate immunity in tumor microenvironment. *Cancer Research*, 74 (5), 1576–1587. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1656>
236. Liu, L., Zeng, M., & Stamler, J. S. (1999). Hemoglobin induction in mouse macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (12), 6643–6647. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.6643>
237. Liu, X., Ji, C., Xu, L., Yu, T. T., Dong, C., & Luo, J. (2018). Hmox1 promotes osteogenic differentiation at the expense of reduced adipogenic differentiation induced by BMP9 in C3H10T1/2 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119 (7), 5503–5516. <https://doi.org/10.1002/jcb.26714>
238. Liu, Y., & Liu, R. (2015). Spectroscopy and molecular model identify the behavior of doxorubicin-spion binding to bovine hemoglobin. *International journal of biological macromolecules*, 79, 564–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.043>
239. Liu, Y., Xu, L., Hu, L., Chen, D., Yu, L., Li, X., Chen, H., Zhu, J., Chen, C., Luo, Y., Wang, B., & Li, G. (2019). Stearic acid methyl ester promotes migration of mesenchymal stem cells and accelerates cartilage defect repair. *Journal of Orthopaedic Translation*. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2019.09.008>
240. Łos, M. J., Skubis, A., & Ghavami, S. (2019). Stem cells. In Łos, M., Hudecki, A., & Wiechec, E. (Eds.), *Stem cells and biomaterials for regenerative medicine* (1st ed., pp. 5–16). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812258-7.00002-2>
241. Lu, W., Zhao, M., Rajbhandary, S., Xie, F., Chai, X., Mu, J., Meng, J., Liu, Y., Jiang, Y., Xu, X., & Meng, A. (2013). Free iron catalyzes oxidative damage to hematopoietic cells/mesenchymal stem cells *in vitro* and suppresses hematopoiesis in iron overload patients. *European Journal of Haematology*, 91 (3), 249–261. <https://doi.org/10.1111/ejh.12159>
242. Lueangsakulthai, J., Phosri, S., Theansungnoen, T., Jangpromma, N., Temsiripong, T., Mckendrick, J. E., Khunkitti, W., & Klaynongsruang, S. (2018). Novel antioxidant and anti-inflammatory peptides from the Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) hemoglobin hydrolysate. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65 (3), 455–466. <https://doi.org/10.1002/bab.1628>
243. Lundberg, J. O., & Weitzberg, E. (2010). The biological role of nitrate and nitrite: The times they are a-changin'. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 22 (2), 61–63. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2009.11.004>
244. Ma, B., Day, J. P., Phillips, H., Slootsky, B., Tolosano, E., & Doré, S. (2016). Deletion of the hemopexin or heme oxygenase-2 gene aggravates brain injury following stroma-free hemoglobin-induced intracerebral hemorrhage. *Journal of Neuroinflammation*, 13 (1), 1–12.

<https://doi.org/10.1186/s12974-016-0490-1>

245. Mairbaur, H. (1994). Red blood cell function in hypoxia at altitude and exercise. *International Journal of Sports Medicine*, 15 (2), 51–63. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1021020>
246. Mairbäur, H., & Weber, R. E. (2012). Oxygen transport by hemoglobin. *Comprehensive Physiology*, 2 (2), 1463–1489. <https://doi.org/10.1002/cphy.c080113>
247. Mak, P. (2008). Hemocidins in a functional and structural context of human antimicrobial peptides. *Frontiers in Bioscience*, 13, 6859–6871. <https://doi.org/10.2741/3194>
248. Mak, P., Wicherek, L., Suder, P., Dubin, A., Banas, T., Kaim, I., & Klimek, M. (2006). Analysis of free hemoglobin level and hemoglobin peptides from human puerperal uterine secretions. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 13 (4), 285–391. <https://doi.org/10.1016/j.jsgi.2006.02.009>
249. Mak, P., Wojcik, K., Silberring, J., & Dubin, A. (2000) Antimicrobial peptides derived from heme-containing proteins: Hemocidins. *Antonie von Leeuwenhoek*, 77 (3), 197–207. <https://doi.org/10.1023/a:1002081605784>
250. Mak, P., Wojcik, K., Wicherek, L., Suder, P., & Dubin, A. (2004). Antibacterial peptides in human menstrual blood. *Peptides*, 25 (11), 1839–1840. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.06.015>
251. Mallet, V., Duthel, D., Polard, V., Rousselot, M., Leize, E., Hauet, T., Goujon, J. M., & Zal, F. (2014). Dose-ranging study of the performance of the natural oxygen transporter HEMO2life in organ preservation. *Artificial Organs*, 38 (8), 691–701. <https://doi.org/10.1111/aor.12307>
252. Malovrh, T., Melkić, E., Kompan, D., Levart, A., & Kompan, L. (2014). Incorporation of conjugated linoleic acid isomers into porcine erythrocytes. *European Journal of Nutrition*, 53 (3), 989–993. <https://doi.org/10.1007/s00394-013-0618-3>
253. Matheson, B., Razynska, A., Kwansa, H., Bucci, E. (2000). Appearance of dissociable and cross-linked hemoglobins in the renal hilar lymph. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 135 (6), 459–464. <https://doi.org/10.1067/mlc.2000.106458>
254. Carter, M., Shieh, J. (2015). Cell culture techniques. In Carter, M., Shieh, J. (Ed.), *Guide to Research Techniques in Neuroscience* (2nd ed., pp. 295–310). <https://doi.org/10.1017/CBO9780511813412.003>
255. Matthews, K. E., Mueller, S. G., Woods, C., & Bell, D. N. (2006). Expression of the hemoglobin-haptoglobin receptor CD163 on hematopoietic progenitors. *Stem Cells and Development*, 15 (1), 40–48. <https://doi.org/10.1089/scd.2006.15.40>
256. McCormick, D. J., & Atassi, M. Z. (1990). Hemoglobin binding with haptoglobin: Delineation of the haptoglobin binding site on the α -chain of human hemoglobin. *Journal of Protein Chemistry*, 9 (6), 735–742. <https://doi.org/10.1007/BF01024768>
257. McFaul, S. J., Bowman, P. D., Villa, V. M., Gutierrez-Ibanez, M. J., Johnson, M., & Smith, D. (1994). Hemoglobin stimulates mononuclear leukocytes to release interleukin-8 and tumor necrosis factor α . *Blood*, 84 (9), 3175–3181. <https://doi.org/10.1182/blood.v84.9.3175.bloodjournal8493175>
258. McLeod, C. M., & Mauck, R. L. (2017). On the origin and impact of mesenchymal stem cell heterogeneity: New insights and emerging tools for single cell analysis. *European Cells and Materials*, 34, 217–231. <https://doi.org/10.22203/eCM.v034a14>
259. Meligy, F. Y., Shigemura, K., Behnsawy, H., M., Fujisawa, M., Kawabata, M., & Shirakawa, T. (2012) The efficiency of in vitro isolation and myogenic differentiation of MSCs derived from adipose connective tissue, bone marrow, and skeletal muscle tissue. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 48 (4), 203–215. <https://doi.org/10.1007/s11626-012-9488-x>
260. Menko, A. S., & Boettiger, D. (1987). Occupation of the extracellular matrix integrin is a control point for myogenic differentiation. *Cell*, 1987; 51 (1), 51–57. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90009-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90009-2)
261. Merkel, T. J., Jones, S. W., Herlihy, K. P., Kersey, F. R., Shields, A. R., Napier, M., Luft, J. C., Wu, H., Zamboni, W. C., Wang, A. Z., Bear, J. E., & DeSimone, J. M. (2011). Using

- mechanobiological mimicry of red blood cells to extend circulation times of hydrogel microparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (2), 586–591. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010013108>
262. Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., & Shi, S. (2003). SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (10), 5807–5812. <https://doi.org/10.1073/pnas.0937635100>
263. Mo, B., Zhang, Z., Xu, Y., Xiong, W., Liu, X., & Zhen, G. (2005). Expression of heme oxygenase-1 in the peripheral blood mononuclear cells from asthmatic patients. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 25, 385–388. <https://doi.org/10.1155/2011/725926>
264. Monboisse, J. C., Garnotel, R., Randoux, A., & Dufer Borel, J. J. P. (1991). Adhesion of human neutrophils to and activation by type-I collagen involving a $\alpha 2$ integrin. *Journal of Leukocyte Biology*, 50 (4), 373–380. <https://doi.org/10.1002/jlb.50.4.373>
265. Montich, G. G. (2000). Partly folded states of bovine carbonic anhydrase interact with zwitterionic and anionic lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1468 (1–2), 115–126. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00250-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00250-9)
266. Morita, Y. (2015). Mechanism of functional alterations in hematopoietic stem cell aging. Rudolph, K.L. (Ed.), *Adult stem cells in aging, diseases and cancer* (vol 5, pp 40-59). Karger Publishers. <https://doi.org/10.1159/000366570>
267. Morszeck, C., Götz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kühn, U., Möhl, C., Sippel, C., & Hoffmann, K. H. (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biology*, 24 (2), 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2004.12.004>
268. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
269. Moyo, V. M., Mukhina, G. L., Garrett, E. S., & Brodsky, R. A. (2004). Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *British Journal of Haematology*, 126 (1), 133–138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.04992.x>
270. Mueller, S. G., Stuart, S. E., Masuta, K. K., Wong, T., Christoff, B., Ning, J., Carmichael, F. J. L., Wong, L. T. & Bell, D. N. (1997). The enhancement of erythropoiesis by hemoglobin. *Proceeding of the 29th Annual meeting of the American Society of Hematology* (Abstract).
271. Muldoon, L. L., Alvarez, J. I., Begley, D. J., Boado, R. J., Del Zoppo, G. J., Doolittle, N. D., Engelhardt, B., Hallenbeck, J. M., Lonser, R. R., Ohlfest, J. R., Prat, A., Scarpa, M., Smeyne, R. J., Drewes, L. R., & Neuwelt, E. A. (2013). Immunologic privilege in the central nervous system and the blood-brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33 (1), 13–21. <http://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.153>
272. Nagy, E., Eaton, J.W., Jeney, V., Soares, M.P., Varga, Z., Galajda, Z., Szentmiklósi, J., Méhes, G., Csonka, T., Smith, A., Vercellotti, G.M., Balla, G., & Balla, J. (2010). Red cells, hemoglobin, heme, iron, and atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30 (7), 1347–1353. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.206433>
273. Nakai, K., Sakuma, I., Ohta, T., Ando, J., Kitabatake, A., Nakazato, Y., Takahashi, T. A. (1998). Permeability characteristics of hemoglobin derivatives across cultured endothelial cell monolayers. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 132 (4), 313–319. [http://doi.org/10.1016/s0022-2143\(98\)90045-2](http://doi.org/10.1016/s0022-2143(98)90045-2)
274. Nakamizo, A., Marini, F., Amano, T., Khan, A., Studeny, M., Gumin, J., Chen, J., Hentschel, S., Vecil, G., Dembinski, J., Andreeff, M., & Lang, F. F. (2005). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Research*, 65 (8), 3307–3318. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1874>
275. Ner, J.H., Kotlinska, J., Silberring, J. (2015). Crypteins--An overlooked piece of peptide systems. *Current Protein & Peptide Science*, 16 (3), 203–218. <https://doi.org/10.2174/1389203716666150224125557>

276. Newman, R. E., Yoo, D., LeRoux, M. A., & Danilkovitch-Miagkova, A. (2009). Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. *Inflammation and Allergy - Drug Targets*, 8 (2), 110–123. <https://doi.org/10.2174/187152809788462635>
277. Nicholls, M. (2019). Nitric oxide discovery Nobel Prize winners. *European Heart Journal*, 40 (22), 1747–1749. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz36>
278. Nikolić, N., Krstić, A., Trivanović, D., Mojsilović, S., Kocić, J., Santibanez, J. F., Jovčić, G., & Bugarski, D. (2011). Mesenchymal stem cell properties of dental pulp cells from deciduous teeth. *Archives of Biological Sciences*, 63 (4), 933–942. <https://doi.org/10.2298/ABS1104933N>
279. Nowak, W. N., Taha, H., Kachamakova-Trojanowska, N., Stępniewski, J., Markiewicz, J. A., Kusienicka, A., Szade, K., Szade, A., Bukowska-Strakova, K., Hajduk, K., Klóska, D., Kopacz, A., Grochot-Przęczek, A., Barthenheier, K., Cauvin, C., Dulak, J., & Józkwicz, A. (2017). Murine bone marrow mesenchymal stromal cells respond efficiently to oxidative stress despite the low level of heme oxygenases 1 and 2. *Antioxidants & Redox Signaling*, 29 (2), 111–127. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7097>
280. Obradovic, H., Krstic, J., Trivanovic, D., Mojsilovic, S., Okic, I., Kukulj, T., Ilic, V., Jaukovic, A., Terzic, M., & Bugarski, D. (2019). Improving stemness and functional features of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of a human umbilical cord by mimicking the native, low oxygen stem cell niche. *Placenta*, 82, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.05.005>
281. Oez, S., Welte, K., Platzer, E., & Kalden, J. R. (1990). A simple assay for quantifying the inducible adherence of neutrophils. *Immunobiology*, 180 (4–5), 308–315. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(11\)80294-9](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(11)80294-9)
282. Ogasawara, N., Oguro, T., Sakabe, T., Matsushima, M., Takikawa, O., Isobe, K. I., & Nagase, F. (2009). Hemoglobin induces the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells through the activation of PI3K, PKC, and NF-κB and the generation of reactive oxygen species. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108 (3), 716–725. <https://doi.org/10.1002/jcb.22308>
283. Ogawa, K., Sun, J., Taketani, S., Nakajima, O., Nishitani, C., Sassa, S., Hayashi, N., Yamamoto, M., Shibahara, S., Fujita, H., Igarashi, K. (2001). Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO Journal*, 20 (11), 2835–43. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.11.2835>
284. Okamura, H., Udupa, K. B., & Reissmann, K. R. (1971). On the mechanism of erythropoietic action of hemoglobin and its derivatives. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 136 (3), 794–797
285. Olofsson, C., Ahl, T., Johansson, T., Larsson, S., Nellgård, P., Ponzer, S., Fagrell, B., Przybelski, R., Keipert, P., Winslow, N., & Winslow, R. M. (2006). A multicenter clinical study of the safety and activity of maleimide-polyethylene glycol-modified hemoglobin (Hemospan®) in patients undergoing major orthopedic surgery. *Anesthesiology*, 105 (6), 1153–1163. <https://doi.org/10.1097/00000542-200612000-00015>
286. Olson, J. S. (2020). Lessons learned from 50 years of hemoglobin research: unstirred and cell-free layers, electrostatics, baseball gloves, and molten globules. *Antioxidants and Redox Signaling*, 32 (4), 228–246. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7876>
287. Olsson, M. G., Centlow, M., Rutardottir, S., Stenfors, I., Larsson, J., Hosseini-Maaf, B., Olsson, M. L., & Hansson, S. R., Åkerström, B. (2010). Increased levels of cell-free hemoglobin, oxidation markers, and the antioxidative heme scavenger α1-microglobulin in preeclampsia. *Free Radical Biology & Medicine*, 48 (2), 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.10.052>
288. Olsson, M. G., Allhorn, M., Bülow, L., Hansson, S. R., Ley, D., Olsson, M. L., Schmidtchen, A., & Åkerström, B. (2012). Pathological Conditions Involving Extracellular Hemoglobin: Molecular Mechanisms, Clinical Significance, and Novel Therapeutic Opportunities for α1-microglobulin. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17 (5), 813–846. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4282>
289. Olsson, M., Olofsson, T., Tapper, H., & Åkerström, B. (2008). The lipocalin α1-

- microglobulin protects erythroid K562 cells against oxidative damage induced by heme and reactive oxygen species. *Free Radical Research*, 42 (8), 725–736. <https://doi.org/10.1080/10715760802337265>
290. Olszowy, M., & Dawidowicz, A. L. (2018). Is it possible to use the DPPH and ABTS methods for reliable estimation of antioxidant power of colored compounds? *Chemical Papers*, 72 (2), 393–400. <https://doi.org/10.1007/s11696-017-0288-3>
291. Ortegon, D. P., Davis, M. R., Dixon, P. S., Smith, D. L., Josephs, J. D., Mueller, D. L., Jenkins, D. H., & Kerby, J. D. (2002). The polymerized bovine hemoglobin-based oxygen-carrying solution (HBOC-201) is not toxic to neural cells in culture. *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care*, 53 (6), 1068–1072. <https://doi.org/10.1097/00005373-200212000-00007>
292. Oshino, R., Oshino, N., & Chance, B. (1973). Studies on yeast hemoglobin. The properties of yeast hemoglobin and its physiological function in the cell. *European Journal of Biochemistry*, 35 (1), 23–33. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1973.tb02805.x>
293. P. De Miguel, M., Fuentes-Julian, S., Blazquez-Martinez, A., Y. Pascual, C., A. Aller, M., Arias, J., & Arnalich-Montiel, F. (2012). Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Current Molecular Medicine*, 12 (5), 574–591. <https://doi.org/10.2174/156652412800619950>
294. Pagliacci, M. C., Spinozzi, F., Migliorati, G., Fumi, G., Smacchia, M., Grignani, F., Riccardi, C., & Nicoletti, I. (1993). Genistein inhibits tumour cell growth in vitro but enhances mitochondrial reduction of tetrazolium salts: A further pitfall in the use of the MTT assay for evaluating cell growth and survival. *European Journal of Cancer*, 29 (11), 1573–1577. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(93\)90297-S](https://doi.org/10.1016/0959-8049(93)90297-S)
295. Palumbo, R., & Bianchi, M. E. (2004). High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment. *Biochemical Pharmacology*, 68 (6), 1165–1170. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.03.048>
296. Pan, D., Rogers, S., Misra, S., Vulugundam, G., Gazdzinski, L., Tsui, A., Mistry, N., Said, A., Spinella, P., Hare, G., Lanza, G., & Doctor, A. (2016). Erythromer (EM), a nanoscale bio-synthetic artificial red cell: proof of concept and *in vivo* efficacy results. *Blood*, 128 (22), 1027. <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.1027.1027>
297. Pandav, R. S., Chandra, V., Dodge, H. H., DeKosky, S. T., & Ganguli, M. (2004). Hemoglobin levels and Alzheimer disease: An epidemiologic study in India. *American Journal of Geriatric Psychiatry*, 12 (5), 523–526. <https://doi.org/10.1097/00019442-200409000-00011>
298. Panja, C., Setty, R. K. S., Vaidyanathan, G., & Ghosh, S. (2016). Label-free proteomic analysis of flavohemoglobin deleted strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Proteomics*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8302423>
299. Papadimitriou, N., Thorfve, A., Brantsing, C., Junevik, K., Baranto, A., & Henriksson, H. B. (2014). Cell viability and chondrogenic differentiation capability of human mesenchymal stem cells after iron labeling with iron sucrose. *Stem Cells and Development*, 23 (21), 2568–2580. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0153>
300. Paraskevas F. T (2009). T Lymphocytes and Natural Killer Cells. In Greer, J. P., Foerster, J., Rodgers, G. M., Paraskevas, F., Glader, B., Arber, D. A., Means, R. T. Jr. (Eds.), *Wintrobe's clinical hematology* (12th ed., pp. 358–401). Lippincott Williams & Wilkins.
301. Parish, C. A., Jiang, H., Tokiwa, Y., Berova, N., Nakanishi, K., McCabe, D., Zuckerman, W., Xia, M. M., & Gabay, J. E. (2001). Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9 (2), 377–382. [https://doi.org/10.1016/s0968-0896\(00\)00263-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(00)00263-7)
302. Parish, C. R., & Warren, H. S. (2001). Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. *Current Protocols in Immunology*, 1–10. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0409s49>
303. Parolini, O., Alviano, F., Bagnara, G. P., Bilic, G., Bühring, H.-J., Evangelista, M., Hennerbichler, S., Liu, B., Magatti, M., Mao, N., Miki, T., Marongiu, F., Nakajima, H., Nikaido,

- T., Portmann-Lanz, C. B., Sankar, V., Soncini, M., Stadler, G., Surbek, D., Takahashi, T.A., Redl, H., Sakuragawa, N., Wolbank, S., Zeisberger, S., Zisch, A., & Strom, S. C. (2008). Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. *Stem Cells*, 26 (2), 300–311. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0594>
304. Penders, J., & Delanghe, J. R. (2004). Alpha 1-microglobulin: Clinical laboratory aspects and applications. *Clinica Chimica Acta*, 346 (2), 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.03.037>
305. Pereira, R. F., Halford, K. W., O'Hara, M. D., Leeper, D. B., Sokolov, B. P., Pollard, M. D., Bagasra, O., & Prockop, D. J. (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (11), 4857–4861. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.11.4857>
306. Perutz, M., Rossmann, M., Cullis, A., Muirhead, H., Will, G., & North, A. (1960). Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*, 185, 416–422
307. Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S., & Goff, J. P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 284 (5417), 1168–1170. <https://doi.org/10.1126/science.284.5417.1168>
308. Pijnappels, D. A., Schaliij, M. J., Ramkisoensing, A. A., Van Tuyn, J., De Vries, A. A. F., Van Der Laarse, A., Ypey, D. L., & Atsma, D. E. (2008). Forced alignment of mesenchymal stem cells undergoing cardiomyogenic differentiation affects functional integration with cardiomyocyte cultures. *Circulation Research*, 103 (2), 167–176. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.176131>
309. Pimenta, D. C., Lebrun, I. (2007). Cryptides: Buried secrets in proteins. *Peptides* 28 (12), 2403–2410. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.10.005>
310. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284 (5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
311. Platt, I. D., & El-Sohemy, A. (2009). Regulation of osteoblast and adipocyte differentiation from human mesenchymal stem cells by conjugated linoleic acid. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20 (12), 956–964. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.08.008>
312. Ponka, P., Sheftel, A. D., English, A. M., Scott Bohle, D., & Garcia-Santos, D. (2017). Do mammalian cells really need to export and import heme? *Trends in Biochemical Sciences*, 42(5), 395–406. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.006>
313. Posta, N., Csósz, É., Oros, M., Pethő, D., Potor, L., Kalló, G., Hendrik, Z., Sikura, K. É., Méhes, G., Tóth, C., Posta, J., Balla, G., & Balla, J. (2020). Hemoglobin oxidation generates globin-derived peptides in atherosclerotic lesions and intraventricular hemorrhage of the brain, provoking endothelial dysfunction. *Laboratory Investigation*. <https://doi.org/10.1038/s41374-020-0403-x>
314. 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. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315626>
315. Przybelski, R. J., Daily, E. K., Kisicki, J. C., Mattia-Goldberg, C., Bounds, M. J., Colburn, W. A. (1996). Phase I study of the safety and pharmacologic effects of diaspirin cross-linked hemoglobin solution. *Critical Care Medicine*, 24 (12), 1993–2000. <https://doi.org/10.1097/00003246-199612000-00011>
316. Puri, N., Sodhi, K., Haarstad, M., Kim, D. H., Bohinc, S., Foglio, E., Favero, G., & Abraham, N. G. (2012). Heme induced oxidative stress attenuates sirtuin1 and enhances adipogenesis in mesenchymal stem cells and mouse pre-adipocytes. *Journal of Cellular*

- Biochemistry*, 113 (6), 1926–1935. <https://doi.org/10.1002/jcb.24061>
317. Quaye, I. K. (2015). Extracellular hemoglobin: The case of a friend turned foe. *Frontiers in Physiology*, 6 (96), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00096>
318. Rankin, E. B., Wu, C., Khatri, R., Wilson, T. L., Andersen, R., Araldi, E., Rankin, A. L., Yuan, J., Kuo, C. J., Schipani, E., & Giaccia, A. J. (2012). The HIF signaling pathway in osteoblasts directly modulates erythropoiesis through the production of EPO. *Cell*, 149 (1), 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.051>
319. Reed, B. C., & Lane, M. D. (1980). Insulin receptor synthesis and turnover in differentiating 3T3-L1 preadipocytes (insulin receptor half-life/receptor density shift/isopycnic banding on CsCl gradients/3T3-L1 adipocytes). *Biochemistry*, 77 (1), 285–289. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.1.285>
320. Reeder, B. J., Sharpe, M.A., Kay, A. D., Kerr, M., Moore, K., & Wilson, M. T. (2002). Toxicity of myoglobin and haemoglobin: oxidative stress in patients with rhabdomyolysis and subarachnoid haemorrhage. *Biochemical Society Transactions*, 30 (4), 745–748. <https://doi.org/10.1042/BST0300745>
321. Reeder, B. J. (2010). The redox activity of hemoglobins: from physiologic functions to pathologic mechanisms. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13 (7), 1087–1123. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2974>
322. Regan, R. F., Guo, Y., & Kumar, N. (2000). Heme oxygenase-1 induction protects murine cortical astrocytes from hemoglobin toxicity. *Neuroscience Letters*, 282 (1–2), 1–4. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)00817-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)00817-X)
323. Reiter, C. D., Wang, X., Tanus-Santos, J. E., Hogg, N., Cannon, R. O. 3rd., Schechter, A. N., & Gladwin, M. T. (2002). Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nature Medicine*, 8 (12), 1383–1389. <https://doi.org/10.1038/nm1202-799>
324. Revin, V. V., Gromova, N. V., Revina, E. S., Gruntyushkin, I. P., Tychkov, A. Y., Samonova, A. Y., Kukina, A. N., Moskovkin, A. A., Bourdon, J. C., & Zhelev, N. (2018). The effect of experimental hyperoxia on erythrocytes' oxygen-transport function. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 32 (5), 1236–1250. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1414633>
325. Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, 1 (3), 1458–1461. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>
326. Richter, F., Meurers, B. H., Zhu, C., Medvedeva, V. P., & Chesselet, M. F. (2009). Neurons express hemoglobin α - and β -chains in rat and human brains. *Journal of Comparative Neurology*, 515 (5), 538–547. <https://doi.org/10.1002/cne.22062>
327. Riera-Heredia, N., Lutfi, E., Gutiérrez, J., Navarro, I., & Capilla, E. (2019). Fatty acids from fish or vegetable oils promote the adipogenic fate of mesenchymal stem cells derived from gilthead sea bream bone potentially through different pathways. *PLoS ONE*, 14 (4), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215926>
328. Rifkind, J. M., Mohanty, J. G., & Nagababu, E. (2015). The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. *Frontiers in Physiology*, 6, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00500>
329. Robins, J. C., Akeno, N., Mukherjee, A., Dalal, R. R., Aronow, B. J., Koopman, P., & Clemens, T. L. (2005). Hypoxia induces chondrocyte-specific gene expression in mesenchymal cells in association with transcriptional activation of Sox9. *Bone*, 37 (3), 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.04.040>
330. Roche, C. J., Cassera, M. B., Dantsker, D., Hirsch, R. E., & Friedman, J. M. (2013). Generating S-nitrosothiols from hemoglobin: Mechanisms, conformational dependence, and physiological relevance. *Journal of Biological Chemistry*, 288 (31), 22408–22425. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.482679>
331. Roeder, E., Henrionnet, C., Goebel, J. C., Gambier, N., Beuf, O., Grenier, D., Chen, B., Vuissoz, P. A., Gillet, P., & Pinzano, A. (2014). Dose-response of superparamagnetic iron oxide labeling on mesenchymal stem cells chondrogenic differentiation: A multi-scale in vitro study. *PLoS ONE*, 9 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098451>

332. Rogers, D. M., & Crookston, K. P. (2006). The approach to the patient who refuses blood transfusion. *Transfusion*, 46 (9), 1471–1477. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2006.00947.x>
333. Roth, A. D., Elmer, J., Harris, D. R., Huntley, J., Palmer, A. F., Nelson, T., Johnson, J. K., Xue, R., Lannutti, J. J., & Viapiano, M. S. (2014). Hemoglobin regulates the migration of glioma cells along poly(ϵ -caprolactone)-aligned nanofibers. *Biotechnology Progress*, 30 (5), 1214–1220. <https://doi.org/10.1002/btpr.1950>
334. Roth, R. (1994). Hemoglobin enhances the production of tissue factor by endothelial cells in response to bacterial endotoxin. *Blood*, 83 (10), 2860–2865. <https://doi.org/10.1182/blood.v83.10.2860.2860>
335. Rother, R. P., Bell, L., & Hillmen, P. (2015). The clinical sequelae of intravascular hemolysis a novel mechanism of human disease. *Clinical Review*, 293 (13), 1653–1662. <https://doi.org/10.1001/jama.293.13.1653>
336. Roufousse, C. A., Direkze, N. C., Otto, W. R., & Wright, N. A. (2004). Circulating mesenchymal stem cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36 (4), 585–597. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.10.007>
337. Rousselot, M., Delpy, E., La Rochelle, C. D., Lagente, V., Pirow, R., Rees, J. F., Hagege, A., Le Guen, D., Hourdez, S., & Zal, F. (2006). Arenicola marina extracellular hemoglobin: A new promising blood substitute. *Biotechnology Journal*, 1 (3), 333–345. <https://doi.org/10.1002/biot.200500049>
338. Ruiz-Ojeda, F. J., Rupérez, A. I., Gomez-Llorente, C., Gil, A., & Aguilera, C. M. (2016). Cell models and their application for studying adipogenic differentiation in relation to obesity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (7), 1040. <https://doi.org/doi:10.3390/ijms17071040>
339. Ryter, S. W., & Choi, A. M. (2013). Carbon monoxide: present and future indications for a medical gas. *Korean Journal of Internal Medicine*. 28, 123–140. <https://doi.org/10.3904/kjim.2013.28.2.123>
340. Sakai, H., Masada, Y., Takeoka, S., & Tsuchida, E. (2002). Characteristics of bovine hemoglobin as a potential source of hemoglobin-vesicles for an artificial oxygen carrier. *Journal of Biochemistry*, 131 (4), 611–617. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003141>
341. Sakai, H., Sou, K., Horinouchi, H., Kobayashi, K., & Tsuchida, E. (2009). Review of hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers. *Artificial Organs*, 33 (2), 139–145. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2008.00698.x>
342. Sako, T., Takeda, S., Shubuya, M., Koyama, H., Uchino, T., & Motoyoshi, S. (1989). Seasonal changes in the phospholipids and fatty acid composition of the bovine erythrocyte membrane. *CJapanese Journal of Veterinary Science (Japan)*, 51 (6), 1243–1245. <https://doi.org/10.1292/jvms1939.51.1243>
343. Sarjeant, K., & Stephens, J. M. (2012). Adipogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4 (9), a008417. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a008417>
344. Scanu, M., Mancuso, L., & Cao, G. (2011). Evaluation of the use of human mesenchymal stem cells for acute toxicity tests. *Toxicology in Vitro*, 25 (8), 1989–1995. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.07.006>
345. Schaer, D. J., Buehler, P. W., Alayash, A. I., Belcher, J. D., & Vercellotti, G. M. (2013). Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*, 121 (8), 1276–1285. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-451229.1276>
346. Schafer, A., Wiesmann, F., Neubauer, S., Eigenthaler, M., Bauersachs, J., Channon, K.M. (2004). Rapid regulation of platelet activation in vivo by nitric oxide. *Circulation*, 109 (15), 1819–22. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000126837.88743.DD>
347. Schechter, A.N. (2008). Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*, 112, 3927–3938. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-078188>
348. Schipani, E., Ryan, H. E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M., & Johnson, R. S. (2001). Hypoxia in cartilage: HIF-1 α is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes*

- and Development*, 15 (21), 2865–2876. <https://doi.org/10.1101/gad.934301>
349. Schonberger, S. J., Edgar, P. F., Kydd, R., Faull, R. L. M., & Cooper, G. J. S. (2001). Proteomic analysis of the brain in Alzheimer's disease: Molecular phenotype of a complex disease process. *Proteomics*, 1 (12), 1519–1528. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200111\)1:12<1519::AID-PROT1519>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200111)1:12<1519::AID-PROT1519>3.0.CO;2-L)
350. Schwartz, M., Kipnis, J., Rivest, S., & Prat, A. (2013). How do immune cells support and shape the brain in health, disease, and aging? *Journal of Neuroscience*, 33, 17587–17596. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3241-13.2013>
351. Schwartz, R. E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W., & Verfaillie, C. M. (2002). Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 109 (10), 1291–1302. <https://doi.org/10.1172/JCI200215182>
352. Scott, J. A. G., Berkley, J. A., Mwangi, I., Ochola, L., Uyoga, S., MacHaria, A., Ndila, C., Lowe, B. S., Mwarumba, S., Bauni, E., Marsh, K., & Williams, T. N. (2011). Relation between falciparum malaria and bacteraemia in Kenyan children: A population-based, case-control study and a longitudinal study. *The Lancet*, 378 (9799), 1316–1323. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60888-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60888-X)
353. Semenza, G. L. (2009). Regulation of vascularization by hypoxia-inducible factor 1. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1177, 2–8. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05032.x>
354. Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahimi, J., Young, M., Robey, P. G., Wang, C. Y., & Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364 (9429), 149–155. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16627-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16627-0)
355. Šerban, N.M. (2007). Osnovi histologije: tkiva. Biološki fakultet Univerzitet u Beogradu.
356. Setty, B. N. Y., Betal, S. G., Zhang, J., & Stuart, M. J. (2008). Heme induces endothelial tissue factor expression: Potential role in hemostatic activation in patients with hemolytic anemia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6 (12), 2202–2209. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03177.x>
357. Shaanan, B. (1983). Structure of human oxyhaemoglobin at 2.1 resolution. *Journal of Molecular Biology*, 171 (1), 31–59. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80313-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80313-1)
358. Sharma, J., Boyd, T., Alvarado, C., Gunn, E., Adams, J., Ness, T., Dunwoody, R., Lamb, J., House, B., Knapp, J., & Garner, R. (2019). Reporter cell assessment of TLR4-induced NF-κB responses to cell-free hemoglobin and the influence of biliverdin. *Biomedicine*, 7 (2), 41. <https://doi.org/10.3390/biomedicine7020041>
359. Shaver, C. M., Upchurch, C. P., Janz, D. R., Grove, B. S., Putz, N. D., Wickersham, N. E., Dikalov, S. I., Ware, L. B., & Bastarache, J. A. (2016). Cell-free hemoglobin: A novel mediator of acute lung injury. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 310 (6), L532–L541. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00155.2015>
360. Sheftel, A. D., Mason, A. B., & Ponka, P. (2012). The long history of iron in the Universe and in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1820 (3), 161–187. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.08.002>
361. Sen Gupta, A. (2019). Hemoglobin-based oxygen carriers: current state-of-the-art and novel molecules. *Shock*, 52 (1), 70–83. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001009>
362. Sheng, Y., Yuan, Y., Liu, C., Tao, X., Shan, X., & Xu, F. (2009). *In vitro* macrophage uptake and *in vivo* biodistribution of PLA-PEG nanoparticles loaded with hemoglobin as blood substitutes: Effect of PEG content. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20 (9), 1881–1891. <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3746-9>
363. Sherif, S. M., & Amal, E. I. (2010). Analysis of retinal b-wave by fourier transformation due to ammonia exposure and the role of blood erythrocytes. *Romanian Journal of Biophysics*, 20 (3), 269–281. <https://www.rjb.ro/articles/286/art08Sherif.pdf>
364. Shi, M., Liu, Z. W., & Wang, F. S. (2011). Immunomodulatory properties and therapeutic

- application of mesenchymal stem cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 164 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04327.x>
365. Shinoda, K., Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Hayashizaki, K., Zehentmeier, S., Hosokawa, H., Iwamura, C., Koseki, H., Tumes, D. J., Radbruch, A., & Nakayama, T. (2012). Type II membrane protein CD69 regulates the formation of resting T-helper memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (19), 7409–7414. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118539109>
366. Shiva, S., Rassaf, T., Patel, R. P., & Gladwin, M. T. (2011). The detection of the nitrite reductase and NO-generating properties of haemoglobin by mitochondrial inhibition. *Cardiovascular Research*, 89 (3), 566–573. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq327>
367. Shomento, S. H., Wan, C., Cao, X., Faugere, M. C., Bouxsein, M. L., Clemens, T. L., & Riddle, R. C. (2010). Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha exert both distinct and overlapping functions in long bone development. *Journal of Cellular Biochemistry*, 109 (1), 196–204. <https://doi.org/10.1002/jcb.22396>
368. Sibov, T. T., Severino, P., Marti, L. C., Pavon, L. F., Oliveira, D. M., Tobo, P. R., Campos, A. H., Paes, A. T., Amaro, E., Gamarra, L. F., & Moreira-Filho, C. A. (2012). Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: Parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation. *Cytotechnology*, 64 (5), 511–521. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9428-3>
369. Sim, H. J., Kim, J. H., Kook, S. H., Lee, S. Y., & Lee, J. C. (2016). Glucose oxidase facilitates osteogenic differentiation and mineralization of embryonic stem cells through the activation of Nrf2 and ERK signal transduction pathways. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 419 (1–2), 157–163. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2760-8>
370. Simoni, J., Simoni, G., Moeller, J. F., Feola, M., & Wesson, D. E. (2014). Artificial oxygen carrier with pharmacologic actions of adenosine-5'-triphosphate, adenosine, and reduced glutathione formulated to treat an array of medical conditions. *Artificial Organs*, 38 (8), 684–690. <https://doi.org/10.1111/aor.12337>
371. Singh, D., Nayak, V., & Kumar, A. (2010). Proliferation of myoblast skeletal cells on three-dimensional supermacroporous cryogels. *International Journal of Biological Sciences*, 6 (4), 371–381. <https://doi.org/10.7150/ijbs.6.371>
372. Skurk, T., Berti-Huber, C., Herder, C., & Hauner, H. (2007). Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92, 1023–1033. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1055>
373. Smeds, E., Romantsik, O., Jungner, Å., Erlandsson, L., & Gram, M. (2017). Pathophysiology of extracellular haemoglobin: use of animal models to translate molecular mechanisms into clinical significance. *ISBT Science Series*, 12 (1), 134–141. <https://doi.org/10.1111/voxs.12328>
374. Smith, A., & McCulloh, R. J. (2015). Hemopexin and haptoglobin: Allies against heme toxicity from hemoglobin not contenders. *Frontiers in Physiology*, 6, 187. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00187>
375. Soleymaninejadian, E., Pramanik, K., & Samadian, E. (2012). Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: Cytokines and factors. *American Journal of Reproductive Immunology*, 67 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01069.x>
376. Son, B.-R., Marquez-Curtis, L. A., Kucia, M., Wysoczynski, M., Turner, A. R., Ratajczak, J., Ratajczak, M. Z., & Janowska-Wieczorek, A. (2006). Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells*, 24 (5), 1254–1264. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0271>
377. Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R. S., Wang, S., Shi, S., & Huang, G. T. J. (2008). Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of Endodontics*, 34 (2), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.11.021>
378. Soto Méndez, A., & Caballero Pérez, L. (2011). Adición de hierro hemo, proveniente de

- hemoglobina bovina a un chocolate de consumo directo. *Bistua Revista De La Facultad De Ciencias Basicas*, 9 (1), 21–31. <https://doi.org/10.24054/01204211.v1.n1.2011.25>
379. Souto, J. C., Vila, L., & Bru, A. (2011). Polymorphonuclear neutrophils and cancer: intense and sustained neutrophilia as a treatment against solid tumors. *Medicinal Research Reviews*, 31 (3), 311–363. <https://doi.org/10.1002/med.20185>
380. Stojanović, R., Ilić, V., Manojlović, V., Bugarski, D., Dević, M., & Bugarski, B. (2012). Isolation of hemoglobin from bovine erythrocytes by controlled hemolysis in the membrane bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166 (6), 1491–1506. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9543-9>
381. Subramanian, K., Du, R., Tan, N. S., Ho, B., & Ding, J. L. (2013). CD163 and IgG codefend against cytotoxic hemoglobin via autocrine and paracrine mechanisms. *The Journal of Immunology*, 190 (10), 5267–5278. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202648>
382. Subramanian, K., Winarsih, I., Keerthani, C., Ho, B., & Ding, J. L. (2014). Preferential silent survival of intracellular bacteria in hemoglobin-primed macrophages. *Journal of Innate Immunity*, 6(4), 515–529. <https://doi.org/10.1159/000358236>
383. Sugawara, Y., Hayashi, Y., Shigemasa, Y., Abe, Y., Ohgushi, I., Ueno, E., et al. (2010). Molecular biosensing mechanisms in the spleen for the removal of aged and damaged red cells from the blood circulation, *Sensors*, 10, 7099–7121. <https://doi.org/10.3390/s100807099>
384. Sun, Q., & Luo, Y. (2011). Porcine hemoglobin hydrolysate prepared with pepsin: Antioxidant activities and their mechanisms. *International Journal of Food Properties*, 14 (4), 840–853. <https://doi.org/10.1080/10942910903453405>
385. Sverrisson, K., Axelsson, J., Rippe, A., Gram, M., Åkerström, B., Hansson, S. R., & Rippe, B. (2014). Extracellular fetal hemoglobin induces increases in glomerular permeability: Inhibition with α 1-microglobulin and tempol. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 306 (4), 442–448. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00502.2013>
386. Taghizadeh, R. R., Cetrulo, K. J., & Cetrulo, C. L. (2011). Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications. *Placenta*, 32 (4), S311–S315. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.06.010>
387. Tanaka, H., Espinoza, J., Fujiwara, R., Rai, S., Morita, Y., Ashida, T., Kanakura, Y., & Matsumura, I. (2019). Excessive reactive iron impairs hematopoiesis by affecting both immature hematopoietic cells and stromal cells. *Cells*, 8 (3), 226. <https://doi.org/10.3390/cells8030226>
388. Tang, N., Chen, L. Q., & Zhuang, H. (2014). Effects of heme iron enriched peptide on iron deficiency anemia in rats. *Food and Function*, 5 (2), 390–399. <https://doi.org/10.1039/c3fo60292c>
389. Tang, N., Zhu, Y., & Zhuang, H. (2015). Antioxidant and anti-anemia activity of heme iron obtained from bovine hemoglobin. *Food Science and Biotechnology*, 24 (2), 635–642. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0083-2>
390. Tanis, R. J., Tashian, R. E., & Yu, Y. S. (1970). Properties of carbonic anhydrase isozymes isolated from porcine erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 245 (22), 6003–6009. PMID: 4991848
391. Taylor, G. A., & Weinberg, J. B. Mononuclear Phagocytes. In Greer, J. P., Foerster, J., Rodgers, G. M., Paraskevas, F., Glader, B., Arber, D. A., Means, R. T. Jr. (Eds.), *Wintrobe's clinical hematology* (12th ed., pp. 249–280). Lippincott Williams & Wilkins.
392. Telen, M. J. The mature erythrocyte. In Greer, J. P., Foerster, J., Rodgers, G. M., Paraskevas, F., Glader, B., Arber, D. A., Means, R. T. Jr. (Eds.), *Wintrobe's clinical hematology* (12th ed., pp. 126–155). Lippincott Williams & Wilkins.
393. Tenhunen, R., Marver, H. S., & Schmid, R. (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 61 (2), 748–755. <https://doi.org/10.1073/pnas.61.2.748>
394. Thoms, B. L., Dudek, K. A., Lafont, J. E., & Murphy, C. L. (2013). Hypoxia promotes the production and inhibits the destruction of human articular cartilage, *Arthritis & Rheumatology*, 65 (5), 1302–1312. <https://doi.org/10.1002/art.37867>
395. Thorsteinsson, M. V., Bevan, D. R., Ebel, R. E., Weber, R. E., & Potts, M. (1996).

- Spectroscopical and functional characterization of the hemoglobin of *Nostoc commune* UTEX 584 (Cyanobacteria). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1292 (1), 133–139. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(95\)00178-6](https://doi.org/10.1016/0167-4838(95)00178-6)
396. Tiruvannamalai Annamalai, R., Mertz, D., Daley, E. L., & Stagemann, J. P. (2016). Collagen type II enhances chondrogenic differentiation in agarose-based modular microtissues. *Cytotherapy*, 18 (2), 263–277. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.10.015>
397. Toldrà, M., Parés, D., Saguier, E., & Carretero, C. (2011). Hemoglobin hydrolysates from porcine blood obtained through enzymatic hydrolysis assisted by high hydrostatic pressure processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12 (4), 435–442. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.05.002>
398. Toma, C., Pittenger, M. F., Cahill, K. S., Byrne, B. J., & Kessler, P. D. (2002). Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 105 (1), 93–98. <https://doi.org/10.1161/hc0102.101442>
399. Tomita, D., Kimura, T., Hosaka, H., Daijima, Y., Haruki, R., Ludwig, K., Böttcher, C., & Komatsu, T. (2013). Covalent core-shell architecture of hemoglobin and human serum albumin as an artificial O₂ carrier. *Biomacromolecules*, 14 (6), 1816–1825. <https://doi.org/10.1021/bm400204y>
400. Trewitt, P. M., Boyer, D. R., & Bergtrom, G. (1986). Characterization of maternal haemoglobins in the eggs and embryos of *Chironomus thummi*. *Journal of Insect Physiology*, 32 (11). [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(86\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0022-1910(86)90145-9)
401. Trivanović, D., Kocić, J., Mojsilović, S., Krstić, A., Ilić, V., Okić Djordjević, I., Francisco Santibanez, J., Jovčić, G., Terzić, M., & Bugarski, D. (2013a). Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*, 141 (3–4), 178–186. <https://doi.org/10.2298/SARH1304178T>
402. Trivanović, D., Mojsilović, S., Ilić, V., Krstić, J., Jauković, A., Okić-Đorđević, I., Santibanez, J. F., Jovčić, G., & Bugarski, D. (2013b). Immunomodulatory capacity of human mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue, dental pulp, peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. *Central-European Journal of Immunology*, 38 (4), 421–429. <https://doi.org/10.5114/ceji.2013.39756>
403. Trivanović, D., Nikolić, S., Krstić, J., Jauković, A., Mojsilović, S., Ilić, V., Okić-Djordjević, I., Santibanez, J. F., Jovčić, G., & Bugarski, D. (2014). Characteristics of human adipose mesenchymal stem cells isolated from healthy and cancer affected people and their interactions with human breast cancer cell line MCF-7 *in vitro*. *Cell Biology International*, 38 (2), 254–265. <https://doi.org/10.1002/cbin.10198>
404. Tropel, P., Platet, N., Platel, J.-C., Noël, D., Albrieux, M., Benabid, A.-L., & Berger, F. (2006). Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24 (12), 2868–2876. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0636>
405. Uezumi, A., Ito, T., Morikawa, D., Shimizu, N., Yoneda, T., Segawa, M., Yamaguchi, M., Ogawa, R., Matev, M.M., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Tsujikawa, K., Tsuchida, K., Yamamoto, H., & Fukada, S. (2011). Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *Journal of Cell Science*, 124 (Pt 21), 3654–3664. <https://doi.org/10.1242/jcs.086629>
406. Uysal, O., Sevimli, T., Sevimli, M., Gunes, S., & Sariboyaci, A. E. (2017). Cell and tissue culture: The base of biotechnology. In Barh, D., & Azevedo, V. *Omics Technologies and Bioengineering: Towards Improving Quality of Life* (1st ed., pp. 391-429). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00017-8>
407. Valenti, M. T., Carbonare, L. D., Donatelli, L., Bertoldo, F., Zanatta, M., & Lo Cascio, V. (2008). Gene expression analysis in osteoblastic differentiation from peripheral blood mesenchymal stem cells. *Bone*, 43 (6), 1084–1092. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.07.252>
408. Van den Heuvel, M. M., Tensen, C. P., van As, J. H., Van den Berg, T. K., Fluitsma, D. M., Dijkstra, C. D., Döpp, E. A., Droste, A., Van Gaalen, F. A., Sorg, C., Högger, P., & Beelen, R. H. (1999). Regulation of CD163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces

- signalling and activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 66 (5), 858-66. <https://doi.org/10.1002/jlb.66.5.858>
409. Van Deursen, J., Ruitenbeek, W., Heerschap, A., Jap, P., Ter Laak, H., & Wieringa, B. (1994). Creatine kinase (CK) in skeletal muscle energy metabolism: A study of mouse mutants with graded reduction in muscle CK expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 (19), 9091–9095. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.19.9091>
410. Vanella, L., Kim, D. H., Asprinio, D., Peterson, S. J., Barbagallo, I., Vanella, A., Godlstein, D., Ikehara, S., & Abraham, N. G. (2011). HO-1 expression increases mesenchymal stem cell-derived osteoblast but decreases adipocyte lineage. *Bone*, 46 (1), 1–7. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839>
411. Vanella, L., Sanford, C., Kim, D. H., Abraham, N. G., & Ebraheim, N. (2012). Oxidative stress and heme oxygenase-1 regulated human mesenchymal stem cells differentiation. *International Journal of Hypertension*, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/890671>
412. Vinogradov, S. N., Lugo, S. D., Mainwaring, M. G., Kapp, O. H., & Crewe, A. V. (1986). Bracelet protein: A quaternary structure proposed for the giant extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83 (21), 8034–8038. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.21.8034>
413. Vlaški, M., Krstić, A., Jovčić, G., Bugarski, D., Petakov, M., Stojanović, N., & Milenković, P. (2004). Effects of IL-17 on functional activity of peripheral blood cells. *Acta Veterinaria*, 54 (4), 249–261. <https://doi.org/10.2298/avb0404249v>
414. Wafer, R., Tandon, P., & Minchin, J. E. N. (2017). The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG) in adipogenesis: Applying knowledge from the fish aquaculture industry to biomedical research. *Frontiers in Endocrinology*, 8 (102), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00102>
415. Wakelam, M. J. (1985). The fusion of myoblasts. *The Biochemical Journal*, 228 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1042/bj2280001>
416. Wakitani, S., Saito, T., Caplan, A. I. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle & Nerve*, 18 (12), 1417–1426. [10.1002/mus.880181212](https://doi.org/10.1002/mus.880181212)
417. Wang, Q., Chen, B., Cao, M., Sun, J., Wu, H., Zhao, P., Xing, J., Yang, Y., Zhang, X., Ji, M., & Gu, N. (2016). Response of MAPK pathway to iron oxide nanoparticles in vitro treatment promotes osteogenic differentiation of hBMSCs. *Biomaterials*, 86, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.02.004>
418. Wang, X., & Hargrove, M. S. (2013). Nitric oxide in plants: The roles of ascorbate and hemoglobin. *PLoS ONE*, 8 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082611>
419. Wang, Y. L., Lin, S. P., Hsieh, P. C., Hung, S. C. (2016). Concomitant beige adipocyte differentiation upon induction of mesenchymal stem cells into brown adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478 (2), 689-695. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.008>
420. Wang, Ying, Wang, L., Yu, W., Gao, D., You, G., Li, P., Zhang, S., Zhang, J., Hu, T., Zhao, L., & Zhou, H. (2017a). A PEGylated bovine hemoglobin as a potent hemoglobin-based oxygen carrier. *Biotechnology Progress*, 33 (1), 252–260. <https://doi.org/10.1002/btpr.2380>
421. Wang, Yu, Zhang, T., Zhang, H., Yang, H., Li, Y., & Jiang, Y. (2017b). Bovine hemoglobin derived peptide asn-phe-gly-lys inhibits pancreatic cancer cells metastasis by targeting secreted Hsp90 α . *Journal of Food Science*, 82 (12), 3005–3012. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13962>
422. Weber, R. E., & Vinogradov, S. N. (2001). Nonvertebrate hemoglobins: Functions and molecular adaptations. *Physiological Reviews*, 81 (2), 569–628. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.569>
423. Wegiel, B., Hauser, C. J., & Otterbein, L. E. (2015). Heme as a danger molecule in pathogen recognition. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 651–661. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.020>

424. Weiss, A. R. R., & Dahlke, M. H. (2019). Immunomodulation by mesenchymal stem cells (mscs): mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Frontiers in Immunology*, 10, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01191>
425. Welch, W.D., Rose, D.M., Carlson, R. (1982). Reduced hemoglobin as an inhibitor of human polymorphonuclear leukocyte bacterial killing. Role of hemoglobin--oxygen tension in polymorphonuclear function. *Surgery*, 91 (1), 75-80. PMID: 7034261
426. Wells, R. M. G., Hudson, M. J., & Brittain, T. (1981). Function of the hemoglobin and the gas bubble in the backswimmer *Anisops assimilis* (Hemiptera: Notonectidae). *Journal of Comparative Physiology*, 142 (4), 515–522. <https://doi.org/10.1007/BF00688984>
427. Widmer, C. C., Pereira, C. P., Gehrig, P., Vallelian, F., Schoedon, G., Buehler, P. W., & Schaer, D. J. (2010). Hemoglobin can attenuate hydrogen peroxide–induced oxidative stress by acting as an antioxidative peroxidase. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12 (2), 185–198. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2826>
428. Winner, M., Koong, A. C., Rendon, B. E., Zundel, W., & Mitchell, R. A. (2007). Amplification of tumor hypoxic responses by macrophage migration inhibitory factor-dependent hypoxia-inducible factor stabilization. *Cancer Research*, 67 (1), 186–193. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3292>
429. Winslow, R. M. (1999). New transfusion strategies: Red cell substitutes. *Annual Review of Medicine*, 50 (1), 337–353. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.50.1.337>
430. Witkowska-Zimny, M., & Walenko, K. (2011). Stem cells from adipose tissue. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 16 (2), 236–257. <https://doi.org/10.2478/s11658-011-0005-0>
431. Wolff, D. G. (1976). The formation of carbon monoxide during peroxidation of microsomal lipids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 73, 850–857. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(76\)90199-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(76)90199-6)
432. Wu, B., Wu, Y., & Tang, W. (2019). Heme catabolic pathway in inflammation and immune disorders. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00825>
433. Xia, Y., Chen, H., Zhao, Y., Zhang, F., Li, X., Wang, L., Weir, M. D., Ma, J., Reynolds, M. A., Gu, N., & Xu, H. H. K. (2019). Novel magnetic calcium phosphate-stem cell construct with magnetic field enhances osteogenic differentiation and bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, 98, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.120>
434. Xiong, Y., Liu, Z. Z., Georgieva, R., Smuda, K., Steffen, A., Sendeski, M., Voigt, A., Patzak, A., & Bäumlner, H. (2013). Nonvasoconstrictive hemoglobin particles as oxygen carriers. *ACS Nano*, 7 (9), 7454–7461. <https://doi.org/10.1021/nn402073n>
435. Xu, J., Wang, W., Ludeman, M., Cheng, K., Hayami, T., Lotz, J. C., & Kapila, S. (2008). Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in three-dimensional alginate gels. *Tissue Engineering: Part A*, 14 (5), 667–680. <https://doi.org/10.1089/tea.2007.0272>
436. Xu, L., Liu, Z., Liao, T., & Tuo, X. (2019). Probing the interaction between levamlodipine and hemoglobin based on spectroscopic and molecular docking methods. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 5, 223:117306. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117306>
437. Yagami-Hiromasa, T., Sato, T., Kurisaki, T., Kamijo, K., Nabeshima, Y-I., Fujisawa-Sehara, A. (1995). A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature*, 377 (6550), 652–656. <https://doi.org/10.1038/377652a0>
438. Yaghooti, H., Mohammadtaghvaei, N., & Mahboobnia, K. (2019). Effects of palmitate and astaxanthin on cell viability and proinflammatory characteristics of mesenchymal stem cells. *International Immunopharmacology*, 68, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.12.063>
439. Yan, X., Liu, B., Chong, B., & Cao, S. (2013). Interaction of Cefpiramide sodium with bovine hemoglobin and effect of the coexistent metal ion on the protein-drug association. *Journal of Luminescence*, 142, 155-162. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2013.04.009>
440. Yang, Q., Bai, S.-Y., Li, L.-F., Li, S., Zhang, Y., Munir, M., & Qiu, H.-J. (2019). Human hemoglobin subunit beta functions as a pleiotropic regulator of RIG-I/MDA5-mediated antiviral innate immune responses. *Journal of Virology*, 93 (16), pii: e00718-19.

<https://doi.org/10.1128/jvi.00718-19>

441. Yang, Y., Ren, J., Sun, Y., Xue, Y., Zhang, Z., Gong, A., Wang, B., Zhong, Z., Cui, Z., Xi, Z., Yang, G. yuan, Sun, Q., & Bian, L. (2018). A connexin43/YAP axis regulates astroglial-mesenchymal transition in hemoglobin induced astrocyte activation. *Cell Death and Differentiation*, 25 (10), 1870–1884. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0137-0>
442. Yang, Y., Xi, Z., Xue, Y., Ren, J., Sun, Y., Wang, B., Zhong, Z., Yang, G. yuan, Sun, Q., & Bian, L. (2017). Hemoglobin pretreatment endows rat cortical astrocytes resistance to hemin-induced toxicity via Nrf2/HO-1 pathway. *Experimental Cell Research*, 361 (2), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.10.020>
443. Yanting, C., Yang, Q. Y., Ma, G. L., Du, M., Harrison, J. H., & Block, E. (2018). Dose- and type-dependent effects of long-chain fatty acids on adipogenesis and lipogenesis of bovine adipocytes. *Journal of Dairy Science*, 101 (2), 1601–1615. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13312>
444. Yao, Y., & Wang, Y. (2013). ATDC5: An excellent *in vitro* model cell line for skeletal development. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114 (6), 1223–1229. <https://doi.org/10.1002/jcb.2446>
445. Yazid, M. D., Ariffin, S. H. Z., Senafi, S., Razak, M. A., & Wahab, R. M. A. (2010). Determination of the differentiation capacities of murines' primary mononucleated cells and MC3T3-E1 cells. *Cancer Cell International*, 10 (42), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-10-42>
446. Yeh, L.H., & Alayash, A. I. (2004). Effects of cell-free hemoglobin on hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) and heme oxygenase (HO-1) expressions in endothelial cells subjected to hypoxia. *Antioxidants & Redox Signaling*, 6 (6), 944–953. <https://doi.org/10.1089/ars.2004.6.944>
447. Yeh, T. S., Hsu, C. C., Yang, S. C., Hsu, M. C., & Liu, J. F. (2014). *Angelica Sinensis* promotes myotube hypertrophy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-144>
448. Yin, H., Price, F., Rudnicki, M.A. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiological Reviews*, 93 (1), 23–67. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2011>
449. Yue, B. (2014). Biology of the extracellular matrix: An overview. *Journal of Glaucoma*, 23 (8 Suppl 1), S20-3. <https://doi.org/10.1097/IJG.0000000000000108>
450. Zal, F., & Rousselot, M. (2014). Extracellular Hemoglobins from Annelids, and their Potential Use in Biotechnology. In La Barre, S., & Kornprobst, J-M. (Eds.) *Outstanding Marine Molecules* (1st ed. pp. 361-376). <https://doi.org/10.1002/9783527681501.ch16>
451. Zal, F., Green, B. N., Lallier, F. H., Vinogradov, S.N., and Toulmond, A. (1997) Quaternary structure of the extracellular haemoglobin of the lugworm *Arenicola marina*. A multi-angle laser light scattering and electrospray ionisation mass spectrometry analysis. *European Journal of Biochemistry*, 243 (1-2), 85–92. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.851a.x>
452. Zebisch, K., Voigt, V., Wabitsch, M., & Brandsch, M. (2012). Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Analytical Biochemistry*, 425 (1), 88–90. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.03.005>
453. Zhang, L. F., Qi, J., Zuo, G. L., Jia, P., Shen, X., Shao, J., Kang, H., Yang, H. L., & Deng, L. F. (2014). Osteoblast-secreted factors promote proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells via VEGF/heme-oxygenase-1 pathway. *PLoS ONE*, 9 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099946>
454. Zhang, Y., Zhai, W., Zhao, M., Li, D., Chai, X., Cao, X., Meng, J., Chen, J., Xiao, X., Li, Q., Mu, J., Shen, J., & Meng, A. (2015). Effects of iron overload on the bone marrow microenvironment in mice. *PLoS ONE*, 10 (3), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120219>
455. Zhao, L. N., Mu, Y., & Chew, L. Y. (2013). Heme prevents amyloid beta peptide aggregation through hydrophobic interaction based on molecular dynamics simulation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15 (33), 14098–14106. <https://doi.org/10.1039/c3cp52354c>
456. Zheng, Y., Chen, Q., Shan, A., & Zhang, H. (2013). Optimisation of the enzymatic hydrolysis of blood cells with a neutral protease. *BioMed Research International*, 2013, 278927.

<https://doi.org/10.1155/2013/278927>

457. Zhu, H., Yan, K., Dang, X., Huang, H., Chen, E., Chen, B., Luo, C., Chang, T. M. S., Dai, P., & Chen, C. (2011). Immune safety evaluation of polymerized porcine hemoglobin (pPolyHb): A potential red blood cell substitute. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 39 (6), 398–405. <https://doi.org/10.3109/10731199.2011.631499>
458. Zhu, X., Chu, W., Fan, D., Dan, N., Chen, C., Wang, T., & Wang, F. (2007). Variations in dominant antigen determinants of glutaraldehyde polymerized human, bovine and porcine hemoglobin. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 35 (5), 518–532. <https://doi.org/10.1080/10731190701586244>
459. Zhu, Y., Liu, T., Song, K., Fan, X., Ma, X., & Cui, Z. (2008). Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochemistry and Function*, 26, 664–675. <https://doi.org/10.1002/cbf>
460. Zhuang, J., Lin, S., Dong, L., Cheng, K., & Weng, W. (2018). Magnetically actuated mechanical stimuli on Fe₃O₄/mineralized collagen coatings to enhance osteogenic differentiation of the MC3T3-E1 cells. *Acta Biomaterialia*, 71, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.009>
461. Zijlstra, W. G. (1997). Standardisation of haemoglobinometry: History and new challenges. *Comparative Haematology International*, 7 (3), 125–132. <https://doi.org/10.1007/BF02652590>
462. Zijlstra, W. G., Buursma, A., & Meeuwse-van der Roest, W. P. (1991). Absorption spectra of human fetal and adult oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. *Clinical Chemistry*, 37 (9), 1633–1638. <https://doi.org/10.1093/clinchem/37.9.1633>
463. Zivadinov, R., Ramasamy, D. P., Benedict, R. R. H., Polak, P., Magnano, C., Dwyer, M. G., Bergsland, N., Bertolino, N., Weinstock-guttman, B., Kolb, C., Hojnacki, D., Utriainen, D., Haacke, E.M., & Schweser, F. (2016). Cerebral microbleeds in multiple sclerosis evaluated on susceptibility-weighted images and quantitative susceptibility maps: a case-control study. *Radiology*, 281, 884–895, <http://doi.org/10.1148/radiol.2016160060>
464. Zuckerbraun, B. S., McCloskey, C. A., Gallo, D., Liu, F., Ifedigbo, E., Otterbein, L. E., Billiar, T.R. (2005). Carbon monoxide prevents multiple organ injury in a model of hemorrhagic shock and resuscitation. *Shock*, 23 (6), 527–532. <http://doi.org/10.1097/01.shk.0000163206.22032.a1>
465. Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., & Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7 (2), 211–228. <https://doi.org/10.1089/107632701300062859>
466. Zvaifler, N. J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C. J., Moss, J., Burger, J. A., & Maini, R. N. (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Research*, 2 (6), 477–488. <https://doi.org/10.1186/ar130>
467. Большаков А. С., Рейн Л. М., Янушкин Н. П. (1976). Гематоген - Технология мяса и мясопродуктов. Пищевая промышленность.

ПРИЛОЗИ

8. Прилози

Прилог 1

Адхезивност МНЋ и ПМЋ гајених у присуству свињског или говеђег хемоглобина испитана у тесту са пре-адхезијом. Резултати су приказани као проценат адхезивности МНЋ/ПМЋ гајених у стандардном медијуму за гајење ћелија без хемоглобина чија је вредност означена као 100%. РМА: повећање адхезивности леукоцита у одговору на стимулацију 50 ng/mL РМА; озитивна контрола теста. Вредности у табели представљају средње вредности \pm стандардна девијација четири независна експеримента.

Свињски хемоглобин, тест са пре-адхезијом								
Давалац	МНЋ				ПМЋ			
	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	РМА	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	РМА
1	99 \pm 2	116 \pm 1	118 \pm 4	634 \pm 32	107 \pm 10	175 \pm 10	189 \pm 17	126 \pm 10
2	100 \pm 6	125 \pm 3	120 \pm 6	652 \pm 52	154 \pm 19	121 \pm 20	149 \pm 32	95 \pm 1
3	93 \pm 3	95 \pm 4	113 \pm 7	209 \pm 7	96 \pm 6	101 \pm 7	95 \pm 6	92 \pm 9
4	87 \pm 4	85 \pm 4	89 \pm 5	266 \pm 14	74 \pm 6	76 \pm 6	77 \pm 5	112 \pm 4
5	181 \pm 10	179 \pm 13	147 \pm 10	281 \pm 17	94 \pm 2	101 \pm 2	97 \pm 1	1097 \pm 30
6	135 \pm 10	119 \pm 11	93 \pm 3	303 \pm 15	116 \pm 7	106 \pm 5	69 \pm 3	320 \pm 31
7	90 \pm 18	106 \pm 7	91 \pm 10	400 \pm 24	105 \pm 7	110 \pm 7	94 \pm 4	808 \pm 30
8	110 \pm 7	99 \pm 8	109 \pm 11	439 \pm 29	106 \pm 7	124 \pm 11	147 \pm 23	1291 \pm 31

Говеђи хемоглобин, тест са пре-адхезијом								
Давалац	МНЋ				ПМЋ			
	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	РМА	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	РМА
1	94 \pm 6	104 \pm 8	112 \pm 11	201 \pm 22	116 \pm 10	117 \pm 12	127 \pm 11	883 \pm 62
2	147 \pm 4	138 \pm 9	156 \pm 13	318 \pm 14	180 \pm 21	139 \pm 18	124 \pm 11	1072 \pm 19
3	150 \pm 13	139 \pm 12	127 \pm 12	219 \pm 9	86 \pm 9	63 \pm 6	78 \pm 5	159 \pm 9
4	113 \pm 9	110 \pm 5	105 \pm 5	139 \pm 11	126 \pm 9	113 \pm 4	138 \pm 12	221 \pm 3
5	92 \pm 11	91 \pm 7	103 \pm 13	370 \pm 29	77 \pm 7	82 \pm 12	64 \pm 11	138 \pm 2
6	117 \pm 12	140 \pm 12	132 \pm 17	499 \pm 24	86 \pm 5	84 \pm 3	91 \pm 3	361 \pm 30
7	94 \pm 6	104 \pm 8	112 \pm 11	201 \pm 22	116 \pm 10	117 \pm 12	127 \pm 11	883 \pm 62
8	147 \pm 4	138 \pm 9	156 \pm 13	318 \pm 14	180 \pm 21	139 \pm 18	124 \pm 11	1072 \pm 19

Прилог 2

Адхезивност МНЋ и ПМЋ гајених у присуству свињског или говеђег хемоглобина испитана у тесту без пре-адхезије. Резултати су приказани као проценат адхезивности МНЋ/ПМЋ гајених у стандардном медијуму за гајење ћелија без хемоглобина чија је вредност означена као 100%. РМА: Повећање адхезивности леукоцита у одговору на стимулацију 50 ng/mL РМА; позитивна контрола теста. Вредности у табели представљају средње вредности ± стандардна девијација четири независна експеримента.

Свињски хемоглобин, тест без пре-адхезије								
Давалац	МНЋ				ПМЋ			
	0,1 μМ	1 μМ	10 μМ	РМА	0,1 μМ	1 μМ	10 μМ	РМА
1	91 ± 1	90 ± 2	93 ± 1	305 ± 30	84 ± 1	78 ± 3	77 ± 5	158 ± 31
2	104 ± 3	93 ± 1	102 ± 4	158 ± 31	58 ± 1	70 ± 7	72 ± 14	75 ± 30
3	96 ± 4	92 ± 2	86 ± 3	218 ± 9	109 ± 8	120 ± 15	98 ± 13	601 ± 30
4	91 ± 3	93 ± 3	88 ± 3	171 ± 3	92 ± 8	94 ± 6	77 ± 4	473 ± 32
5	125 ± 10	97 ± 6	100 ± 4	439 ± 30	102 ± 4	94 ± 2	92 ± 4	1093 ± 31
6	46 ± 3	65 ± 5	60 ± 5	144 ± 9	71 ± 5	62 ± 6	59 ± 3	665 ± 30
7	68 ± 4	69 ± 5	108 ± 8	377 ± 30	94 ± 7	91 ± 3	86 ± 10	669 ± 33
8	92 ± 4	74 ± 5	104 ± 8	498 ± 32	92 ± 5	84 ± 6	88 ± 3	772 ± 2

Говеђи хемоглобин, тест без пре-адхезије								
Давалац	МНЋ				ПМЋ			
	0,1 μМ	1 μМ	10 μМ	РМА	0,1 μМ	1 μМ	10 μМ	РМА
1	68 ± 6	83 ± 2	83 ± 7	141 ± 5	104 ± 7	100 ± 4	98 ± 2	624 ± 32
2	46 ± 8	65 ± 5	60 ± 7	231 ± 33	96 ± 3	92 ± 4	96 ± 5	978 ± 30
3	42 ± 2	48 ± 2	75 ± 1	237 ± 21	65 ± 4	59 ± 6	53 ± 5	299 ± 6
4	54 ± 8	52 ± 9	55 ± 4	230 ± 25	61 ± 8	53 ± 5	44 ± 7	202 ± 12
5	114 ± 2	110 ± 7	100 ± 7	409 ± 18	166 ± 19	150 ± 10	153 ± 10	811 ± 31
6	128 ± 8	100 ± 9	93 ± 4	469 ± 10	100 ± 5	95 ± 4	102 ± 9	412 ± 1
7	68 ± 6	83 ± 2	83 ± 7	141 ± 5	104 ± 7	100 ± 4	98 ± 2	624 ± 32
8	46 ± 8	65 ± 5	60 ± 7	231 ± 33	96 ± 3	92 ± 4	96 ± 5	978 ± 30

Прилог 3

Производња ROS у МНЂ и ПМЂ култивисаним у присуству свињског или говеђег хемоглобина. Резултати су приказани као проценат производње ROS од стране МНЂ/ПМЂ гајених у стандардном медијуму за гајење ћелија без хемоглобина чија је вредност означена као 100%. PMA: Повећање адхезивности леукоцита у одговору на стимулацију 50 ng/mL PMA; позитивна контрола теста. Вредности у табели представљају средње вредности \pm стандардна девијација четири независна експеримента.


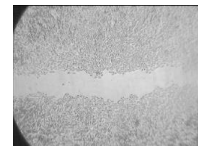
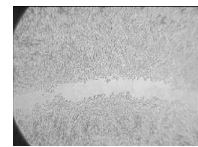
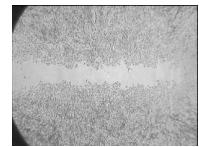
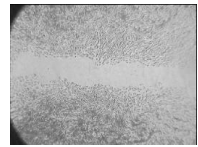
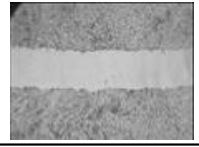
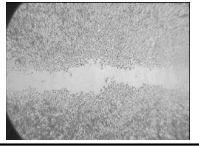
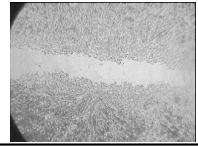
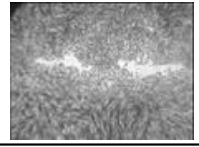
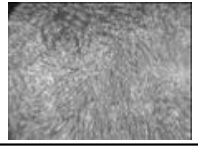
Свињски хемоглобин, производња ROS								
Давалац	МНЂ				ПМЂ			
	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	PMA	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	PMA
1	91 \pm 1	90 \pm 2	93 \pm 1	305 \pm 30	84 \pm 1	78 \pm 3	77 \pm 5	158 \pm 31
2	104 \pm 3	93 \pm 1	102 \pm 4	158 \pm 31	58 \pm 1	70 \pm 7	72 \pm 14	75 \pm 30
3	96 \pm 4	92 \pm 2	86 \pm 3	218 \pm 9	109 \pm 8	120 \pm 15	98 \pm 13	601 \pm 30
4	91 \pm 3	93 \pm 3	88 \pm 3	171 \pm 3	92 \pm 8	94 \pm 6	77 \pm 4	473 \pm 32
5	125 \pm 10	97 \pm 6	100 \pm 4	439 \pm 30	102 \pm 4	94 \pm 2	92 \pm 4	1093 \pm 31
6	46 \pm 3	65 \pm 5	60 \pm 5	144 \pm 9	71 \pm 5	62 \pm 6	59 \pm 3	665 \pm 30
7	68 \pm 4	69 \pm 5	108 \pm 8	377 \pm 30	94 \pm 7	91 \pm 3	86 \pm 10	669 \pm 33
8	92 \pm 4	74 \pm 5	104 \pm 8	498 \pm 32	92 \pm 5	84 \pm 6	88 \pm 3	772 \pm 2

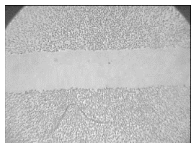
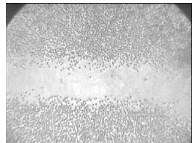
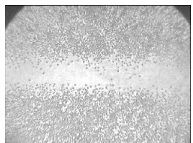
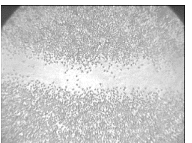
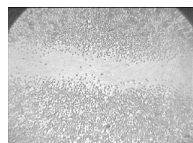
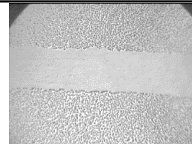
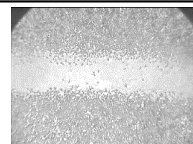
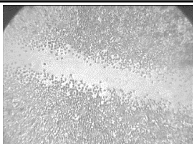
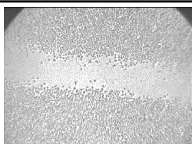
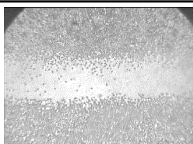
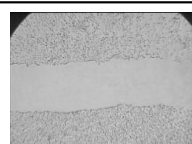
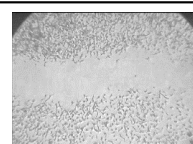
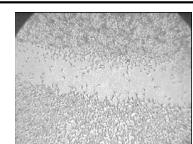
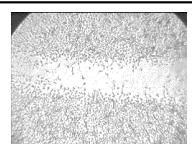
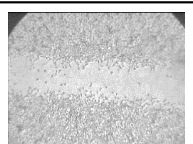
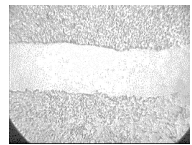
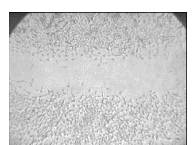
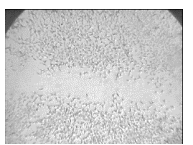
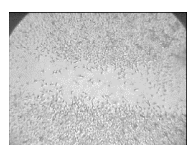
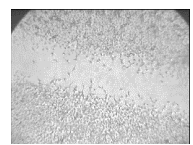
Говеђи хемоглобин, производња ROS								
Давалац	МНЂ				ПМЂ			
	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	PMA	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	PMA
1	68 \pm 6	83 \pm 2	83 \pm 7	141 \pm 5	104 \pm 7	100 \pm 4	98 \pm 2	624 \pm 32
2	46 \pm 8	65 \pm 5	60 \pm 7	231 \pm 33	96 \pm 3	92 \pm 4	96 \pm 5	978 \pm 30
3	42 \pm 2	48 \pm 2	75 \pm 1	237 \pm 21	65 \pm 4	59 \pm 6	53 \pm 5	299 \pm 6
4	54 \pm 8	52 \pm 9	55 \pm 4	230 \pm 25	61 \pm 8	53 \pm 5	44 \pm 7	202 \pm 12
5	114 \pm 2	110 \pm 7	100 \pm 7	409 \pm 18	166 \pm 19	150 \pm 10	153 \pm 10	811 \pm 31
6	128 \pm 8	100 \pm 9	93 \pm 4	469 \pm 10	100 \pm 5	95 \pm 4	102 \pm 9	412 \pm 1
7	68 \pm 6	83 \pm 2	83 \pm 7	141 \pm 5	104 \pm 7	100 \pm 4	98 \pm 2	624 \pm 32
8	46 \pm 8	65 \pm 5	60 \pm 7	231 \pm 33	96 \pm 3	92 \pm 4	96 \pm 5	978 \pm 30


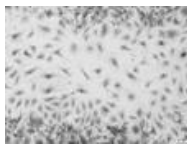
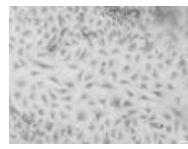
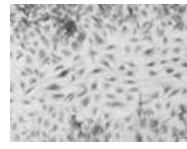
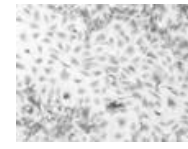
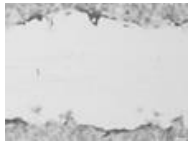
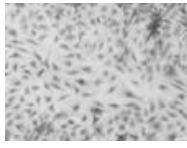
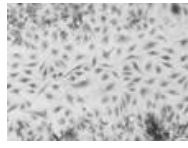
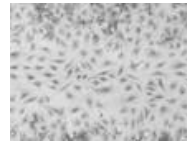
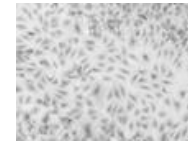

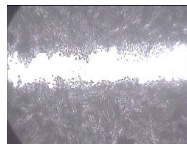




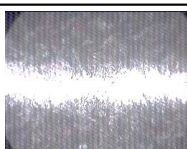
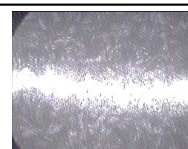


Прилог 4

Утицај свињског (А, В, Д, Е, З) и говеђег (Б, Г, Ђ, Ж, З) хемоглобина на миграторни потенцијал мезенхимских ћелија: ПК-ММЋ (А, Б), АТДС5 (В, Г), МС3Т3-Е1 (Д, Ђ), 3Т3-Л1 (Е, Ж) и С2С12 ћелија (З, И) након 24 h у култури. Резултати су приказани као проценат попуњености површине огреботине у култури одговарајућих ћелија у односу на површину огреботине у почетном тренутку (СМ t₀) којој је додељена вредност 100%. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација. (*) означава статистички значајну разлику у попуњености површине огреботине ћелија култивисаних са хемоглобином у односу на попуњеност површине огреботине у култури ћелија гајених у стандардном медијуму за култивацију ћелија (СМ). Приказане су репрезентативне микрографије огреботина у слоју ћелија.

ПК-ММЋ

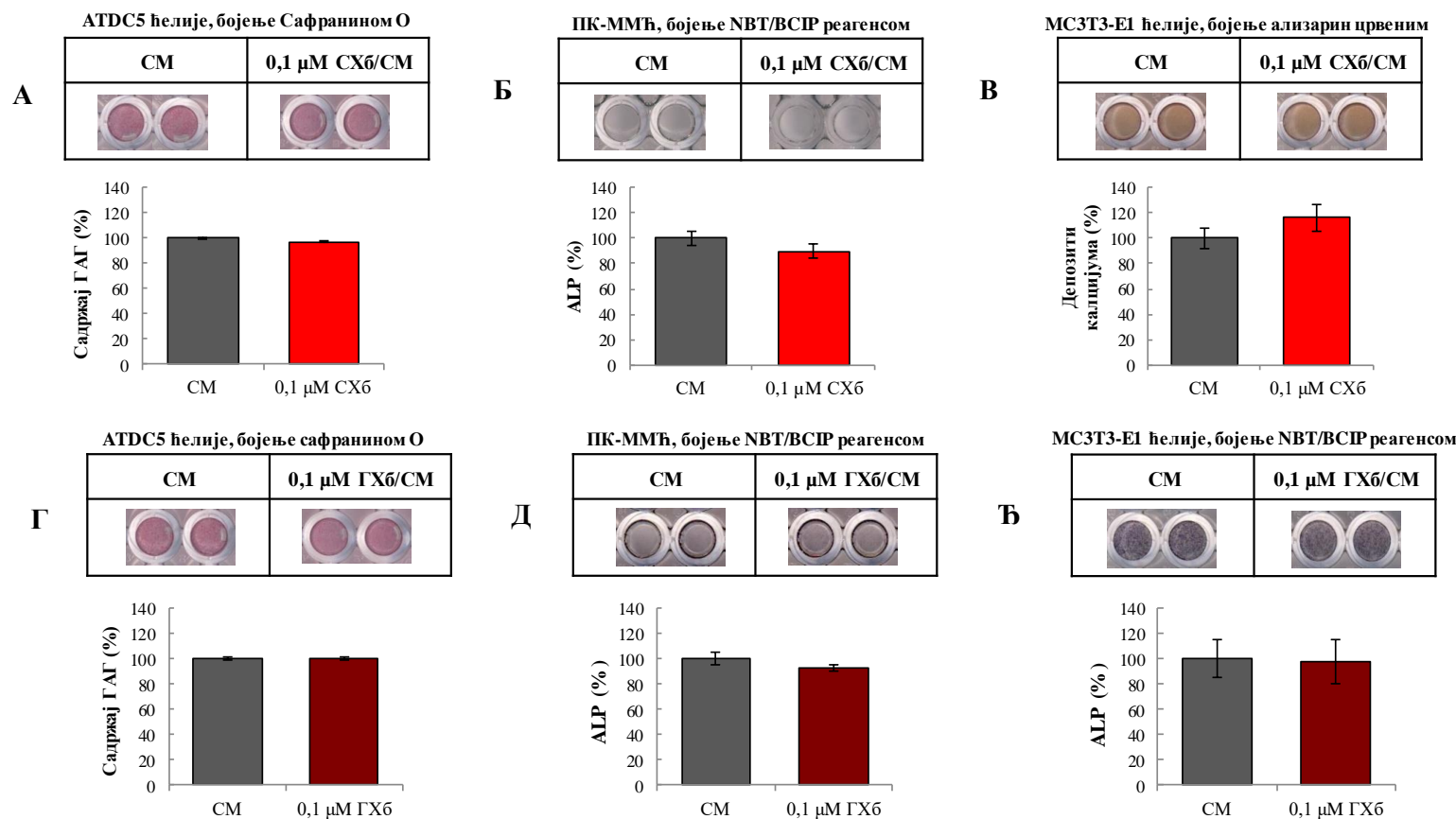
	СМ t ₀	СМ	0,1 μМ СХ6/СМ	1 μМ СХ6/СМ	10 μМ СХ6/СМ	
А	Попуњеност површине огреботине (%)	100	121 ± 3	124 ± 3	121 ± 3	119 ± 3
						
Б	Попуњеност површине огреботине (%)	100	121 ± 3	122 ± 3	127 ± 3*	129 ± 3*
						

В		CM t_0	CM	0,1 μM CX6/CM	1 μM CX6/CM	10 μM CX6/CM	ATDC5 ћелије
	Попуњеност површине огреботине (%)	100	117 \pm 3	121 \pm 2*	121 \pm 2*	119 \pm 2*	
							
Г		CM t_0	CM	0,1 μM GX6/CM	1 μM GX6/CM	10 μM GX6/CM	MS3T3-E1 ћелије
	Попуњеност површине огреботине (%)	100	117 \pm 3	122 \pm 3*	120 \pm 2*	117 \pm 3	
							
Д		CM t_0	CM	0,1 μM CX6/CM	1 μM CX6/CM	10 μM CX6/CM	MS3T3-E1 ћелије
	Попуњеност површине огреботине (%)	100	121 \pm 4	123 \pm 3	124 \pm 2*	123 \pm 3	
							
Ђ		CM t_0	CM	0,1 μM GX6/CM	1 μM GX6/CM	10 μM GX6/CM	MS3T3-E1 ћелије
	Попуњеност површине огреботине (%)	100	121 \pm 4	124 \pm 3	125 \pm 3*	121 \pm 3	
							

Е		CM t₀	CM	0,1 μM CX6/CM	1 μM CX6/CM	10 μM CX6/CM	3T3-L1 ћелије
	Попуњеност површине огреботине (%)	100	125 ± 3	126 ± 3	126 ± 3	126 ± 3	
							
Ж		CM t₀	CM	0,1 μM GX6/CM	1 μM GX6/CM	10 μM GX6/CM	3T3-L1 ћелије
	Попуњеност површине огреботине (%)	100	125 ± 3	127 ± 3	125 ± 3	127 ± 2	
							
З		CM t₀	CM	0,1 μM CX6/CM	1 μM CX6/CM	10 μM CX6/CM	C2C12 ћелије
	Попуњеност површине огреботине (%)	100	110 ± 3	111 ± 3	110 ± 3	109 ± 3	
							
И		CM t₀	CM	0,1 μM GX6/CM	1 μM GX6/CM	10 μM GX6/CM	C2C12 ћелије
	Попуњеност површине огреботине (%)	100	110 ± 3	118 ± 2*	119 ± 3*	119 ± 2*	
							

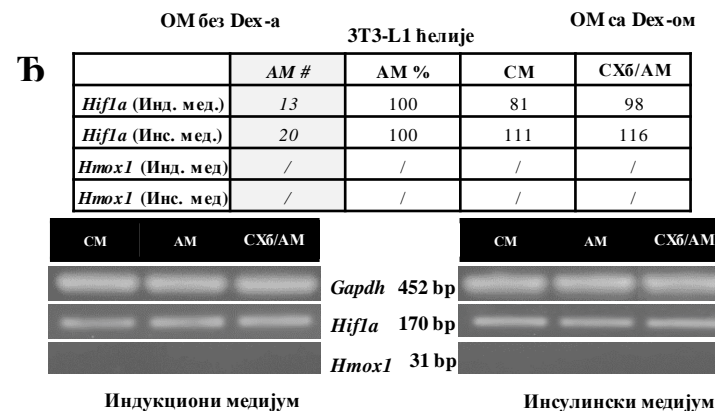
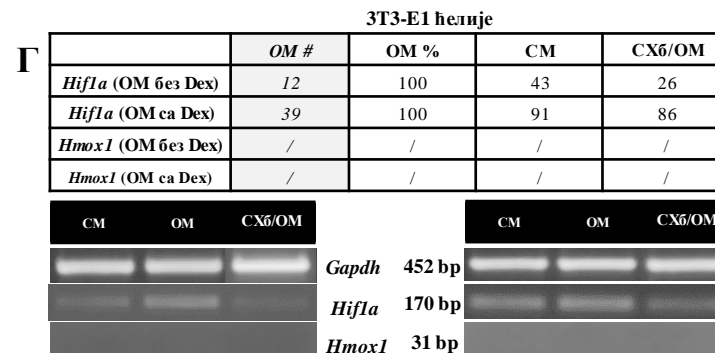
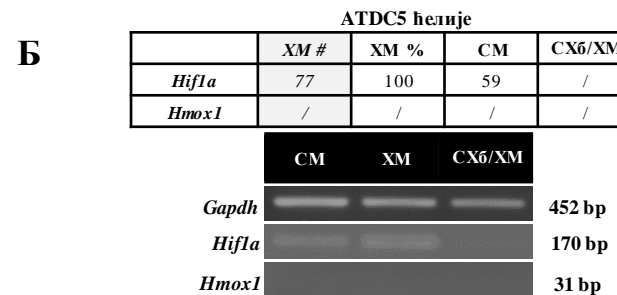
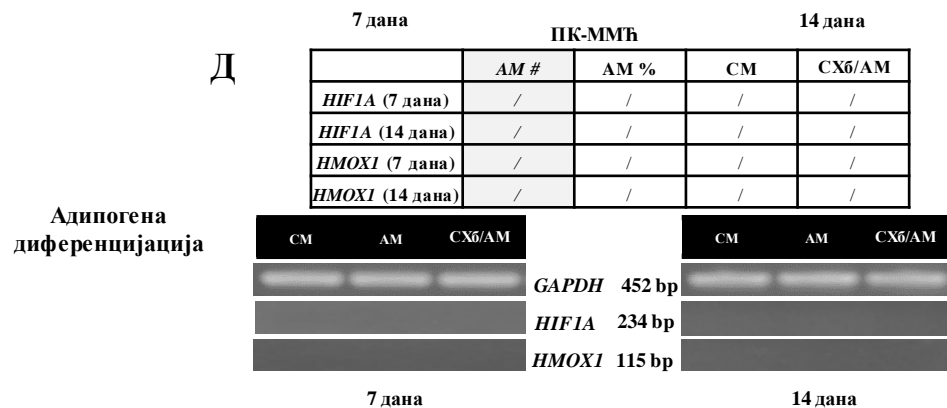
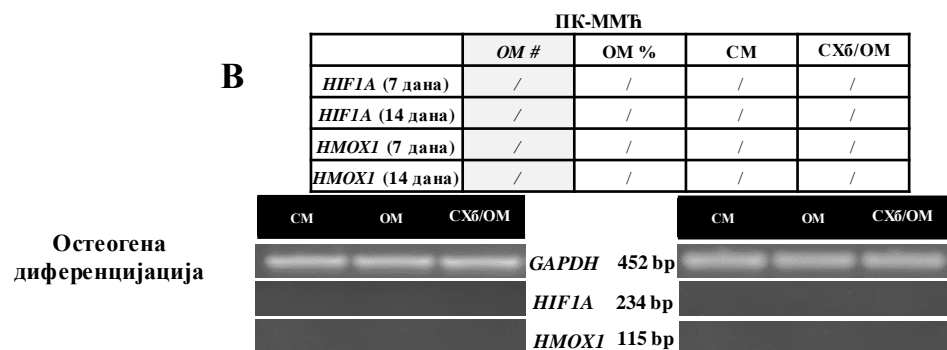
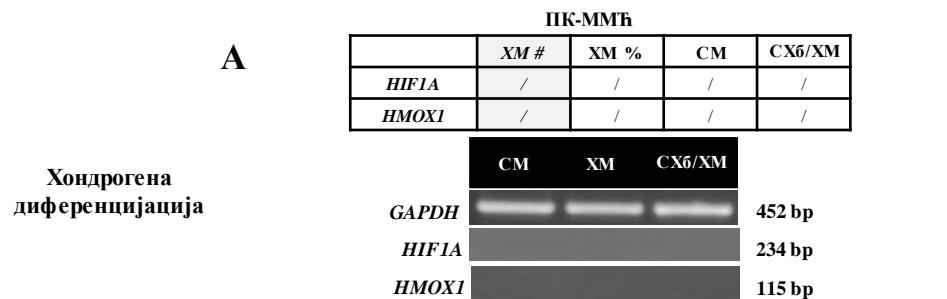
Прилог 5

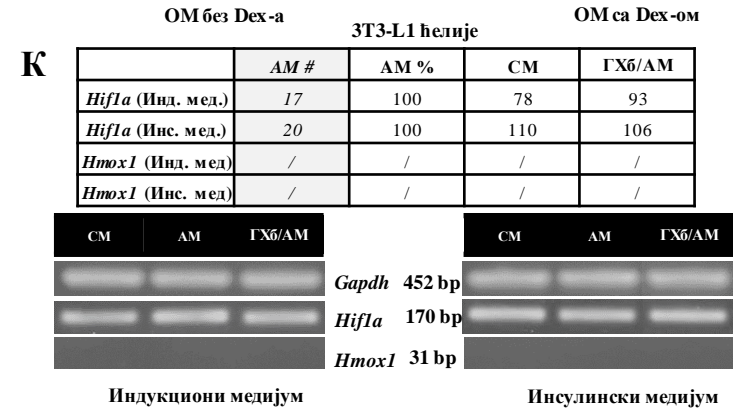
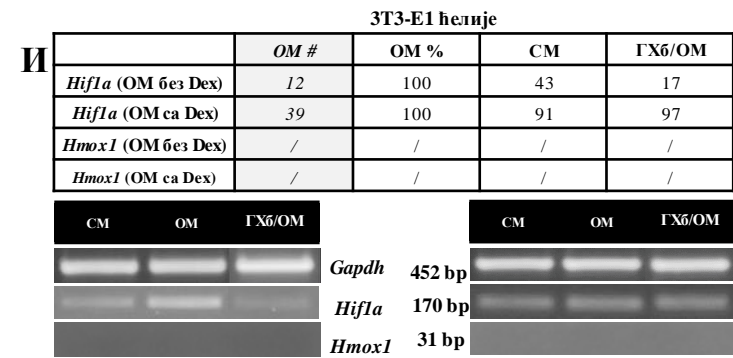
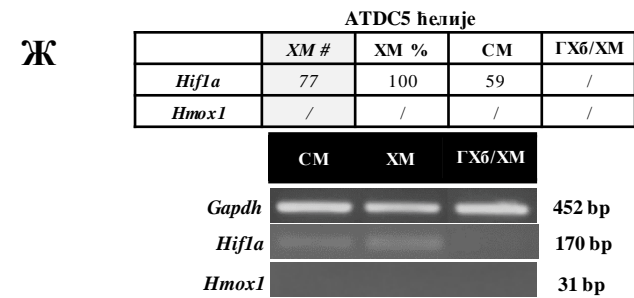
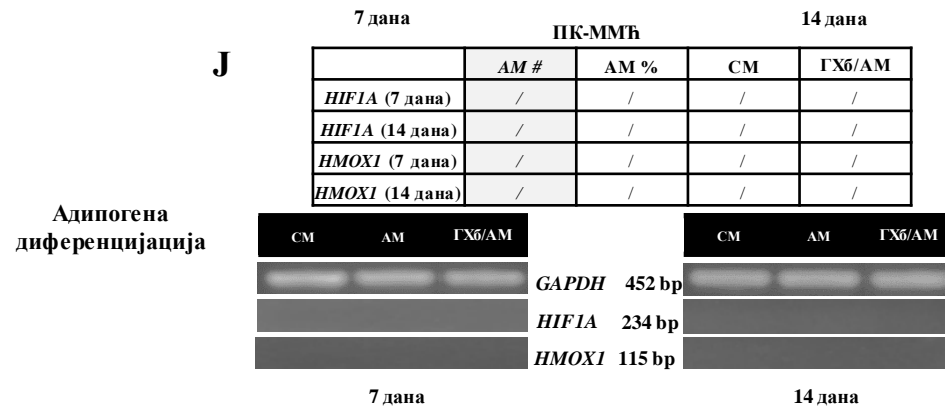
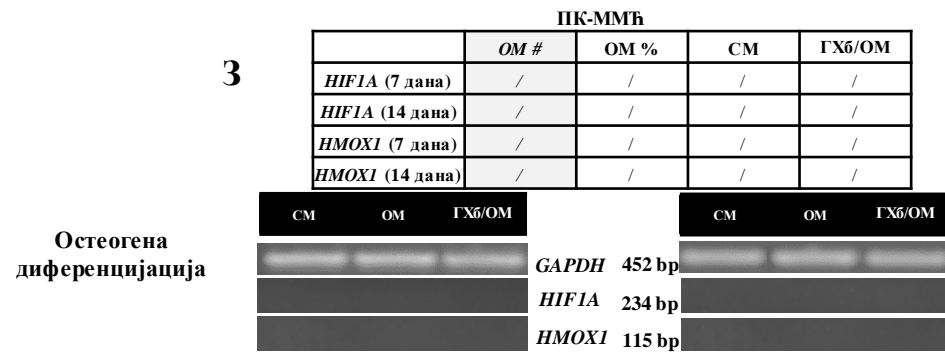
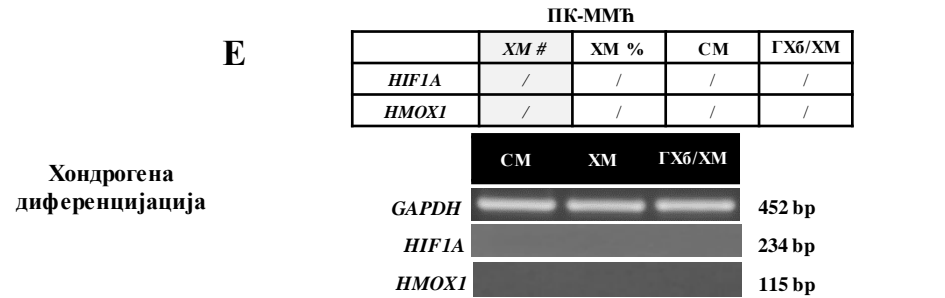
Говеђи и свињски хемоглобини додати у СМ не индукују хондрогену диференцијацију АТDC5 ћелија и остеогену диференцијацију ПК-ММЋ и МС3Т3-Е1 ћелија. Хондрогена диференцијација АТDC5 ћелија анализирана је дензитометријски одређивањем садржаја ГАГ детектованих бојењем Сафранином О, након 14 дана у култури у стандардном медијуму за култивацију ћелија (СМ) или СМ суплементисаним са 0,1 μМ говеђим хемоглобином (0,1 μМ ГХ6/СМ). Остеогена диференцијација ПК-ММЋ и МС3Т3-Е1 анализирана је дензитометријским одређивањем активности АLР ензима детектоване NBT/BCIP бојењем након 7 дана у култури у СМ или 0,1 μМ ГХ6/СМ и дензитометријском анализом депозита калцијума детектованих бојењем ализарин црвеним након 14 дана у култури. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација процента садржаја ГАГ, активност АLР и депозита калцијума у култури ћелија култивисаних у СМ (додељена вредност 100%).



Прилог 6

Утицај свињског (А, Б, В, Г, Д, Ђ) и говеђег (Е, Ж, З, И, Ј, К) хемоглобина на експресију гена који кодирају HIF-1 (*HIF1A* и *Hif1α*) и HO-1 (*HMOX1* и *Hmox1*) у ПК-ММЋ, АТDC5, МС3Т3-Е1 и 3Т3-Л1 ћелијама гајеним у стандардном медијуму за ћелијску културу (СМ) или одговарајућим диференцијационим медијумима (хондрогени, остеогени, адипогени) без или са 0,1 μМ свињског/говеђег хемоглобина. Индукција хондрогене диференцијације за ПК-ММЋ трајала је 11 дана (А, Е), за АТDC5 ћелије 7 дана (Б, Ж). Индукција остеогене диференцијације за ПК-ММЋ трајала је 11 дана (В, З), за МС3Т3-Е1 ћелије 7 дана (Г, И). Индукција остеогене диференцијације МС3Т3-Е1 ћелија вршена је у две експерименталне поставке: гајењем ћелија у остеогеним медијумум са дексаметазоном (ОМ са Dex) или остеогеним медијумом без дексаметазона (ОМ без Dex). Индукција адипогене диференцијације за ПК-ММЋ трајала је 14 дана (Д, Ј), за 3Т3-Л1 ћелије 10 дана (Ђ, К) током којих су ћелије прво гајене у индукционом, па инсулинском медијуму, па СМ. Говеђи и свињски хемоглобини су у адипогени медијум за 3Т3-Л1 додавани почев од фазе индукције или инсулинске фазе. Приказане су репрезентативне RT-PCR траке анализираних гена и трака GAPDH као контрола количине узорка нанетих на гел. У табелама су дати кванитативни подаци добијени дензитометријом RT-PCR трака. Ниво експресије сваког гена у специфичном диференцијационом медијуму је нормализован одговарајућим нивоом експресије GAPDH гена (означено #). Резултати су приказани као проценат експресије гена за HIF-1 и HO-1 у ћелија гајеним у одговарајућем диференцијационом медијуму (додељена вредност 100%) и као средња вредност ± стандардна девијација.





Прилог 7

Списак скраћеница

2,3-DPG (енг. *2,3-diphosphoglycerate*) - 2,3-дифосфоглицерат

A1M (енг. *α1-microglobulin*) - α1-микроглобулин

ABTS - 2,2'-азино-бис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина)

ALP (енг. *alkaline phosphatase*) – алкална фосфатаза

AMP (енг. *antimicrobial peptide*) - антимикробни пептиди

AP-1 (енг. *activating protein 1*) - активаторскиг протеин 1

ATP (енг. *adenosine triphosphate*) - аденозин трифосфат

Bach-1 (енг. *BTB and CNC homology 1*) - транскрипциони репресор 1 који показује хомологију са BTB и CNC

BCIP (енг. *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, p-toluidine salt*) - 5-бромо-4-хлоро-3-индолил фосфат, p-толуидин со

BFU-E (енг. *burst forming units-erythroid*) – еритроидни прекурсор определених матичних ћелија хематопоезе периферне крви човека

bHLH протеини (енг. *basic helix-loop-helix proteins*) – основни хеликс-петља-хеликс протеини

BMP (енг. *bone morphogenetic protein*) - морфогенетски протеин кости

C/EBP (енг. *CCAAT-enhancer-binding proteins*) - протеини који се везују за CCAAT енхансер

CA (енг. *carbonic anhydrase*) - карбонатна анхидраза

CaCO₃ - калцијум-карбонат

CAMs (енг. *cell adhesion molecule*) - ћелијски адхезивни молекули

CAT (енг. *catalase*) – каталаза

CD (енг. *cluster of differentiation*) – кластер диференцијације

CFC тест (енг. *colony forming cells*) – тест формирања колонија од стране определених матичних ћелија хематопоезе периферне крви човека

CFDA-SE (енг. *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) - карбокси-флуоресцеин диацетат сукцинимидил естар

CFSE (енг. *carboxyfluorescein succinimidyl ester*) - карбокси-флуоресцеин диацетат сукцинимидил естар

CFU-E (енг. *colony-forming unit-erythroid*) - прекурсор еритроидне лозе

CFU-F тест (енг. *colony-forming units fibroblasts test*) - тест формирања колонија фибробласта

CFU-GEMM (енг. *colony-forming unit – granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte*) - прекурсор заједнички за гранулоците, еритроците, макрофаге и мегакариоците

CFU-GM (енг. *colony-forming unit-granulocyte-monocyte*) - прекурсор гранулоцитно-моноцитне лозе

CO – угљен-моноксид

CO₂ – угљен-диоксид

CO-Hb – карбоксихемоглобин

con A (енг. *concanavalin A*) - конкавалин А

CSF (енг. *colony-stimulating factors*) - фактори стимулације колонија

CXCR4 (енг. *chemokine receptor type 4*) - СХС рецептор за хемокине тип 4

DAMP (енг. *damage/danger-associated molecular pattern*) - молекулски образац повезан са опасношћу

DEPC вода (енг. *diethyl pyrocarbonate water*) - дестилована DEPC третирана вода

DMEM (енг. *Dulbecco's modified Eagle medium*) - Дулбекова модификација Игловог медијума

dNTP (енг. *deoxynucleotide*) – дезоксинуклеотид

Dex - дексаметазон

EGFP (енг. *enhanced green fluorescent protein*) - побољшани зеленим флуоресцентни протеин

EHb (енг. *extracellular hemoglobin*) - екстрацелуларни хемоглобин

eNOS - ендотелна азот-оксид синтаза

FCS (енг. *fetal calf serum*) - фетални телећи серум

FcγR – Fcγ рецептор

FDA (енг. *Food and Drug Administration Agency*) - Америчка агенција за храну и лекове

FGF (енг. *fibroblast growth factor*) - фактор раста фибробласта

GAPDH (енг. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) - дехидрогеназа глицералдехид 3-фосфата

GFP (енг. *green fluorescent protein*) - зелени флуоресцентни протеин

GM-CSF (енг. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) - фактора стимулације гранулоцитно-макрофагних колонија

H⁺ - протон

H₂CO₃ - угљена киселина

H₂O₂ - водоник пероксид

HAPLN1 (енг. *hyaluronan and proteoglycan link protein*) - везни протеин хијалурона и протеогликана

HbA1c - гликозиловани хемоглобин изолован из крви пацијената оболелих од дијабетес мелитус тип 2

HbAm – хемоглобин изолован из *Arenicola marina*

HbF - фетални хемоглобин

- Hb-Fe²⁺** - ферохемоглобин
- Hb-Fe³⁺** - ферихемоглобин
- Hb-Fe⁴⁺** - ферилхемоглобин
- HBOC** (енг. *hemoglobin-based oxygen carriers*) - преносиоци кисеоника на бази хемоглобина
- HbV** (енг. *hemoglobin vesicle*) – везикуле које садрже хемоглобин
- HCO₃⁻** - бикарбонатни јон
- HCP1** (енг. *heme carrier protein 1*) – протеински носач за хем 1
- HDL** (енг. *high-density lipoprotein*) - липопротеин велике густине
- HGF** (енг. *hepatocyte growth factor*) - фактор раста хепатоцита
- HIF** (енг. *hypoxia-inducible factor*) - фактор индукован хипоксијом
- HIV** (енг. *human immunodeficiency virus*) - вирус хумане имунодефицијенције
- HLA-A** (енг. *human leukocyte antigen – A isotype*) - антиген хуманих леукоцита – изотип А
- HLA-DR** (енг. *human leukocyte antigen – DR isotype*) - антиген хуманих леукоцита – изотип DR
- HLA-G** (енг. *human leukocyte antigen – G isotype*) - антиген хуманих леукоцита – изотип G
- HO** (енг. *heme oxygenase*) – хем оксигеназа
- Hp** (енг. *haptoglobin*) – хаптоглобин
- Hp-Hb** - комплекс хемоглобина и хаптоглобина
- HpHbR** – рецептор за хемоглобин у комплексу са хаптоглобином
- Hpx** (енг. *hemopexin*) – хемопексин
- HS** (енг. *horse serum*) - коњски серум
- HSA** (енг. *human serum albumin*) - хумани серумски албумин
- HUVEC** (енг. *human umbilical vein endothelial cells*) - хумане ендотелне ћелије умбиликалне вене
- IBMX** (енг. *isobutyl-methylxanthine*) - изобутил-метилксантин
- ICAM-1** (енг. *intercellular adhesion molecule-1*) - унутарћелијски адхезиони молекул-1
- IDO** (енг. *indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase*) - индоламин-2,3-деоксигеназа
- IFN-γ** (енг. *interferon gamma*) – интерферон γ
- IgG** - имуноглобулин G
- IL** (енг. *interleukin*) - интерлеукин
- ILC** (енг. *innate lymphoid cell*) - урођене лимфоидне ћелије
- IMDM** (енг. *Iscove's modified Dulbecco's medium*) - Искова модификација Дулбековог медијума
- iNOS, NOS II** - индуцибилна азот-оксид синтаза

- ISCT** (енг. *International Society for Cellular Therapy*) - Међународно друштво за ћелијску терапију
- IVH** (енг. *cerebral intraventricular hemorrhage*) - церебрална интравентрикуларна хеморагија
- KLF** (енг. *Krüppel-like factors*) - фактори слични Krüppel-у
- LD50** (енг. *mean lethal dose*) - средња летална доза
- LFA-1** (енг. *lymphocyte function-associated antigen 1*) - антиген повезан са функцијом лимфоцита 1
- LIP** (енг. *labile iron pool*) - лабилни пул гвожђа
- LPS** (енг. *lipopolysaccharides*) – липополисахариди
- LRP** (енг. *lipoprotein receptor-related protein-1*) – протеин-1 повезан са рецептором липопротеина
- LTA** (енг. *lipoteichoic acid*) - липотеихоинска киселина
- mCD163** – мембрански CD163 молекул
- MCK** (енг. *muscle creatine kinase*) - мишићна креатин киназа
- MCP-1** (енг. *monocyte chemoattractant protein-1*) - моноцитни хемоатрактантни протеин-1
- MEP** (енг. *megakaryocyte-erythroid progenitor*) - заједнички прекурсор мегакариоцита и еритроцита
- MHC II** (енг. *major histocompatibility complex class II*) - главни комплекс ткивне подударности, класе II
- MnCO₃** - манган-карбонат
- MS** (енг. *multiple sclerosis*) - мултипла склероза
- MSC** (енг. *medicinal signaling cells*) - медицинске сигналне ћелије
- NADPH** - редуковани никотинамид аденин динуклеотид фосфат
- NBT** - *Nitro blue* тетразолијумова со
- N-CAM** (енг. *neural cell adhesion molecule*) - адхезивни молекул нервних ћелија
- NETs** (енг. *neutrophil extracellular traps*) - екстрацелуларне замке неутрофила
- NF-κB** (енг. *nuclear factor kappa B*) - нуклеусни фактор – κB
- NK ћелије** (енг. *natural killer*) - ћелије природне убице
- NKT** (енг. *natural killer T*) - T ћелије урођене убице
- nNOS, NOS I** - неуронална азот-оксид синтаза
- NO** – азот-оксид
- NO₂⁻** - нитрит
- NO₃⁻** - нитрат
- NOD** (енг. (енг. *nitric oxide dioxygenase*)) - азот-оксид диоксигеназа
- NOS** (енг. *nitrogen oxide synthase*) - азот-оксид синтаза

O₂^{•-} - супероксид анјон радикал

O₂ – кисеоник

OH[•] - хидроксил радикал

oxLDL (енг. *oxidized low density lipoprotein*) – оксидовани липопротеин мале густине

PAMP (енг. *pathogen-associated molecular patterns*) - молекулски образац повезан са патогеном

PB-MSCs (енг. *peripheral blood mesenchymal stem cells*) - мезенхимске матичне ћелије периферне крви

PBS (енг. *phosphate buffered saline*) - изотонични фосфатни пуфер

pCO₂ - парцијални притисак угљен-диоксида

PCR (енг. *polymerase chain reaction*) - ланчана реакција полимеразе

PEG (енг. *polyethylene glycol*) - полиетилен гликол

PFC (енг. *perfluorocarbons*) - перфлуорокарбонати

PHA (енг. *phytohaemagglutinin*) - фитохемаглутинин

PI (енг. *propidium iodide*) - пропидијум јодид

PLA-PEG наночестице (енг. *poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles*) – наночестице од блок полимера млечне киселине и полиетилен гликола

PMA (енг. *phorbol 12-myristate 13-acetate*) - форбол миристат ацетат

PNH (енг. *paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*) – пароксизмална ноћна хемоглобинурија

pO₂ - парцијални притисак кисеоника

PPAR γ (енг. *peroxisome proliferator-activated receptor γ*) – рецептор γ који се активира уз пролиферацију пероксизома

PTHrP (енг. *parathyroid hormone-related protein*) - протеин повезан са паратиroidним хормоном

PtNP (енг. *platinum nanoparticle*) - наночестице од платине

PWM (енг. *pokeweed mitogen*) - митоген из корена винобојке

RIPA (енг. *radioimmunoprecipitation assay buffer*) - пуфер радиоимунопреципитацијског есеја

RNS (енг. *reactive nitrogen species*) - реактивне врсте азота

ROS (енг. *reactive oxygen species*) - реактивне врсте кисеоника

RT-PCR (енг. *reverse transcription polymerase chain reaction*) - ланчана реакција полимеразе којој претходни реверзна транскрипција

SCD (енг. *sickle-cell disease*) - анемија српастих еритроцита

sCD163 - солубилни CD163 молекул

SCF (енг. *stem cell factor*) - фактор матичних ћелија

SDF-1 (енг. *stromal cell-derived factor 1*) - фактор пореклом од стромалних ћелија

- SDS** (енг. *sodium dodecyl sulfate*) - натријум додецил сулфат
- SDS-PAGE** (енг. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) - електрофореза у полиакриламидном гелу са додатком натријум додецил сулфата
- sGC** (енг. *soluble guanylate cyclase*) - солубилна гуанилат циклаза
- SMCC** (енг. *N-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate*) - N-сукцинимидил 4-(N-малеимидомети) циклохексан-1-карбоксилат
- SOD** (енг. *superoxide dismutase*) - супероксид дисмутаза
- SREBP-1** (енг. *sterol response element-binding protein-1*) - протеин 1 који се везује за елемент одговора на стероле
- STATs** (енг. *signal transducer and activator of transcription*) – сигнални трансдусери и активатори транскрипције
- ТАЕ пуфер** (енг. *Tris-acetate-EDTA buffer*) - Tris-ацетатни-EDTA пуфер
- ТЕМЕД** - тетраметил етилен диамин
- TF** (енг. *tissue factor*) - ткивни фактор
- TFR** (енг. *transferrin receptor*) – трансферински рецептор
- TGF- β** (енг. *transforming growth factor- β*) - фактор трансформишућег раста- β
- Th17** (енг. *T17 helper cells*) - помоћнички Т17 лимфоцити
- ТИМ-2** (енг. *T cell immunoglobulin-domain and mucin-domain-2*) – протеин 2 Т ћелија са имуноглобулинским и муцинским доменом и доменом
- TLC** (енг. *thin-layer chromatography*)- хроматографија на танком слоју силика гела
- TLF-1** (енг. *trypanosome lytic factor-1*) - литички фактор трипанозоме 1
- TLR** (енг. *Toll-like receptor*) - рецептор сличан *Toll*-у
- TNF- α** (енг. *tumor necrosis factor- α*) - фактор некрозе тумора α
- Treg** (енг. *regulatory T lymphocytes*) - регулаторни Т лимфоцити
- UCP-1** (енг. *uncoupling protein-1*) – некупловани протеин 1
- VCAM-1** (енг. *vascular cell adhesion protein 1*) - адхезиони протеин васкуларних ћелија 1
- VEGF** (енг. *vascular endothelial growth factor*) - васкуларни ендотелни фактор раста
- VLA-4** (енг. *very late antigen 4*) - веома касни антиген 4
- ГАГ** – гликозаминогликани
- ГИТ** - гастроинтестинални тракт
- ГХб** – говеђи хемоглобин
- кДНК** - комплементарна дезоксирибонуклеинска киселина
- ММћ** - мезенхимске матичне ћелије
- МНћ** - мононуклеарне ћелије
- МТТ** - 3-(4,5-диметил-тиазол-2ил)-2,5 дифенил-тетразолијум бромид
- ПК-ММћ** – мезенхимске матичне ћелије периферне крви

ПМћ - полиморфонуклеарне ћелије

РНКаза А - рибонуклеаза А

СМ – стандардни медијум за гајење мезенхимских ћелија (DMEM/10% FCS)

СХб – свињски хемоглобин

Хб - хемоглобин

ХМћ - хематопоеетске матичне ћелије

ЦНС - централни нервни систем

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Ана Станчић рођена је 19. новембра 1988. године у Крагујевцу. Гимназију је завршила у Врњачкој Бањи 2007. године и исте године уписала студије на Биолошком факултету Универзитета у Београду, смер Молекуларна биологија и физиологија. Основне академске студије завршила је 2010. године са просечном оценом 9,30. Исте године уписала је мастер студије на Биолошком факултету, смер Молекуларна биологија и физиологија, модул Експериментална биомедицина које је завршила је 2012. године са просечном оценом 9,71. Докторске студије је уписала 2013. године на Биолошком факултету Универзитета у Београду, на модулу Биологија ћелија и ткива, при чему је положила све програмом предвиђене испите са просечном оценом 10,00. Од априла 2014. године Ана Станчић укључена је у рад Групе за Имунологију Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду, као стипендиста докторанд Министарства просвете, науке и технолошког развоја, Републике Србије. Ана Станчић је 29.12.2017. изабрана у звање истраживач-приправник и од марта 2018. године запослена је као истраживач-приправник у Групи за Имунологију Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду. У звање истраживач-сарадник Ана Станчић изабрана је 23.05.2019. године на истом институту.

У сарадњи са другим ауторима Ана Станчић је објавила укупно 26 публикације, од тога је 8 библиографских јединица објављено у целини: 1 поглавље у књизи (M14), 1 рад у часопису категорије M21a, 1 рад у часопису категорије M21, 2 рада у часописима категорије M22, 1 рад у часопису категорије M23, 1 саопштење са међународних скупова штампаних у целини (M33) и 1 рад у часопису категорије M51. Ана Станчић коаутор је 9 саопштења са међународних скупова штампаних у изводу (M34) и 9 саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу (M64).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а: **Ана З. Станчић**

број индекса: **Б3009/2013**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утицај ванћелијског хемоглобина ксеногеног порекла на функцијска својства мезенхимских ћелија *in vitro*“

- 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, 09.06.2020.

Ана Станчић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада

Име и презиме аутора: **Ана З. Станчић**

Број индекса: **Б3009/2013**

Студијски програм: **Биологија (Биологија ћелије и ткива)**

Наслов рада: **„Утицај ванћелијског хемоглобина ксеногеног порекла на функцијска својства мезенхимских ћелија *in vitro*“**

Ментори: **др Александра Кораћ**, редовни професор,
Универзитет у Београду-Биолошки факултет
др Ивана Дрвеница, научни сарадник,
Универзитет у Београду-Институт за медицинска истраживања

Потписана **Ана З. Станчић**

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, 09.06.2020.

Ана Станчић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Утицај ванћелијског хемоглобина ксеногеног порекла на функцијска својства мезенхимских ћелија *in vitro*“

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, 09.06.2020.

Ана Сивачевић

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

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољава 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. Дозвољава 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. Дозвољава 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. Дозвољава 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. Дозвољава 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.