

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Emilija Lazić

**ENERGETSKI METABOLIZAM MATIČNIH  
ĆELIJA HEMATOPOEZE PERIFERNE KRVI  
BOLESNIKA SA MALIGNIM OBOLJENJIMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Emilija Lazić

**ENERGY METABOLISM IN PERIPHERAL  
BLOOD HEMATOPOIETIC STEM CELLS OF  
PATIENTS WITH MALIGNANT DISEASES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

MENTORI:

dr Bato Korać

vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

dr Dragana Vujić

vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu.

ČLAN KOMISIJE:

dr Aleksandra Korać

redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

DATUM ODBRANE:

-----

*Ovaj rad posvećujem mojoj ćerki Jovani,  
mom smislu života i postojanja*

## *Zahvalnica*

Ova doktorska disertacija urađena je u Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu, i Institutu za zdravstvenu zaštitu majke u deteta Srbije "dr Vukan Čupić", Beograd.

Ovom prilikom želim da se zahvalim:

Prof. dr Bati Koraću, mentoru, na savetima, pruženoj pomoći i podršci tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Prof. dr Dragani Vujić, mentoru, na prenesenom znanju, pomoći, sugestijama. Posebnu zahvalanost želim da uputim dr Vujić na prilici da sa njom učestvujem u stvaranju prve Nacionalne banke krvi pupčanika Srbije.

Prof. dr Aleksandri Korać na pomoći tokom izrade teze.

Lekarima i sestrama Odeljenja za transplantaciju kostne srži sa laboratorijom za kriobiologiju na pomoći, podršci i razumevanju tokom svih ovih godina. Posebno se zahvaljujem sestri Aleksandri Sarovski na prijateljstvu, podršci i optimizmu.

Osooblju Laboratorije za protočnu citometriju i imunologiju, a posebno Dr Bojani Slavković na saradnji i pomoći kad god je bilo potrebno.

Osooblju Službe za trasnfuziju, Službe za hemato-onkologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke u deteta Srbije "dr Vukan Čupić", Beograd, kao i kolegama Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, Odeljenje pedijatrije na doprinosu izrade ove disertacije.

Posebno želim da se zahvalim saradnicama Ani Stojanović i Jeleni Tomić, na pomoći, divnoj saradnji i njihovom vedrom duhu koji mi je bio podstrek da ovaj posao privedem kraju.

Divnim koleginicama Ani, Aleksandri i Milici iz Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, na sjajnoj saradnji i pomoći.

Posebnu zahvalnost dugujem svom suprugu Dušku Iliću na više decenijskoj podršci, pomoći, strpljenju i zato što nas daljina nikad nije razdvojila (naprotiv).

Na ovo počasnom mestu želim da se zahvalim mojim roditeljima, Milici i Dragoljubu, koji nikada nisu odustajali, koji su uvek verovali u mene i čija podrška i ljubav nikad nisu nedostajali.

# ENERGETSKI METABOLIZAM MATIČNIH ĆELIJA HEMATOPOEZE PARIFERNE KRVI BOLESNIKA SA MALIGNIM OBOLJENJIMA

## REZIME

Iako se transplantacija matičnim ćelijama hematopoeze kao oblik lečenja koristi više decenija, još uvek nije potpuno jasno zašto postoje razlike u brzini oporavka hematopoeze (vremenu prihvatanja kalema, *engl.* engraftment) kod bolesnika sa istim oboljenjima, kod kojih su primenjeni istovetni mobilizacioni protokoli i režimi kondicioniranja. Za sagledavanje terapijskog potencijala matičnih ćelija neophodno je poznavanje njihovih funkcionalnih karakteristika, između ostalog metaboličkog (energetskog) statusa i redoks-spregnutih mehanizama kontrole diferencijacije u različitim ćelijskim stanjima (mirovanje, opredeljivanje, diferencijacija, aktivacija), tokom hematopoeze.

Cilj disertacije je da se ispituju metabolički parametri u matičnim ćelijama hematopoeze periferne krvi bolesnika sa solidnim tumorima (neuroblastom, NB), Juingov sarkom (*engl.* Ewing Sarcoma, ES) i limfoma (Hočkinov, HL i non Hočkinov, NHL). Ispitivani su ekspresioni profili enzima ključnih metaboličkih puteva energetskog metabolizma: glikolize,  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina, ciklusa limunske kiseline, procesa oksidativne fosforilacije (ND4 subjedinica kompleksa I, Ndufa6 subjedinica kompleksa I, citohrom *b*, citohrom *c* i subjedinice II (COX II) i IV(COX IV) citohrom *c* oksidaze) i same sinteze ATP. Ispitivan je i funkcioni status mitohondrija i nivo mitohondrijalne DNK, ekspresija NADPH oksidaze, ekspresija izoformi azot oksid sintaza i produkcija azot oksida, ekspresija enzima antioksidativne odbrane matičnih ćelija hematopoeze (glutation-peroksidaze, GSH-Px), katalaze, mangan superoksid dismutaze (MnSOD), bakar cink superoksid dismutaze (CuZnSOD) i ekspresija interleukina-6 (IL-6) i faktora nekroze tumora  $\alpha$  (*engl.* tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ).

Eksperimenti su rađeni na uzorcima monojedarnih ćelija periferne krvi pacijenata koji su primali protokol mobilizacije (MP), pacijenata koji nisu primali protokol mobilizacije i od zdravih davalaca (kontrola).

Na osnovu dobijenih rezultata zaključuje se da se izdvajaju dva metabolička fenotipa monojedarnih ćelija iz periferne krvi.

Prvi fenotip karakterističan je za monojedarne ćelije periferne krvi kod svih ispitivanih tumora, bez primene protokola mobilizacije.

Drugi fenotip istovetan je za monojedarne ćelije periferne krvi svih ispitivanih tumora posle primene protokola mobilizacije.

Ova dva fenotipa odlikavaju funkcionalno stanje matičnih ćelija iz periferne krvi (*engl.* peripheral blood stem cell, PBSC), na nivou antioksidativne odbrane, energetskog metabolizma (glikolize,  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina, ciklusa limunske kiseline, oksidativne fosforilacije (*engl.* oxidative phosphorylation, OXPHOS)), sinteze ATP, mitohondrijalne DNK (mtDNK), ekspresije NADPH oksidaze, kao i ekspresije citokina: IL-6 i TNF-6.

U uzorcima ne-mobilisanih pacijenata, uočava se snažna aktivacija metabolizma monojedarnih ćelija periferne krvi kod pacijenata obolelih od HL, NHL i NB, u poređenju sa kontrolnim uzorcima (monojedarne ćelije zdravih osoba). Ekspresija GAPDH na nivou iRNK i na nivou proteina je nekoliko desetina puta povećana u svim uzorcima ove grupe pacijenata. Ekspresija (na proteinskom nivou) acil-CoA dehidrogenaze srednjeg lanca (ACADM) veća je u monojedarnim ćelijama dva puta kod HL, a skoro četiri puta kod pacijenata sa NHL i NB.

Ovi rezultati sugerišu veću metaboličku aktivnost u grupi ne-mobilisanih pacijenata pokazujući sličnosti sa Warburgovim fenotipom.

Drugi metabolički fenotip monojedarnih ćelija periferne krvi mobilisanih pacijenata pokazuje znatno niže vrednosti metaboličkih parametara u poređenju sa zdravim kontrolama i ne-mobilisanim pacijentima. Utišani fenotip karakteriše: nizak nivo glikolize,  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina, ciklusa limunske kiseline, OXPHOS (kompleksi respiratornog lanca) i sinteze ATP. Detektovan je i manji broj kopija mtDNK što je u saglasnosti sa rezultatima koji potvrđuju nisku stopu oksidativnog metabolizma u mitohondrijama. Izuzetak je ekspresija citohroma *c* na nivou iRNK i kompleksa IV na proteinskom nivou.

Proteinski ekspresioni nivo antioksidativnih enzima (CuZnSOD i GSH-Px, dominantno lokalizovanih u citoplazmi, a MnSOD u mitohondrijama) može biti jedan od parametara koji ukazuje na prirodu oksidativnih procesa u matičnim ćelijama hematopoeze, a posebno na ulogu koju ima vodonik peroksid.

Povećana ekspresija citokina, IL-6 i TNF $\alpha$ , na proteinskom nivou, kod svih ispitivanih grupa pacijenata (sa i bez mobilizacije matičnih ćelija hematopoeze) navodi na zaključak da imaju važnu ulogu u pokretanju i sinhronizaciji kompleksnih događaja u monojedarnim ćelijama.

Rezultati disertacije ne ukazuju na jasnu korelaciju između utišanog metaboličkog fenotipa i vremena prihvatanja kalema granulocitne i megakariocitne loze posle transplantacije matičnih ćelija hematopoeze periferne krvi. Prihvatanje kalema obe loze je individualno, vremenski heterogeno i nezavisno od osnovne bolesti. Moguće je, da iako utišan, metabolički fenotip matičnih ćelija hematopoeze poseduje različite individualne

potencijale da se eksprimira u zavisnosti od opšteg stanja pacijenta, stepena progresije oboljenja, infekcija i specifičnosti mikrosredina koje mogu uticati na prihvatanje kalema.

KLJUČNE REČI: matične ćelije hematopoeze, mitohondrija, autologna transplantacija matičnim ćelijama hematopoeze, energetski metabolizam, antioksidativna odbrana

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Animalna i humana fiziologija

UDK BROJ: [616-006.4:[[ 576.374:577.121]:[576.3:612.119]]:612-022.3(043.3)



# ENERGY METABOLISM IN PERIPHERAL BLOOD HEMATOPOIETIC STEM CELLS OF PATIENTS WITH MALIGNANT DISEASES

## ABSTRACT

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a standard clinical practice for more than 50 years. However, we still cannot predict with certainty a rate of recovery in the patients with the same disease undergoing identical therapeutic protocols. To determine therapeutic potential of hematopoietic stem cell (HSC), we need to understand better correlation between the metabolic/energy status of the cells and stages of stem cell differentiation during hematopoiesis.

Main goal of this work is to investigate metabolic status of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with solid tumors (neuroblastoma, Ewing sarcoma) and lymphoma (Hodgkin and nonHodgkin). We determined expression profiles of key enzymes involved in glycolysis, fatty acid  $\beta$ -oxidation, citric acid cycle, oxidative phosphorylation and adenosine triphosphate (ATP) synthesis: ND4 subunit complexes I, Ndufa6 subunits of complex I, cytochrome *b*, cytochrome *c* and subunits II (COX II) and IV (COX IV) cytochrome *c* oxidase. Next, we investigated number of mitochondria and their function as well as expression levels of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) - oxidase, expression isoforms of nitric oxide synthase and production of nitric oxide, expression of HSC antioxidant enzymes (glutathione-peroxidase (GSH-Px), catalase, manganese superoxide dismutase (MnSOD), copper-zinc superoxide dismutase (CuZnSOD)) and expression of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).

Experiments were performed on PBMC samples of patients that were: a) subjected to mobilization of stem cells from bone marrow, b) not subjected to mobilization, and c) healthy donors (control group).

Our results suggested that PBMC metabolic phenotypes differ between mobilized and non-mobilized patients, regardless of diagnosis.

These two phenotypes represent functional status of the PBSC at the level of anti-oxidative defense, energy metabolism (glycolysis,  $\beta$ -oxidation of fatty acids, citric acid cycle, oxidative phosphorylation-OXPHOS), ATP synthesis, mitochondrial DNA (mtDNK), expression of NADPH oxidase and cytokines IL-6 and TNF $\alpha$ .

In samples of non-mobilized HL, NHL and NB patients, we detected a strong metabolic activation of PBMC in comparison with control samples from healthy individuals.

GAPDH mRNA and protein levels are significantly higher in this group of patient samples. Protein level of acyl-CoA dehydrogenase medium chain (ACADM) is higher two folds in HL and 4 folds in NHL and NB. These results suggested a higher metabolic activity in non mobilized patients, show similarity to Warburg phenotype.

The second metabolic phenotype of PBMC characteristic for mobilized patients demonstrated significantly lower metabolic parameters in comparison with healthy controls and non-mobilised patients. Such quiescent phenotype is reflected through low levels of glycolysis,  $\beta$ -fatty acid oxidation, citric acid cycle, OXPHOS and ATP synthesis. We also detected less mtDNA expression of an NADPH oxidase, as well as the expression of cytokines: IL-6 and TNF $\alpha$ . In all patients that were subjected to mobilization and chemotherapy, PBMC have lower number of mitochondria and lower level of metabolism, regardless of diagnosis. Exceptions are mRNA levels of cytochrome *c* and protein levels of mitochondrial complex IV.

Expression levels of anti-oxidative enzymes CuZnSOD i GSH-Px, localised predominantly in cytoplasm and MnSOD in mitochondria, might reflect oxidative processes in HSC, especially those including H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Higher expression of IL-6 and TNF $\alpha$  in all patient groups, with and without mobilization of HMSC, pointed to their important role in PBMC biology.

However, our results did not find a correlation between metabolic status of PBMC and successful engraftment of the cells of granulocyte and megakaryocyte lineages following autologous HSCT. Engraftment of both lineages is patient specific and does not depend on time or type of tumour examined. We have still to take in account that quiescent phenotype of PBSC has potential to be expressed, depending on status of the patient, disease progress, infection and specific microenvironment which may all have an influence on engraftment.

**KEY WORDS:** hematopoietic stem cell, mitochondry, autologous, autologous HSCT, energy metabolism, antioxidant defense

**SCIETIFIC FIELD:** Biology

**SPECIAL TOPICS:** Animal and human physiology

**UDC NUMBER:** [616-006.4:[ [ 576.374:577.121]:[576.3:612.119]]:612-022.3(043.3)

## SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Podela matičnih ćelija.....	1
1.2. Matične ćelije hematopoeze .....	2
1.3. Transplantacija matičnim ćelijama hematopoeze.....	3
1.4. Limfomi kod dece.....	5
1.4.1. Hočkinov limfom.....	5
1.4.2. Non Hočkinov limfom .....	7
1.5. Neuroblastom.....	8
1.6. Juingov sarkom.....	10
1.7. Mitohondrije: izgled i funkcija.....	11
1.8. Energetski metabolizam .....	13
1.8.1. Glikoliza.....	14
1.8.2. Oksidacija masnih kiselina .....	16
1.8.3. Oksidativna fosforilacija.....	16
1.9. Antioksidativna odbrana.....	17
1.10. Interleukin 6 (IL-6).....	19
1.11. Faktor nekroze tumora $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) .....	20
2. Cilj rada.....	21
3. Materijal i metode.....	22
3.1. Pacijenti i kontrolna grupa.....	22
3.2. Priprema uzoraka .....	22
3.2.1. Mobilizacija matičnih ćelija hematopoeze.....	23
3.2.2. Izdvajanje monojedarnih ćelija iz pune krvi zdravih davalaca i pacijenata koji nisu primali mobilizacioni protokol .....	24
3.2.3. Izdvajanje monojedarnih ćelija iz krvi pacijenata nakon mobilizacione procedure - Afereza.....	26

3.3. Određivanje broja CD34+ u afereznom produktu metodom protočne citometrije.....	27
3.4. Zamrzavanje periferne krvi bogate matičnim ćelijama hematopoeze i uzoraka MNC .....	27
3.5. Ispiranje ćelija od toksičnog krioprotektanta (DMSO) .....	28
3.6. Određivanje vijabilnosti ćelija posle odmrzavanja.....	28
3.6.1. Određivanje vijabilnosti ćelija nakon odmrzavanja metodom Tripan plavo .....	28
3.6.2. Određivanje vijabilnosti ćelija nakon odmrzavanja na automatskom brojaču ćelija....	30
3.7. Određivanje broja prethodnika granulocitno-monocitne i eritrocitne loze u uzorcima periferne krvi nakon odmrzavanja.....	31
3.8. Priprema uzoraka za Western blot i PCR .....	32
3.9. Western blot.....	33
3.9.1. Određivanje količine proteina .....	33
3.9.2. Elektroforeza proteina.....	34
3.9.3. Prenos proteina sa SDS-poliakrilamidnog gela na membranu i imunološka detekcija imobilizovanih proteina (Western blot) .....	34
3.9.4. Kvantifikacija rezultata dobijenih Western blot analizom.....	37
3.10. Lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu (RT-PCR) .....	37
3.11. Konfokalna mikroskopija .....	41
3.11.1. Priprema uzoraka za konfokalnu mikroskopiju .....	41
3.11.2. Bojenje MitoTracker Green FM (MT-G) .....	41
3.11.3. Bojenje Daf2-DA za detekciju NO .....	41
3.11.4. Imunohistohemijsko detektovanje konfokalnom mikroskopijom .....	42
3.12. Statistička obrada rezultata.....	42
4.Rezultati.....	43
4.1. Klinički parametri.....	43
4.1.1. Promena broja leukocita tokom mobilizacije .....	43
4.1.2. Rezultati mobilizacionih procedura .....	44
4.1.2.1. Rezultati mobilizacionih procedura (periferna krv pacijenata na dan afereze) .....	44

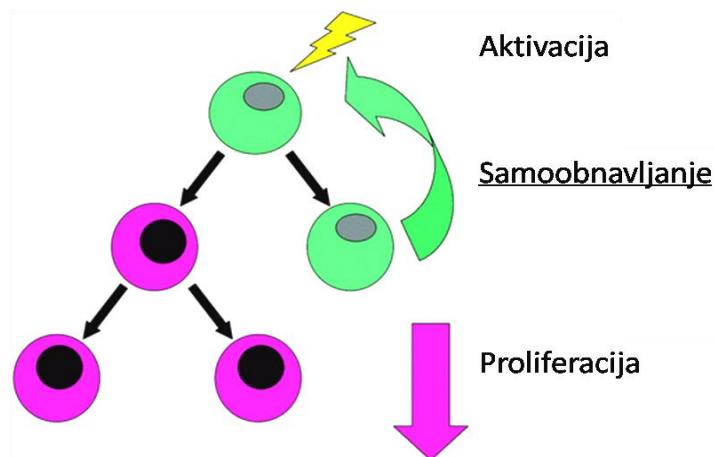
4.1.2.2. Rezultati mobilizacionih procedura (aferezni produkt) .....	45
4.1.3. Vijabilnost ćelija pre i posle zamrzavanja i broj GM-CFU (sposobnost repopulacije PBSC) .....	46
4.2. Rezultati RT-PCR analiza .....	46
4.2.1. Količina iRNK za enzime antioksidativne odbrane .....	46
4.2.2. Količina iRNK za GAPDH .....	48
4.2.3. Genska ekspresija komponenti elektron-transportnog lanca .....	48
4.2.4. Genska ekspresija ATP sintaze .....	49
4.2.5. Genska ekspresija NAD(P)H oksidaze .....	50
4.2.6. Genska ekspresija IL-6 i TNF $\alpha$ .....	51
4.2.7. Kvantifikacija mtDNK .....	51
4.3. Rezultati Western blot analize .....	52
4.3.1. Proteinska ekspresija enzima antioksidativne odbrane .....	52
4.3.2. Proteinska ekspresija GAPDH i PDH .....	53
4.3.3. Proteinski nivo enzima $\beta$ -oksidacije i Krebsovog ciklusa .....	54
4.3.4. Proteinska ekspresija komponenti oksidativne fosforilacije .....	55
4.3.5. Proteinska ekspresija NAD(P)H oksidaze .....	57
4.3.6. Ekspresija IL-6 i TNF $\alpha$ na nivou proteina .....	57
4.4. Mikroskopija .....	58
4.4.1. Funkcioni status mitohondrija .....	58
4.4.2. Vizuelizacija unutarćelijske produkcije azot oksida (NO) fluorescentnim obeležavanjem 4,5-diaminofluorescin-2-diacetatom (Daf2-DA) .....	59
4.4.3. Imunofluorescentna detekcija ekspresije i unutarćelijska lokalizacija izoforni azot oksid sintaza konfokalnom mikroskopijom .....	60
4.4.3.1. Detekcija ekspresije i lokalizacija iNOS .....	60
4.4.3.2. Detekcija ekspresije i lokalizacija eNOS .....	61
4.4.4. Imunofluorescentna detekcija ekspresije i unutarćelijska lokalizacija katalaze konfokalnom mikroskopijom .....	62

4.4.5. Imunofluorescentna detekcija ekspresije i unutarćelijska lokalizacija IL-6 konfokalnom mikroskopijom.....	63
4.4.6. Imunofluorescentna detekcija ekspresije i unutarćelijska lokalizacija TNF $\alpha$ konfokalnom mikroskopijom.....	64
4.5. Prihvatanje kalema posle učinjene autologne transplantacije .....	65
5. Diskusija.....	70
6. Zaključci.....	88
7. Literatura.....	90

## ***1. Uvod***

Matične ćelije su nespecializovane ćelije koje karakteriše: sposobnost samoobnavljanja i kapacitet diferencijacije u različite tipove ćelija.

Matične ćelije se, za razliku od somatskih ćelija koje se dele simetrično (daju dve iste "ćerke" ćelije), dele asimetrično. Asimetrična deoba podrazumeva da se matična ćelija deli na dve "ćerke" ćelije od kojih jedna postaje zrela ćelija, a druga zadržava kapacitet ponovne deobe (Slika1).



**Slika 1.** Šematizovani prikaz deobe matične ćelije (adaptirano iz Muschler i sar., 2004).

### 1.1. Podela matičnih ćelija

U odnosu na poreklo matične ćelije se mogu podeliti na: *embrionalne, fetalne, perinatalne, adultne i iPS* (*engl. induced pluripotent stem cell*). Embrionalne matične ćelije (*engl. embryonal stem cell, ESC*) dobijaju se iz blastocista. Fetalne matične ćelije (*engl. fetal stem cell, FSC*) se dobijaju iz embriona, po prekidu trudnoće. Klasifikacija fetalnih matičnih ćelija je nejasna i često ih svrstavaju u adultne matične ćelije. Perinatalne matične ćelije se dobijaju iz amnionske tečnosti, placente i pupčane vrpce. Adultne matične ćelije se dobijaju iz adultnih tkiva/organa. iPS su stvorene u laboratoriji, tako što su tkivno specifične ćelije reprogramirane do nivoa embrionalnih matičnih ćelija (Takahashi i Yamanaka, 2006).

Matične ćelije se mogu podeliti i prema potencijalu diferencijacije (koliko tipova ćelija može dati matična ćelija) na: totipotentne, pluripotentne, multipotentne, oligopotentne i unipotentne. Totipotentne matične ćelije diferenciraju se u sva embrionalna ili ekstraembrionalna tkiva (placenta). Jedina totipotentna matična ćelija je oplodena jajna ćelija do deobe od 8 blastomera. Pluripotentne matične ćelije diferenciraju se u ćelije tri germinativna sloja: endoderm, mezoderm i ektoderm. Iz germinativnih slojeva nastaju svi humani organi: iz endoderma nastaju gastrointestinalni trakt i pluća; iz mezoderma mišići,

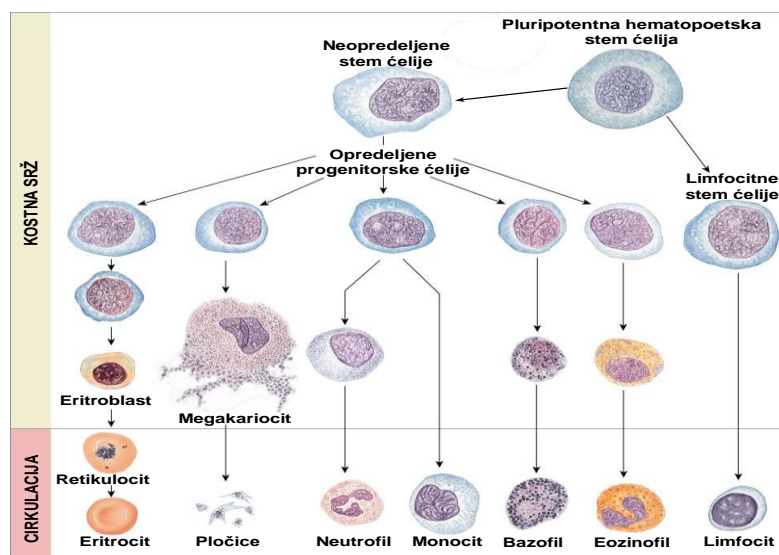


kosti, krv i urogenitalni trakt, a iz ektoderma nastaju epidermalno tkivo i nervni sistem. Multipotentne matične ćelije diferenciraju se u više tipova ćelija, isključivo u bliske familije ćelija. U ovu grupu ćelija spadaju matične ćelije hematopoeze, čijom diferencijacijom nastaju zreli oblici svih ćelija krvi. Oligopotentne matične ćelije mogu se diferencirati samo u bliske familije ćelija, kao što su mijeloidne i limfoidne matične ćelije. Unipotentne matične ćelije mogu se diferencirati u samo jedan tip ćelija, kao što su: mišićne matične ćelije, bazalni epidermis i parenhimske ćelije jetre (Ibelgauf, 2013).

## 1.2. Matične ćelije hematopoeze

Kostna srž je mesto gde se odvija proces hematopoeze kod ljudi. Specijalizovano, anatomski definisano mesto u kostnoj srži gde se matične ćelije hematopoeze diferenciraju naziva se ćelijska niša.

Samoobnavljanjem, matične ćelije hematopoeze održavaju svoju populaciju u kostnoj srži, a njihovom diferencijacijom nastaju dve loze: mijeloidna i limfoidna, koje nemaju sposobnost samoobnavljanja. Diferencijacijom i proliferacijom ćelija mijeloidne i limfoidne loze nastaju progenitorske ćelije koje imaju slabu ili nikakvu sposobnost samoobnavljanja i koje svojom daljom diferencijacijom i sazrevanjem daju zrele ćelije krvi (Slika 2). Sposobnost samoobnove matičnih ćelija hematopoeze postepeno se smanjuje, kako se povećava njihova diferencijacija.



**Slika 2.** Šema humane hematopoeze (adaptirano iz Silverthorn, 2006).

Pod normalnim uslovima samo mali broj humanih matičnih ćelija (*engl.* human stem cell, HSC) i progenitorskih ćelija se može naći u perifernoj krvi. Tretman citokinima, posebno granulocitnim faktorom rasta (*engl.* granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) može dovesti do migracije velikog broja matičnih i progenitorskih ćelija iz kostne srži u perifernu cirkulaciju. U normalnim uslovima broj i ukupna masa svakog tipa ćelija krvi u cirkulaciji ostaje relativno konstantna.

Progenitorske ćelije hematopoeze pokazuju značajan proliferativni potencijal sa kapacitetom za brzo regovanje na stimulse sredine koji signaliziraju za ekspanziju diferencirane ćelijske populacije (Seaberg i Van Der Kooy, 2003).

### 1.3. Transplantacija matičnim ćelijama hematopoeze

Transplantacija matičnim ćelijama hematopoeze (*engl.* hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) je oblik lečenja koji omogućava lečenje brojnih urođenih i stečenih bolesti. U Tabeli 1. prikazane su bolesti kod kojih se kao vid lečenja koristi HSCT kao i oblici transplantacije.

**Tabela 1.** Indikacije za transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze kod dece i oblik transplantacije (Tabela preuzeta iz Marisavljević i sar., 2012).

dijagnoza	status bolesti	alogeni HSCT ISD	alogeni HSCT NID	alogeni HSCT S/NDPD	autologna HSCT
AML	CR1 (nizak rizik)	GNP	GNP	GNP	GNP
	CR1 (visoki rizik)	ST	KO	GNP	ST
	CR1 (veoma visok rizik)	ST	ST	KO	KO
	CR2	ST	ST	ST	ST
	>CR2	KO	R	R	GNP
LLA	CR1 (nizak rizik)	GNP	GNP	GNP	GNP
	CR1 (visok rizik)	ST	ST	KO	GNP
	CR2	ST	ST	KO	KO
	>CR2	ST	ST	KO	KO
CML	hronična faza	ST	ST	R	GNP
	faza akceleracije i blastne transformacije	ST	ST	R	GNP
Hodgkinov limfom	CR1	GNP	GNP	GNP	GNP
	prvi recidiv, CR2	KO	R	GNP	ST
Non-Hodgkinov limfom	CR1 (nizak rizik)	GNP	GNP	GNP	GNP
	CR1 (visok rizik)	KO	KO	GNP	KO
	CR2	ST	ST	KO	KO
MDS		ST	ST	D	GNP
primarne imunodeficijencije		ST	ST	ST	NR

Nastavak Tabele 1.

talasemija major bolest srpastih ćelija (visoki rizik)	ST	KO	GNP	NR
aplastična anemija	ST	ST	KO	NR
Fankonijeva anemija	ST	ST	KO	NR
Blackfan Diamond anemija	ST	KO	GNP	NR
hronična granulomatozna bolest	ST	ST	KO	NR
Kostman-ova bolest	ST	ST	GNP	NR
mukopolisaharidoza tip 1 (Hurler)	ST	ST	KO	NR
mukopolisaharidoza Hurler Scheie	GNP	GNP	GNP	NR
mukopolisaharidoza tip VI	KO	KO	KO	NR
osteopetroza	ST	ST	ST	NR
ostale bolesti taloženja	GNP	GNP	GNP	NR
autoimune bolesti	GNP	GNP	GNP	KO
Sa Ewing, visok rizik, CR>1	R	GNP	GNP	ST
tumori germinativnih ćelija	GNP	GNP	GNP	KO
neuroblastom, visoki rizik	KO	GNP	GNP	KO
neuroblastom CR>1	KO	R	S	
mekotkivni tumori visok rizik, CR>1	R	R	GNP	KO
Wilmsov tumor CR>1	GNP	GNP	GNP	KO
tumori mozga	GNP	GNP	GNP	KO
osteosarkom	GNP	GNP	GNP	R

\*legenda: ST - standardna terapija; KO - klinička opcija; GNP - generalno se ne preporučuje; NR - ne radi se; R - protokoli u razvoju; ISD - identični srodni davalac; NID - nesrodni identični davalac; S/NDPD - srodni/nesrodni delimično podudaran davalac; AML - akutna mijeloidna leukemija, LLA - akutna limfoblastna leukemija; CML - hronična mijeloidna leukemija; MDS - mijelodisplazni sindrom; CR.-kompletna remisija; HSCT transplantacija matičnim ćelijama hematopoeze

HSCT može biti autologna, kada se bolesniku daju sopstvene HSC ili alogena, kada je davalac HSC druga osoba. Tip HSCT određuje se na osnovu bolesti i dostupnosti davaoca. Kod bolesnika sa solidnim tumorima prvenstveno se primenjuju autologne, a kod bolesnika sa stečenim i urođenim bolestima hematopoeznog sistema alogena HSCT. Danas se koriste tri izvora HSC i to: kostna srž, periferna krv i krv pupčanika. Odluka o izboru izvora HSC zavisi od osnovne bolesti, stadijuma bolesti i uzrasta bolesnika (Marisavljević i sar., 2012).

Za autologe HSCT kod većine bolesnika (više od 98%) koriste se HSC iz periferne krvi pokrenute kombinovanom citostatskom terapijom i G-CSF (protokol mobilizacije HSC), čijom se primenom postiže brži oporavak hematopoeznog sistema (Porth i Matfin, 2009).

Istraživači širom sveta pokušavaju da upoznaju mehanizame koji stoje u osnovi funkcionisanja matičnih ćelija hematopoeze. Jedno od značajnijih otkrića je da su funkcionalne karakteristike matičnih ćelija hematopoeze regulisane redoks mehanizmima. U zavisnosti od njihovog stanja u organizmu (mirovanje, diferencijacija, programirana ćelijska smrt) i metaboličke funkcije ćelija su značajno izmenjene. Primećeno je da se u toku proliferacije ćelija povećava produkcija ATP, kao i intermedijera neophodnih za rast i deobu ćelija. Energetski i biosintetski zahtevi ćelija u mirovanju su niži od ćelija u proliferaciji (Vander Heiden i sar., 2009).

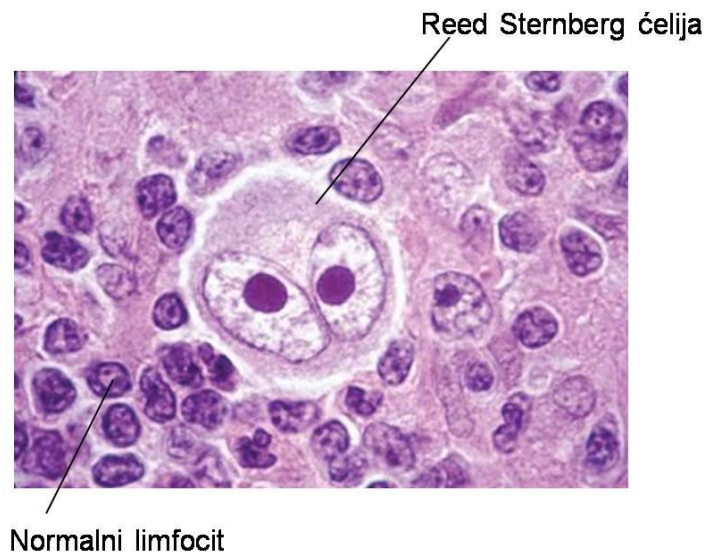
#### **1.4. Limfomi kod dece**

Limfomi su heterogena grupa maligniteta poreklom od limfoidnih ćelija. Čine oko 14% svih maligniteta kod dece do uzrasta od 18 godina. Po učestalosti nalaze se na trećem mestu od svih malignih oboljenja dečijeg doba.

Zbog značajnih razlika u kliničkoj slici i lečenju, izvršena je podela na Hočkinove limfome (HL) i non Hočkinove limfome (NHL) (Smith i sar., 2010).

##### **1.4.1. Hočkinov limfom**

Raniji naziv Hočkinova bolest zamenjen je terminom HL jer je pokazano da multijedarne Reed Sternberg-ove (RS) ćelije koje karakterišu ovu bolest vode poreklo od B limfocita. RS ćelije su krupne (20-50  $\mu\text{m}$ ), bi-nukleisane ćelije (Slika 3). Ove ćelije su maligne, poreklom od B limfocita. CD20 marker, tipičan za B limfocite, nije eksprimiran na RS ćelijama. Klasifikacija HL je učinjena na osnovu zastupljenosti i rasporeda ovih elemenata na histološkom preparatu (Rassidakis i sar., 2002; Bräuninger i sar., 2006).



**Slika 3.** Mikroskopski prikaz normalnog limfocita i RS ćelije (adaptirano sa sajta National cancer Institute).

HL čini približno polovinu svih limfoma kod dece. Deca mlađa od 5 godina retko oboljevaju, a incidencija raste sa uzrastom. Tokom prve decenije života 5-10 puta je češći u dečaka, dok kod adolescenata ne postoji značajna razlika u zastupljenosti među polovima. Češće se javlja među decom u zemljama u razvoju i među onom iz niže socijalne sredine (Smith i sar., 2010).

Češća pojava u pojedinim porodicama ili etničkim grupama govori u prilog genetičkog faktora ili zajedničkog faktora sredine. Učestalost HL među bliskim rođacima je veća nego među daljim rođacima. Deca sa primarnim i sekundarnim imunodeficijencijama imaju veći rizik da obole od HL. Često prisustvo genoma Epstein-Barr virusa (EBV) u tumorskom tkivu potkrepljuje ulogu EBV u patogenezi (Lash i sar., 2014).

HL se u oko 80% dece manifestuje bezbolnom cervikalnom ili supraklavikularnom limfadenopatijom. Većina dece ima zahvaćene limfne čvorove, eventualno slezinu, dok je u oko 20% prisutna ektranodalna lokalizacija (pluća, jetra, kosti i kostna srž). Medijastinalna lokalizacija se nalazi u oko 75% adolescenata i može biti asimptomatska. Oko 20% dece ima veliku tumorsku masu, tj. perifernu limfadenopatiju dijametra  $> 10$  cm ili medijastinalnu limfadenopatiju veću od  $1/3$  dijametra grudnog koša. Nespecifični simptomi poput zamora, anoreksije, gubitka težine, svraba i noćnog znojenja prisutni su u oko 25% dece (De Vita i sar., 2011).

Dijagnoza se postavlja histološkom i imunohistohemijskom analizom u tkivu tumora dobijenog biopsijom tumora. Pregled krvne slike, rutinske biohemijske analize, određivanje

reaktanata akutne faze, biopsija kostne srži i vizualizacione tehnike služe za određivanje stadijuma bolesti, faktora rizika i izbora terapije. Parametri loše prognoze su: povišena temperatura, noćno znojenje i gubitak težine > 10% u roku od 6 meseci pre postavljanja dijagnoze, velika tumorska masa, ubrzana sedimentacija eritrocita, leukocitoza, limfopenija, anemija, loš odgovor na terapiju i klinički stadijum bolesti. Statistički češće se javlja kod dečaka, nego kod devojčica (Hellman i Ed, 1999).

Zavisno od stadijuma bolesti lečenje se sprovodi kombinovanom hemioterapijom, radioterapijom ili hemio i radioterapijom, a kod bolesnika koji imaju loš odgovor na prvu terapijsku liniju ili imaju recidiv bolesti primenjuje se HSCT.

#### 1.4.2. Non Hočkinov limfom

NHL dečijeg doba prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (SZO) su podeljeni u: zrele B limfome, limfoblastne limfome (LBL) i anaplastične krupnoćelijske limfome (ALCL) (Tabela 2.).

**Tabela 2.** Zastupljenost NHL kod dece.

Patohistološki tip NHL	učestalost %
Zreli B limfomi	
Burkitt-ov limfom (BL)	40
Difuzni krupnoćelijski B limfom (DLBCL)	10
B limfom sa karakteristikama između BL i DLBCL (prelazni BL/DLBCL)	nepoznat
Prekursorske limfoidne neoplazme (limfoblastni limfomi)	
B limfoblastni limfomi (pB - LBL)	5
T limfoblastni limfomi (T - LBL)	20
Anaplastični krupnoćelijski limfom (ALCL) T ili "nula" tipa	15
Retki podtipovi	10

NHL se veoma retko javlja pre treće godine života, a incidencija raste sa uzrastom. NHL je 2-3 puta češći kod dečaka. Primećene su razlike u distribuciji i imunofenotipu NHL zavisno od geografske širine.

Primarne i sekundarne imunodeficijencije, zbog odsustva imunske kontrole nad maligno izmenjenim limfoidnim ćelijama, takođe predstavljaju faktor za nastanak NHL. Veća je učestalost NHL kod bolesnika sa primarnom i sekundarnom imunodeficijencijom.

Zbog prisustva genoma EBV u tumorskom tkivu endemskih oblika Burkitt-ovog limfoma (BL), kao i većine pacijenata sa sporadičnim oblikom BL, predpostavlja se da EBV ima ulogu u nastanku NHL (Küppers i sar., 2002).

Identifikacija i uloga onkogeni i tumor supresorskih gena je još uvek predmet naučnih istraživanja (Patte i sar., 2007).

Klinička slika NHL zavisi od tipa, lokalizacije, rasprostranjenosti i veličine tumorske mase. Može se javiti bilo gde u organizmu gde ima limfoidnog tkiva. Najčešće se javlja u trbuhu, sredogruđu i na vratu.

Bitna karakteristika NHL dečijeg doba je da imaju brz i agresivan tok zbog čega se dijagnoza, kod većine bolesnika, postavlja u uznapredovaloj fazi bolesti.

Najznačajniji prognostički parametri su raširenost bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze, imunofenotipske karakteristike tumorskog tkiva i prisustvo ili odsustvo citogenetskih aberacija. Kombinovanom, intenzivnom hemioterapijom kod 70-75% dece obolele od T-ćelijskog NHL, 80-85% B-ćelijskog NHL i 60% ALCL postiže se višegodišnja remisija (National Cancer Institute, 2004; Patte i sar., 2007).

Savremeni terapijski protokoli za lečenje recidiva bolesti, ili u slučaju lošeg odgovora na inicijalnu terapiju, uključuju i primenu visokodozne hemioterapije sa autolognom HSCT.

Savremeni pristup lečenju non Hočkinovog limfoma doprineo je većem procentu izlečene dece.

U toku su ispitivanja novih vrsta terapije, kao što su specifična monoklonska antitela (anti-CD20, anti-CD22, anti-CD30 i druga), radioimunokonjugati i graft-versus-limfom efekat nakon alogene transplantacije (Cang i sar., 2012).

## **1.5. Neuroblastom**

Neuroblastom (NB) je najčešći ekstrakranijalni solidni tumor dečijeg doba. Odlikuje se širokim spektrom kliničkih manifestacija, od spontane regresije do brze progresije i smrtnog ishoda, što ga i posle 150 godine od prvog opisa (Rudolf Virchow) čini najvećom enigmom dečije hematološke patologije. Potiče od ćelija neuralnog grebena, od kojih se razvijaju srž nadbubrežnih žlezda i simpatički nervni sistem. Zbog ekstremne kliničke različitosti pojedini autori smatraju da se neuroblastom sastoji od dve različite bolesti. Kod dece uzrasta preko godinu dana, u više od 75% bolest je diseminovana, s agresivnim tokom i lošom prognozom. Nasuprot tome, kod odojčadi bolest je hemosenzitivna i postiže se izlečenje u visokom procentu. Moguća je spontana regresija kod raširenog oblika bolesti u prvoj godini

života. Ova različitost je u korelaciji sa kliničkim i biološkim faktorima, kao što su stadijum bolesti, uzrast bolesnika, histologija tumora i citogenetičke i molekularne promene (Bernard i sar., 2008).

Incidencija NB je 1.3 na 100 000 dece, a po učestalosti malignih bolesti je na četvrtom mestu. Neuroblastom čini 8% svih malignih tumora dečijeg doba. Srednji uzrast u vreme postavljanja dijagnoze je 22 meseca, a preko 90% obolele dece je uzrasta ispod 5 godina. Najveći broj obolele dece je uzrasta između druge i treće godine. Javlja se sporadično, a kod 2-3% bolesnika pozitivna je porodična anamneza (Kemshead i sar., 1992).

Najčešća primarna lokalizacija NB je retroperitoneum, srž nadbubrežnih žlezda (35%) i paraspinalne ganglije (30-35%), a retke lokalizacije su zadnji medijastinum (20%), mala karlica (2-3%), vrat (1-5%), kao i timus, pluća, bubreg, prednji medijastinum, želudac i kauda ekvina. Kod manje od 5% bolesnika sa diseminovanom bolešću nije moguće otkriti primarnu lokalizaciju tumora.

Ćelije NB sintetišu i luče kateholamine (epinefrin, norepinefrin i dopamin) čiji se metaboliti, vanilmandelična kiselina (VMA) i homovanilična kiselina (HVA), mogu detektovati u urinu, serumu ili tumorskom tkivu. Neuroblastom je sekretorno aktivan kod više od 95% bolesnika (Strenger i sar., 2007).

Neuroblastom se odlikuje velikim brojem kliničkih znakova i simptoma, zavisno od primarne lokalizacije, raširenosti i bioloških karakteristika tumora (Friedman i Castleberry, 2007).

Zlatni standard u postavljanju dijagnoze neuroblastoma je ispitivanje tkiva primarnog tumora ili metastaza histopatološkim ili imunohistohemijskim metodama. Kod bolesnika sa diseminovanom bolešću, kada inicijalno nije moguća hirurška intervencija, za postavljanje dijagnoze NB dovoljno je prisustvo ćelija neuroblastoma u kostnoj srži, u vidu rozeta, uz povišene vrednosti metabolita kateholamina u urinu. Biopsiju ili ekstirpaciju tumora treba uraditi kada je to moguće, pošto je tumorsko tkivo neophodno za određivanje genetičkih markera.

Proučavanje biologije NB počinje pre više od 20 godina otkrićem „double minut” hromozoma (DMs), homogeno obojenih regiona (*engl.* homogeneously stained region, HSRs) i delecije kratkog kraka hromozoma 1 (del 1p36), kao specifičnih genetičkih markera za NB.

Kao i za većinu malignih bolesti, određivanje stadijuma bolesti značajan je prognostički parametar, a citogenetski parametar je odsustvo ili prisustvo N-myc onkogena u tumorskom tkivu (Look i sar., 1991).



Bolesnici oboleli od NB mogu se svrstati u tri grupe: grupa niskog, intermedijarnog i visokog rizika. Podela prema grupama rizika je značajna pri donošenju odluke o terapiji.

Tendencija je da se kod bolesnika koji su u grupi niskog ili intermedijarnog rizika primeni manje agresivna terapija, za razliku od grupe visokog rizika.

Terapija se bazira na kombinaciji hirurškog zahvata, radijacionoj terapiji i hemioterapiji. Kod dece sa tumorom visokog rizika za lečenje se koristi visoko dozna hemioterapija, te je potrebno uraditi i autolognu transplantaciju PBSC (Landestein i sar., 2008).

## **1.6. Juingov sarkom**

Ovo oboljenje je prvi put, kao tumor, opisao Džejms Juing (James Ewing) 1920. godine i ustanovio da se razlikuje od limfoma i drugih tipova tumora opisanih u to vreme (Ewing, 1921), pa je po njemu i nazvan.

ES predstavlja tumor maligne prirode koji se može naći u kostima, ali i u mekom tkivu. Najčešće mesto razvoja ove vrste tumora je karlica, femur, humerus, rebra, ključna kost, ali se može naći u bilo kom delu tela.

U pitanju je tumor koji može biti mezodermalnog i ektodermalnog porekla, što ga čini vrlo teškim za klasifikovanje (Longtin, 2003).

Uzrok nastanka ove vrste sarkoma su translokacije gena. Dokazano je da Juingov sarkom nastaje kao rezultat translokacije između hromozoma 11 i 22, 7 i 22, 21 i 22. Translokacija EWS gena sa hromozoma 22 na Fli-1 gen hromozoma 11 generiše fuziju 5' transaktivacionog domena EWS sa 3' domena na Fli-1. Rezultat ove fuzije je stvaranje onkoproteina, EWS/Fli-1, koji se ponaša kao aberantni transkripcioni aktivator, sa snažnom sposobnošću transformacije (Ohno i sar., 1993).

Statistički podaci ukazuju da se ES može javiti u bilo kom uzrastu, ali se najčešće javlja u populaciji mlađoj od 20 godina i češće je javlja kod dečaka nego kod devojčica. Odnos obolelih dečaka u odnosu na devojčice je 1.6:1 (Burt i sar., 1993). U pitanju je drugi po zastupljenosti maligni tumor kostiju kod mlađih osoba i tumor kostiju sa najvećim mortalitetom.

Simptomi ES mogu biti bol u kostima i otok mekog tkiva. Bol se može javljati naizmenično i biti različitog inteziteta. Moguća je pojava povišene temperature, groznice, noćnog znojenja, kao i gubitka apetita i telesne težine.

Kod svakog četvrtog pacijenta, u vreme postavljanja dijagnoze, mogu biti prisutne metastaze na plućima, kostima, kostnoj srži ili pleuri.

Dijagnoza se postavlja na osnovu kliničke slike, radioloških ispitivanja i patohistološke analize tumorskog tkiva. Obavezno je uraditi punkciju i biopsiju kostne srži da bi se potvrdila ili isključila infiltracija iste.

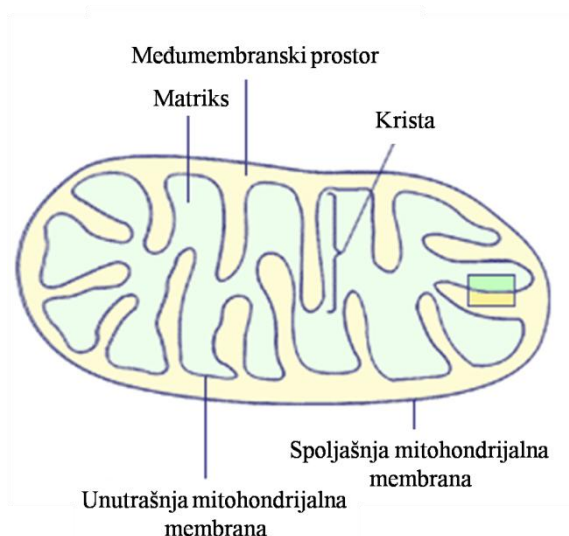
Savremeni terapijski protoli za lečenje ES podrazumevaju primenu multimodalne terapije: kombinovana citostatka terapija, radioterapija i zračenje. Kod bolesnika koji su inicijalno svrstani u grupu visokog rizika ili imaju recidiv bolesti savremeni terapijski protokoli podrazumevaju primenu visokodozne hemioterapije sa autolognom HSCT.

Većina pacijenata sa ES može biti izlečena. Primećeno je da devojčice i mlađi pacijenti imaju bolji odgovor na preoperativnu terapiju. U slučaju da se bolest vrati može se primeniti isti tretman koji podrazumeva operaciju, radijacionu terapiju i/ili hemioterapiju (Ferrari i sar., 2007).

Petogodišnje preživljavanje je oko 60%, kod primarno lokalizovanih tumora bez metastaza, a dugoročno preživljavanje kod postojanja sekundarnih metastaza i pored terapije je samo oko 10%.

### 1.7. Mitohondrije: izgled i funkcija

Svi procesi koji se odvijaju u ćelijama, kao i održavanje njihove strukture i funkcije, zahtevaju energiju. Hemijska energija u formi adenzin-trifosfata (ATP) je osnovni energetski izvor ćelijskih potreba, sa mogućnošću konvertovanja u sve druge energetske forme. Postoji dinamička ravnoteža potrošnje i sinteze ATP u ćelijama. Obnavljanje ATP, koje je od suštinskog značaja za život ćelije, u najvećem obimu odigrava se u mitohondrijama.



Slika 4. Izgled mitohondrije (adaptirano iz Nelson i Cox, 2013).

Metabolički aktivne ćelije (jetre, bubrega, mišića, mozga) sadrže veliki broj mitohondrija. Uopšteno, broj mitohondrija u ćelijama se kreće od nekoliko desetina (spermatozoidi), preko nekoliko hiljada do stotina hiljada (jajna ćelija). S druge strane, eritrociti ne sadrže mitohondrije. I broj mitohondrija i kopija DNK u njima (mtDNK) je varijabilan, zavisi od energetske potrebe tkiva i podložan je dinamičkoj reorganizaciji.

Izgled mitohondrija je takođe varijabilan, različit od ćelije do ćelije (sferičan, štapičast, širine od 0.5 do 1  $\mu\text{m}$ , a dužine nekoliko mikrometara). Proces dinamičke reorganizacije mitohondrija podrazumeva i promenu strukture, kao i fuziju ili fisiju mitohondrija u ćelijama.

Jedna od važnih karakteristika mitohondrija je postojanje dve membrane, spoljašnje (glatka, u dodiru sa citoplazmom) i unutrašnje (naborana, ograničava unutrašnjost mitohondrija). Nabori unutrašnje membrane mitohondrija označeni su kao kriste, a prostor koji oivičavaju, unutarkristalni prostor. Kriste mogu varirati po broju, veličini i obliku. Prostor između dve membrane je međumembranski prostor, a prostor oivičen unutrašnjom membranom se naziva matriks (Alberts i sar., 2002).

Spoljašnja mitohondrijalna membrana određuje oblik ove organele. Debljine je 6-7 nm i propustljiva je za određene molekule zahvaljujući prisustvu porina, membranskih proteina. Unutrašnja mitohondrijalna membrana (debljine 5-6 nm) ima nekoliko puta veću površinu od spoljašnje membrane. Npropustljiva je za većinu molekula i jona. Ima visok sadržaj proteina (75%). U njoj se nalaze proteini respiratornog kompleksa (Alberts i sar., 2002).

Metabolički aktivne ćelije imaju mitohondrije sa većim brojem krista. Npr. u mitohondrijama srčanih mišićnih ćelija kriste su mnogobrojne i protežu se kroz celu organelu, dok su u mitohondrijama makrofaga one retke i kratke (Alberts i sar., 2002).

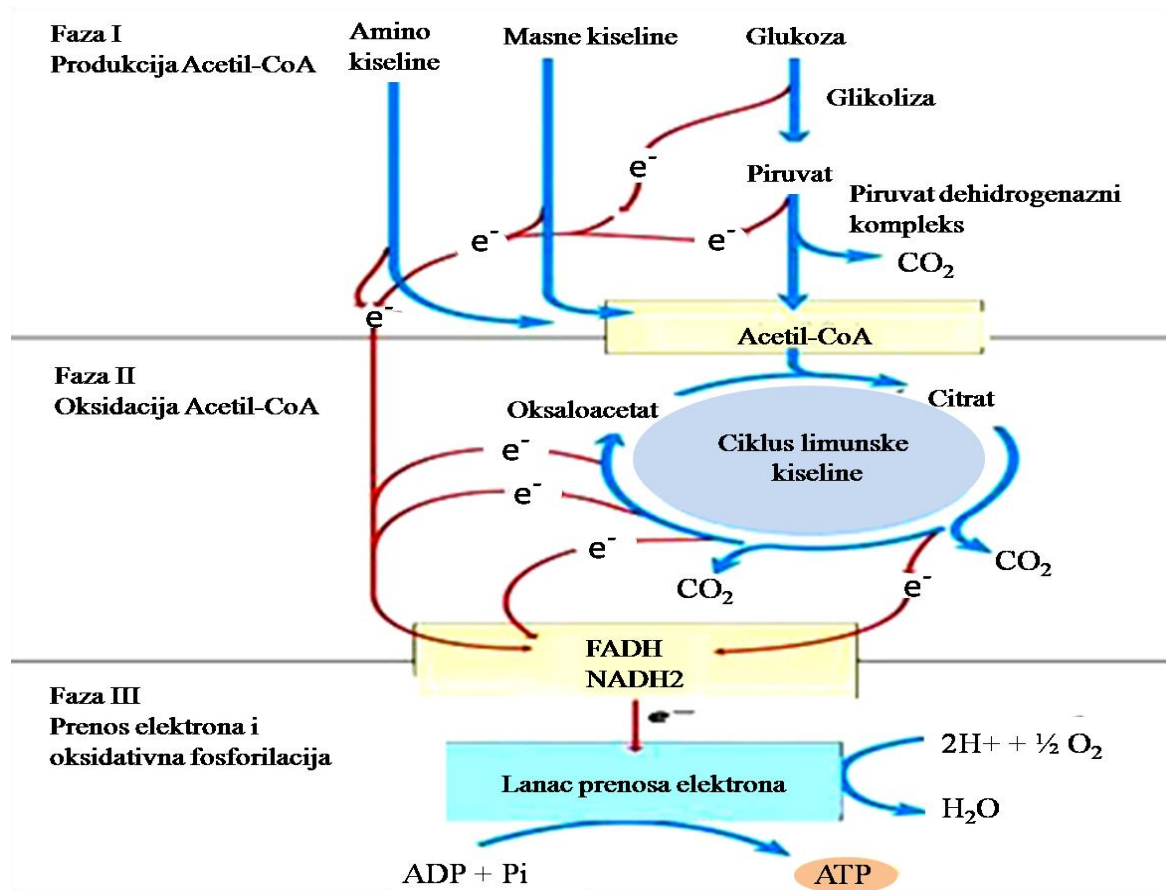
Matriks ispunjava unutrašnjost mitohondrija i sadrži nekoliko stotina enzima koji konvertuju produkte metabolizma ugljenih-hidrata, lipida i proteina.

Mitohondrije sadrže i cirkularnu mtDNK (Alberts i sar., 2002). Humani mitohondrijalni genom ima 37 gena, od kojih 13 kodiraju subjedinice (polipeptide) kompleksa respiratornog lanca (kompleksa I, III, IV i ATP sintaze), 22 kodiraju tRNK, a 2 rRNK (Wallace, 2005; Bonawitz i sar., 2006). Ostale komponente sistema oksidativne fosforilacije, kao i geni za više od hiljadu drugih mitohondrijalnih proteina (enzima), kodirani su nukleusnim genomom, sintetišu se na polizomima u citoplazmi i transportuju u mitohondrije.

Pored produkcije energije (ATP) mitohondrije imaju ulogu i u sintezi prekursora steroidnih hormona (u žlezdanim ćelijama gonada i kore nadbubrega), i hemoglobina, skladištenju jona kalcijuma, apoptozi (programiranoj ćelijskoj smrti) itd (Alberts i sar., 2002).

## 1.8. Energetski metabolizam

Sve funkcije koje obavljaju ćelije zahtevaju energiju. Stvaranje i korišćenje metaboličke energije je fundamentalno za sve ćelijske procese. Energija koju ćelije koriste za sve funkcije, rast i deobu, je hemijska energija u formi ATP.



Slika 5. Ključni putevi energetskog metabolizma (adaptirano iz Nelson i Cox, 2013).

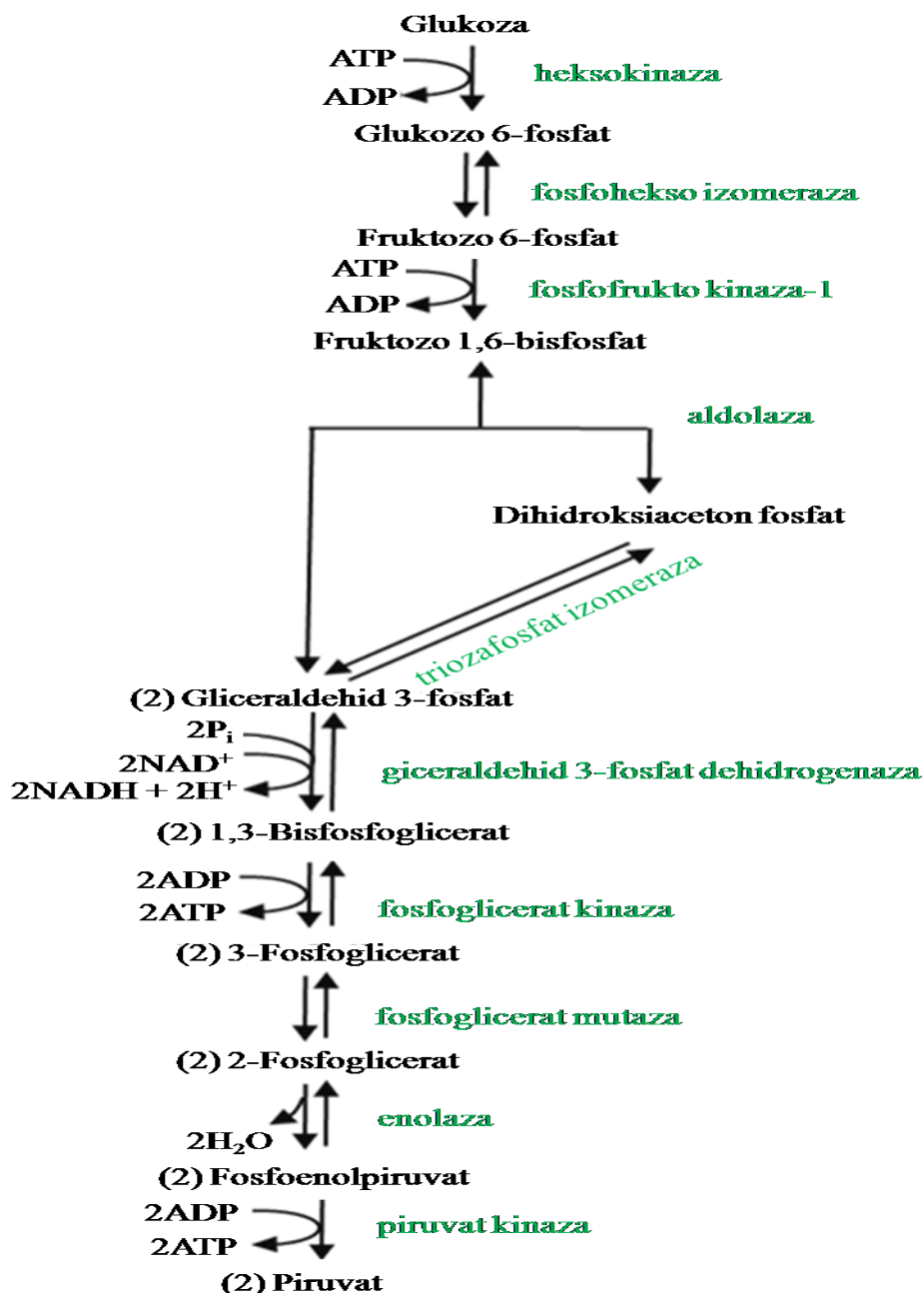
Za većinu živih organizama ključni izvori energije su lipidi i ugljeni hidrati. Složena mreža procesa uključenih u energetski metabolizam je sinhronizovana, povezana i regulisana, kako unutar pojedinačnih ćelija, tako i pojedinih tkiva i organa u organizmu (Slika 5).

### 1.8.1. Glikoliza

Glikoliza je katabolički put glukoze koji se odvija u skoro svim ćelijama, u prisustvu ili odsustvu kiseonika. Glukoza se glikolitički preko 10 povezanih reakcija razlaže do piruvata (Slika 6). Dve početne reakcije glikolitičkog puta (prva i treća) zapravo troše energiju, koristeći ATP za fosforilaciju glukoze do glukozo 6-fosfata, a zatim preko fruktozo 6-fosfata do fruktozo 1,6-bisfosfata. Enzimi koji katalizuju ove dve reakcije, heksokinaza i fosfofruktokinaza-1 (PFK-1), su važne regulatorne tačke glikolitičkog puta. Jedan od ključnih enzima glikolize je i gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH). GAPDH katalizuje konverziju D-gliceraldehid 3-fosfata (G3P) do visokoenergetskog intermedijera 1,3-bisfosfoglicerata (1,3-BPG) (Nelson i Cox, 2013). Pored uloge u glikolitičkom putu, GAPDH je važna u regulaciji apoptoze, metabolizmu gvožđa i ćelijskoj signalizaciji posredovanoj receptorima. Povećana ekspresija i aktivnost GAPDH povezana je sa proliferacijom ćelija i tumorogenezom. Reaktivne vrste smanjuju katalitičku aktivnost GAPDH, što se povezuje sa starenjem ćelija i apoptozom. Izmenjena regulacija GAPDH primećena je kod kancera pluća, bubrega, dojke, želuca, jetre, debelog creva, prostate, pankreasa, mokraćne bešike, glioma i melanoma (Colell i sar., 2009).

Reakcije nakon formiranja fruktozo 1,6-bisfosfata čine deo glikolitičkog puta u kome se proizvodi energija u formi ATP (u reakcijama koje katalizuju fosfoglicerat kinaza i piruvat kinaza) (Cooper, 2000). Neto rezultat glikolitičkog puta su dva molekula ATP i dva molekula NADH (nastaje u reakciji katalizovanoj sa GAPDH). Pored doprinosa u produkciji ATP, jedna od važnih odrednica glikolitičkog puta je doprinos brojnim putevima sinteze biomolekula koji započinju od intermedijera glikolize.

U svim ćelijama glikoliza se odvija u citoplazmi. U eukariotskim ćelijama koje su adekvatno opskrbljene kiseonikom, piruvat kao krajnji produkt glikolize se transportuje u mitohondrije, gde se oksidativnom dekarboksilacijom prevodi u acetil-CoA koji ulazi u ciklus limunske kiseline (Nelson i Cox, 2013). Na taj način se ugljenici glukoze kompletno oksiduju do ugljen dioksida i vode.



Slika 6. Šematski prikaz reakcija glikolitičkog puta.

Doprinos oksidativnoj fosforilaciji u mitohondrijama, osim šećera (glukoze), daju masne kiseline. Da bi se obezbedilo kontinuirano snabdevanje goriva za oksidativni metabolizam, životinjske ćelije skladište masne kiseline u obliku masti i glukoze u obliku glikogena. Kvantitativno, masne kiseline daleko više doprinose ugljeničnim jedinicama od glukoze. Oksidacijom masnih kiselina kao visoko redukovanih goriva, dobija se višestruko više energije nego oksidacijom jednake mase glikogena u svom hidratisanom obliku (Nelson i Cox, 2013).

### 1.8.2. Oksidacija masnih kiselina

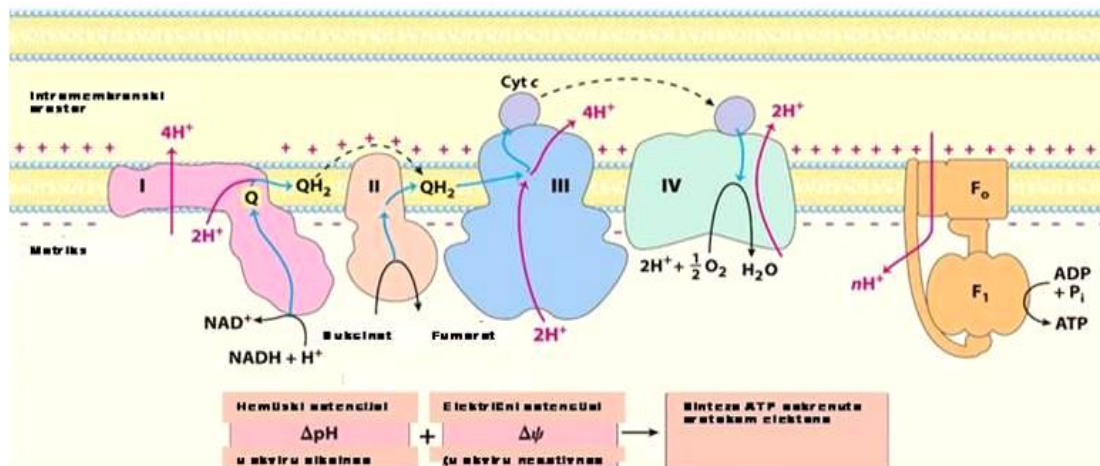
Većina lipida, posebno masnih kiselina čuva se u masnom tkivu i mobilize u skladu sa energetske potrebama organizma. Triacilgliceroli (trigliceridi) su skladišna forma masnih kiselina. Razlaganje masnih kiselina se odvija u mitohondrijama targetnih ćelija u procesu nazvanom  $\beta$ -oksidacija. Kroz četiri reakcije jednog ciklusa  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina oslobađaju se dvougledjениčne jedinice u formi acetil-CoA. Prvi enzim ciklusa  $\beta$ -oksidacije, acil koenzim A dehidrogenaza (ACAD) je i jedno od mesta regulacije ukupnog procesa razgradnje masnih kiselina (Gregersen, 2001). Samom  $\beta$ -oksidacijom i daljim razlaganjem acetil-CoA u ciklusu limunske kiseline, masne kiseline direktno doprinose sintezi ATP i indirektno stvaranjem redukovanih koenzima (NADH i  $FADH_2$ ) (Nelson i Cox, 2013).

Ciklus limunske kiseline (Slika 5), kao centralni metabolički put, akceptuje ugljenike glukoze, masnih kiselina i amino kiselina u formi acetil-CoA.

### 1.8.3. Oksidativna fosforilacija

Mitohondrijalna oksidativna fosforilacija je centralno mesto produkcije energije (ATP). Energija kataboličkih procesa uskladištena u formi redukovanih koenzima se koristi za sintezu ATP. Njihovim oksidovanjem elektroni se predaju kompleksima respiratornog lanca NADH: ubikinon oksido-reduktaza (kompleks I, NADH dehidrogenaza), sukcinat: ubikinon oksido-reduktaza (kompleks II, sukcinat dehidrogenaza), ubikinon: citohrom *c* oksido-reduktaza (kompleks III) i citohrom *c* oksidaza (kompleks IV). Posredstvom nosača elektrona u kompleksima elektroni putuju do kiseonika koji se četvoroelektronski redukuje do vode katalitičkom aktivnošću kompleksa IV (Slika 7). Energija ovog egzergonog procesa (transport elektrona duž respiratornog lanca) se koristi za odvijanje drugog, vektorijalnog procesa, transporta protona iz matriksa mitohondrija u međumembranski prostor, koji je egzergon po prirodi. Transport protona odvija se preko kompleksa I, III i IV (4+4+2 protona po paru elektrona), pa se zato ovi kompleksi nazivaju protonskim pumpama. Na taj način je stvorena koncentraciona razlika protona sa jedne i druge strane unutrašnje mitohondrijalne membrane, koja se označava kao proton pokretačka snaga tj. elektrohemijski potencijal. On sadrži dve vrste energije, hemijski potencijal usled razdvajanja jedne hemijske vrste, protona, i električni potencijal, usled razdvajanja naelektrisanja. Ovako nastala potencijalna energija može se iskoristiti za obavljanje rada ako postoji odgovarajući transduser koji će to moći da uradi. U ovom slučaju, ako se vraćanje protona u matriks (proton pokretačka snaga) iskoristi da se uskladištena energija konvertuje u hemijsku energiju. U unutrašnjoj mitohondrijalnoj

membrani, enzimski kompleks ATP sintaza (nekada označavan i kao kompleks V), ima taj kapacitet da kada se protoni posredstvom njene  $F_o$  subjedinice (transmembranska) vraćaju u matriks, sintetiše ATP iz ADP i neorganskog fosfata ( $P_i$ ) posredstvom svoje katalitičke,  $F_1$  subjedinice (proteže se ka matriksu). Citohrom  $c$  se nalazi u intermembranskom prostoru, uz unutrašnju membranu mitohondrije, noseći elektrone sa kompleksa III na kompleks IV (Nelson i Cox, 2013).



**Slika 7.** Šematski prikaz procesa oksidativne fosforilacije (adaptirano iz Nelson i Cox, 2013).

## 1.9. Antioksidativna odbrana

Smatra se da oko 3% kiseonika koji se koristi u procesu oksidativne fosforilacije, usled parcijalne redukcije biva kanalisano ka produkciji reaktivnih vrsti kiseonika (ROS). Jedno-elektronskom redukcijom nastaje superoksid anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), dvo-elektronskom vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), a redukcijom sa tri elektrona visoko-reaktivni hidroksil radikal ( $\cdot OH$ ). Dosadašnja istraživanja pokazuju da su kompleks III i kompleks I mesta gde nastaje najviše ROS (Phillip West i sar., 2011). Osim u respiratornom lancu,  $O_2^{\cdot-}$  nastaje i na drugim mestima u ćeliji, a jedan od važnih izvora je enzimski kompleks NAD(P)H oksidaza. Ovaj enzim produkuje  $O_2^{\cdot-}$  koristeći NAD(P)H za jednoelektronsku redukciju kiseonika.

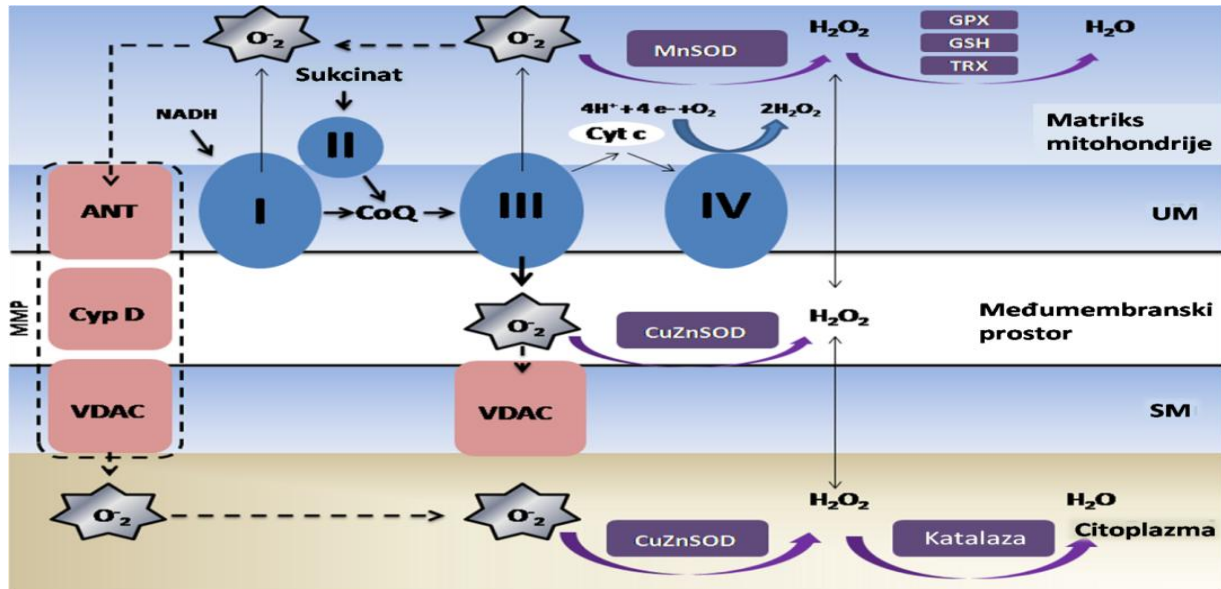
Održavanje redoks ravnoteže u uslovima povećane produkcije ROS postiže se aktivacijom antioksidativne odbrane (*engl.* antioxidant defense, AD) (Halliwell i Gutteridge, 1990; Halliwell i sar., 1992; Johnson, 2002). Primarnu, osnovnu, liniju odbrane čine enzimi: CuZn i Mn superoksid dismutaza (*engl.* superoxide dismutases, SODs), katalaza i glutation peroksidaza (GSH-Px) (Slika 8).

CuZnSOD uglavnom je lokalizovana u citoplazmi i međumembranskom prostoru mitohondrija a MnSOD u mitohondrijalnom matriksu (Majima i sar., 1998; Guan i sar., 1998). Obe izoforme SOD katalizuju istu reakciju, vrše konverziju  $O_2^{\cdot-}$  u  $H_2O_2$ . Vodonik



peroksid nije po hemijskoj prirodi radikal. Uklanjaju ga uglavnom katalaza (u peroksisomima) i GSH-Px (prevashodno lokalizovana u citoplazmi i matriksu mitohondrija).

U uslovima stresa ili bolesti može doći do generisanja većih količina ROS, oštećenja pa i smrti ćelija.



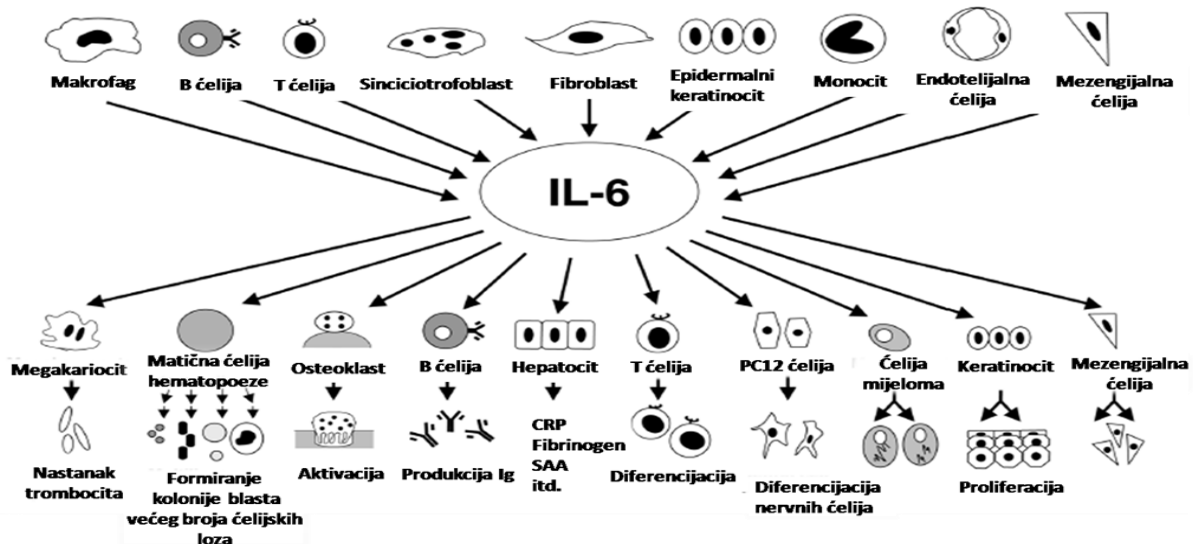
**Slika 8.** Formiranje ROS u ćeliji i antioksidativna odbrana (adaptirano iz Mohammed, 2012). MMP - mitohondrijski membranski potencijal; TRX - tioredoksin; GSH - glutation redukovani; GPX - glutation peroksidaza; VDAC - voltažno zavisni anjonski kanali; ANT - adenin nukleotid translokator; Cyp D - ciklofilin D; CuZnSOD - bakar cink superoksid dismutaza; MnSOD - mangan superoksid dismutaza; SM - spoljašnja membrana; UM - unutrašnja membrana

Osim reaktivnih vrsti kiseonika, postoje i druge, npr. reaktivne vrste azota (RNS). Azot oksid (NO) je slobodni radikal koji nastaje enzimskom akcijom azot oksid sintaze (NOS). Postoje tri izoforme NOS: endotelijalna (eNOS), neuronalna (nNOS) i inducibilna (iNOS). Sve tri izoforme ekspimiraju se u različitim ćelijama, a nazivi ukazuju na njihovo otkriće. Osim njih, za mitohondrije je karakteristična specifična, mitohondrijalna NOS, ali njena karakterizacija nije definisana (Martínez i Andriantsitohaina, 2009).

Pored toga što su reaktivne vrste (ROS i RNS) toksične ako se proizvode u količini koja prevazilazi kapacitet antioksidativne odbrane, one ostvaruju brojne fiziološke uloge. Tako,  $O_2^{\bullet-}$  produkovan NAD(P)H oksidazom u fiziološkim koncentracijama ima brojne uloge u ćeliji, od oplodnje jajne ćelije do sinteze hormona (tiroidni). Azot oksid u fiziološkim okvirima stimuliše mnogobrojne ćelijske procese, uključujući različite aspekte funkcije mitohondrija. Reaktivne vrste imaju važnu ulogu u regulaciji proliferacije i diferencijacije ćelija (Martínez i Andriantsitohaina, 2009).

## 1.10. Interleukin 6 (IL-6)

IL-6, plejotropni citokin, učestvuje u različitim fiziološkim događajima, kao što su: ćelijska proliferacija, diferencijacija, preživljavanje i apoptoza. U prenosu signala IL-6 učestvuje preko JAK/STAT signalne kaskade kojom citokini, hormon rasta i prolaktin prenose signal (Darnell i sar., 1994; Ihle i sar., 1994; Schindler i sar., 1995).

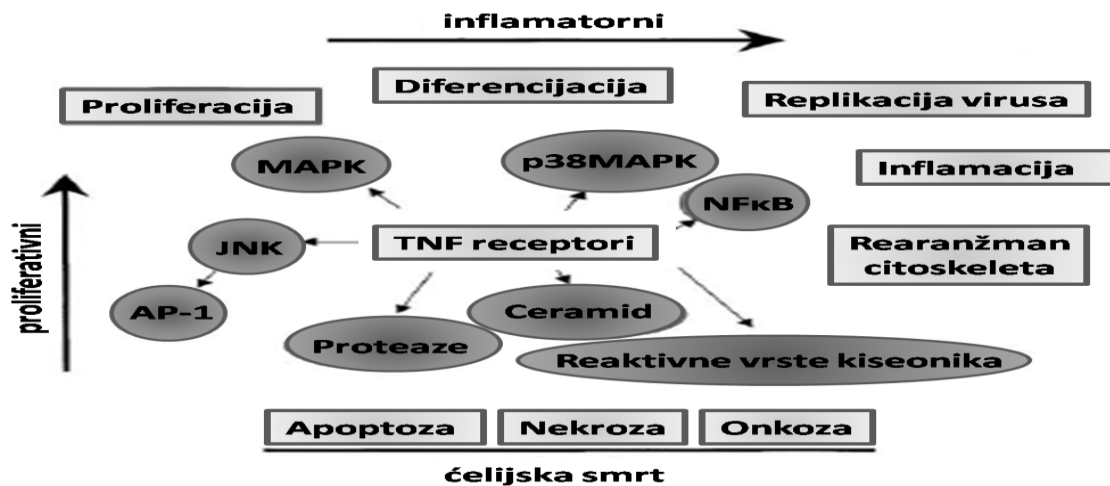


**Slika 9.** IL-6 produkujuće ćelije (gornji deo slike) i biološka aktivnost IL-6 (donji deo slike) (adaptirano iz Naka i sar., 2002)

IL-6 produkuju limfoidne i nelimfoidne ćelije, kao što su T i B limfociti, monociti, fibroblasti, keratinociti, endotelne, mezengijalne ćelije, i neke vrste tumorskih ćelija (Kishimoto i sar., 1995). IL-6 indukuje rast T ćelija, kao i diferencijaciju citotoksičnih T limfocita (Noma i sar., 1987; Okada i sar., 1988). IL-6 deluje sinergistički sa IL-3 pomažući u formiranju kolonija blast ćelija hematopoeze. (Ogawa, 1993). IL-6 indukuje diferencijaciju makrofaga (Nicola i sar., 1983), megakariocita (Ishibashi i sar., 1987) i osteoklasta (Tamura i sar., 1993). Kod akutne zapaljenske reakcije, ovaj citokin stimuliše hepatocite da produkuju karakteristične proteine: C-reaktivni protein (CRP), fibrinogen,  $\alpha$ 1-antitripsin i serum amiloid A (Castell i sar., 1988) i suprimira produkciju albumina (Andus i sar., 1987). IL-6 deluje kao faktor rasta kod nekih vrsta tumora, na primer: plazmocitom (Nordan i sar., 1987), multipli mijelom (Kawano i sar., 1988) i karcinom renalnih ćelija (Miki i sar., 1989).

### 1.11. Faktor nekroze tumora $\alpha$ (TNF $\alpha$ )

Faktor nekroze tumora  $\alpha$  (*engl.* tumor necrosis factor, TNF $\alpha$ ) je verovatno najmoćniji induktor nekoliko puteva prenosa intracelularnih signala, uključujući apoptozu, diferencijaciju ćelija i transkripciju gena (Slika 10.).



Slika 10. Ćelijski mehanizmi posredovani TNF $\alpha$  receptorima (adaptirano iz Macewan, 2002).

Aktivirani TNF receptori posreduju u regulaciji različitih signalnih puteva. Receptori TNF $\alpha$  (TNFR; do danas detektovano 29) su uključeni u aktivaciju mitogen aktivirajuće protein kinaze (MAPK) i c-Jun N-terminal kinaze (JNK), aktivaciju kaspaze, stimulaciju lipaze i indukciju proteaze. Aktiviranjem ovih signalnih puteva, TNF $\alpha$  posreduje u pokretanju mehanizama apoptoze ili preživljavanja ćelija (Arch i Thompson, 1999; Locksley i sar., 2001). Takođe je sugerisano da TNF $\alpha$  menja permeabilitet mitohondrijske membrane, što dovodi do oslobađanja citohroma *c*, oslobađanja i aktivacije kaspaza i apoptoze (Rutka i sar., 1988; Pastorino i sar., 1996; Higuchi i sar., 1998; De Vos i sar., 1998; Bradham i sar., 1998; Chandel i sar., 2001). Novija saznanja o povezanosti TNF $\alpha$  indukovanog signalnog puta sa produkcijom ROS su protivurečna tako da mehanizam ovog signalnog puta nije jasan (Chandel et al., 2001).

Vrlo je intrigantno kako jedan ligand može generisati toliko različitih ćelijskih odgovora. Pretpostavlja se da je razlog ovome što TNF $\alpha$  receptori prilikom aktivacije ne "radi" uvek na isti način, tj. ne generiše uvek isti mehanizam. Istraživači pretpostavljaju da mehanizam ćelijskog odgovora zavisi od trenutnog okruženja (uslova) u ćeliji, kao i od tipa ćelija i tkiva (Macewan, 2002).

Istraživanja i saznavanja činjenica o mehanizmima i signalnim putevima koje pokreće TNF $\alpha$  može otvoriti nove mogućnosti u terapiji različitih oboljenja.

## ***2. Cilj rada***

I pored velikog razvoja, još uvek se suočavamo sa problemima u lečenju pacijenata sa HL, NHL, NB i ES. Još uvek nije potpuno jasno zašto postoje razlike u brzini oporavka hematopoeze (vremenu prihvatanja kalema) posle HSCT kod pacijenata sa istim oboljenjima, kod kojih su primenjeni istovetni mobilizacioni protokoli i režimi kondicioniranja. Dosadašnja ispitivanja na animalnim modelima, *in vitro*, kao i *in vivo* studije, ne pružaju potpunu sliku o pokrenutim molekulskim mehanizmima.

Za sagledavanje terapijskog potencijala matičnih ćelija od značaja je poznavanje njihovog energetskog tj. metaboličkog statusa.

Ciljevi ove doktorske disertacije su :

1. Ispitati metaboličke parametre u matičnim ćelijama hematopoeze periferne krvi bolesnika sa solidnim tumorima (NB, Ewing Sarcoma) i limfoma (HL i NHL):

- parametre energetskog metabolizma: glikolize,  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina, ciklusa limunske kiseline, procesa oksidativne fosforilacije i same sinteze ATP;
- funkcionalni status mitohondrija i nivo mtDNK;
- ekspresiju NOX (NADPH oksidaze), kao važne komponente produkcije superoksid anjon radikala;
- ekspresiju izoformi azot oksid sintaza i produkciju azot oksida;
- nivo najvažnijih komponenti antioksidativne odbrane matičnih ćelija hematopoeze;
- ekspresiju IL-6 i TNF $\alpha$ , citokina sa multifunkcionim efektima.

2. Uporediti rezultate ispitivanja pacijenata bez primene i posle primene protokola mobilizacije hematopoeznih matičnih ćelija kostne srži.

3. Uporediti rezultate dobijene iz uzoraka obe grupe pacijenata sa tumorima sa rezultatima dobijenih iz uzoraka monojedarnih ćelija zdravih subjekata.

4. Ispitati mogući uzročno-posledični odnos ispitivanih parametara i vremena prihvatanja kalema posle autologe transplantacije matičnim ćelijama hematopoeze.

Svi nabrojani parametri praćeni su u monojedarnim ćelijama periferne krvi pacijenata kod kojih nije primenjen mobilizacioni protokol, tj. koji nisu primili kombinovanu hemioterapiju i G-CSF; kod kojih je primenjen mobilizacioni protokol (primili kombinovanu hemioterapiju i G-CSF i zdravih osoba kao kontrolnih subjekata.

Rezultati treba da doprinesu, produbljivanju saznanja o molekulskim mehanizmima uključenih u održanje energetskog metabolizma i funkcije mitohondrija matičnih ćelija hematopoeze periferne krvi i otvore puteve za nove pristupe u dijagnostici i terapiji tumora.

### ***3. Materijal i metode***

### 3.1. Pacijenti i kontrolna grupa

Ispitivanja su rađena na uzorcima monojedarnih ćelija koje su podeljene u tri grupe:

- pacijenti koji su primali mobilizacioni protokol (MP),
- pacijenti koji nisu primali mobilizacioni protokol,
- zdrave osobe, kontrola.

Grupa pacijenata koji su primali protokol mobilizacije obuhvatala je 35 pacijenata obolelih od HL, NHL, NB i ES. Od 35 pacijenata ove grupe ispitivanja su rađena na 27 uzoraka. Podaci za broj dečaka, devojčica i njihov uzrast prikazani su u Tabeli 3.

**Tabela 3.** Distribucija pacijenata koji su primali MP po dijagnozi, polu i uzrastu.

Tip tumora	Pol*		Medijana uzrasta (godine)
	dečaka	devojčica	
Neuroblastom (NB)	5	3	3,1
Juingov sarkom (ES)	8	1	12,7
Hočkinov limfom (HL)	4	2	10,3
Non-Hočkinov limfom (NHL)	4	0	11,8

Uzorci monojedarnih ćelija pacijenata koji nisu dobijali mobilizacioni protokol dobijeni su iz uzoraka krvi koji su korišćeni za rutinska ispitivanja pre svakog ciklusa redovne hemioterapije.

Kontrolnu grupu činile su zdrave osobe koje su dale saglasnost da učestvuju u sprovedenim ispitivanjima.

### 3.2. Priprema uzoraka

S obzirom da je vrlo zahtevno izdvojiti matične ćelije hematopoeze iz uzoraka nemobilisanih pacijenata i zdravih davalaca (mali broj ćelija u perifernoj krvi i vrlo skupe procedure izdvajanja) ispitivanja su rađena na uzorcima monojedarnih ćelija MNC (*engl.* mononuclear cell). Opšte prihvaćen stav je da se detektovane promene u uzorcima MNC mogu prihvatiti, jer matične ćelije hematopoeze spadaju u grupu monojedarnih ćelija.

### 3.2.1. Mobilizacija matičnih ćelija hematopoeze

Za mobilizaciju PBSC kod pacijenata primenjivani su standardni terapijski protokoli uz G-CSF u dozi 10g/kg/TM (telesne mase).

Mobilizacioni protokoli za svaku pojedinačanu dijagnozu dati su u Tabeli 5.

Uspešnost mobilizacije procenjujeva je brojanjem CD34+ ćelija u krvi metodom protočne citometrije. Mobilizacija se smatra uspešnom kada je njihov broj  $\geq 20/\mu\text{L}$  krvi (Sutherland i sar., 1996). U slučaju slabe mobilizacije (10-19 CD34+ ćelija u  $\mu\text{L}$  krvi) radi prikupljanja dovoljnog broja CD34+ ćelija (u zavisnosti od slučaja): urađen je veći broj afereza, povećan je volumen obrađene krvi pri svakoj proceduri afereze ili je ponovljena mobilizacija uz primenu povećanih doza G-CSF. Cilj afereze bio je da prikupljen broj autolognih CD34+ ćelija bude  $\geq 5 \times 10^6/\text{kg}$  TM primaoca. Kod 35 pacijenata (Tabela 4), uzrasta od 6-75 meseci i telesne težine 7-19 kg, urađena je 49 procedura mobilizacije.

**Tabela 4.** Distribucija pacijenata po, polu i uzrastu kod kojih je urađena procedura afereze.

Karakteristika	Vrednost	Maksimalna-minimalna vrednost
Broj pacijenata	35	-
Pol (muški/ženski)	26/9	-
Telesna masa medijana (kg)	13,5	7-19
Uzrast medijana (meseci)	36	6-75

Uzorci MNC dobijeni aferezom su posle dodavanja krioprotektanta (di metil sulfoksid, DMSO) zamrznuti procedurom programskog zamrzavanja i do primene, tj. autologne HSCT čuvani u tečnom azotu na temperaturi  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Za procenu vijabilnosti kriokonzervisanih uzoraka i sprovedena ispitivanja korišćeni su uzorci afereznih produkata (3 mL) koji su kriokonzervisani u kriotubama.



**Tabela 5.** Mobilizacioni protokoli.

<b>Tip tumora</b>	<b>Tretman (sukcesivno davanje)</b>	<b>Doza (mg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Trajanje (dana)</b>
<b>Neuroblastom</b> (COJEC protokol)	Vinkristin	1.5	1-3
	Etopozid	175	1-3
	Ciklofosfamid	1050	1-2
	Cis-platina	80	1
	+ G-CSF	10 mg/kg/dan	-
<b>Juingov sarkom</b> (EURO protokol)	Ifosfamid	1200	1-5
	Karboplatin	400	1-2
	Etopozid	1000	1-5
	+ G-CSF	10 mg/kg/dan	-
<b>Hoćkinov limfom</b> (HT protokol)	Deksametazon	10	1-5
	Ciklofosfamid	200	1-5
	Adriamicin	25	4 i 5
	Vinkristin	1.5	1
	+ G-CSF	10 mg/kg/dan	-
<b>Non-Hoćkinov limfom</b> (HT protokol)	Deksametazon	10	1-5
	Ciklofosfamid	200	1-5
	Adriamicin	25	4 i 5
	Vinkristin	1.5	1
	+ G-CSF	10 mg/kg/dan	-

Uzorci pacijenata (po 2 iz svake grupe tumora), koji nisu bili podvrgnuti protokolu mobilizacije dobijeni su od pacijenata u toku njihovih redovnih uzimanja uzoraka krvi za analize.

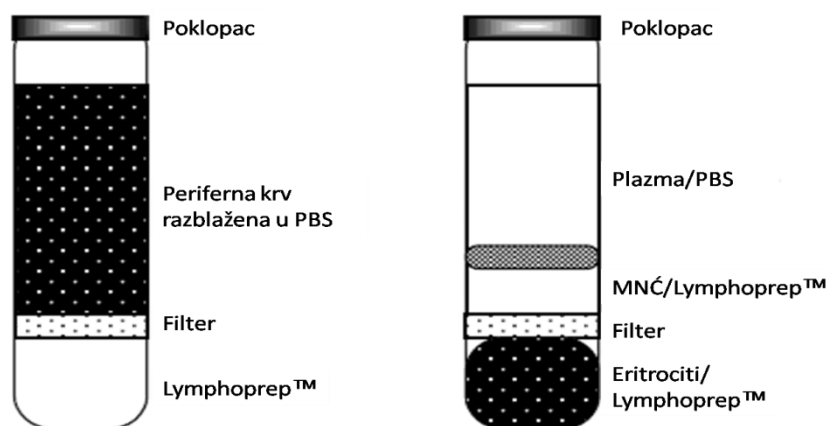
Kontrolnu grupu su činile zdrave osobe koje su dale saglasnost da učestvuju u sprovedenim ispitivanjima.

### **3.2.2. Izdvajanje monojedarnih ćelija iz pune krvi zdravih davalaca i pacijenata koji nisu primali mobilizacioni protokol**

MNC iz pune krvi zdravih davalaca i pacijenata koji nisu dobijali mobilizacioni protokol (6 uzoraka po grupi), izdvojene su uz pomoć gradijentnog medijuma Lymphoprep™ (Nicomed Pharma AS, Oslo, Norway).

Lymphoprep™ je zagrejan na sobnu temperaturu (čuva se na +4 °C). Krv je razblažena fiziološkim rastvorom u odnosu 1:2 (2 mL krvi + 4 mL fiziološkog rastvora). U obeležene epruvete sipano je po 4 mL Lymphoprep™. Pasterovom pipetom ili špricom je lagano, niz zid epruvete (da se ne bi izmešali slojevi), sipana razblažena krv u odnosu 1:1.5 (u 4 mL Lymphoprep™ sipano je 6 mL razblažene krvi). Ovako pripremljene epruvete su pažljivo smeštene u centrifugu (Rotanta 460, Germany) da se slojevi ne izmešaju i centrifugirane 10 minuta na 1200 rpm, bez aktiviranja kočnice na centrifugi. Odmah po završenom prvom centrifugiranju, pokrenut je drugi program centrifugiranja 15 minuta na 3000 rpm, takođe bez aktiviranja kočnice.

Po završenom centrifugiranju u epruvetama odvojili su se slojevi kako je prikazano na Slici 11.



**Slika 11.** Šematski prikaz razdvajanja slojeva u Lymphoprep™ medijumu nakon centrifugiranja.

Pipetom je izdvojen sloj plazme, a zatim pažljivo, kružnim pokretima pokupljen je i prsten MNC. Pokupljene ćelije prebačene su u drugu epruvetu, dodat im je fiziološki rastvor do 10 mL. Ova ćelijska suspenzija centrifugirana je 10 minuta na 2000 rpm (Evans i Middleton, 1970).

Supernatant je aspiriran pipetom, deo taloga ćelija uzet je za proveru vijabilnosti, a ostatak ćelija je posle dodavanja krioprotektanta DMSO, zamrznut tehnikom programskog zamrzavanja i čuvan u tečnom azotu na temperaturi od -196 °C za *Western blot*, *RT-PCR* (*engl.* Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) i imunohistohemijske analize.

### 3.2.3. Izdvajanje monojedarnih ćelija iz krvi pacijenata nakon mobilizacione procedure - Afereza

Proces prikupljanja monojedarnih ćelija (među kojima su i matične ćelije hematopoeze) iz periferne krvi naziva se afereza. Procedura afereze je rađena na polu-automatskom separatoru sa kontinualnim protokom krvi (Cobe Spectra, Version 6.1; Gambro BCT, Lakewood, CO, USA), u programu za kolekciju MNC u skladu sa Nadler i Allen formulom, koja uzima u obzir težinu, visinu i pol pacijenta (Veljkovic i sar., 2011).

Monojedarne ćelije, među kojima su i matične ćelije hematopoeze, prikupljane su procesiranjem 2.5 do 3 puta ukupne zapremine krvi pacijenta. Kontinuirani priliv krvi u separator obezbeđen je preko privremenog katetera u radijalnoj arteriji, femoralnoj ili jugularnoj veni ili preko periferne vene.

Procedurom afereze MNC su odvojene u posebnu kesu a ostali ćelijski elementi i plazma vraćeni pacijentu. Za antikoagulaciju korišćen je rastvor limunske kiseline-dekstroze (*lat.* Acidum Citricum Dextrose, ACD), a u nekim slučajevima kombinacija ACD i heparina. Procedure su trajale od 1.8 do 7 časova (Tabela 6).

Ukoliko je potreban prinos ćelija neophodnih za autolognu transplantaciju bio manji od zahtevanog ( $5 \times 10^6$  CD34+ ćelija/kg TM) procedura prikupljanja ponovljena je narednog dana ili tokom sledećeg terapijskog ciklusa.

Kod 35 dece čija je težina bila manja od 20 kg urađeno je 49 kolekcija PBSC. Karakteristike afereznih produkata prikazane su u Tabeli 6.

**Tabela 6.** Karakteristike afereznih procedura i zapremine prikupljenih produkata.

<b>Parametar</b>	<b>Srednja vrednost</b>	<b>Maksimalna - minimalna vrednost</b>
Broj procedura	2	1-3
Zapremina procesovane krvi (mL/kg/procedura)	320	141-594
Brzina protoka (mL/min)	16	8-28
Vreme trajanja procedure (min)	279	113-420
Zapremina afereznog produkta prikupljenog tokom procedure (mL)	250	98-350

### 3.3. Određivanje broja CD34+ u afereznom produktu metodom protočne citometrije

Pre određivanja broja matičnih ćelija (CD34+) neophodno je odrediti broj leukocita. Broj leukocita određen je na hematološkom analizatoru ACT diff COULTER (Coulter Corp, Miami, USA). Po određivanju ukupnog broja leukocita u afereznom produktu, njihov broj je optimizovan tako da ne bude veći od  $10 \times 10^9/L$  ili  $10\,000/mm^3$ , razblaživanjem PBS ili FACS (*engl.* fluorescence-activated cell sorting) Flow rastvorom (Becton Dickinson, Oxford, UK).

U 2 epruvete (original za protočnu citometriju) dodato je po 100  $\mu L$  uzorka u kome je podešena koncentracija ćelija, a zatim je u epruvetu 1 sipano 100  $\mu L$  uzorka neobojenih ćelija (negativna kontrola), a u epruvetu 2 u 100  $\mu L$  uzorka dodata su monoklonska antitela (MoAt) (Becton Dickinson, Oxford, UK) u količini koja je prethodno određena titracijom. MoAt su bila obeležena fluorescentnim bojama: MoAt Anti-CD<sup>34</sup> PI (propidijum jodid), a MoAt Anti-CD<sup>45</sup> FITC (fluorescein izotiocijanat izomer 1). Uzorak je promešan na vortexu (IKA, Wilmington, USA) 3-4 sekunde i potom inkubiran u mraku 15 minuta na sobnoj temperaturi. Po završenoj inkubaciji u svaku epruvetu dodato je po 2 mL NH<sub>4</sub>Cl rastvora za liziranje (pravljeno u Laboratoriji za protočnu citometriju, Instituta za majku i dete), promešano na vortexu i inkubirano 10 minuta u mraku, na sobnoj temperaturi. Posle inkubacije suspenzija je centrifugirana 5 minuta na 1500 rpm. Po centrifugiranju supernatant je odstranjen, a u talog svake od epruveta dodato je po 0.5 mL FACS Flow rastvora. Merenje je vršeno na FACS protočnom citometru (Becton Dickinson, Oxford, UK), pomoću PAINT-A-GATE softvera, a u skladu sa postupkom koji preporučuje ISHAGE (*engl.* International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) protokol merenja (Sutherland i sar., 1996).

Broj CD34+ matičnih ćelija hematopoeze u uzorku određuje se izračunavanjem na osnovu izmerenog procenta i ukupnog broja leukocita sa hematološkog analizatora. Broj CD34+ matičnih ćelija hematopoeze se izražava brojem ćelija na  $\mu L$  uzorka.

### 3.4. Zamrzavanje periferne krvi bogate matičnim ćelijama hematopoeze i uzoraka MNC

Za potrebe zamrzavanja uzoraka pripremljen je pufer za zamrzavanje dimetil sulfoksid (*engl.* dimethyl sulfoxide, DMSO) (CryoSure-DMSO; WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach/Taunus, Germany) i puferisani fiziološki rastvor (*engl.* buffered physiological saline, PBS) (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany), u odnosu 1:1. Uzorci su zamrzavani sa finalnom koncentracijom DMSO od 10% (Day i sar., 2007).

Pre dodavanja pufera za zamrzavanje uzorci krvi su držani na ledu sa ciljem da se izbegne toksični efekat DMSO. Odmah po mešanju uzorka krvi sa puferom za zamrzavanje

uzorak je razliven u krio tube za zamrzavanje (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany), koje su smeštene u mašinu za programsko zamrzavanje (IceCube1800D; Sy-Lab, Neupurkersdorf, Austria). Proces programskog zamrzavanja MNC obavljen je u skladu sa standardnom operativnom procedurom zamrzavanja periferne krvi Odeljenja za transpalntaciju kostne srži sa laboratorijom za kriobiologiju Instituta za majku idete.

Po završenoj proceduri zamrzavanja krio tube su smeštene u metalne nosače i uronjene u tečni azot (temperatura - 196 °C) i čuvane do upotrebe. (Germann i sar., 2013)

Po istoj proceduri zamrzavaju se i uzorci MNC odvojeni na Lymphoprep™. Razlika u odnosu na zamrzavanje afereznog produkta je što je pre zamrzavanja ovih uzoraka potrebno podesiti koncentraciju ćelija na  $1 \times 10^6/\text{mL}$ .

### **3.5. Ispiranje ćelija od toksičnog krioprotektanta (DMSO)**

Pre ispitivanja zamrznuti uzorak MNC odmrznut je naglim prebacivanjem krio tuba iz tečnog azota u vodeno kupatilo na 37 °C, a potom ispran od DMSO razblaživanjem u PBS u odnosu 1:10. Suspenzija je potom centrifugirana na 1100 rpm/10 min. Deo dobijenog taloga je rասuspendovan u IMDM medijumu (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Life Tehnologies, Glasgow, UK) sa 2% FBS (Fetal Bovine Serum; Stem Cell Tehnologies: Metachem Diagnostics Northampton, UK) i korišćen za ispitivanje vijabilnosti ćelija nakon odmrzavanja, dok je ostatak korišćen za dalja *Western blot*, *RT-PCR* i imunohistohemijska ispitivanja.

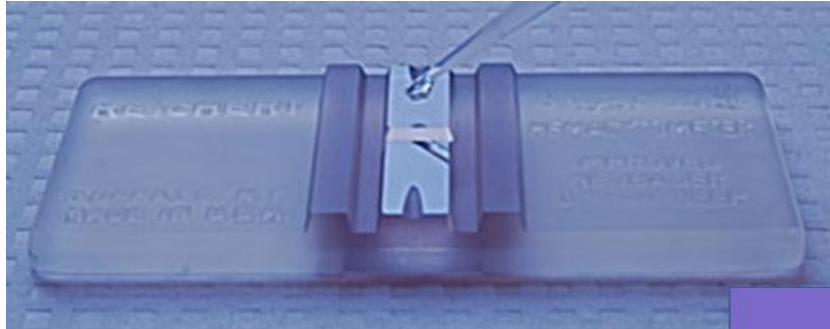
### **3.6. Određivanje vijabilnosti ćelija posle odmrzavanja**

#### **3.6.1. Određivanje vijabilnosti ćelija nakon odmrzavanja metodom Tripan plavo**

Da bi se utvrdio kvalitet produkta pre davanja pacijentu, potrebno je odrediti procenat vijabilnosti, odnosno koliki procenat ćelija je preživeo zamrzavanje. Ovaj parametar je vrlo važan, jer pokazuje kvalitet zamrzavanja. Osim procenta vijabilnosti određuje se i broj granulocitno-monocitnih kolonija (*engl.* colony-forming unit-granulocytes, G-CFU) koje su proizvele matične ćelije po odmrzavanju. Time se određuje kapacitet ćelija za repopulaciju (Necord-FACT international standards). Vijabilnost ćelija određivana je pre zamrzavanja i po odmrzavanju uzorka matičnih ćelija periferne krvi.

Posle centrifugiranja deo taloga je resuspendovan u IMDM medijumu (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Life Tehnologies, Glasgow, UK) sa 2% FBS (Fetal Bovine

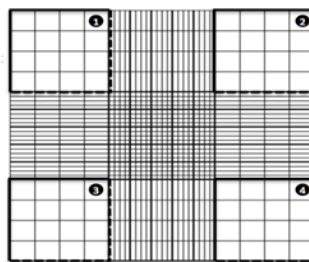
Serum; Stem Cell Technologies: Metachem Diagnostics Northampton, UK), od čega je uzeto 100  $\mu\text{L}$  za brojanje. U uzorak je dodato 100  $\mu\text{L}$  tripan plave boje (Sigma - Aldrich, Poole, UK). Boja i ćelijska suspenzija pomešane su u odnosu 1:1. Po dodavanju boje u suspenziju ćelija uzorak je dobro homogenizovan. Ćelije su brojane na pločici za brojanje, hemocitometru. Pokrovna pločica stavljena je tako da pokrije obe komore na hemocitometru (Slika 12).



**Slika 12.** Hemocitometar za brojanje ćelija.

Uzorak obojenih ćelija nanet je pažljivo između pokrovne pločice i komora hemocitometra, tako da ne uđe vazduh ispod pločice, ali i da se ne sipa premalo i previše uzorka.

Brojane su samo neobojene ćelije, jer su one vijabilne. Ćelije se moraju izbrojati za 3 minuta od trenutka dodavanja boje, jer posle tog vremena boja prodire u ćelije i “ubija” ih.



**Slika 13.** Polja na hemocitometaru u kojima se broje ćelije. Kvadrati 1, 2, 3, 4 imaju stranice dužine 1 mm i 1 mm dubine.

Broj ćelija po mililitru računat je po formuli:

$$\frac{1+2+3+4}{4} \times 10^4 \times \frac{1}{R} = \text{broj ćelija/mL suspenzije}$$

1, 2, 3 i 4 - polja na pločici u kojima se broje ćelije

R - razblaženje uzorka koji je nanet na hemocitometar

Ukupan broj ćelija računat je tako što se broj ćelija po mL pomnoži sa startnom zapreminom (Coligan i sar., 2001).

Da bi se odredio procenat vijabilnosti ćelija, tj. koliki procenat ćelija je preživio zamrzavanje i odmrzavanje izbrojane su sve ćelije na pločici za brojanje, a zatim su izbrojane samo mrtve ćelije i izračunat procenat vijabilnosti po formuli:

$$T / (N \times 100) = \% \text{ vijabilnosti}$$

T - ukupan broj ćelija (žive + mrtve)

N - broj mrtvih ćelija

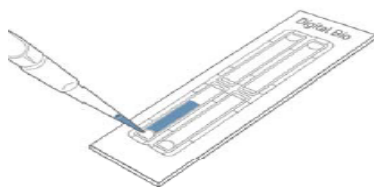
### 3.6.2. Određivanje vijabilnosti ćelija nakon odmrzavanja na automatskom brojaču ćelija

Verodostojnost rezultata dobijenih metodom Tripan plavo nakon odmrzavanja, proverena je na automatskom brojaču ćelija (Advanced Detection & Accurate Measurement, DigitalBio).

Rastvor sa oznakom T (AccuStain Solution T) koji boji sve ćelije sastoji se od PI (propidijum jodid) i rastvora za liziranje ćelija. Rastvor sa oznakom N (AccuStain Solution N), boji samo mrtve ćelije, sastoji se od PI i PBS.

Da bi se odredio ukupan broj ćelija, membrana svih ćelija mora biti lizirana i svi nukleusi obojeni PI. Ovo se postiže bojenjem jednog uzorka sa T rastvorom. U drugom rastvoru žive ćelije ostaju netaknute i samim tim su nebojene (N).

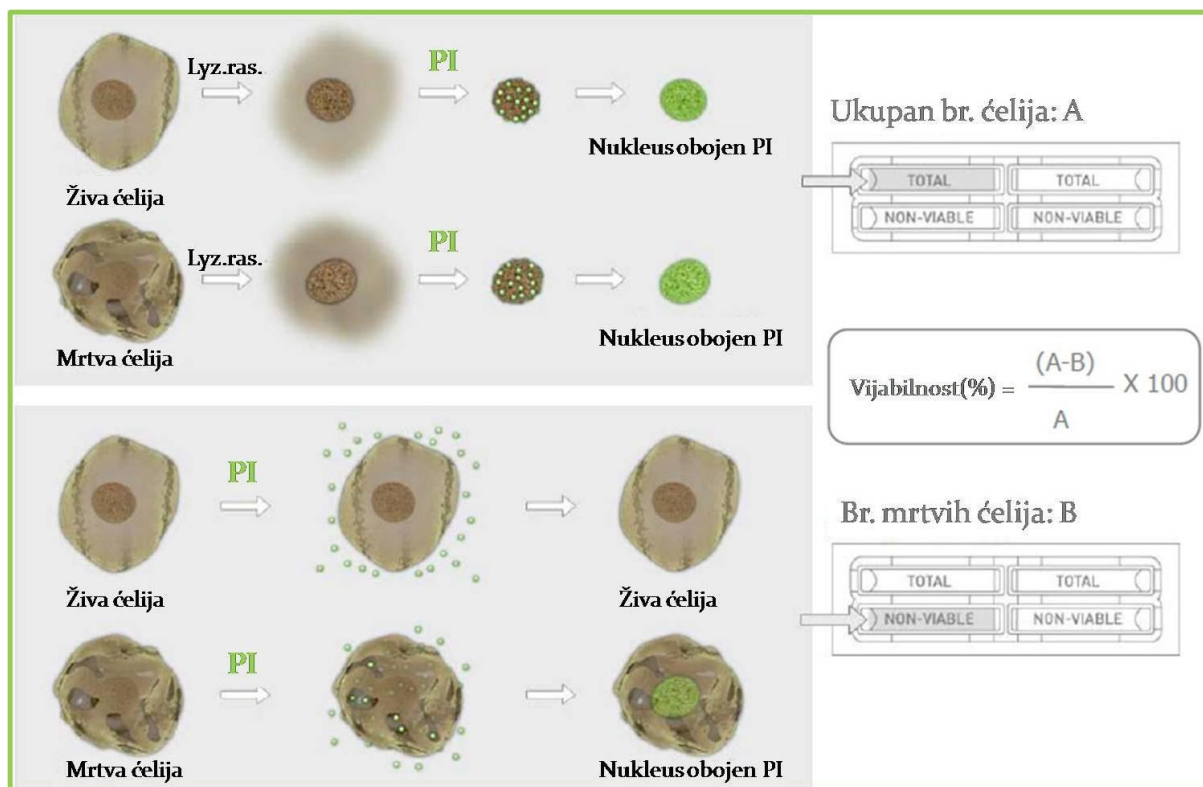
Po 50  $\mu$ L ćelija i rastvora T promešani su na vortex mešalici. Ista procedura je ponovljena i sa rastvorom N. Uzeto je po 12  $\mu$ L suspenzije ćelija iz T, odnosno N rastvora i nanoseno u kanaliće na pločici (čip) (Slika 14). Suspenzije su dodavane pažljivo da mehurić vazduha ne bi ušao u kanalić, jer to može ometati brojanje (ADAM Instruction manual, 2008).



**Slika 14.** Nanošenje lizata na čip

Po nanošenju suspenzija, čip je pažljivo smešten u nosač na instrumentu. Po završenom brojanju na displeju su očitane vrednosti za ukupni broj ćelija i broj mrtvih ćelija i

na osnovu toga instrument je izračunao vijabilnost. Izračunati broj ćelija je na 1 mL (Slika 15).



**Slika 15.** Na slici je prikazan izgled ćelija obeleženih rastvorom T i N, mesto nanošenja na pločicu za brojanje, kao i formula za izračunavanje procenta živih ćelija (Slika preuzeta iz „ADAM A new standard of Automatic cell counter Instruction manual“; Digital Bio, 2008).

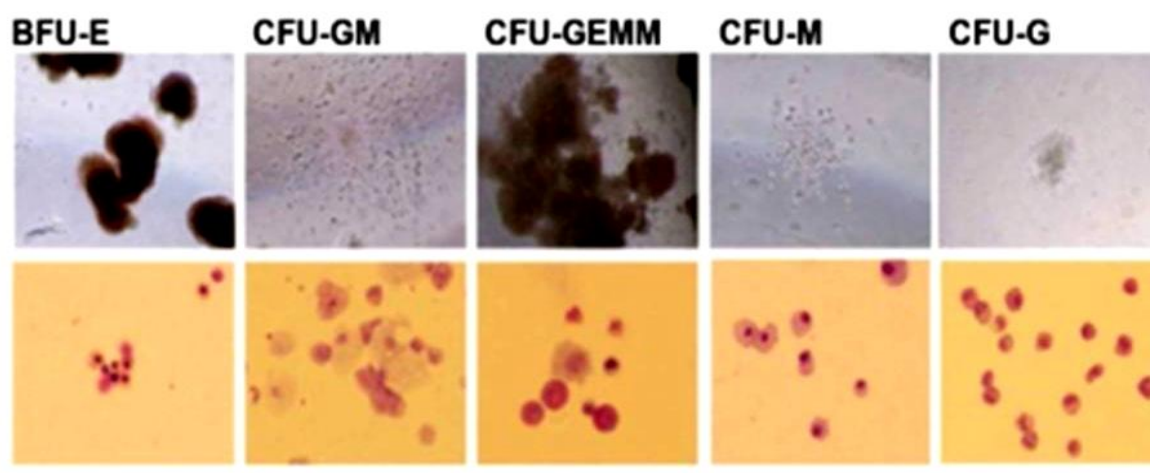
### 3.7. Određivanje broja prethodnika granulocitno-monocitne i eritrocitne loze u uzorcima periferne krvi nakon odmrzavanja

Ova metoda se koristi kod kvantifikovanja i karakterizacije humanih hematopoetskih progenitora poreklom iz krvi pupčanika, mobilisane periferne krvi i kostne srži. Takođe se koristi i za kontrolu krioprezervacije, posle *ex vivo* obrade ćelija, tj. posle bilo kakvog manipulisanja ćelijama mora se proveriti da li su održale kapacitet repopulacije (Lewis i sar., 1996).

Po određivanju vijabilnosti mora se optimizirati broj ćelija po mL podloge. Razblaženje ćelija su napravljena u medijumu IMDM (*engl.* Iscove's Modified Dulbecco's Medium) sa 2% FBS tako da njihova koncentracija bude  $1 \times 10^6$  živih ćelija po mL. Uzeto je 250  $\mu$ L ćelijske suspenzije i prebačeno u prethodno pripremljenih 2.25 mL MethoCult™ polučvrste metilcelulozne podloge MC H4434 (Sigma-Aldrich, Poole, UK) tako da finalna



koncentracija ćelija bude  $1 \times 10^5/\text{mL}$ . Suspenzija je na vorteksu dobro izmešana, sačekano je par minuta da se staloži (odnosno da mehurići vazduha izađu na površinu). Zatim je razliveno po 1 mL podloge sa ćelijama u petri šolje (Miles Laboratories, Neperville) prečnika 35 mm koristeći špic i iglu od 18G (ili deblju). Petri šolje su stavljene u veću petri šolju (100 mm) zajedno sa još jednom od 35 mm, bez poklopca, u kojoj je sterilna voda, kako bi se obezbedilo da se podloga sa ćelijama ne osuši. Potom je veća petri šolja poklopljena i stavljena u inkubator na  $37^\circ\text{C}$  sa atmosferom zasićenom vodenom parom (95% vlage) i sa 5%  $\text{CO}_2$ . Nakon 14 dana inkubacije, na invertnom mikroskopu, izbrojane su kolonije, koje odgovaraju CFU-GM (*engl.* colony-forming unit-granulocytes, macrophages), BFU-E (*engl.* burst-forming unit-erythroid), CFU-GEMM (*engl.* colony-forming unit-granulocytes, erythrocytes, macrophages, megakariocytes), CFU-M (colony-forming unit-macrophages) i CFU-G (*engl.* colony-forming unit-granulocytes) (Slika 16).



**Slika 16.** Mikroskopski prikaz izgleda BFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM, CFU-M, CFU-G kolonija (adaptirano iz Appleby i sar., 2012).

### 3.8. Priprema uzoraka za Western blot i PCR

Za izolaciju RNK i proteina, deo dobijenog taloga (nakon izolovanja monojedarnih ćelija iz pune krvi pomoću Lymphoprep™; odnosno nakon odmrzavanja afereznog produkta i ispiranja ćelija od DMSO) rastvoren je u 250  $\mu\text{L}$  monofaznog rastvora fenola i guanidin-izotiocijanata, koji razara ćelijske membrane (TRIzol®, Invitrogen). Zatim je homogenat inkubiran sa hloroformom (za odvajanje faza) na sobnoj temperaturi, 2-3 min, pa centrifugiran na 10000 g, 15 min, na  $4^\circ\text{C}$ . Nakon centrifugiranja, dobijene su dve faze, gornja vodena koja sadrži RNK, interfaza i donja, organska faza koja sadrži DNK i proteine.

Gornjem vodenom sloju supernatanta, dodat je izopropil alkohol da precipitira RNK (preko noći na - 80 °C). Talog dobijen nakon centrifugiranja na 12000 g, 10 min, 4 °C, ispran je 75% etanolom za odstranjivanje tragova fenola. Po centrifugiranju na 7500 g, 5 min, na 4 °C u talogu je dobijena RNK koja je rastvarana u dietilpirokarbonatnoj vodi. Nakon izolacije ukupne RNK, vršeno je njeno prečišćavanje DNKaznim tretmanom komercijalnim kitom (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waitharm, MA, USA).

Jednolančana komplementarna DNK je sintetisana iz 1 mg RNK i 0,5 mg oligo (dT) prajmera korišćenjem reverzne transkriptaze (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waitharm, MA, USA).

Iz donjeg organskog sloja su precipitirani proteini izopropil alkoholom. Na 250 µl početne zapremine TRIzol<sup>®</sup> reagensa dodato je 375 µL izopropil alkohola. Uzorci su inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi, zatim centrifugirani na 12 000 g, 10 min, na 4 °C. Proteini dobijeni u talogu su inkubirani u 500 µl 0.3 M guanidin hidrohloridu rastvorenom u 96% etanolu, a potom centrifugirani na 7500 g, 5 min, na 4 °C. Ovaj postupak ispiranja proteina u guanidin hidrohloridu je ponovljen 3 puta. Zatim je dobijenom talogu proteina dodat 100% etanol, vorteksovan je, inkubiran 20 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugiran na 7500 g, 5 min, na 4 °C. Uklonjen je supernatant, a talog proteina je osušen na vazduhu 10 min. Dobijen talog proteina je resuspendovan u 1% SDS i iz rastvora je određena koncentracija proteina koji su korišćeni u *Western blot* analizi.

### **3.9. Western blot**

#### **3.9.1. Određivanje količine proteina**

Količina proteina je određivana po metodi Lowry i saradnika (1951). Metoda se zasniva na reakciji peptidnih veza i Cu<sup>2+</sup> jona u alkalnoj sredini i reakciji fosfomolibdensko-fosfovolframovog reagensa sa aromatičnim aminokiselinama (triptofan i tirozin) u polipeptidnim lancima. Nastalo kompleksno jedinjenje plave boje ima maksimum apsorpcije na 500 nm. Intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji proteina koja se očitava sa standardne krive, konstruisane merenjem apsorbanace rastvora albumina (rastućih, poznatih koncentracija) na 500 nm. Koncentracija proteina, se izražava u mg/mL.

### 3.9.2. Elektroforeza proteina

Proteini su razdvajani po molekulskim masama natrijum-dodecil sulfat (*engl.* sodium dodecyl sulfate, SDS)-poliakrilamidnom elektroforezom (SDS-PAGE) u BioRad mini-Protean III sistemu. Korišćeni gelovi za razdvajanje su bili različite procentnosti, zavisno od molekulske mase traženog proteina, dok su gelovi za koncentrovanje uvek bili 5% (5% akrilamid/bisakrilamid; 0.1% SDS, 0.125 M Tris, pH 6.8). Polimerizacija gelova je omogućena dodavanjem 0.05% amonijum-persulfata i 0.033% N,N,N,N-tetrametil-etilendiamina (TEMED). Pufer za rezervoare se sastojao od 0.192 M glicina, 0.1% SDS i 0.025 M Tris, pH 8.3. U određenu zapreminu proteinskog rastvora dodata je ista zapremina pufera za uzorke (4% SDS, 20 % glicerol, 10%  $\beta$ -merkaptotanol; 0.125 M Tris, pH 6,8; 0.025% brom-fenol plavo). Uzorci su pre nalivanja denaturisani kuvanjem 5 min, na 95 °C. Za sve ispitivane proteine nanošeno je 5  $\mu$ g proteina iz uzorka. Na gelove je nanošen i proteinski marker u cilju određivanja molekulskih masa (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waitharm, MA, USA). Elektroforeza je trajala 60-90 min pri konstantnom naponu od 120 V. Nakon elektroforeze, gelovi su korišćeni za *Western blot*.

### 3.9.3. Prenos proteina sa SDS-poliakrilamidnog gela na membranu i imunološka detekcija imobilizovanih proteina (Western blot)

Proteini su sa gelova preneseni na membrane (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech). Membrane su aktivirane u metanolu (10 sekundi), a potom su sa gelovima pakovane i smeštane u rezervoare sa transfer puferom (0.192 M glicin, 20 % metanol, 0.025 M Tris, pH 8.3). Prenos proteina sa gelova na membrane se odvijao pri konstantnom naponu od 100 V, 60 min. Uspešnost transfera je proveravana 5% Ponceau S bojom rastvorenom u glacijalnoj sirćetnoj kiselini. Membrane su potom obezbojavane ispiranjem u destilovanoj vodi i inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi u serumu za blokiranje slobodnih mesta na membrani-5% BSA (*engl.* bovine serum albumine) u Tris-boratnom puferu sa dodatkom detergenta Tween 20 (TBS-T: 0.2 M Tris, 1.5 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7,4) ili alternativno-5% rastvorom obranog mleka u TBS-T. Nakon blokiranja membrane su inkubirane sa primarnim antitelom.

Podaci o antitelima korišćenim u ovom eksperimentu kao i njihova koncentracija, prikazani su u Tabeli 7. Po blokiranju, membrane su inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelima rastvorenim u 5% BSA, preko noći, na 4 °C. Nakon inkubacije i ispiranja viška primarnog antitela, membrane su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelima

dobijenim imunizacijom kože na IgG zeca, odnosno miša, (*engl.* goat-anti rabbit HRP, Santa Cruz Biotechnology, Inc. i goat-anti mouse HRP, BD Bioscience Pharmingen), u razblaženju 1:2000 (antitelo:5% BSA) 2 h, na sobnoj temperaturi. Po inkubaciji, membrane su ispirane TBS rastvorom, 30 minuta na sobnoj temperaturi. Za vizuelizaciju proteina, membrane su inkubirane u hemiluminiscentnom supstratu - luminolu, uz dodatak  $H_2O_2$  (3 min). Nakon toga, rentgen filmovi (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech) su izlagani ekscitovanom luminolu sa membrana (1-3 min). Razvijani i skenirani filmovi su korišćeni za kvantifikaciju proteinskih traka.

Alternativno, membrane su inkubirane u rastvoru 4-hloro- $\alpha$ -naftola uz dodatak  $H_2O_2$  do pojave traka (2-10 min), a reakcija je prekidana ispiranjem membrana u destilovanoj  $H_2O$ . Membrane su potom skenirane za kompjutersku kvantifikaciju.

**Tabela 7.** Primarna antitela korišćena za Western blot.

<b>Antitelo<sup>1</sup></b>	<b>Proizvođač, kat. br.</b>	<b>Razblaženje/ koncentracija</b>	<b>Mr (kDa)</b>
CuZnSOD	Abcam, ab13498	0.2 µg/mL	~18
MnSOD	Abcam, ab13533	1:5000	25
Katalaza	Abcam, ab18771	1:1000	59
GSH-Px	Abcam, ab16798	1:2000	27
Trx	Abcam, ab26320	1 µg/ml	12
GAPDH	Abcam, ab8245	1:2000	36
PDH	Abcam, ab84588	1:1000	39
SUCLG	Abcam, ab96172	1:1000	47
ACADM	Abcam, ab92461	1:10000	47
TNF $\alpha$	Abcam, ab6671	1:500	26
HIF-1 $\alpha$	Abcam, ab51608	1:2000	92
IL-6	Abcam, ab66231	1:200	27
$\beta$ -aktin	Abcam, ab8226	1:1000	42
Citohrom <i>c</i>	Abcam, ab18738	1:200	12
ATP sintaza	Abcam, ab14730	0.5 µg/ml	52
UQCRC2	Abcam, ab14745	1:2000	49.5
Kompleks II	Abcam, ab14715	0.1 µg/ml	70
Ndufa9	Abcam, ab55521	2.5 µg/ml	43
COX IV	Abcam, ab14744	1:1000	17
iNOS	Abcam, ab15323	1:2000	130
NOX	Abcam, ab31092	1:1000	14

<sup>1</sup> Skraćenice korišćene u tabeli: CuZnSOD/MnSOD - CuZn/Mn superoksid dismutaza, GSH-Px - glutation peroksidaza, Trx - tioredoksin, GAPDH - gliceralhid-3-fosfat dehidrogenaza, PDH - piruvat dehidrogenaza, SCAS - sukcinil-CoA sintetaza, ACADM - acetil-CoA dehidrogenaza masnih kiselina srednje dužine lanca, TNF $\alpha$  - faktor nekroze tumora  $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$  - hipoksija-inducibilni faktor-1 $\alpha$ , IL-6 - interleukin 6, UQCRC2 - ubikinol-citohrom *c* reduktazni kompleks (kompleks III), Ndufa9 - Ndufa9 subjedinica kompleksa I, COX IV - subjedinica IV kompleksa citohrom *c* oksidaze (kompleksa IV), iNOS - inducibilna azot oksid sintaza, NOX - NAD(P)H oksidaza.

### 3.9.4. Kvantifikacija rezultata dobijenih Western blot analizom

ImageQuant softverski paket je korišćen za kvantifikaciju dobijenih traka. Rezultati su izraženi putem integracije volumena i predstavljaju sumu svih vrednosti piksela pobuđenih signalom ( $1 \text{ piksel} = 0.007744 \text{ mm}^2$ ) unutar označenog objekta (trake) vizuelizovane na prethodno objašnjen način. Ova vrednost, umanjena za fon pozadine (*engl.* background), predstavlja intenzitet zatamnjenja (*engl.* volume) na površini zaokružene trake.

### 3.10. Lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu (RT-PCR)

Za određivanje promena na nivou iRNK korišćen je metod lančane reakcije polimerizacije u realnom vremenu. Relativna ekspresija je određena direktnim poređenjem dobijenih *Ct* (*engl.* cycle threshold) vrednosti, koje su normalizovane prema endogenoj kontroli. *Ct* vrednost predstavlja broj ciklusa koji je potreban da fluorescentni signal pređe prag, signal koji potiče od nespecifičnog fluorescentnog signala (*engl.* background level) i predstavlja tačku u kojoj amplifikaciona kriva ulazi u eksponencijalnu fazu. *Ct* vrednost je obrnuto proporcionalna količini ciljne nukleinske kiseline u uzorku. Pre određivanja nivoa ekspresije ciljnog gena urađeni su validacioni eksperimenti koji su pokazali približno jednako variranje promene *Ct* vrednosti odgovarajućeg ciljnog gena i endogene kontrole za niz serijskih dilucija komplementarne DNK. U našim uzorcima se kao adekvatna endogena kontrola pokazala 18S subjedinica ribozomalne RNK. Nakon toga urađena je RT-PCR detekcija.

U RT-PCR je korišćen iQ<sup>TM</sup> SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) koji sadrži 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.4; 0.4 mM od svakog dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), i iTaq DNK polimerazu, 50 jedinica/mL, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, interkalirajuću boju - SYBR Green I, 20 nM, fluorescein i stabilizatore. Sekvence korišćenih prajmera (Metabion International AG, Martinsried, Germany) i uslovi reakcije prikazani su u Tabeli 8.

RT-PCR reakcija je izvedena u 20  $\mu\text{L}$  reakcione zapremine. Svaka reakciona smeša sastojala se od: 10  $\mu\text{L}$  iQ<sup>TM</sup> SYBR Green Supermix 2x, po 0.25  $\mu\text{L}$  svakog od prajmera finalne koncentracije 200 nM, 0.4  $\mu\text{L}$  ROX (Invitrogen, USA) i *nuclease free* vode do 20  $\mu\text{L}$  ukupne zapremine smeše.

Po 18  $\mu\text{L}$  reakcione smeše i 2  $\mu\text{L}$  komplementarne DNK dodato je u odgovarajuće mesto na optičku ploču za RT-PCR. Uz svaki set prajmera uključena je negativna kontrola (bez komplementarne DNK), da bi verifikovali odsustvo nespecifične amplifikacije (dimere prajmera ili kontaminaciju). Sve reakcije su izvedene na aparatu ABI Prism 7000 Sequence

Detection System, pod uslovima koji zavise od ispitivanih gena i prikazani su u Tabeli 7. Svaki uzorak je rađen u triplikatu, a srednja vrednost je uzeta za dalja izračunavanja. U svaku analizu bila je uključena endogena kontrola. Zbog razlika u efikasnosti amplifikacije, svaki uzorak je normalizovan na nivo ekspresije svoje endogene kontrole.

Kvantifikacija je urađena komparativnom  $C_t$  metodom. Količina ciljnog gena, normalizovanog na nivo ekspresije svoje endogene kontrole, izražena je relativno u odnosu na kalibrator i data je formulom  $2^{-\Delta C_t}$ , gde je  $\Delta C_t = (C_t, \text{ciljnog gena} - C_t, \text{endogene kontrole})$ . Kalibrator predstavlja kontrolni uzorak (kontrola). Rezultati su izraženi kao procenat u odnosu na adekvatnu kontrolnu grupu kojoj je dodeljena vrednost od 100%.

**Tabela 8.** Sekvence prajmera korišćenih u RT-PCR i uslovi reakcija.

Gen <sup>2</sup>	Sekvenca prajmera	Broj ciklusa
<i>ND4</i>		
F:	5' - ACA AGC TCC ATC TGC CTA CGA CAA - 3'	40
R:	5' - TTA TGA GAA TGA CTG CGC CGG TGA - 3'	
Uslovi reakcije:	15'' na 95 °C, 30'' na 60 °C, 30'' na 72 °C	
<i>Ndufa6</i>		
F:	5' - CAA GAT GGC GGG GAG CGG - 3'	40
R:	5' - GTA TAG TGA GTT TAT TTG TGC TC - 3'	
Uslovi reakcije:	15'' na 95 °C, 30'' na 51 °C, 30'' na 72 °C	
<i>COX II</i>		
F:	5' - TGC CCT TTT CCT AAC ACT CAC AA - 3'	40
R:	5' - CGC CGT AGT CGG TGT ACT CG - 3'	
Uslovi reakcije:	10'' na 95 °C, 30'' na 54 °C, 30'' na 72 °C	
<i>COX IV</i>		
F:	5' - AGG TGG CCC ATG TCA AGC AC - 3'	40
R:	5' - CAT GAT AAC GAG CGC GGT GA - 3'	
Uslovi reakcije:	10'' na 95 °C, 30'' na 54 °C, 30'' na 72 °C	
<i>Cyt b</i>		
F:	5' - TCC TCC CGT GAG GCC AAA TAT CAT - 3'	40
R:	5' - AAA GAA TCG TGT GAG GGT GGG ACT - 3'	
Uslovi reakcije:	15'' na 95 °C, 30'' na 60 °C, 30'' na 72 °C	
<i>Cyt c</i>		
F:	5' - TTG GCG GCG GAA GAG GAA GGA GT - 3'	40
R:	5' - CAA AGG CGC AGA AGT GGG GGT ATG - 3'	
Uslovi reakcije:	15'' na 95 °C, 30'' na 51 °C, 30'' na 72 °C	
<i>ATP sintaza</i>		
F:	5' - AGC TCA GCT CTT ACT GCG G - 3'	40
R:	5' - GGT GGT AGT CCC TCA TCA AAC T - 3'	
Uslovi reakcije:	10'' na 95 °C, 30'' na 54 °C, 30'' na 72 °C	
<i>Katalaza</i>		
F:	5' - CTC GTG GGT TTG CAG TGA AAT - 3'	40
R:	5' - TCA GGA CGT AGG CTC CAG AAG - 3'	
Uslovi reakcije:	10'' na 95 °C, 30'' na 54 °C, 30'' na 72 °C	
<i>GSH-Px</i>		
F:	5' - CCA GTC GGT GTA TGC CTT CTC - 3'	40
R:	5' - GAG GGA CGC CAC ATT CTC G - 3'	
Uslovi reakcije:	10'' na 95 °C, 30'' na 54 °C, 30'' na 72 °C	



## Nastavak Tabele 8.

### *MnSOD*

F: 5' - CCT CAC ATC AAC GCG CAG AT - 3' 40  
 R: 5' - CGT TCA GGT TGT TCA CGT AGG - 3'  
 Uslovi reakcije: 15'' na 95 °C, 15'' na 56 °C, 30'' na 72 °C

### *CuZnSOD*

F: 5' - AGG GCA TCA TCA ATT TCG AGC - 3' 40  
 R: 5' - GCC CAC CGT GTT TTC TGG A - 3'  
 Uslovi reakcije: 10'' na 95 °C, 30'' na 54 °C, 30'' na 72 °C

### *NOX*

F: 5' - CTC AGC GGA ATC AAT CAG CTG TG - 3' 40  
 R: 5' - AGA GGA ACA CGA CAA TCA GCC TTA G - 3'  
 Uslovi reakcije: 15'' na 95 °C, 30'' na 60 °C, 30'' na 72 °C

### *mtDNK*

F: 5' - AGG GCA TCA TCA ATT TCG AGC - 3' 40  
 R: 5' - GCC CAC CGT GTT TTC TGG A - 3'  
 Uslovi reakcije: 15'' na 95 °C, 30'' na 51 °C, 30'' na 72 °C

### *TNF $\alpha$*

F: 5' - CTC AGC GGA ATC AAT CAG CTG TG - 3' 40  
 R: 5' - AGA GGA ACA CGA CAA TCA GCC TTA G - 3'  
 Uslovi reakcije: 15'' na 95 °C, 30'' na 60 °C, 30'' na 72 °C

### *IL-6*

F: 5' - TTG GGG GCC TGG GAT TTC TGG - 3' 40  
 R: 5' - CGT TGG CAT GGG GGA GTG AGC - 3'  
 Uslovi reakcije: 15'' na 95 °C, 30'' na 51 °C, 30'' na 72 °C

### *18S rRNK*

F: 5' - CGA AGA CGA TCA GAT ACC GTC GTA - 3' 40  
 R: 5' - AAG GGC ATC ACA GAC CTG TTA TTG - 3'  
 Uslovi reakcije: 10'' na 95 °C, 30'' na 54 °C, 30'' na 72 °C

### *GAPDH<sup>2</sup>*

F: 5' - CCA GTG CAA AGA GCC CAA AC - 3' 40  
 R: 5' - GCA CGG ACA CTC ACA ATG TTC - 3'  
 Uslovi reakcije: 10'' na 95 °C, 30'' na 54 °C, 30'' na 72 °C

<sup>2</sup> *Skraćenice korišćene u tabeli:* ND4 - ND4 subjedinica kompleksa I, Ndufa6 - Ndufa6 subjedinica kompleksa I, COX II - subjedinica IV kompleksa citohrom *c* oksidaze (kompleksa II), COX IV - subjedinica IV kompleksa citohrom *c* oksidaze (kompleksa IV), Cyt *b* - citohrom *b*, Cyt *c* - citohrom *c*, GSH-Px - glutation peroksidaza, CuZnSOD/MnSOD - CuZn/Mn superoksid dismutaza, NOX - NAD(P)H oksidaza, mtDNK - mitohondrijalna DNK, TNF $\alpha$  - faktor nekroze tumora  $\alpha$ , IL-6 - interleukin-6, GAPDH - glicer aldehid-3-fosfat dehidrogenaza, 18S rRNK - 18S subjedinica ribozomalne RNK.

### **3.11. Konfokalna mikroskopija**

#### **3.11.1. Priprema uzoraka za konfokalnu mikroskopiju**

Alikvot uzorka od 1 mL je rastvoren u 10 mL PBS-EDTA i centrifugiran na 1100 g, 10 min. Dobijen talog je ponovo rastvoren u 300-600  $\mu$ L PBS-EDTA i od tog homogenata je jedan deo odvojen za detekciju azot oksida (NO), deo za ispitivanje mitohondrijalne funkcije, a od preostalog dela su napravljeni razmazi koji su dalje korišćeni za imunohistohemijsku detekciju konfokalnom mikroskopijom.

#### **3.11.2. Bojenje MitoTracker Green FM (MT-G)**

Mitohondrijalna funkcija je ispitivana korišćenjem MitoTracker<sup>®</sup>Green FM (Molecular Probes Inc., Eugene, USA), katjonske fluorescentne probe koja se akumulira selektivno u mitohondrijama u zavisnosti od transmembranskog elektro-hemijskog gradijenta. Za ovo ispitivanje, talog sa ćelijama je resuspendovan u 20 nM MT-G i inkubiran u mraku na sobnoj temperaturi, 60 min. Nakon inkubacije, talog sa ćelijama je ispiran u PBS i centrifugiran na 2000 g, 5 min. Dobijeni talog sa ćelijama je fiksiran paraformaldehidom, 15 min, na sobnoj temperaturi i nakon toga još 3 puta ispran u PBS i centrifugiran na 2000 g, po 5 min. Nakon toga, bojeni su nukleusi ćelija PI. Ćelije u razmazu su permeabilizovane u 0.2% rastvoru TritonX 100-PBS, 10 min, potom 2 puta ispirane po 5 min u PBS i inkubirane u PI, 10 min. Nakon toga su ponovo ispirane 2 puta u PBS po 5 min i jednom ispirane u destilovanoj H<sub>2</sub>O. Pločice sa razmazima su kratko osušene na vazduhu, potom montirane u Mowiol<sup>®</sup> 4-88 (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Germany) i posmatrane konfokalnim laserskim Carl Zeiss LSM510 mikroskopom (Carl Zeiss MicroImaging, Hamburg, Germany). Procenat MT-G pozitivnih ćelija je izračunat na osnovu 200 posmatranih ćelija po razmazu (pločici), a predstavljene su reprezentativne ćelije.

#### **3.11.3. Bojenje Daf2-DA za detekciju NO**

Nakon ispiranja i centrifugiranja na 2000 g, 10 min, talogu je dodata fluorescentna boja Daf2-DA do finalne koncentracije od 10  $\mu$ M. Nakon inkubacije u mraku, na sobnoj temperaturi, 1 h, talog sa ćelijama je ispiran u PBS i centrifugiran na 2000 g, 5 min. Dobijeni talog sa ćelijama je fiksiran paraformaldehidom, 15 min, na sobnoj temperaturi i nakon toga još 3 puta ispran u PBS i centrifugiran na 2000 g, 5 min. Nakon toga, bojeni su nukleusi ćelija PI. U tu svrhu, ćelije u razmazu su permeabilizovane u 0.2% rastvoru TritonX 100-PBS, 10

min, potom 2 puta ispirane po 5 min u PBS i inkubirane u PI, 10 min. Nakon toga su ponovo ispirane 2 puta u PBS po 5 min i jednom ispirane u destilovanoj H<sub>2</sub>O. Pločice sa razmazima su kratko osušene na vazduhu, potom montirane u Mowiol<sup>®</sup> 4-88 (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Germany) i posmatrane konfokalnim laserskim Carl Zeiss LSM510 mikroskopom (Carl Zeiss MicroImaging, Hamburg, Germany).

#### **3.11.4. Imunohistohemijsko detektovanje konfokalnom mikroskopijom**

Specifična ćelijska ekspresija i unutarćelijska lokalizacija izoformi azot oksid sintaza, katalaze, IL-6 i TNF $\alpha$  imunohistohemijski su ispitivani konfokalnom mikroskopijom. Razmazi ćelija su fiksirani 5 min u metanolu, ispirani 3 puta po 5 min u PBS, a potom blokirani u 1% BSA u 0.1% Tween-PBS, 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja nespecifičnog vezivanja, razmazi ćelija su inkubirani 2 h na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim primarnim antitelima (Abcam) na eNOS (5  $\mu$ g/mL), iNOS (1:100), nNOS (2  $\mu$ g/mL), katalazu (1:300); TNF $\alpha$  (1:200), IL-6 (2  $\mu$ g/mL). Potom su pločice ispirane 3 puta po 5 min u PBS i inkubirane u odgovarajućim fluorescentno obeleženim sekundarnim antitelima, 30 min, na sobnoj temperaturi. Alexa Fluor 488 (*engl.* goat anti-rabbit, Molecular Probes) je korišćeno za vizuelizaciju endotelijalne azot oksid sintaze (*engl.* endothelial nitric oxide synthase, eNOS), inducibilne NOS (iNOS), neuronalne NOS (nNOS) i katalaze, dok je za obeležavanje IL-6 i TNF $\alpha$  korišćeno Alexa Fluor 488 (*engl.* goat anti-mouse, Molecular Probes), oba antitela u razblaženju 1:200. Nakon ispiranja od sekundarnog antitela (3 puta po 15 min u PBS), izvršena je permeabilizacija ćelija u 0.2% TritonX 100-PBS, 10 min, ispiranje 2 puta po 5 min u PBS i bojenje nukleusa ćelija PI. Nakon ispiranja boje, 2 puta po 5 min u PBS i 5 min u destilovanoj H<sub>2</sub>O, razmazi ćelija su sušeni na vazduhu i montirani u Mowiol<sup>®</sup> 4-88 (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Germany) i posmatrane konfokalnim laserskim Carl Zeiss LSM510 mikroskopom (Carl Zeiss MicroImaging, Hamburg, Germany).

#### **3.12. Statistička obrada rezultata**

Statistička značajnost dobijenih rezultata je testirana GraphPad Software 3.03. Za poređenje rezultata između grupa korišćena je ANOVA. Statistička značajnost rezultata je određivana Tukey testom. Za najniži stepen značajnosti uzeta je vrednost verovatnoće  $p < 0.05$ .

## ***4.Rezultati***

## 4.1. Klinički parametri

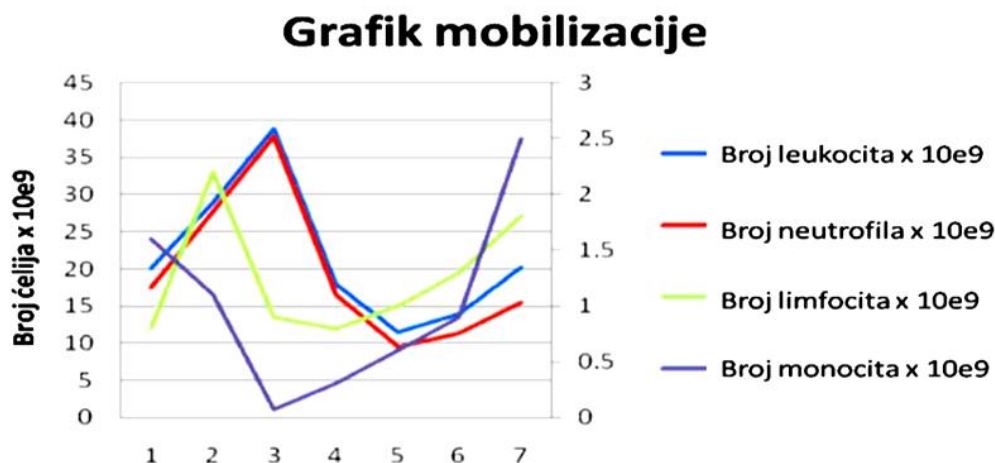
### 4.1.1. Promena broja leukocita tokom mobilizacije

Od započinjanja mobilizacionog protokola do separacije kod 35 pacijenata je svakodnevno određivana kompletna krvna slika, a od 4. ili 5. dana, zavisno od broja leukocita i vrednosti CD34+ ćelija u perifernoj krvi. Uočeno je da se broj leukocita menjao tokom mobilizacionog protokola. Neposredno po završetku kombinovane hemioterapije i prvih dana primene granulocitnog faktora rasta, registruje se pad broja leukocita, kod nekih bolesnika pancitopenija, a zatim oporavak elemenata krvne slike, sa porastom broja leukocita. Tokom svakodnevne kontrole kompletne krvne slike uočene su promene u leukocitarnoj formuli, odnosno uočen je oporavak broja leukocita koji je praćen i prisustvom većeg broja monojedarnih ćelija u perifernoj krvi. Na osnovu broja leukocita (preko  $4.0 \times 10^9/L$ ) i leukocitarne formule (procentualno veća zastupljenost monojedarnih ćelija) određivan je dan za kontrolisanje broja CD34+ ćelija u perifernoj krvi. Procedura afereze rađena je kod pacijenata čiji je broj leukocita preko  $4 \times 10^{11}/L$  i CD34+ ćelije u perifernoj krvi  $\geq 20$  ćelija/ $\mu L$  (Tabela 9, Grafik 1).

**Tabela 9.** Promena broja leukocita u perifernoj krvi pacijenta u toku mobilizacije.

<b>Dan mobilizacionog protokola</b>	<b>Broj leukocita (<math>\times 10^9</math>)</b>	<b>Apsolutni br. neutrofila (<math>10^9</math>)/udeo u ukupnom br leukocita (%)</b>	<b>Apsolutni br. limfocita (<math>10^9</math>)/udeo u ukupnom br leukocita %</b>	<b>Apsolutni br. monocita (<math>10^9</math>)/udeo u ukupnom br leukocita %</b>
1	20.1	17.4/86.2	0.8/4.2	1.6/8.0
2	28.9	27.6/95.1	2.2/0.6	1.1/0.3
3	38.9	37.7/97.0	0.9/2.4	0.07/0.1
4	17.9	16.5/92.3	0.8/4.7	0.26/1.5
5	11.5	9.5/82.9	1.0/8.7	0.6/5.3
6	13.9	11.4/81.7	1.28/9.2	0.87/6.2
7	20.2	15.5/76.7	1.8/8.9	2.51/12.4

**Grafik 1.** Grafički prikaz promene broja leukocita u perifernoj krvi u toku mobilizacije.



#### 4.1.2. Rezultati mobilizacionih procedura

##### 4.1.2.1. Rezultati mobilizacionih procedura (periferna krv pacijenata na dan afereze)

Srednje vrednosti parametara određivane iz periferne krvi (Tabela 10), a na dan afereze bile su: broj leukocita  $21.8 \times 10^9/L$  (opseg  $3.0-83.1 \times 10^9/L$ ), trombocita  $127 \times 10^9/L$  (opseg  $29-483 \times 10^9/L$ ), dok je broj CD34+ bio je  $24/\mu L$  (opseg  $2-845/\mu L$ ).

Kod 2 od 35 pacijenata (5.7%) broj CD34+ u perifernoj krvi bio je  $< 10$  ćelija/ $\mu L$ , kod 6 pacijenata (17.1%) broj CD34+ bio je  $10-19$  ćelija/ $\mu L$ ; kod 11 pacijenata (31.4%) broj CD34+ bio je  $20-49$  ćelija/ $\mu L$  i kod 16 pacijenata (45.7%) broj CD34+ bio je  $\geq 50$  ćelija/ $\mu L$ . Rezultati nisu pokazali značajnu korelaciju između broja CD34+ u perifernoj krvi na dan kolekcije i godina, pola, trajanja bolesti ili hemioterapije.

**Tabela 10.** Srednje vrednosti parametara određivane iz periferne krvi na dan afereze.

Parametri	Srednja vrednost	Opseg (min-max)
<i>PERIFERNA KRV</i>		
Leukociti ( $\times 10^9$ )	21.8	3.0-83.1
Hematokrit (l/L)	0.031	0.023-0.037
Trombociti ( $\times 10^9$ )	127	29-483
CD34+ ( $\mu L$ )	24	2-845

#### 4.1.2.2. Rezultati mobilizacionih procedura (aferezni produkt)

Rezultati 49 kolekcija urađenih kod 35 dece prikazani su u Tabeli 11.

Prosek od 320 mL/kg pacijentove krvi (srednja vrednost opsega od 140-594 mL/kg), je procesovano po proceduri u vremenu od 279 min (opseg 113-420 min). Srednja vrednost prosečnog broja afereznih procedura po pacijentu bila je 2 (opseg 1-3), dok je prosečna zapremina afereznih produkata bila je oko 250 mL (98-350 mL).

Što se tiče samog afereznog produkta, srednja vrednost broja prikupljenih monojedarnih ćelija po aferezi bio je  $7.5 \times 10^8$ /kg TM (opseg  $1.7-28.4 \times 10^8$ /kg TM), dok je srednja vrednost broja CD34+ bila  $6.6 \times 10^6$ /kg TM (opseg  $1.4-117.7 \times 10^6$ /kg TM). Zahtev za ciljnom dozom CD34+ od  $5.0 \times 10^6$  ćelija/ kg TM realizovan je kod 80% pacijenata.

**Tabela 11.** Srednje vrednosti parametara određivanih iz afereznog produkta na dan afereze.

Parametri	Srednja vrednost	Opseg (min-max)
<b>AFEREZNI PRODUKT</b>		
Limfociti ( $\times 10^9$ )	28	4-82
Monojedarne ćelije ( $\times 10^9$ )	7.5	1.8-57,0
Hematokrit (l/L)	0.006	0.003-0,015
Trombociti ( $\times 10^9$ )	427	290-1830
CD34+ ( $\mu$ L)	68	3-2119
Prinos monojedarnih ćelija ( $\times 10^8$ /kgTM)	7.5	1.7-28.4
Prinos CD34+ ( $\times 10^6$ /kgTM)	6.6	1.4-117.7

### 4.1.3. Vijabilnost ćelija pre i posle zamrzavanja i broj GM-CFU (sposobnost repopulacije PBSC)

U Tabeli 12. prikazane su srednje vrednosti vijabilnosti ćelija pre zamrzavanja i po odmrzavanju, kao i srednje vrednosti broja kolonija koje su CD34+ ćelije davale po odmrzavanju. Vijabilnost ćelija je određivana metodom bojenja tripan plavim, a kontrolna brojanja istih uzoraka su rađena na automatskom brojaču ćelija.

Vijabilnost pre zamrzavanja određivana je iz svežih uzoraka afereznih produkata. Primećuje se da je vijabilnost ćelija veća pre zamrzavanja (od 81.5-98.5%) od vijabilnosti po odmrzavanju (67.8-95.0%).

Rezultati broja kolonija ukazuju da su matične ćelije zadržale sposobnost repopulacije nakon odmrzavanja. Ovi rezultati su pokazali i da broj kolonija nije direktno proporcionalan broju živih ćelija po odmrzavanju.

**Tabela 12.** Vijabilnost monojedarnih ćelija iz afereznog produkta pre i posle zamrzavanja i broj GM-CFU u odmrznutom produktu.

Dijagnoza	Vijabilnost ćelija pre zamrzavanja (%)	Vijabilnost ćelija nakon odmrzavanja (%)	Broj GM-CFU/L nakon odmrzavanja ( $\times 10^5$ )
NB	81.5	67.8	103.9
ES	91.0	86.0	108.0
HL	96.5	83.4	139.0
NHL	93.3	70.0	146.8
Kontrola	98.5	95.0	-

## 4.2. Rezultati RT-PCR analiza

### 4.2.1. Količina iRNK za enzime antioksidativne odbrane

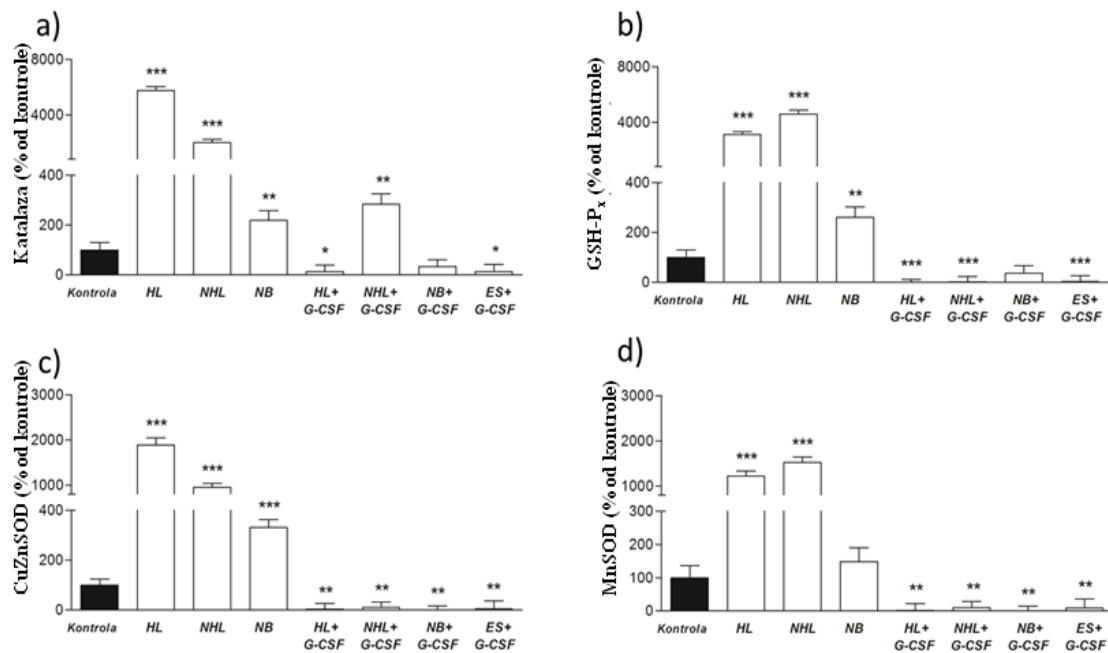
Rezultati RT-PCR analize za enzime antioksidativne odbrane prikazani su na Figuri 1. U poređenju sa kontrolom, nivo iRNK za katalazu je bio značajno povećan u grupi pacijenata koji nisu primali mobilizacioni protokol sa HL, NHL, NB, kao i kod pacijenata sa NHL koji su primali mobilizacioni protokol (Figura 1a). Nasuprot njima, kod ostalih pacijenata koji su



primali MP količina iRNK za katalazu je bila nešto niža u odnosu na kontrolu (HL i ES;  $p < 0.05$ ), odnosno na nivou kontrole (NB).

Figura 1b. pokazuje da je pri određivanju količine iRNK za GSH-Px u odnosu na kontrolu uočeno povećanje genske ekspresije kod pacijenata koji nisu primali MP, nezavisno od vrste tumora. Sa druge strane, kod pacijenata koji su primali MP, količina iRNK za GSH-Px je bila manja u odnosu na kontrolnu grupu (HL, NHL i ES;  $p < 0.001$ ), tj. na kontrolnom nivou (NB).

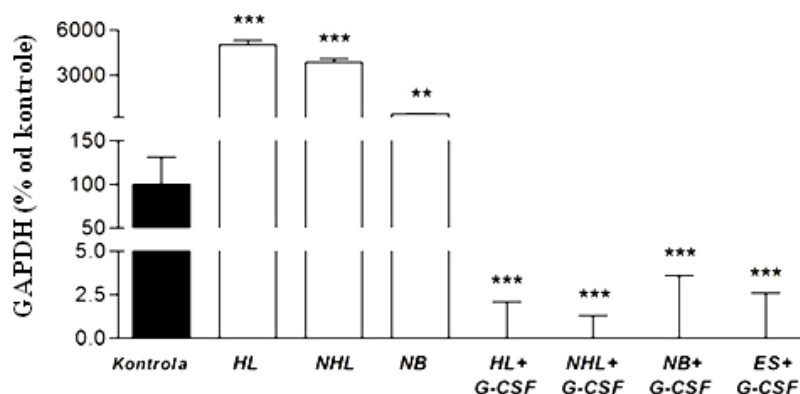
Kod pacijenata koji nisu primali MP, došlo je do povećanja genske ekspresije izoforni superoksid dismutaze (Figura 1c, 1d), nezavisno od tipa tumora, a u poređenju sa kontrolnim uzorcima ( $p < 0.001$ ). Izuzetak je bio NB, kod koga je količina iRNK za MnSOD bila na kontrolnom nivou. U poređenju sa kontrolom, količina iRNK za CuZnSOD i MnSOD je bila značajno manja kod pacijenta koji su primali MP nezavisno od tipa tumora ( $p < 0.01$ ).



**Figura 1a-d.** Promena ekspresije iRNK komponenti antioksidativne odbrane kod pacijenata koji su primali MP i koji nisu. \*poređenje sa kontrolnom grupom; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.2.2. Količina iRNK za GAPDH

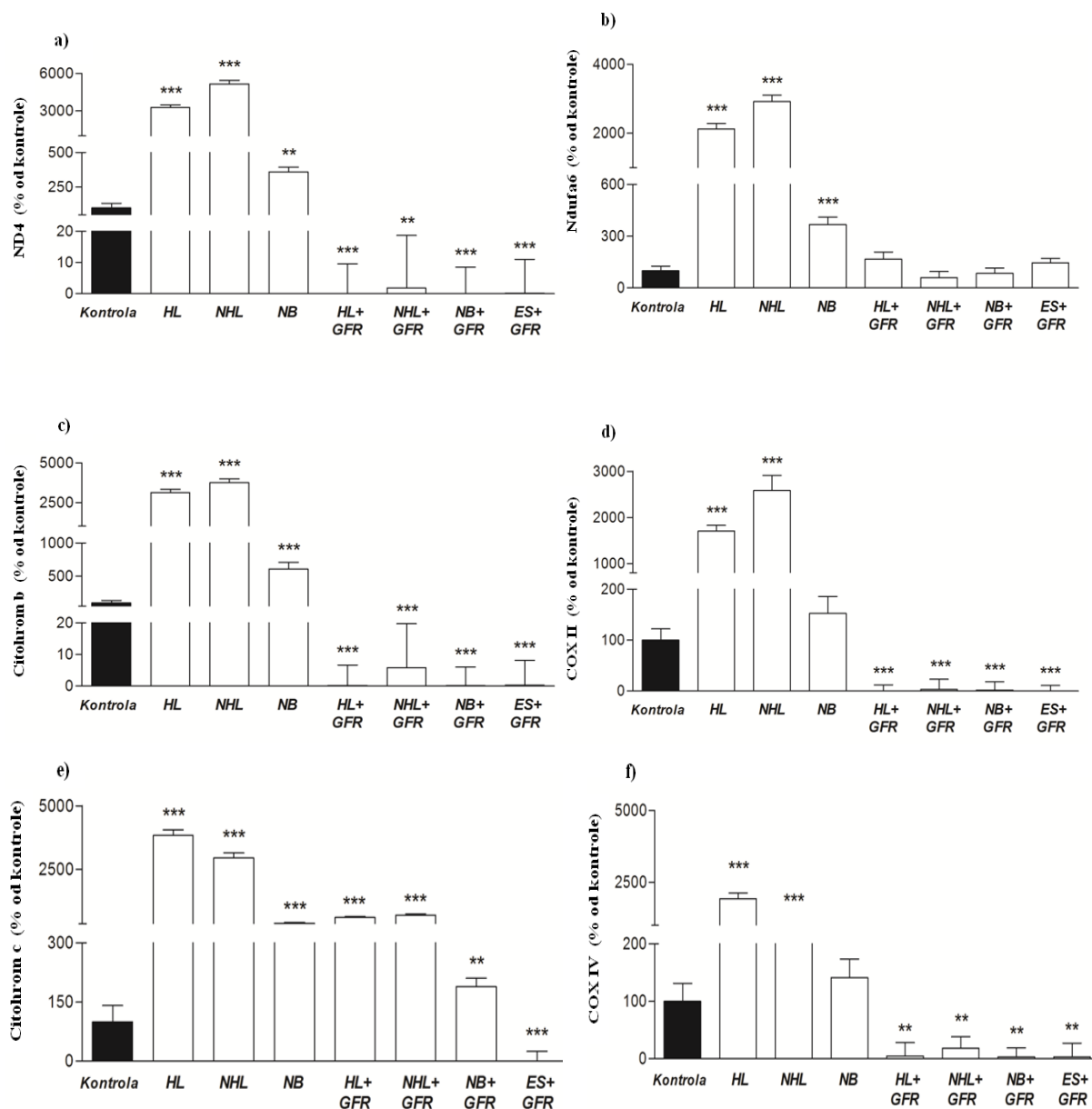
U poređenju sa kontrolom, količina iRNK za GAPDH (Figura 2.) bila je veća kod pacijenata koji nisu primali MP ( $p < 0.001$  za HL i NHL, a za NB  $p < 0.01$ ). Kod pacijenata koji su primali MP, bez obzira na vrstu tumora, genska ekspresija ovog glikolitičkog enzima bila je manja u odnosu na detektovanu u kontrolnoj grupi ( $p < 0.001$ ).



**Figura 2.** Promena količine iRNK za GAPDH kod pacijenata koji su bili primali MP i koji nisu. \*poređenje sa kontrolnom grupom; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.2.3. Genska ekspresija komponenti elektron-transportnog lanca

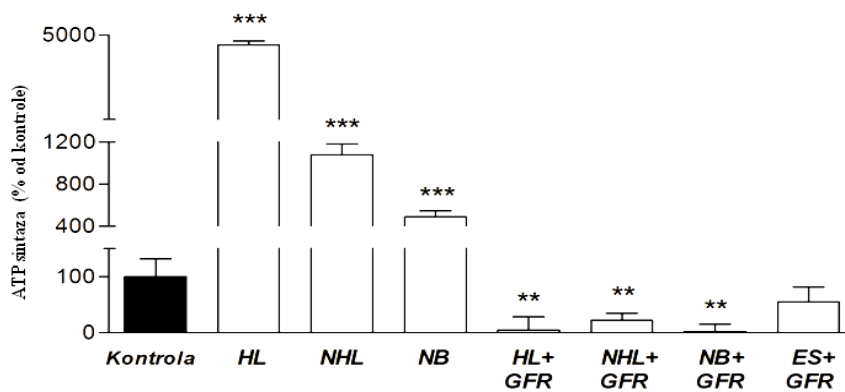
U grupama pacijenata koji nisu primali MP, genska ekspresija svih ispitivanih komponenti respiratornog lanca bila je značajno veća u odnosu na kontrolu, sa izuzetkom dve subjedinice kompleksa IV čija je genska ekspresija bila na kontrolnom nivou, kod pacijenata sa NB (Figura 3a-f). Nasuprot tome, količine iRNK za ND4 subjedinicu kompleksa I (Figura 3a), citohrom *b* (Figura 3c) i subjedinice II i IV citohrom *c* oksidaze (Figura 3d i 3f) bile su statistički značajno manje u odnosu na kontrolu, kod pacijenata koji su primali MP, nezavisno od tipa tumora. Kod istih grupa pacijenata nije zabeležena promena genske ekspresije Ndufa6 subjedinice kompleksa I (Figura 3b). Genska ekspresija citohroma *c* (Figura 3e) bila je veća u odnosu na kontrolu kod svih pacijenata koji su primali MP, osim kod pacijenata sa ES gde je detektovano smanjenje u odnosu na kontrolu ( $p < 0.001$ ).



**Figura 3 a-f.** Promena ekspresije iRNK komponenti respiratornog lanca kod pacijenata koji su primali MP i koji nisu. \*poređenje sa kontrolnom grupom; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.

#### 4.2.4. Genska ekspresija ATP sintaze

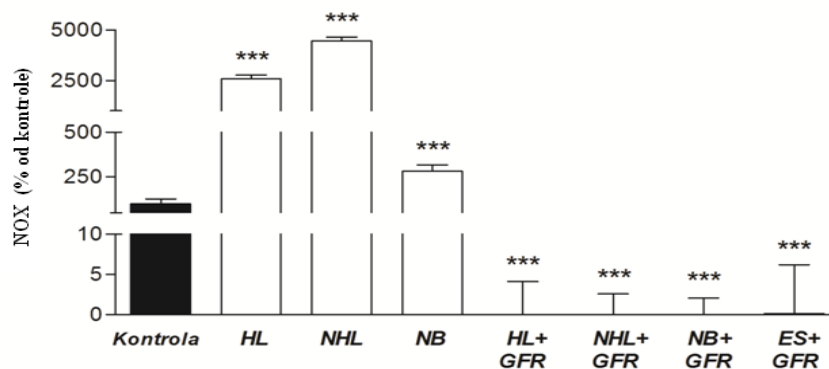
Pri određivanju iRNK za ATP sintazu detektovano je povećanje genske ekspresije u odnosu na kontrolu kod pacijenata koji nisu primali MP bez obzira na vrstu tumora (p < 0.001) (Figura 4). Genska ekspresija u svim grupama pacijenata koji su primali MP bila je manja u odnosu na onu detektovanu u kontrolnoj grupi (p < 0,01), osim u grupi pacijenata sa ES, gde je količina iRNK bila na kontrolnom nivou.



**Figura 4.** Promena ekspresije ATP sintaze kod pacijenata koji su primali MP i koji nisu. \*poređenje sa kontrolnom grupom; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.2.5. Genska ekspresija NAD(P)H oksidaze

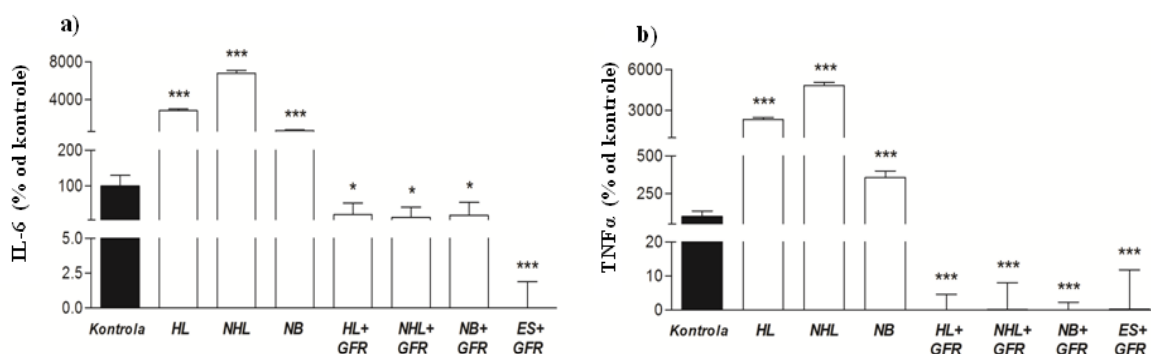
Promene genske ekspresije NAD(P)H oksidaze kod pacijenata sa različitim tipovima tumora, a koji su primali MP ili ne, prikazane su na Figuri 5. U odnosu na kontrolu, nivo iRNK za NAD(P)H oksidazu bio je povećan kod pacijenata koji nisu primali MP, bez obzira na tip tumora ( $p < 0.001$ ). Nasuprot tome, kod pacijenata koji su primali MP, nezavisno od tipa tumora, genska ekspresija NAD(P)H oksidaze bila je manja u odnosu na onu detektovanu u kontrolnoj grupi ( $p < 0.001$ ).



**Figura 5.** Promena ekspresije NAD(P)H oksidaze kod pacijenata koji su primali MP i koji nisu. \*poređenje sa kontrolnom grupom; \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.2.6. Genska ekspresija IL-6 i TNF $\alpha$

U grupama pacijenata koji nisu primali MP, nezavisno od tipa tumora, genska ekspresija IL-6 i TNF $\alpha$  bila je značajno veća od kontrole ( $p < 0.001$ ) (Figura 6a i b, respektivno). Suprotno tome, u grupama pacijenata koji su primali MP, genska ekspresija oba faktora bila je statistički značajno niža od kontrole.

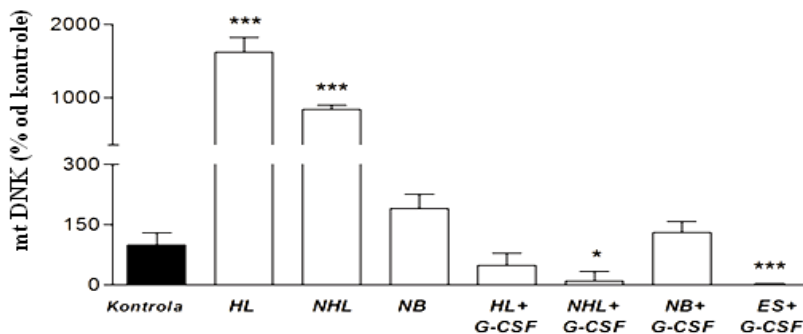


**Figura 6.** Promena ekspresije IL-6 (a) i TNF $\alpha$  (b) kod pacijenata koji su primali MP i koji nisu. \*poređenje sa kontrolnom grupom; \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.2.7. Kvantifikacija mtDNK

Nivo mtDNK bio je povećan u odnosu na kontrolu, kod pacijenata obolelih od HL i NHL, koji nisu primali MP ( $p < 0.001$ ). Takođe, kod pacijenata sa NB uočava se trend povećanja nivoa mtDNK, koje nije statistički značajano

Kod pacijenata koji su primali MP, nivo mtDNK kod pacijenata sa NHL ( $p < 0.05$ ) i ES ( $p < 0.001$ ) je manji u odnosu na kontrolnu grupu. Za razliku od njih, kod druga dva tipa tumora (NB i HL), koji su primali MP nivo mtDNK bio je na nivou kontrole (Figura 7).



**Figura 7.** Promena nivoa mtDNK kod pacijenata koji su primali MP i koji nisu. \*poređenje sa kontrolnom grupom; \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

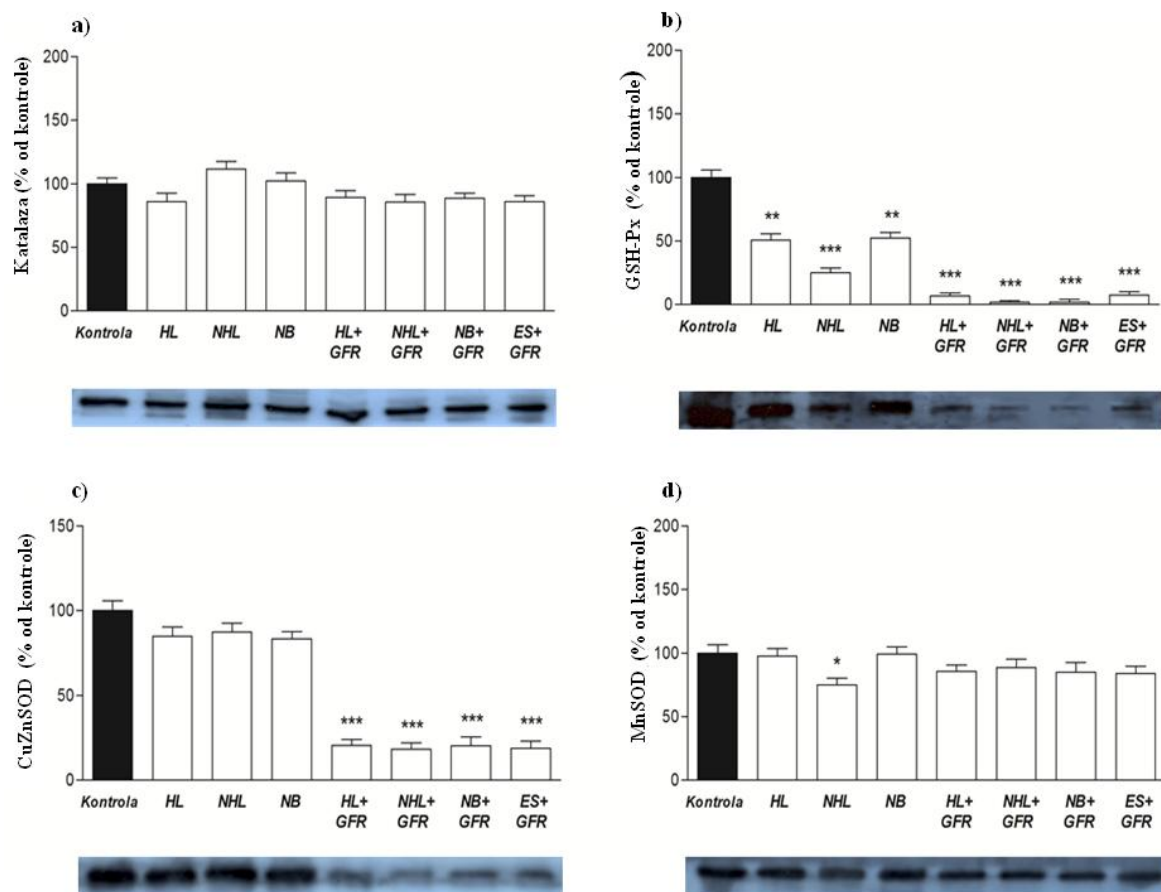
### 4.3. Rezultati *Western blot* analize

#### 4.3.1. Proteinska ekspresija enzima antioksidativne odbrane

*Western blot* analizom je utvrđeno da je u grupama pacijenata koji su primali MP, kao i grupama koje nisu primali MP, nezavisno od tipa tumora, proteinska ekspresija katalaze bila je na nivou kontrole (Figura 8a). Nasuprot tome, proteinska ekspresija GSH-Px bila je značajno smanjena u svim ispitivanim grupama, sa ili bez primene MP (Figura 8b).

Proteinska ekspresija CuZnSOD u grupama pacijenata koji nisu primali MP, bez obzira na vrstu tumora, bila je na nivou kontrole, tj. bez značajnih odstupanja (Figura 8c). Suprotno tome, u svim grupama pacijenata koji su primali MP detektovana je značajno niža ekspresija ovog proteina ( $p < 0.001$ ).

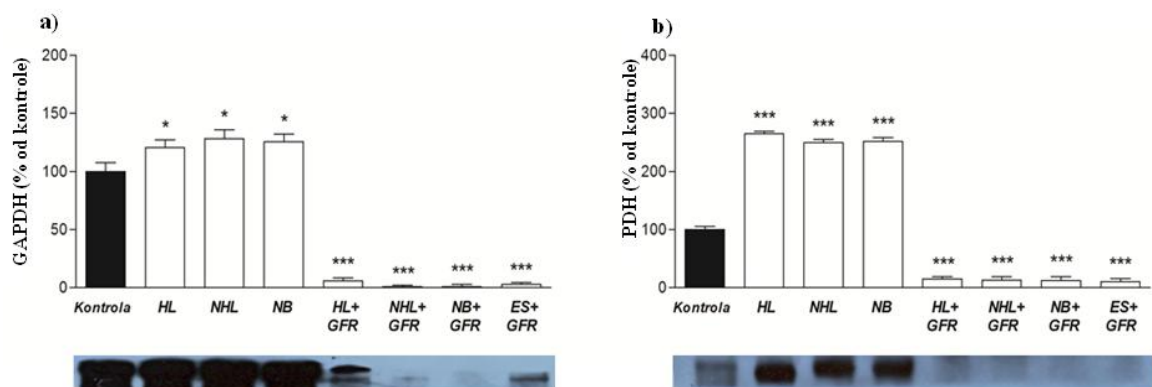
Slično kao i u slučaju katalaze, proteinska ekspresija MnSOD je bila na kontrolnom nivou u grupama pacijenata koji su primali MP, kao i u grupama koja nisu bile izložene njegovom dejstvu (Figura 8d). Smanjenje ekspresije primećeno je samo u grupi pacijenata sa NHL koji nisu primali MP ( $p < 0.05$ ).



**Figura 8a-d:** Promena proteinske ekspresije komponenti antioksidativne odbrane kod pacijenata koji su primali MP i koji nisu primali MP. \*poređenje sa kontrolnom grupom; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.3.2. Proteinska ekspresija GAPDH i PDH

Proteinska ekspresija GAPDH kod pacijenata koji nisu primali MP povećana u odnosu na kontrolu ( $p < 0.05$ ), nezavisno od tipa tumora (Figura 9a). Nasuprot tome, u grupama pacijenata koji su primali MP proteinska ekspresija ovog glikolitičkog enzima bila je značajno niža u odnosu na kontrolu, nezavisno od tipa tumora ( $p < 0.001$ ).



**Figura 9.** Promena proteinske ekspresije GAPDH (a) i PDH (b) kod pacijenata koji su primali MP i koji nisu primali MP. \*poređenje sa kontrolnom grupom; \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

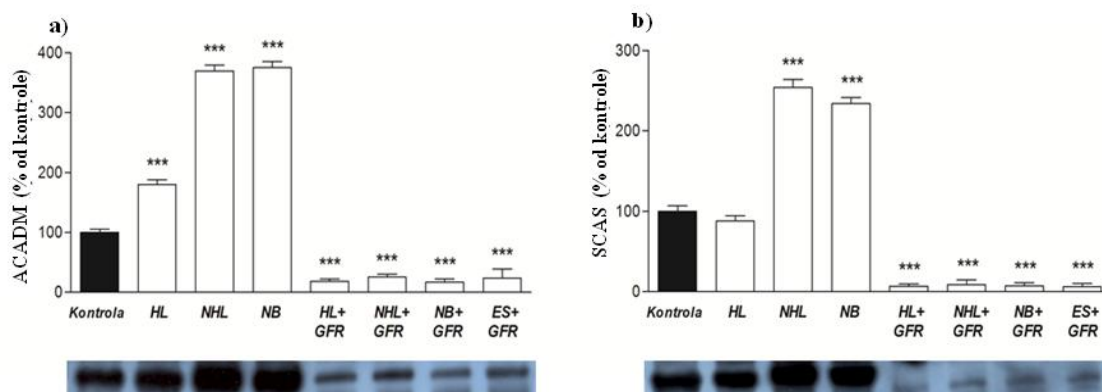
Slično tome, *Western blot* analizom je detektovana veća proteinska ekspresija PDH u grupama pacijenata koji nisu primali MP u odnosu na kontrolu ( $p < 0.001$ ), nezavisno od tipa tumora (Figura 9b). Takođe, u svim grupama pacijenata koji su primali MP proteinski nivo ovog kompleksa je bio značajno niži u poređenju sa kontrolom ( $p < 0.001$ ).

#### 4.3.3. Proteinski nivo enzima $\beta$ -oksidacije i Krebsovog ciklusa

Određivanjem proteinske ekspresije acil-CoA dehidrogenaze masnih kiselina srednje dužine (ACADM) (Figura 10a) u grupi pacijenata koji nisu primali MP detektovano je značajno povećanje u odnosu na kontrolni nivo ( $p < 0.001$ ). U grupi pacijenata koji su primali MP, bez obzira na vrstu tumora, detektovana je značajno niža ekspresija ovog enzima  $\beta$ -oksidacije u odnosu na kontrolu ( $p < 0.001$ ).

U grupi pacijenata koji nisu primali MP nivo proteinske ekspresije sukcinil-CoA sintetaze (SCAS) bio je značajno veći kod pacijenata sa NHL i NB u odnosu na kontrolu ( $p < 0.001$ ), za razliku od pacijenata sa HL, gde se ekspresija održava na kontrolnom nivou (Figura 10b). U grupi pacijenata koji su primali MP, bez obzira na vrstu tumora, a u odnosu na kontrolu, detektovana je značajno niža proteinska ekspresija SCAS ( $p < 0.001$ ).

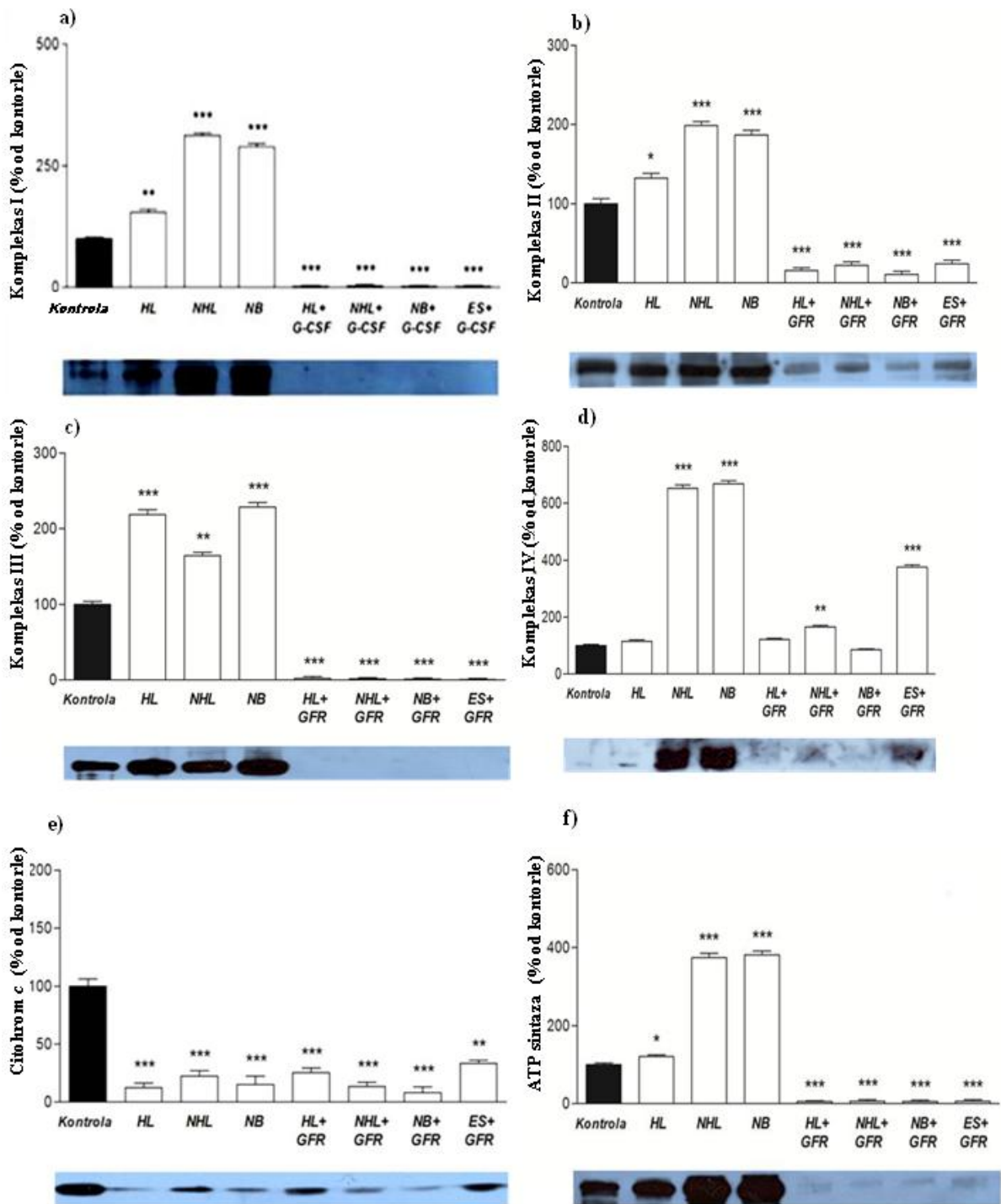




**Figura 10.** Promena proteinske ekspresije ACADM (a) i SCAS (b) kod pacijenata koji su primali MP i koji nisu primali MP. \*poređenje sa kontrolnom grupom; \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.3.4. Proteinska ekspresija komponenti oksidativne fosforilacije

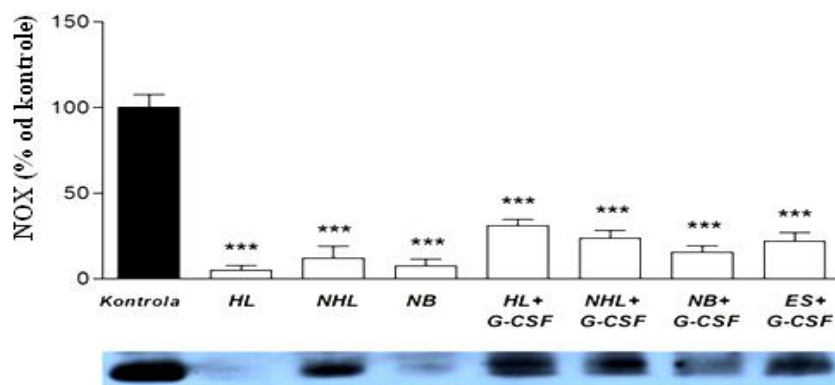
Određivanjem nivoa proteinske ekspresije komponenti respiratornog lanca (Figura 11), utvrđeno je da su u grupama pacijenata koji nisu primali MP, sve ispitivane komponente značajno više eksprimirane u poređenju sa kontrolom. Izuzetak je citohrom *c* (Figura 11e) čiji je nivo proteina značajno smanjen u svim ispitivanim grupama pacijenata, i kod onih koji su i koji nisu primali MP, kao i subjednica IV citohrom *c* oksidaze (Figura 11d), čija je proteinska ekspresija bila na kontrolnom nivou u grupi pacijenata sa HL koji nisu primali MP. Nadalje, u grupama pacijenata koje su primali MP, proteinska ekspresija kompleksa I, II i III je bila statistički značajno manja u odnosu na kontrolu ( $p < 0.001$ ) (Figura 11a-c, respektivno), nezavisno od vrste tumora, dok je u ovim grupama pacijenata proteinska ekspresija subjednice IV citohrom *c* oksidaze (Figura 11d) bila na kontrolnom nivou (HL i NB) ili čak veća od kontrole (NHL i ES). Nivo proteina ATP sintaze kod pacijenata koji su primali MP je bio značajno snižen u odnosu na kontrolu ( $p < 0.001$ ). U grupi pacijenata koji nisu primali MP, nivo proteinske ekspresije ATP sintaze bio je značajno veći kod pacijenata sa HL, NHL i NB, u odnosu na kontrolu ( $p < 0.001$ ) (Figura 11f).



**Figura 11a-f** . Promena proteinske ekspresije komponenti respiratornog lanca kod pacijenata koji su primali MP i koji nisu. \*poređenje sa kontrolnom grupom; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.3.5. Proteinska ekspresija NAD(P)H oksidaze

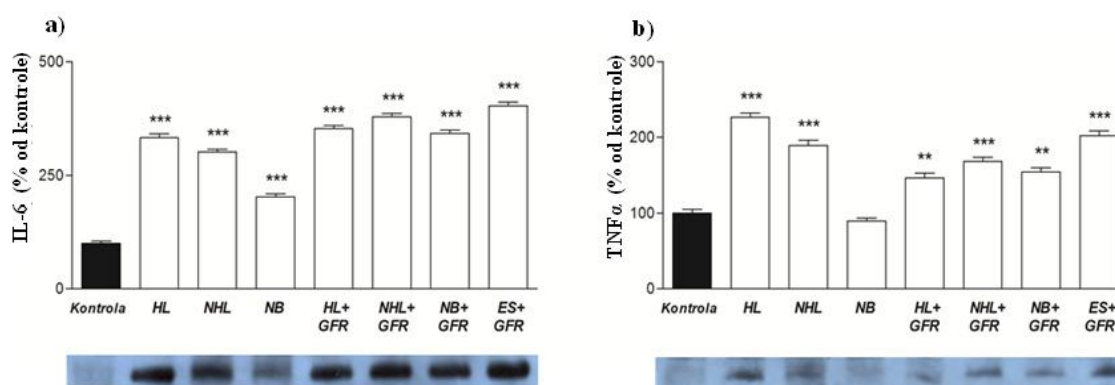
Proteinska ekspresija NAD(P)H oksidaze u svim ispitivanim grupama pacijenata, bilo da su primali ili ne MP, bila je statistički značajno niža u odnosu na kontrolu ( $p < 0.001$ ), kao što je prikazano na Figuri 12.



**Figura 12.** Promena proteinske ekspresije NAD(P)H oksidaze kod pacijenata koji su primali MP i koji nisu. \*poređenje sa kontrolnom grupom; \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.3.6. Ekspresija IL-6 i TNF $\alpha$ na nivou proteina

U poređenju sa kontrolom, proteinska ekspresija IL-6 i TNF $\alpha$  bila je značajno veća u svim ispitivanim grupama pacijenata, nezavisno od toga da li su primali ili ne MP i tipa tumora (Figura 12a i b, respektivno). Jedini izuzetak je viđen u grupi pacijenata sa NB koji su primali ili ne MP, kod kojih je količina TNF $\alpha$  proteina bila na kontrolnom nivou.

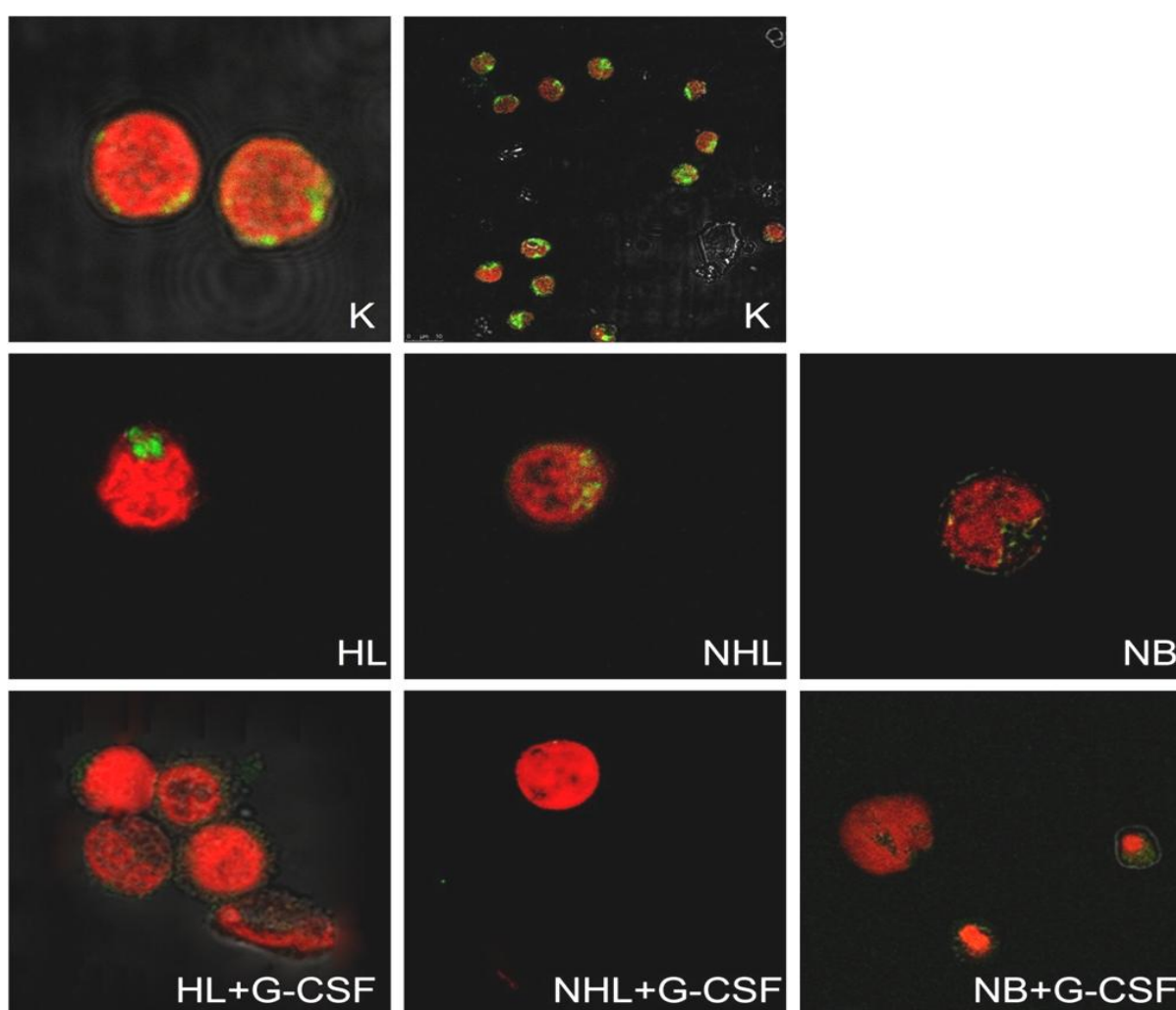


**Figura 12.** Promena proteinske ekspresije IL-6 (a) i TNF $\alpha$  (b) kod pacijenata koji su primali MP i koji nisu. \*poređenje sa kontrolnom grupom; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 4.4. Mikroskopija

### 4.4.1. Funkcioni status mitohondrija

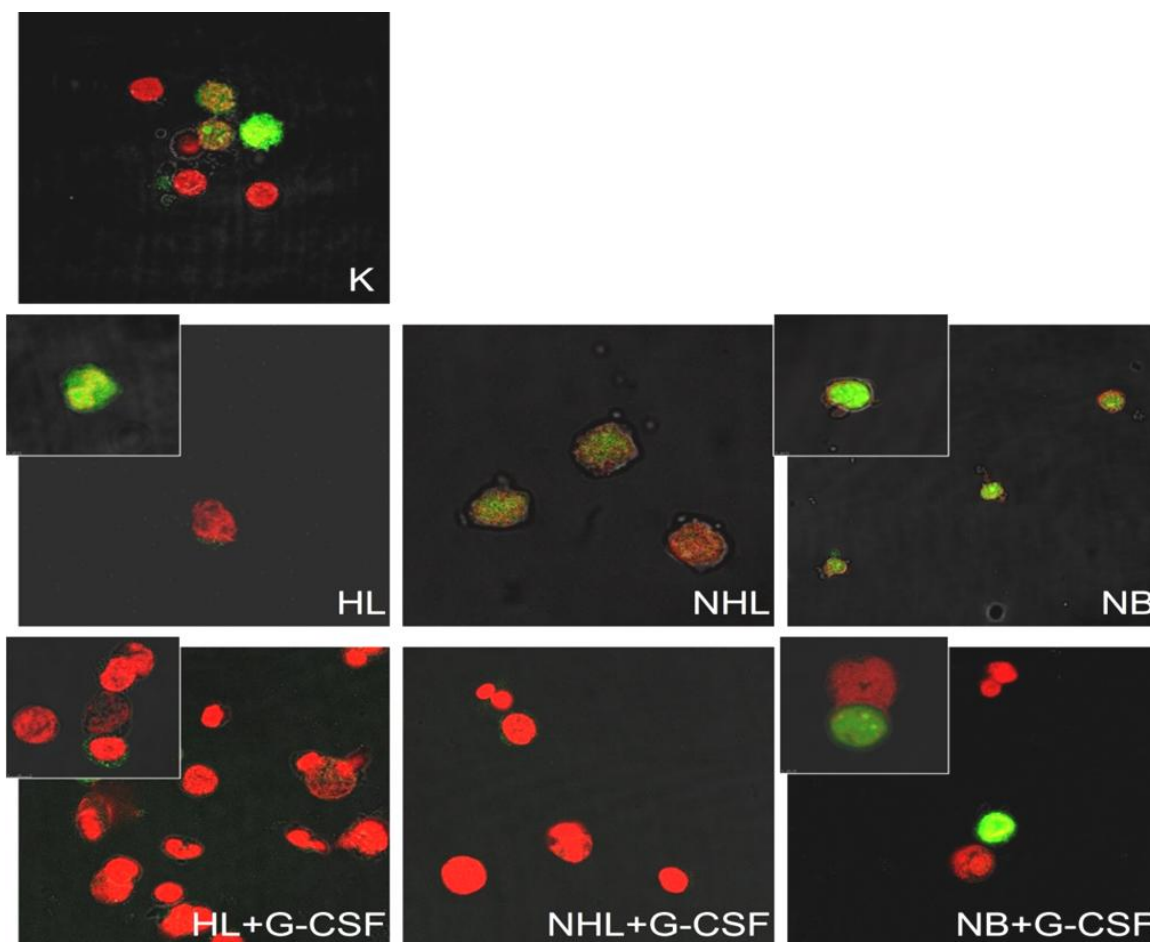
Funkcioni status mitohondrija je ispitivan korišćenjem specifične fluorescentne probe MT-G, koja se selektivno akumulira u mitohondrijama sa očuvanim transmembranskim elektrohemijским potencijalom (Slika 17). U ćelijama kontrolne grupe (monojedarne ćelije zdravih davalaca) detektuje se intenzivna fluorescencija perinukleusno lokalizovanih mitohondrija. Za razliku od kontrole, ćelije pacijenata koji nisu primali MP pokazuju slabiju fluorescenciju MT-G, koja je još slabija u grupi pacijenata nakon tretmana.



**Slika 17.** Imunofluorescentna detekcija MT-G, konfokalnom mikroskopijom u ćelijama kontrolnih pacijenata, pacijenata sa HL, NHL i NB i pacijenata sa HL, NHL i NB koji su primali MP (HL+G-CSF; NHL+G-CSF; NB+G-CSF); uveličanje x100, orig.

#### 4.4.2. Vizuelizacija unutarćelijske produkcije azot oksida (NO) fluorescentnim obeležavanjem 4,5-diaminofluorescin-2-diacetatom (Daf2-DA)

Rezultati fluorescentne detekcije NO produkcije prikazani su na Slici 18. U kontrolnoj grupi zapaža se izražena heterogenost ćelija u pogledu intenziteta NO produkcije. Po intenzitetu fluorescentne reakcije ćelije se mogu svrstati u tri grupe: 1) grupa sa intenzivnom reakcijom u celoj ćeliji; 2) grupa sa slabijom, difuzno raspoređenom reakcijom unutar ćelija i 3) grupa sa veoma slabom reakcijom, specifično prisutnom samo u perifernim delovima citoplazme. Heterogenost u intenzitetu fluorescence je izražena i u ćelijama pacijenata sa NB koji su primali MP gde se jasno vidi da pojedine ćelije pokazuju jaku fluorescentnu reakciju, dok su pojedine ćelije potpuno Daf2-DA negativne. Daf2-DA pozitivnost se uočava i u grupama netretiranih pacijenata sa HL, NHL i posebno u ćelijama pacijenata sa NB. U ćelijama pacijenata sa HL i NHL koji su primali MP detektuje se veoma slaba granularna fluorescentna reakcija lokalizovana na periferiji pojedinih ćelija.

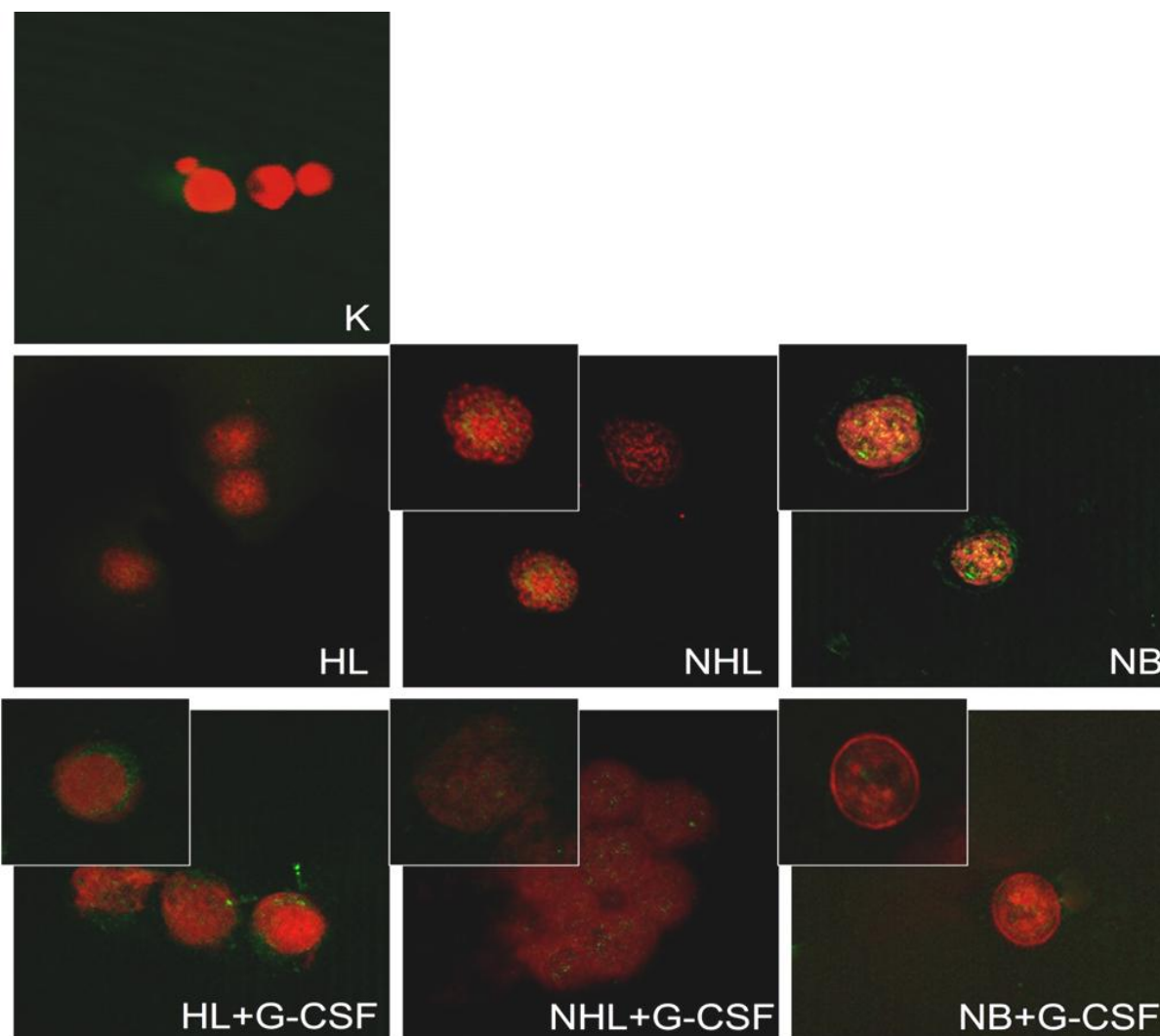


**Slika 18.** Imunofluorescentna detekcija azot oksida 4,5-diaminofluorescein-2-diacetatom (Daf2-DA) u ćelijama kontrolnih pacijenata, pacijenata sa HL, NHL i NB i pacijenata sa HL, NHL i NB koji su primali MP (HL+G-CSF; NHL+G-CSF; NB+G-CSF); uvećanje x100, orig.

### 4.4.3. Imunofluorescentna detekcija ekspresije i unutarćelijska lokalizacija izoformi azot oksid sintaza konfokalnom mikroskopijom

#### 4.4.3.1. Detekcija ekspresije i lokalizacija iNOS

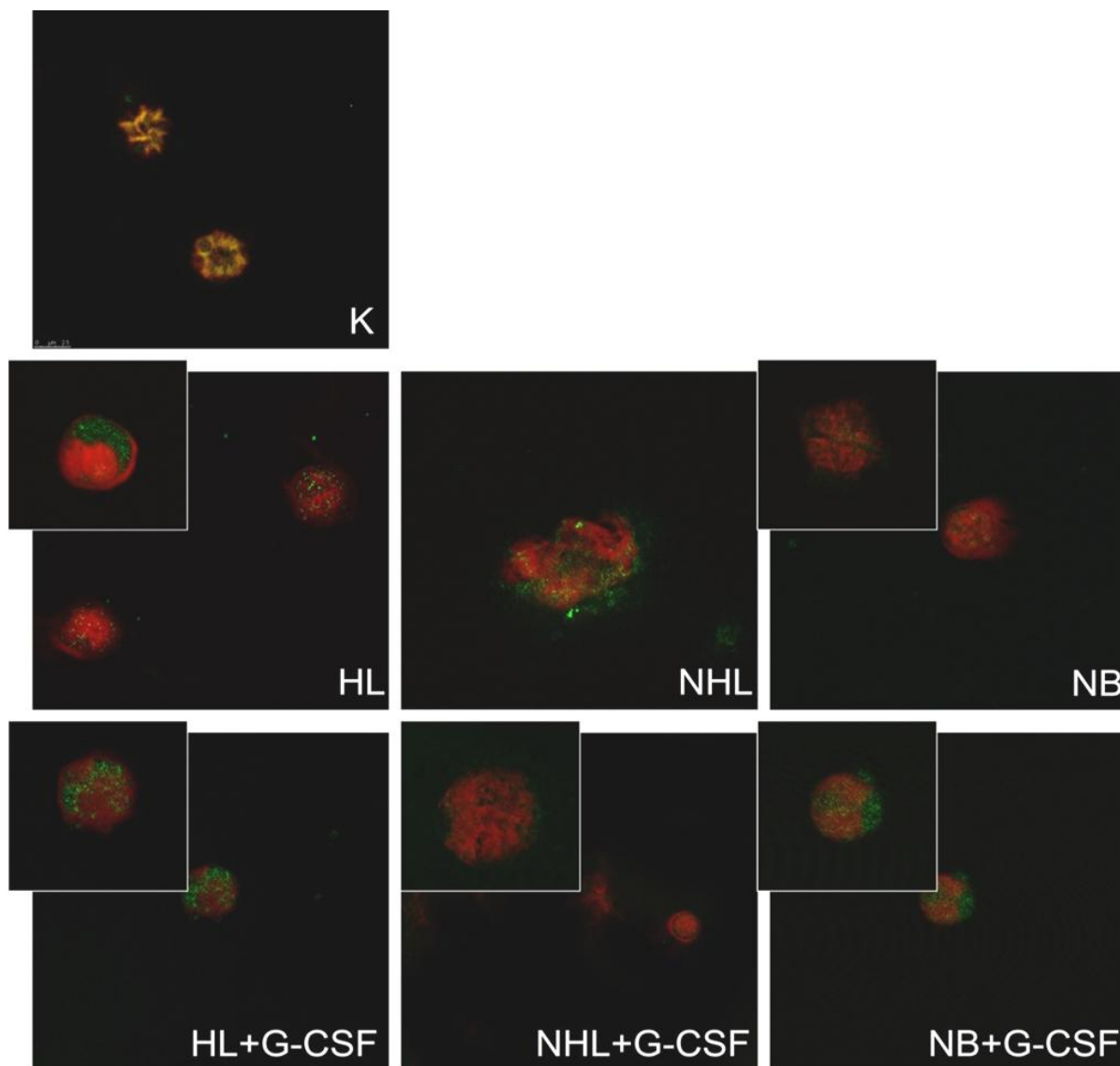
U poređenju sa kontrolom gde je imunopozitivnost na iNOS na pragu detektabilnosti, slaba imunopozitivna reakcija na iNOS detektovana je u svim ispitivanim grupama pacijenata sa tumorom nezavisno od tretmana. Ova reakcija je intenzivnija u ćelijama netretiranih pacijenata sa NB (Slika 19).



**Slika 19.** Imunofluorescentna detekcija ekspresije i unutarćelijska lokalizacija iNOS konfokalnom mikroskopijom u ćelijama kontrolnih pacijenata, pacijenata sa HL, NHL i NB i pacijenata sa HL, NHL i NB koji su primali MP (HL+G-CSF; NHL+G-CSF; NB+G-CSF); uveličanje x100, orig.

#### 4.4.3.2. Detekcija ekspresije i lokalizacija eNOS

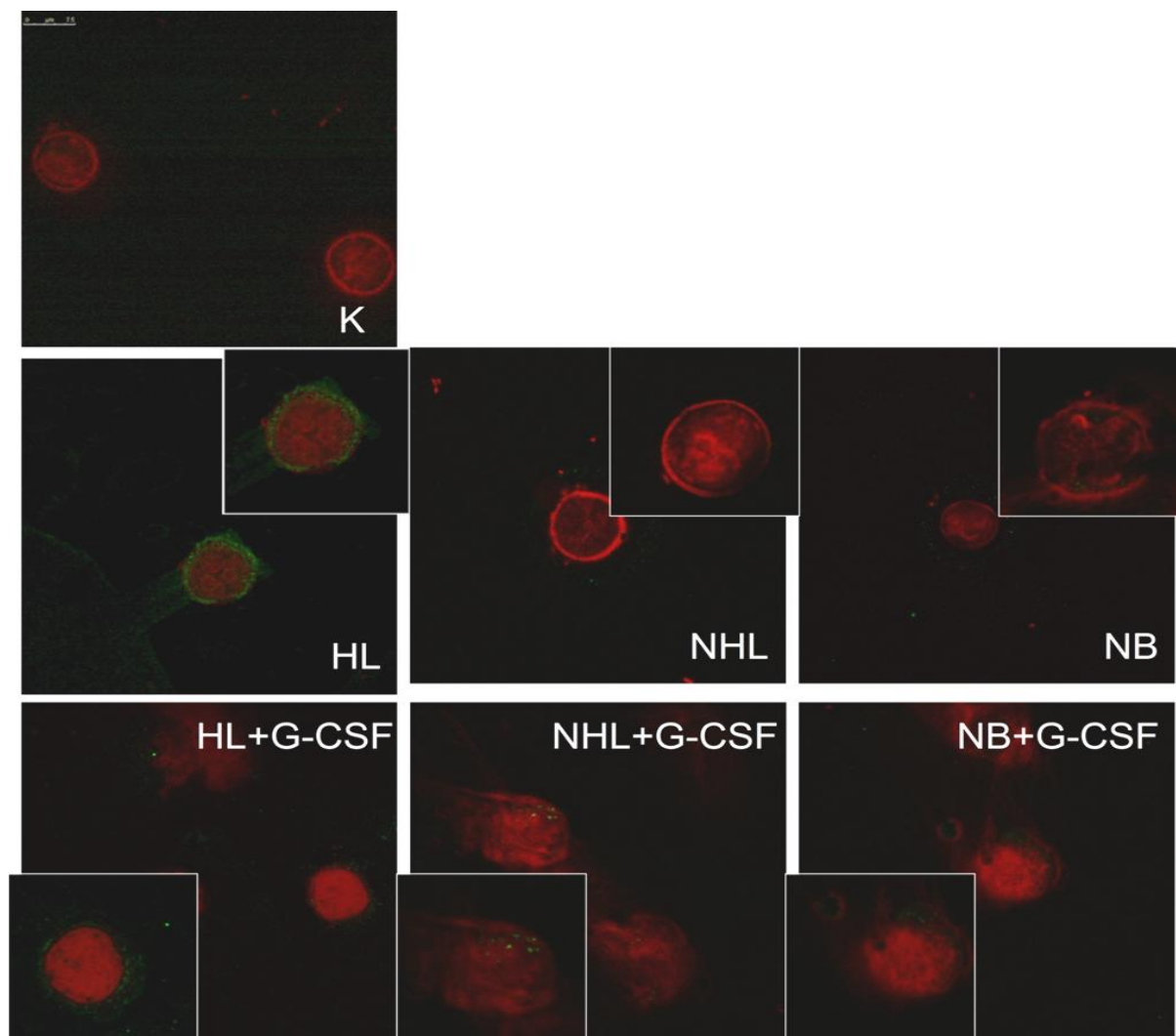
Ćelije imunopozitivne na eNOS detektuju se u kontroli, kao i u svim ispitivanim grupama obolelih pacijenata, izuzev grupe pacijenata sa NHL koji su primali MP. Jasna, granularna reakcija na eNOS, lokalizovana u citoplazmi, izražena je u ćelijama netretiranih pacijenata sa HL i NHL, kao i u ćelijama pacijenata sa HL i NB koji su primali MP (Slika 20).



**Slika 20.** Imunofluorescentna detekcija ekspresije i unutarćelijska lokalizacija eNOS konfokalnom mikroskopijom u ćelijama kontrolnih pacijenata, pacijenata sa HL, NHL i NB i pacijenata sa HL, NHL i NB koji su primali MP (HL+G-CSF; NHL+G-CSF; NB+G-CSF); uveličanje x100, orig.

#### 4.4.4. Imunofluorescentna detekcija ekspresije i unutarćelijska lokalizacija katalaze konfokalnom mikroskopijom

Veoma slaba imunopozitivnost na katalazu detektovana je u ćelijama svih ispitivanih grupa pacijenata (Slika 21). U poređenju sa kontrolom, u grupama pacijenata sa HL (koji su primali i koji nisu primali MP) detektuje se izraženija imunopozitivna reakcija na katalazu, koja je lokalizovana na periferiji citoplazme.

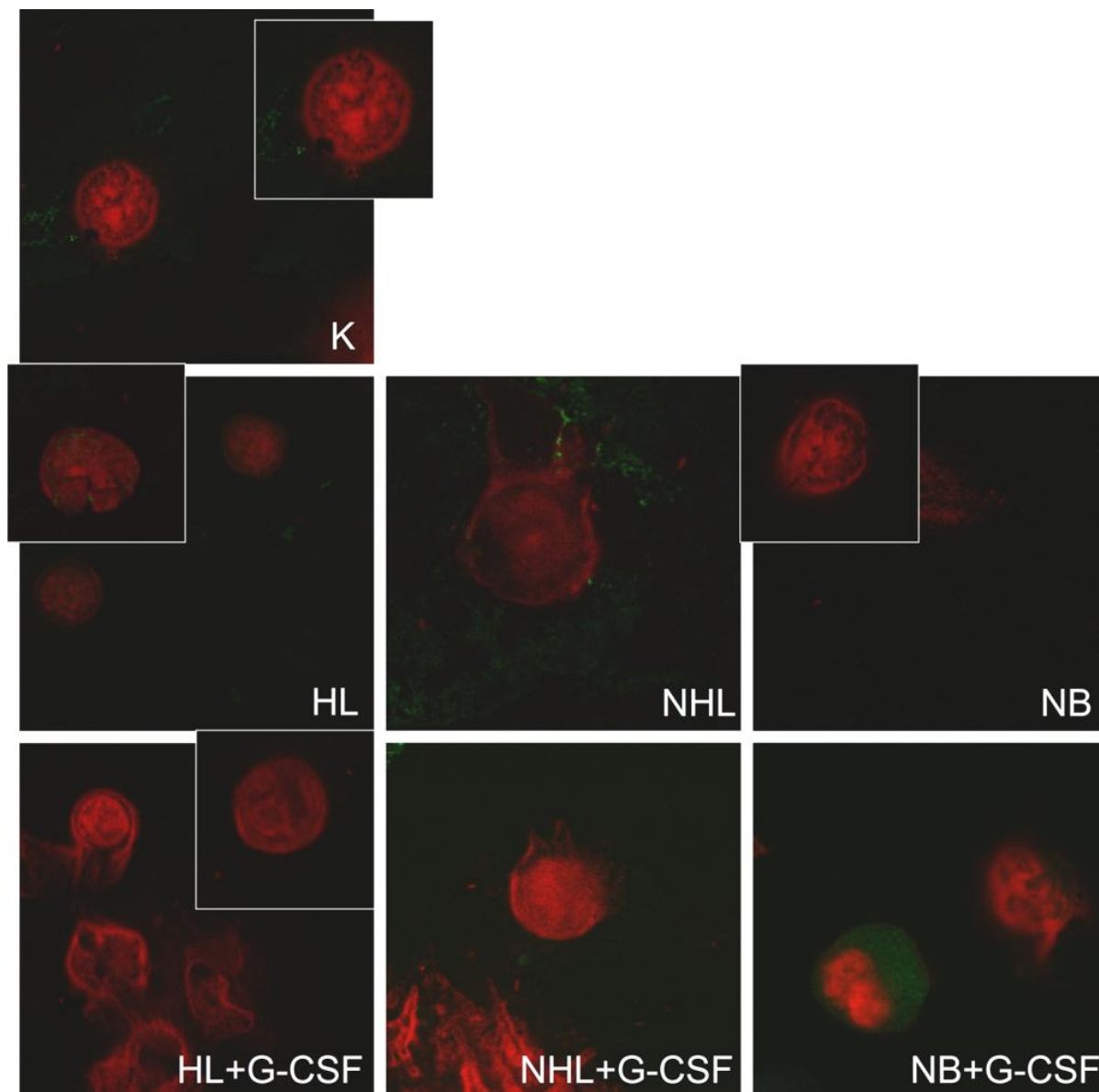


**Slika 21.** Imunofluorescentna detekcija ekspresije i unutarćelijska lokalizacija katalaze konfokalnom mikroskopijom u ćelijama kontrolnih pacijenata, pacijenata sa HL, NHL i NB i pacijenata sa HL, NHL i NB koji su primali MP (HL+G-CSF; NHL+G-CSF; NB+G-CSF); uveličanje x100, orig.



#### 4.4.5. Imunofluorescentna detekcija ekspresije i unutarćelijska lokalizacija IL-6 konfokalnom mikroskopijom

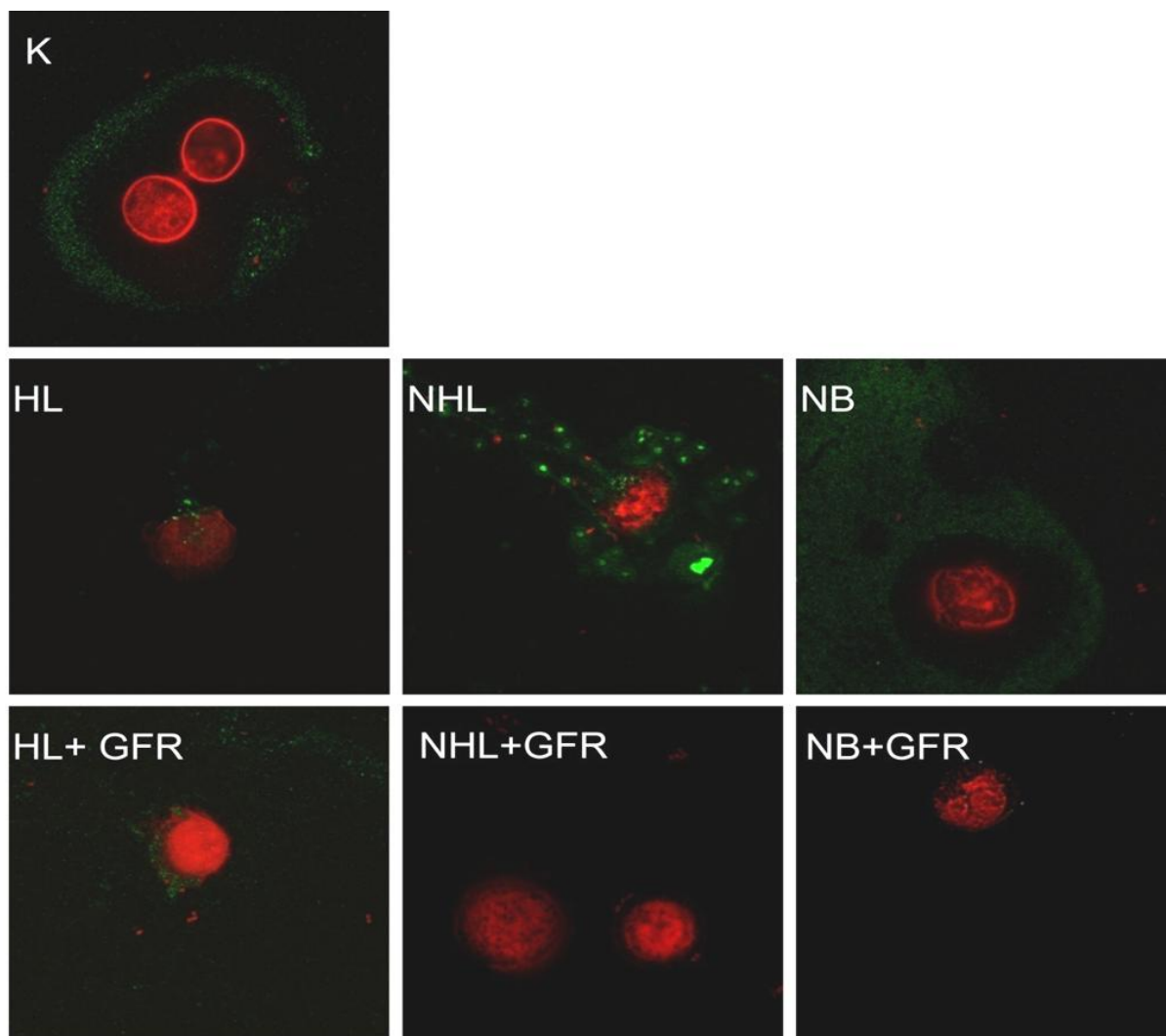
U ćelijama kontrolne grupe detektuje se veoma slaba reakcija na IL-6. U poređenju sa kontrolom, izražena imunopozitivnost na IL-6 detektuje se u pojedinim ćelijama pacijenata sa HL koji su primali MP (Slika 22).



**Slika 22.** Imunofluorescentna detekcija ekspresije i unutarćelijska lokalizacija IL-6 konfokalnom mikroskopijom u ćelijama kontrolnih pacijenata, pacijenata sa HL, NHL i NB i pacijenata sa HL, NHL i NB koji su primali MP (HL+G-CSF; NHL+G-CSF; NB+G-CSF); uveličanje x100, orig.

#### 4.4.6. Imunofluorescentna detekcija ekspresije i unutarćelijska lokalizacija TNF $\alpha$ konfokalnom mikroskopijom

Rezultati imunohistohemijske detekcije TNF $\alpha$  prikazani su na Slici 23. Slaba imunopozitivnost na TNF $\alpha$  detektuje se u pojedinim ćelijama svih ispitivanih grupa pacijenata, s tim da je najizraženija reakcija zabeležena u grupi pacijenata sa neuroblastomom koji su primali mobilizacioni protokol. U pojedinim ćelijama ove grupe pacijenata detektuje se jasna citoplazmatska lokalizacija TNF $\alpha$ .



**Slika 23.** Imunofluorescentna detekcija ekspresije i unutarćelijska lokalizacija TNF $\alpha$  konfokalnom mikroskopijom u ćelijama kontrolnih pacijenata, pacijenata sa HL, NHL i NB i pacijenata sa HL, NHL i NB koji su primali MP (HL+G-CSF; NHL+G-CSF; NB+G-CSF); uveličanje x100, orig.

#### 4.5. Prihvanje kalema posle učinjene autologne transplantacije

Rezultati prikazani u Tabeli 13. pokazuju broj ćelija po kilogramu telesne mase koji je primio svaki pacijent grupe koja je primala MP (MNC; CD34+, broj kolonija), kao i dan prihvatanja kalema po učinjenoj autolognoj transplantaciji. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da ne postoji zavisnost između broja datih MNC, CD34+ i GM-CFU i dana prihvatanja kalema.

Tabela 13. Prikaz dijagnoza, broja datih MNC, CD34+ i GM- CFU, kao i dan prihvatanja granulocitne i megakariocitne loze

pacijent	dijagnoza	broj datih MNC x 10 <sup>8</sup> /kg TM	broj datih CD34+ ćelija x 10 <sup>6</sup> /kg TM	broj datih GM-CFU x 10 <sup>5</sup> /kg TM	dan prihvatanja kalema granulocitne loze	dan prihvatanja kalema megakariocitne loze
1	NHL	1.8	13.2	6.8	17	11
2	NHL	1.5	21.5	13.5	12	30
3	NHL		4.1	2.24	20	9
4	HL	3.7	5.3	1.4	12	8
5	HL	7	4.5	3.5	14	13
6	HL	3.8	8.0	0.6	17	11
7	HL	2.0	6	1.5	15	9
8	HL	2.5	8.5	6	24	13
9	NB	2	7.6	6.5	15	11
10	NB	11.1	7.0	6	12	8
11	NB	4.4	27.9	4.2	15	32
12	NB	1.04	9.3	0.02	82	/
13	NB	4.5	6.4	5.6	19	9
14	NB	8.3	6.4	7.5	9	10
15	NB	3.6	5.6	5.3	16	12
16	ES	7.5	8.8	3.7	15	10
17	ES	0.9	16.3	1.5	11	8
18	ES	13.6	10.1	1.5	12	11
19	ES	0.9	9.9	0.65	11	10
20	ES	3.54	7.0	6.4	14	7
21	ES	22.7	8.0	6.4	22	13
22	ES	1.1	6.7	veliki br. kolonija*	18	14
23	ES	2.2	6.4	3.4	17	9

\*Nije moglo biti izbrojano, jer su se formirali klasteri kolonija.

Od 27 uzoraka na kojima su rađeni eksperimenti 4 uzorka nisu navedena u Tabeli 13, jer transplantacije nisu urađene.

Dani prihvatanja kalema, nivo c-reaktivnog proteina (CRP), kao i srednja dnevna vrednost telesne temperature prikazani su posebno za svaki tip tumora i pacijenta.

**Tabela 14.** Praćenje temperature i nivoa CRP-a kod bolesnika sa HL od dana davanja ćelija do dana prihvatanja kalema.

	Pacijent 1		Pacijent 2		Pacijent 3		Pacijent 4		Pacijent 5	
	T°C	CRP mg/L	T°C	CRP mg/L	T°C	CRP mg/L	T°C	CRP mg/L	T°C	CRP mg/L
0	36.8	9.5	36.8	<10	37.5	/	37.5	26.7	37.9	50.7
1	38.4	32.6	36.9	/	38.2	/	37.6	/	37.8	/
2	38	65.7	36.5	/	38.2	/	37.8	53.8	37.2	15.3
3	38.7	72	37.7	/	38.2	40.3	37.8	62.9	36.8	/
4	38.8	113	36.5	16	38.8	59.4	38.2	58	37	/
5	38.4	90.9	36.6	/	38.3	/	37.5	/	36.8	/
6	37.4	/	36.6	/	37.9	90.7	37.2	59.9	36.7	/
7	37.3	122.2	36.7	<10	37.2	72.2	37.7	/	36.7	5
8	37.5	132.8	37.8	/	38.7	/	38	35.9	36.6	/
9	36.8	/	38.6	22	38.1	81.1	38.3	54.2	37.3	/
10	35.9	/	38.5	45	37.8	64	37.8	94.6	37.3	/
11	36.5	49.8	37.4	/	37.1	/	37.8	61.8	37.4	5.5
12	36.6	/	36.8	/	37.2	/	37.1	/	39.3	4.7
13			37.8	/	36.8	/	36.8	42.5	38	/
14			36.8	15	36.8	/	37.2	/	36.8	7.6
15					36.8	/	37.2	22.7	36.5	/
16					36.8	/			36.8	2.5
17					36.8	1.2			35.9	/
18									36.6	1.9
19									36.6	/
20									36.7	/
21									36.7	0,9
22									36.8	/
23									36.8	/
23									36,8	/

Žuta boja obeležava dan prihvatanja trombocita  
 Crvena boja obeležava dan prihvatanja granulocita

**Tabela 15.** Praćenje temperature i nivoa CRP-a kod bolesnika sa NHL od dana davanja ćelija do dana prihvatanja kalema.

dan	Pacijent 1		Pacijent 2		Pacijent 3	
	T°C	CRP mg/L	T°C	CRP mg/L	T°C	CRP mg/L
0	37	/	36.5	24.4	36.5	/
1	37.1	/	36.5	/	36.7	/
2	37.4	13.5	36.6	17.6	36.7	/
3	37.5	/	36.7	21.4	38.7	8.6
4	38.2	43.7	37.9	/	38.8	/
5	38.7	84.6	37.3	60.3	39.1	46.6
6	37.8	98.8	37.6	/	38.8	/
7	38.7	60.3	38.4	80.9	38.9	98.0
8	37.9	62.0	37.4	/	37.8	/
9	38.3	51.4	38.2	60.3	37.3	31.8
10	37.2	/	41	91.2	37.5	/
11	37	/	38.1	/	37.3	/
12	36.7	12.7	39.4	3.7	37.2	10.3
13	36.7	/	36.5	130.7	36.7	/
14	36.8	/	37.5	101.5	36.7	5
15	36.8		36.8	/	36.5	/
16	36.8	2.1	36.8	64.1	36.7	/
17	36.6	/	38.3	46.5	36.7	/
18			37.4	61.3	36.3	/
19			37.9	69.4	37.2	1.5
20			37.6	/	36.6	/
21			37.5	78.6		
22			37.5	/		
23			37.8	51.9		
24			38.2	38.3		
25			38.5	/		
26			37.5	/		
27			37.5	34.8		
28			37.1	31.5		
29			37	/		
30			36.8	24.6		

Žuta boja obeležava dan prihvatanja trobocita

Crvena boja obeležava dan prihvatanja granulocita

**Tabela 16.** Praćenje temperature i nivoa CRP-a kod bolesnika sa NB od dana davanja ćelija do dana prihvatanja kalema.

	Pacijent 1		Pacijent 2		Pacijent 3		Pacijent 4		Pacijent 5		Pacijent 6	
	T°C	CRP mg/L	T°C	CRP mg/L	T°C	CRP mg/L	T°C	CRP mg/L	T°C	CRP mg/L	T°C	CRP mg/L
0	37	/	36.8	11.1	36.5	/	37.5	3.3	36.5	92.9	36.6	0.4
1	36.6	/	36.8	/	36.5	/	37.2	/	36.5	/	36.8	/
2	36.7	/	36.9	/	36.6	/	37.5	/	36.5	45.2	36.8	/
3	37.4	1.8	36.8	/	36.6	/	37.6	1.4	37.5	34.4	36.8	1.1
4	37.2	/	36.7	/	36.5	/	38	/	36.7	67.1	36.6	/
5	37.2	/	37.6	22.9	36.6	/	38.2	8.8	36.8	78.9	36.6	/
6	37.3	/	38.3	/	36.7	1.0	38.5	/	36.9	/	36.6	/
7	37	/	38.6	125.4	37.8	19.1	38.2	22.7	36.6	45	38.9	16.5
8	36.8	/	38.2	129.9	38.6	/	38.5	/	36.5	46.9	38	61.8
9	37	/	38.3	130.4	38.2	108.3	38.4	/	36.7	/	37.5	/
10	36.6	/	37.6	/	36.5	/	38.6	39.9	36.7	28.1	38.3	50.9
11	37.7	1.4	37	91.5	36.7	/	37.5	/	36.8	/	37.4	/
12	36.8	/	36.8	/	36.8	35.4	37.8	10.4	36.8	/	37.5	35.8
13	36.8	/			36.8	18.4	38	/	36.8	6.1	36.7	/
14	37.2	/			36.6	/	38.8	11.1	36.8	/	36.7	18.2
15	37	/			36.8	8.4	38	/	36.8	3.0	36.8	/
16	36.8	/					37.9	/			36.8	/
17	36.8	/					38.2	10.2				
18	36.9	1.7					38.1	/				
19	36.6	/					37.5	17.9				
20							36.8	15.9				
21							37.1	15.6				
22							36.9	/				
23							36.6	/				
24							37.2	13.4				
25							36.7	/				
26							36.6	6.9				
27							36.8	/				
28							36.8	/				
29							36.8	/				
30							36.8	/				
31							36.7	/				
32							36.7	/				

Žuta boja obeležava dan prihvatanja trombocita

Crvena boja obeležava dan prihvatanja granulocita

**Tabela 17.** Praćenje temperature i nivoa CRP-a kod bolesnika sa ES od dana davanja ćelija do dana prihvatanja kalema

	Pacijent 1		Pacijent 2		Pacijent 3		Pacijent 4		Pacijent 5		Pacijent 6		Pacijent 7		Pacijent 8	
	T°C	CRP mg/L	T°C	CRP mg/L	T°C	CRP mg/L	T°C	CRP mg/L	T°C	CRP mg/L	T°C	CRP mg/L	T°C	CRP mg/L	T°C	CRP mg/L
0	36.9	/	37	/	38.3	92.5	38	/	36.6	5.8	37.1	34.7	36.8	/	37.1	/
1	36.7	/	36.4	/	36.8	/	37	81.8	36.7	/	38	51.9	36.8	/	36.8	/
2	36.7	/	37	/	36.8	/	36.6	/	36.6	8.1	37.8	/	36.6	/	36.5	/
3	37.1	/	38.5	2.7	36.8	/	37	/	36.7	9.8	37.8	/	36.7	/	36.5	/
4	37.5	/	37.1	/	36.8	/	37	/	36.7	/	37.7	55.6	36.8	/	36.6	/
5	38.2	16.3	38.2	25.4	36.7	/	37.4	45.6	36.8	/	36.7	/	36.8	1.6	36.7	/
6	37.9	72.4	38.2	/	37.8	/	37.5	97.1	37.8	11.2	36.8	59.1	36.7	/	37	4.0
7	37.9	/	38.9	82.3	38.2	75.7	<b>37</b>	/	38.7	73.8	37.2	/	37.5	/	37.2	/
8	36.6	41.3	<b>38.9</b>	/	38.5	/	36.7	51	38.9	102.2	36.8	29.5	36.8	/	37.2	/
9	37.3	/	38.9	112.2	38.5	/	36.7	/	39.2	112.8	36.8	/	<b>36.9</b>	/	38.3	11.6
10	<b>37.1</b>	<b>19.5</b>	38.8	98.2	38.3	127	36.8	53.9	<b>38.9</b>	/	36.8	/	37.8	9.4	36.8	28.9
11	36.7	/	<b>37.8</b>	/	<b>37.2</b>	/	39	/	<b>37.1</b>	<b>111.8</b>	36.8	/	38	16.5	38	/
12	36.6	/			<b>36.7</b>	/	38.4	/			36.8	3.8	37.2	/	38	17.3
13	36.7	5.9					38.3	38.1			<b>36.6</b>	<b>3.3</b>	36.9	18.2	37	19.8
14	36.7	/					<b>37</b>	/			36.8	/	36.8	/	<b>36.8</b>	/
15	<b>36.8</b>	<b>2</b>									36.7	4.7	36.7	4.6	36.8	/
16											36.8	/	36.7	/	36.7	/
17											36.5	2.2	<b>36.7</b>	<b>1.6</b>	36.6	/
18											36.6	/			<b>36.8</b>	/
19											36.8	/				
20											36.9	0.8				
21											36.9	/				
22											<b>36.7</b>	/				

Žuta boja obeležava dan prihvatanja trobocita

Crvena boja obeležava dan prihvatanja granulocita

## ***5. Diskusija***



Jedna važna, interesantna i mlada oblast istraživanja u ćelijskoj biologiji, pa i imunologiji je metabolička regulacija limfocita. Postalo je jasno da tokom mirovanja (uspavanosti) limfociti nisu izgubili aktivirajuće signale, već da izbalansirani procesi kontrolišu nivo metaboličke aktivnosti. Aktivacija limfocita, njihova proliferacija i diferencijacija nisu automatski procesi (bilo u odgovoru na antigen ili u patološkim stanjima), već zahtevaju drastične promene u metaboličkoj funkciji ćelija, neophodne da se održe replikacija DNK, sinteza proteina i efektorske funkcije. Iz tih razloga od neprocenjive važnosti je poznavati mehanizme metaboličke regulacije matičnih ćelija hematopoeze periferne krvi.

Rezultati doktorske disertacije pokazuju (kada su u pitanju ispitivani parametri) dva dominantna metabolička fenotipa monojedarnih ćelija iz periferne krvi. Prvi fenotip karakterističan je za monojedarne ćelije periferne krvi nemobilisanih pacijenata, kod svih ispitivanih tumora. Drugi fenotip, istovetan je za monojedarne ćelije periferne krvi mobilisanih pacijenata kod svih tipova tumora. Ova dva fenotipa odslikavaju funkcionalno stanje PBSC, na nivou antioksidativne odbrane, energetskog metabolizma (glikolize,  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina, ciklusa limunske kiseline, oksidativne fosforilacije (OXPHOS)) i same sinteze ATP, mtDNK, ekspresije NOX (NADPH oksidaze), kao i ekspresije citokina: IL-6 i TNF $\alpha$ .

Specifične promene koje karakterišu ova dva fenotipa i mogući uticaj na vreme prihvatanja kalema posle urađene autologne transplantacije matičnim ćelijama periferne krvi, biće diskutovani u daljem tekstu.

Prve ideje da biohemijske promene na metaboličkom nivou karakterišu (maligne) tumore, potiču od tridesetih godina prošlog veka (Pedersen, 2007). Postulirao ih je Otto Heinrich Warburg, nemački fiziolog i jedan od najistaknutijih biohemičara u prošlom veku. U svom radu: "On the origin of cancer cells" (Warburg, 1956), Warburg u centar pažnje stavlja energiju respiracije i fermentacije, postavljajući mogućnost da bi analize metaboličkih parametara mogle da obezbede snažnu osnovu za dijagnostiku malignih tumora. Iz tih istraživanja proistekao je postulat poznat kao „Warburgov efekat“. On je pokazao da mnoge tumorske ćelije, u poređenju sa zdravim imaju veću stopu glikolize za sopstvenu produkciju ATP u odnosu na mitohondrijalnu (respiracija), čak i u prisustvu kiseonika. To ne znači da tumorske ćelije prvenstveno koriste glikolitički put za produkciju ATP, jer i kod malignih tumora sa brzim rastom, glikolitički doprinos najčešće ne prelazi 50% (Warburg, 1956, Pedersen, 2007). Još uvek se smatra da je ovo opšte svojstvo tumora visokog stepena maligniteta i da predstavlja najkarakterističniju promenu na biohemijskom nivou. Međutim,

danas kada se mnogo više zna o molekulskim osnovama Warburgovog efekta, neophodno ga je sagledavati u širem kontekstu ćelijske biologije i metabolizma.

Poslednjih godina istraživači pokušavaju da okarakterišu bioenergetski indeks ćelija kancera, tj. da naprave bioenergetski "potpis" ćelije kancera (Isidoro i sar., 2004; Cuezva 2004; Sanchez-Cenizo i sar., 2010; Willers i sar., 2010). "Potpis" bi obuhvatio i opisao promene na ekspresionim nivoima proteina uključenih u glikolizu i oksidativnu fosforilaciju.

Promene na metaboličkom nivou do kojih se u disertaciji došlo, posmatrajući ekspresione profile na nivou mRNA i na nivou proteina, pokazuju snažnu aktivaciju metabolizma monojedarnih ćelija periferne krvi kod HL, NHL i NB, u poređenju sa kontrolnim uzorcima (monojedarne ćelije zdravih osoba). Iako ove ćelije nisu primarno mesto malignog procesa (kao npr. kod leukemija), procesi koji se dešavaju u njima indirektno se odražavaju i interaguju sa brojnim procesima povezanih sa bolešću. Sa progresijom bolesti menja se proliferativni indeks limfocita, dolazi do morfoloških promena, što je praćeno imunološkim defektom i pacijenti su osetljivi na infekcije virusima, gljivama i protozoama (Porth i Matfin, 2008).

Rezultati do kojih se došlo u disertaciji pokazuju da je ekspresija GAPDH nekoliko desetina puta povećana na nivou mRNA i na nivou proteina, kod sva tri tipa tumora. Može se reći da metabolizam ispitivanih monojedarnih ćelija ima sličnosti sa Warburgovim fenotipom, da je glikolitički fluks povećan i da je ova karakteristika nezavisna od tipa, karaktera i porekla tumora.

GAPDH, kao marker glikolitičkog puta, je takođe, povećan kod tumora dojke, želuca, pluća, bubrega i debelog creva (Isidoro i sar., 2004). Mada su studije metabolizma u kanceru primarno usmerene ka energetsom metabolizmu, visoko proliferirajuće ćelije, osim ATP, zahtevaju amino kiseline, nukleotide, masne kiseline i membranske lipide, kao gradivne blokove za nove ćelije. Zato glikolizu, kao jedan od najvažnijih kataboličkih puteva u ćeliji, treba posmatrati i kao važnu anaboličku formu metabolizma, jer obezbeđuje prekursore za sintezu gradivnih elemenata. Intermedijeri glikolitičkog puta, posebno glukozo 6-fosfat, 3-fosfoglicerat, fosfoenolpiruvat, piruvat i laktat, su esencijalni prekursori za biosintezu amino kiselina, nukleotida i redukativnih ekvivalenata (NADPH) (Hsu i Sabatini, 2008).

Rezultati drugih autora ukazuju na povećan glikolitički fluks u kancerskim ćelijama. Primećeno se da je ekspresija svih ili većine glikolitičkih enzima i glukoznih transportera povećana (najmanje 70%) u humanim malignim tumorima (Altenberg i Greulich, 2004; Moreno-Sanchez i sar., 2007). Njihova genska ekspresija je dodatno stimulisana hipoksijom, uz posredovanje transkripcionog faktora HIF-1 $\alpha$  (*engl.* hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ) (Marin-

Hernandez i sar., 2009). Tako je aktivnost većine glikolitičkih enzima povećana dva do deset puta u AS-30D hepatomu kod pacova, a aktivnost fosfofruktokinaze-1 i heksokinaze čak 17-300 puta, u poređenju sa normalnim hepatocitima (Marin-Hernandez i sar., 2006). Studija rađena na pacovima sa Morris hepatomom pokazala je povećanu aktivnost (5-500 puta) heksokinaze, fosfofruktokinaze-1 i piruvat kinaze (Stubbs i sar., 2003). Kod humanog kancera dojke i HeLa ćelijama humanog cerviksa više enzima glikolitičkog puta pokazuje povećanu aktivnost (Balinsky i sar., 1984; Marin-Hernandez i sar., 2006).

Rezultati disertacije su u skladu sa studijom ispitivanja metaboličkog reprogramiranja u T limfocitima tokom aktivacije, klonalne ekspanzije i diferencijacije (Pearce, 2010). Naime, T limfociti u stanju mirovanja i tokom aktivacije imaju suprotne metaboličke fenotipe. Aktivirani T limfociti imaju anabolički metabolički profil koji im omogućava da istovremeno ostvaruju visok nivo sinteze biomolekula (biomase) i sinteze ATP. Autorka ističe da pri stimulaciji T limfocita antigenima ili faktorima rasta (citokinima) dolazi do visoke stopa proliferacije limfocita koju prati aktivacija glikolize. Nasuprot tome, T limfociti u stanju mirovanja imaju katabolički metabolički profil, koristeći glukozu, masne kiseline i amino kiseline za produkciju ATP, dalju razgradnju preko ciklusa limunske kiseline i oksidativnu fosforilaciju (Pearce, 2010). Proliferirajući T limfociti zahtevaju glukozu za preživljavanje i u njenom odsustvu ne zadovoljavaju bioenergetske potrebe, zbog čega podležu ćelijskoj smrti, što su potvrdila ispitivanja i drugih autora (Rathmell i sar., 2000; Vander Heiden, 2001; Alves, 2006).

Imajući u vidu da je metabolizam integrativan spoj kataboličkih i anaboličkih puteva, važno je istaći rezultate disertacije koji se odnose na povećanje proteinske ekspresije piruvat dehidrogenaze (PDH, piruvat dehidrogenazni kompleks) i sukcinil Co-A sintetaze. PDH je jedino mesto ulaska ugljenika glukoze iz glikolitičkog puta u dalju razgradnju. Oksidativnom dekarboksilacijom piruvat se prevodi u acetil-CoA, koji je supstrat ciklusa limunske kiseline. Na taj način ugljenici glukoze (i drugih šećera) se potpuno (u ciklusu limunske kiseline) oksiduju do vode i ugljen dioksida, obezbeđujući dodatno ATP direktnom sintezom - fosforilacijom na nivou supstrata i redukovanjem nukleotidnih koenzima koji se kao supstrati koriste u mitohondrijalnoj oksidativnoj fosforilaciji (NADH i FADH<sub>2</sub>). To dodatno povećava kapacitet „tumorskih“ monojedarnih ćelija i kao „bioreaktora“, jer je ciklus limunske kiseline centralno mesto intermedijernog metabolizma. Slično intermedijerima glikolitičkog puta, intermedijeri ciklusa limunske kiseline su važni prekursori za ceo spektar biomolekula: citrat - masne kiseline, steroli;  $\alpha$ -ketoglutarat-amino kiseline, purini; sukcinil-CoA-porfirini, hem; oksalacetat-amino kiseline, pirimidini, glukoza (Nelson i Cox, 2013). Očigledno da

metaboličko reprogramiranje u monojedarnim ćelijama pacijenata sa HL, NHL i NB jeste sinhronizovano da obezbedi i energiju i biomasu u takvim, malignom transformacijom, izmenjenim uslovima. Šta više, ulazak ugljeničnih jedinica u ciklus limunske kiseline intenziviran je iz glavnog izvora, masnih kiselina. Ekspresija (na proteinskom nivou) acil-CoA dehidrogenaze srednjeg lanca veća je u monojedarnim ćelijama dva puta kod HL, a skoro četiri puta kod pacijenata sa NHL i NB. Na osnovu ovog nalaza može se zaključiti da je pojačan ulazak ugljeničnih jedinica iz masnih kiselina (glavnog izvora) u ciklus limunske kiseline. Intenziviranjem  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina, intenzivirani su metabolički procesi u mitohondrijama, gde se ovaj katabolički put odigrava. Pojačan ulazak ugljeničnih jedinica od masnih kiselina u ciklus limunske kiseline, usmeren je ka obezbeđivanju ATP iz oksidativne fosforilacije.

Posmatrajući glikolitički put kao izvor ugljenika za biosintetske procese, pre svega lipida i masnih kiselina, od posebnog je interesa činjenica da maligne ćelije imaju sposobnost reprogramiranja na nivou genske ekspresije. One pojačavaju svoj biosintetski potencijal ekspimirajući tumor specifičnu izoformu piruvat kinaze (PK), M2-PK. PK katalizuje poslednji korak u glikolizi, konverziju fosfoenolpiruvata (PEP) do piruvata. U malignim ćelijama M2-PK je manje aktivna u ovoj konverziji i time doprinosi sintezi ATP. Sa druge strane, time se svi intermedijeri glikolitičkog puta iznad PEP usmeravaju ka sintetskim procesima (Mazurek i sar., 2005). Skorašnji rezultati pokazuju da je ekspresija tumor specifične M2-PK direktno povezana sa povećanjem inkorporacije ugljenika glukoze u lipide (Christofk i sar, 2008a, 2008b). Sintaza lipida je potrebna za tumorogenezu i aktivno je promoviše. Rezultati Menendez i Lupu (2007) pokazuju da je sintaza masnih kiselina (ekspimirana na niskom nivou u fiziološkim stanjima) visoko ekspimirana u kanceru i neophodna za tumorogenezu. U saglasnosti sa ovim su rezultati Hatzivassiliou i sar. (2005) koji pokazuju da inhibicija citrat liaze zaustavlja proliferaciju malignih ćelija i rast tumora (citrat liaza je citoplazmatični enzim koji zahteva ATP za konverziju mitohondrijalno-prodovanog citrata u acetyl-CoA, prekursora za sintezu malonil-CoA i time mnogih lipida).

Rezultati disertacije ukazuju na neophodnost metaboličke sinhronizacije u monojedarnim ćelijama pacijenata sa NL, NHL i NB. Na nivou iRNK, ekspresija skoro svih ispitivanih komponenti kompleksa respiratornog lanca i ATP sintaze je izrazito povećana (jedino nema promena ekspresije kod pacijenata sa NB za subjedinice kompleksa IV kodirane bilo mitohondrijalnim ili nukleusnim genom). Ekspresioni profili za proteine kodirane mitohondrijalnim genima istovetni su sa ispitivanim genima iz nukleusa. Količina mitohondrijalne DNK u monojedarnim ćelijama pokazuje skoro istovetan obrazac u

poređenju sa ekspresijom komponenti respiratornog lanca, dvadeset puta je veća kod pacijenata sa HL, deset sa NHL i pokazuje trend povećanja kod pacijenata sa NB. Na nivou proteina detektovan je istovetan odgovor kao kod iRNK. Ekspresija proteina i iRNK je izrazito povećana. Jedini izuzetak je značajno smanjenje citohroma *c* u odnosu na nivo iRNK kod pacijenata sa HL, NHL i NB tumorima.

Može se govoriti da su dobijeni rezultati u skladu sa prethodno pomenutim promenama na nivou glikolize,  $\beta$  - oksidacije masnih kiselina, oksidativne dekarboksilacije piruvata i ciklusa limunske kiseline tj. da pored obezbeđivanja neophodnih prekursora za biosintetske procese, intenziviranje oksidativne fosforilacije u monojedarnim ćelijama periferne krvi kod pacijenata sa tumorima obezbeđuje energiju za te i za druge procese.

Metabolička simbioza monojedarnih ćelija je karakteristika ne samo pacijenata studiranih u disertaciji, već je odlika normalnih, fizioloških stanja, a posebno je razvijena kod tumora. Kod solidnih tumora postoji metabolička simbioza između hipoksičnih i aerobnih ćelija malignih tumora gde je laktat produkovan kod prvih, preuzet od strane drugih koje ga koriste kao supstrat za oksidativnu fosforilaciju (Semenza i sar., 2008). Ćelije tumora koje se nalaze u slabo i u dobro oksigenisanim regijama tumora podležu reprogramiranju na genskom nivou. Ćelije tumora koje se nalaze u slabo oksigenisanim regijama tumora ekspimiraju izoformu A laktat dehidrogenaze (prevodi piruvat do laktata) i izoformu 4 monokarboksilatnog transportera (eksportuje produkovani laktat iz ćelije). Ćelije tumora koje se nalaze u dobro oksigenisanim regijama ekspimiraju izoformu B laktat dehidrogenaze (konvertuje laktat do piruvata), a laktat se importuje zahvaljujući specifičnoj izoformi 1 monokarboksilatnog transportera (importuje laktat u ćelije) (Semenza i sar., 1996; Kim i sar., 2006; Zhang i sar., 2008; Shimoda i sar., 2006). Ovakvo metaboličko reprogramiranje kontroliše HIF-1, koji u anaerobnim uslovima u malignim ćelijama stimuliše glikolizu, a smanjuje (inhibicijom PDH kompleksa) konverziju piruvata i korišćenje ugljenika glukoze u oksidativnoj fosforilaciji. OXPHOS je, takođe suprimirana u anaerobnim uslovima (Semenza i sar., 1996; Kim i sar., 2006; Shimoda i sar., 2006; Zhang i sar., 2008). Međutim, respiratorni lanac, a time i OXPHOS se adaptiraju da funkcionišu pri niskom parcijalnom pritisku kiseonika, između ostalog tako što se povećava ekspresija specifične subjedinice COX4-2 (*engl.* cytochrome *c* oxidase subunit 4 isoform 2), umesto COX4-1 (*engl.* cytochrome *c* oxidase subunit 4 isoform 1), koju aktivirane proteaze razgrađuju u hipoksičnim uslovima. Ovaj odnos između glikolize i oksidativne fosforilacije (definisane kao Warburgov efekat), postoji i u monojedarnim ćelijama kod ispitivanih tumora, u određenoj proporciji, koja zavisi od unutarćelijskog stanja i vanćelijskog okruženja (podložna metaboličkom remodeliranju).

Kako je u literaturi malo podataka o ovim molekulskim događajima kod monojedarnih ćelija, rezultati do kojih se došlo u disertaciji doprinose saznanjima o uspostavljanju mehanizama koji su osnova metaboličkog reprogamiranja.

Kada govorimo o regulaciji glikolitičke stope i oksidativne fosforilacije, ne ulazeći u njihov kvantitativni odnos, rezultati disertacije ukazuju na povećanu stopu oba metabolička puta kako glikolize tako i oksidativne fosforilacije u monojedarnim ćelijama kod pacijenata sa NL, NHL i NB tumorima. Rezultati (promene u monojedarnim ćelijama), do kojih se u disertaciji došlo, su u skladu sa Warburgovim efektom, koji je karakteristika malignih ćelija.

Povećan unos glukoze (ekspresija glukoznog transportera 1 je povećana u većini malignih ćelija) i njena razgradnja u malignim ćelijama su dobro dokumentovani procesi i ova metabolička karakteristika omogućila je razvoj novih dijagnostičkih metoda, kao što je pozitron emisiona tomografija (Phelps i sar., 1975; Di Chiro i sar., 1982).

Rezultati do kojih smo došli u našim eksperimentima mogu pojasniti još jednu specifičnost malignih ćelija na metaboličkom nivou. Maligne ćelije snažno eksprimiraju specifičnu izoformu heksokinaze, heksokinazu 2. Heksokinaza 2 se razlikuje, posebno na regulatornom nivou od ostale tri izoforme enzima-1, 2 i 4. Za razliku od njih, heksokinaza 2 nije alosterično inhibirana svojim produktom glukozo-6-fosfatom. Heksokinaza 2 je najverovatnije preko voltažno zavisnog anjonskog kanala (VDAC) vezana za spoljašnju mitohondijalnu membranu. To joj omogućava da privilegovano koristi ATP, nastao oksidativnom fosforilacijom u mitohondrijama, za fosforilaciju glukoze i uvođenje u glikolitički put (Pedersen, 2007).

Iako je malo podataka u literaturi koji se odnose na metaboličko reprogamiranje u ćelijama krvi, posebno kod malignih oboljenja, jedan broj autora jasno ističe obrasce specifične za ćelijske tipove. Monociti i fagociti odgovaraju na inflamatorne stresne signale. Inflamatorni signali snažno aktiviraju monocite koji migriraju do mesta povrede gde se mogu diferencirati ka pro-inflamatornom (M1) ili anti-inflamatornom (M2) fenotipu. U M1 stanju, aktivirane monocit-makrofag ćelije podležu metaboličkom sviču od oksidativne fosforilacije do glikolize (Rodriguez-Prados i sar., 2010; Kramer i sar., 2014). Ova metabolička promena obezbeđuje supstrate za biosintetske procese uz produkciju ATP (Neill i Hardie, 2013). Inhibicijom oksidaciono-fosforilacioni sistem povećava se produkcija ROS, a time i baktericidni potencijal ćelija (Neill i Hardie, 2013). Tokom antiinflamatornog delovanja makrofagi se transformišu u alternativno aktivirani M2 fenotip, koji je više oksidativno fosforilacioni (Shapiro i sar., 2011). Metaboličko reprogamiranje populacije monocita i makrofaga ima visoku plastičnost. Smisao visoke plastičnosti je podrška funkcionalnih

promena tokom inflamatornog procesa. Diferencijacija makrofaga u specifični M1 ili M2 fenotip odvija se na mestu inflamacije, a ne u cirkulaciji (Kramer i sar., 2014). Limfociti, kao što smo ranije istakli, tokom mirovanja primarno koriste mitohondrije da zadovolje svoje energetske potrebe (Krauss i sar., 2001). Aktivaciju limfocita prati reprogramiranje, a novi metabolički fenotip se karakteriše povećanjem i glikolitičke aktivnosti i mitohondrijalne OXPHOS (Macintyre i Rathmell, 2013). Ovo je od posebne važnosti imajući u vidu veliki opseg imunoloških funkcija limfocita (klonalna ekspanzija, produkcija citokina i antitela) (Pearce, 2010; Van der Windt i Pearce, 2012a; Van der Windt i sar., 2012b; Pearce i Pearce, 2013a; Kramer i sar., 2014). Granulociti imaju veoma malo mitohondrija, koje nemaju bitnu ulogu u energetske metabolizmu, ali održavaju energetske potencijal za apoptotsku signalizaciju (Fossati i sar., 2003; Van Raam i sar., 2004; Van Raam i sar., 2008; Kramer i sar., 2014;). Oni svoje energetske potrebe za hemotaksu i aktivnost obezbeđuju glikolizom (Borregaard i Herlin, 1982). Trombociti (anukleusni elementi sa životom 5 do 7 dana u cirkulaciji) svoje energetske potrebe u bazalnom stanju podmiruju i oksidativnom fosforilacijom i glikolizom (Reuter i Gross, 1978; Chacko i sar., 2013). Agregacija trombocita praćena je povećanjem glikolitičkog metabolizma, ali je snažan oksidaciono fosforilacioni sistem potreban da obezbedi funkcionalnost trombocita (Akahori i sar., 1995).

Treba istaći da ne postoje podaci koji ukazuju na procentualni odnos glikolize i OXPHOS tokom reprogramiranja metabolizma koji prati aktivaciju specifičnih krvnih ćelija. Još manje se zna o promenama u patološkim stanjima, posebno tumorima. Kramer i sar. (2014) ističu da praćenje metaboličkih profila u većini ćelija krvi, a posebno u limfocitima, zbog njihove brojnosti, funkcionalne heterogenosti i reaktivnosti, čini ove ćelije idealnim za ispitivanje uzajamne veze bioenergetike i propagacije patološkog stanja.

Pored navedenih postoje i drugi faktori koji mogu modulirati energetske metabolizam. Brojni onkogeni mogu stimulisati glikolizu pri aerobnim stanjima, ali mogu i direktno uticati na oksidativnu fosforilaciju. Tako, C-MYC može, u zavisnosti od mikrosredine ćelija tumora, istovremeno stimulisati i glikolizu i OXPHOS, preko ekspresije glikolitičkih gena ili aktivacije mitohondrijalne oksidacije glutamina (Gao i sar., 2009). Takođe, pokazano je da RAS (*engl.* Rat sarcoma) onkogen povećava OXPHOS u rano transformisanim ćelijama (Telang i sar., 2007; Funes, 2007; De Groof i sar., 2009). Dalje, tumor protein-p53 može izmeniti ekspresiju COX i tako uticati na kapacitet OXPHOS (Matoba i sar., 2006). Naime, deficijencija p53 u ćelijama malignih tumora dovodi do smanjenja ekspresije COX4-2 izoforme, što za posledicu ima pokretanje anaerobnih metaboličkih promena. Novije studije pokazuju da se tumor specifični peptid-p32 različito eksprimira tokom progresije

epidermalnog karcinoma, reguliše ravnotežu između OXPHOS i glikolize, odžavajući oksidativni metabolizam tako što utiče na sintezu protein kod kodiranih mtDNK (Fogal i sar., 2010).

Naša ispitivanja su pokazala da se metabolički fenotip matičnih ćelija hematopoeze periferne krvi posle primene mobilizacionog protokola kod svih pacijenata karakteriše skoro potpunim gašenjem ispitivanih parametara u odnosu na vrednosti nađene u ćelijama zdravih osoba i pacijenata koji nisu dobijali mobilizacioni protokol. Izuzetak je nivo citohroma *c* na iRNK nivou i kompleksa IV na proteinskom nivou.

Može se reći da ove ćelije karakteriše nizak nivo glikolize,  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina, ciklusa limunske kiseline, OXPHOS i same sinteze ATP, kao i nivoa mtDNK i ekspresije NOX. U kojoj meri se ovaj nalaz može smatrati smanjenjem kada se rezultati porede sa nalazima u nemobilisanim monojedarnim ćelijama, a u kojoj su realno stanje mobilisanih matičnih ćelija hematopoeze, nemoguće je sa sigurnošću reći.

Poređenje sa rezultatima dostupnim u literaturi koji se odnose na matične ćelije hematopoeze kostne srži, njihove ćerke ćelije i mobilisane matične ćelije hematopoeze može pomoći razumevanju rezultata do kojih se u disertaciji došlo. Postoji mogućnost da mobilizacione procedure mogu uticati na funkciju matičnih ćelija hematopoeze periferne krvi na različitim nivoima.

Razvoj hematopoetskih ćelija i nekih ćelija limfoidne populacije primarno je ograničen na kostnu srž, dok zrele ćelije napuštaju mesto nastanka i ulaze u perifernu cirkulaciju. U homeostatskim stanjima mala populacija HSC i hematopoetskih progenitorskih ćelija (*engl.* hematopoietic progenitor cell, HPC) je prisutna u perifernoj krvi. Zapažanje da se povećan broj HPC nalazi u krvi pacijenata koji se oporavljaju od hemioterapije, dovelo je do razvoja procedura da se ove nezrele ćelije mobilišu iz kostne srži do krvi, iz koje se mogu sakupiti i koristiti za transplantaciju (McCredie i sar., 1971; Kurnick i Robinson, 1971; Chervenick i Boggs, 1971; To i sar., 1997). Opšte je poznato da mnogi citokini mogu mobilisati HSC i HPC, a kada se primenjuju u kombinaciji sa citostaticima imaju sinergistički i aditivni efekat (To i sar., 1997; Thomas i sar., 2002; Fruehauf i Seggewiss, 2003; Papayannopoulo, 2004). Matične ćelije hematopoeze iz periferne krvi su postale primarni izvor ćelija kod autologne transplantacije matičnih ćelija hematopoeze. Da bi se izbegle komplikacije (Kessinger i Armitage, 1991; To i sar., 1997) počelo se sa primenom G-CSF kao mobilizatora, imajući u vidu njegov potencijal, predvidljivost i bezbednost (To i sar., 1997; Ringden i sar., 2000; Goldman i Horowitz, 2002; Benito i sar., 2004). Prikupljanje matičnih/progenitorski ćelija hematopoeze iz periferne krvi ima prednosti u odnosu na



prikupljanje iz kostne srži: manje je invazivno, a i broj prikupljenih ćelija je veći (Bensinger i sar., 1993; Welte i sar., 1996; To i sar., 1997; Kennedy 1998; Blume i sar., 2000).

Kako je broj matičnih ćelija hematopoze u perifernoj krvi mali (0,001-0,1 % svih ćelija sa jedrom) neophodno je pre njihovog prikupljanja sprovesti mobilizaciju MNC iz kostne srži u krv primenom tzv. mobilizacionog protokola (Landenstein i sar., 2008). Naša, kao i iskustva drugih autora (Ikeda i sar., 2004) ukazuju da istovremena primena hemioterapije i G-CSF povećava broj CD34+ ćelija u krvi do 1000 puta. Mobilizacioni protokoli podrazumevaju davanje različitih citostatika, koji se doziraju na telesnu površinu pacijenta i daju sukcesivno (jedan za drugim). Po završenom davanju citostatika u roku od 1-4 dana (u zavisnosti od dijagnoze) počinje se sa davanjem G-CSF.

Mobilizacija se smatra uspešnom kada je broj CD34+  $\geq 20/\mu\text{L}$  krvi (Sutherland i sar., 1996). U slučaju slabe mobilizacije (10-19 CD34+ ćelija u  $\mu\text{L}$  krvi) radi prikupljanja dovoljnog broja CD34+ ćelija (u zavisnosti od slučaja) može se povećati broj afereza, povećati volumen obrađene krvi pri svakoj proceduri afereze ili ponoviti mobilizacija uz primenu povećanih doza G-CSF. Prinos CD34+ ćelija prilikom prikupljanja (afereze) pokazuje jaku zavisnost od broja CD34+ ćelija u krvi pacijenta/davaoca pre procedure.

Naša, kao i iskustva drugih autora ukazuju da istovremena primena hemioterapije i G-CSF, kao mobilizacionog protokola, povećava broj PBSC u krvi do 1000 puta (Ikeda i sar., 2004).

Još jedan važan aspekt predstavlja pentozofosfatni put (PPP). Pentozofosfatni put u proliferirajućim ćelijama je neophodan da obezbedi ribozu za sintezu nukleotida i redukovane ekvivalente u formi NADPH. NADPH održava redoks stanje u populaciji matičnih ćelija, pomažući u regulaciji koncentracije reaktivnih vrsti. Deficijencija glukoze 6-fosfat dehidrogenaze čini mišje ESC senzitivnijim na oksidativno oštećivanje (Efferth i sar., 1995; Fico i sar., 2004). Manganeli i sar. (2012) su u svojim istraživanjima pokazali da deficijencija glukoze 6-fosfat dehidrogenaze može usmeriti diferencijaciju ESC (*in vitro*) u pravcu razvoja endoderma, radi dobijanja tkiva pluća, jetre i pankreasa. Na osnovu navedenih rezultata može se pretpostaviti da se uz visok glikolitički fluks u pluripotentnim ćelijama može očekivati povećan fluks u PPP i moguća regulacija opredeljivanja matičnih ćelija.

Balans između mirovanja i proliferacije čvrsto je kontrolisan unutrašnjim mehanizmima u HSC i interakcijama HSC sa specifičnom mikrosredinom, nišom matičnih ćelija, interakcijom ćelija - ćelija, ćelija - vanćelijski matriks i receptor - ligand interakcija. Ova regulatorna mreža uključuje i pozitivne i negativne regulatore (Till i sar., 1964; Metcalf, 1993; Li i Xie, 2005; Suda i sar., 2005).

Sposobnost samoobnavljanja HSC u dužem vremenskom periodu je omogućena mirovanjem (Go faza ćelijskog ciklusa), sa malo ulazaka u sintezu DNK i proliferativnu fazu (S/G2/M) (Cheshier i sar., 1999; Wilson i sar., 2008). Mirovanje štiti HSC od oštećenja DNK (skraćivanja telomera), pod kontrolom je hipoksičnog odgovora HSC u svojoj niši u kostnoj srži i jedna je od osnovnih "primitivnih" karakteristika embriona (hipoksična sredina) u kojem su nastale. Kostna srž spada u hipoksična tkiva (u poređenju sa drugim tkivima). Primitivne ćelije hematopoeze (marker CD133+) uključujući i matične ćelije hematopoeze (marker CD34+) su locirane u hipoksičnom okruženju kostne srži (Parmar i sar., 2007).

Eksperimenti su pokazali da se HSC ("primitivne" CD133+ i CD34+), razmenjujući signalne molekule sa mikrosredinom svoje niše u kostnoj srži, održavaju u stanju mirovanja (Parmar i sar., 2007). Slične studije su pokazale da na mirovanje HSC ima uticaj ekspresija HIF-1 $\alpha$ . Deficijencija HIF-1 $\alpha$  dovodi do deobe matičnih ćelija. Ista studija je pokazala da primitivne matične ćelije (CD133+), čija niša je u osteoblastima (najniži nivo kiseonika), poseduju visoki dugovremenski kapacitet za obnavljanje (Takubo i sar., 2010). U drugoj studiji HSC su razvrstane na osnovu nivoa ROS. Pokazano je da ćelije sa niskim nivoom ROS imaju veći kapacitet samoobnavljanja u odnosu na ćelije sa većim nivoom ROS (Jang i sar., 2007). Kada se ćelije kostne srži analiziraju na osnovu mitohondrijalne aktivnosti kod više od 80% HSC koje imaju visok kapacitet za samoobnavljanje zabeležen je nizak nivo mitohondrijalnog potencijala (Simsek i sar., 2010).

Mirovanje obezbeđuje očuvanje integriteta i funkcije HSC ograničavajući oštećenja ćelija tokom mitohondrijalne respiracije, kao i od citotoksičnih agenasa. Takođe, štiti HSC od iscrpljivanja usled preterane proliferacije, tj. ulaska u nekontrolisane ćelijske cikluse (Orford i Scadden, 2008; Bakker i Passegue, 2013).

Svako od različitih stanja HSC (mirovanje, proliferacija i diferencijacija) nameće jedinstvene bioenergetske zahteve (Shyh-Chang i sar., 2013).

Možemo reći da HSC u stanju mirovanja (utišanosti) imaju sklonost ka anaerobnom metabolizmu. Mada HSC imaju veliki broj mitohondrija, one su malo aktivne sa niskim mitohondrijalnim membranskim potencijalom i nivoom ATP, i sa dominacijom glikolitičkog puta u odnosu na OXPHOS i ciklus limunske kiseline (Simsek i sar., 2010; Norrdahl i sar., 2011; Takubo i sar., 2013). Povećani nivoi glikolitičkih intermedijera i piruvata, uz odsutnost intermedijera ciklusa limunske kiseline, podržavaju ovu tvrdnju (Takubo i sar., 2013). Važno je naglasiti da glikolitički profil HSC nije naprosto produkt mikrosredine u kostnoj srži, već se snažno oslanja na unutrašnje ćelijske mehanizme i interakciju molekularnih mehanizama ćelije i okruženja.

Opređeljenost HSC da li će ostati u stanju mirovanja ili će ući u deobu povezana je i sa metabolizmom lipida. Kada HSC napuštaju stanje mirovanja i vraćaju se u ćelijski ciklus, izbor između asimetrične i simetrične podele je jedna od prvih važnih odluka koja određuje njihovu sudbinu. Asimetričnom podelom nastaju dve ćelije sa različitim sudbinama, što omogućava održavanje pula HSC i stvaranje diferenciranih progenitorskih ćelija za održanje homeostaze krvi. Suprotno, simetričnom podelom stvaraju se dve ćelije sa zajedničkom sudbinom gde mogu ili održavati pul HSC, ili povećati broj diferenciranih ćelija u stanjima koja zahtevaju intenzivnu hematopoezu. Ravnoteža između simetrične i asimetrične deobe HSC često je povezana sa stanjem bolesti (Rhee i sar., 2000). Istraživanja Ushio-Fukai (2006) ukazuju na mogućnost da je oksidacija masnih kiselina ključna odrednica sudbine HSC. Rezultati ukazuju da aktiviranje oksidacije masnih kiselina utiče na opređeljenje HSC, omogućavajući asimetričnu ćelijsku deobu koja je energetski više zavisna od simetrične ćelijske deobe. Važno je napomenuti da blokada oksidacije masnih kiselina dovodi do diferencirajuće ćelijske deobe, pre nego samo-obnavljajuće simetrične deobe (Fukai i Ushio-Fukai, 2011).

Rezultati disertacije ukazuju da je oksidacija masnih kiselina izrazito niska kod ispitivanih uzoraka PBSC, nasuprot povećanju kod diferenciranih monojedarnih ćelija (kontrolni uzorci zdravih ispitanika). Očigledno da metabolizam masnih kiselina ima dijametralno suprotan profil kada se posmatra (zavisno od prirode deobe), u mobilisanim matičnim ćelijama hematopoeze i potpuno diferenciranim hematopoeznim ćelijama.

Iako rezultati ukazuju na jasnu korelaciju između mitohondrijalnog metabolizma, proliferacije i diferencijacije, još uvek ne znamo precizne mehanizme koji kontrolišu ove procese. Današnja saznanja usmeravaju istraživanja na promene redoks stanja ćelija i nivoa ROS kao moguće regulatore usmeravanja HSC ili u pravcu samoobnavljanja ili u pravcu diferencijacije. Ovo je važno za tumačenje rezultata disertacije, jer je količina mtDNK povećana u monojedarnim ćelijama kod nemobilisanih pacijenata, a smanjena kod mobilisanih pacijenata sa NHL i ES, ali bez značajnih promena kod pacijenata sa NH i NB.

Većina ćelija sisara sadrži 1000 do 10 000 kopija mtDNK, dok zrela jajna ćelija sisara sadrži oko 100 000 kopija, pri čemu svaka mitohondrija sadrži 2-10 kopija mtDNK (Piko i Matsumoto, 1976).

Tokom spontane diferencijacije mišjih embrionalnih matičnih ćelija, broj kopija mtDNK se šestog dana povećava 100 puta (Facucho-Oliveira i sar., 2007). Kod humanih ESC, spontana diferencijacija povezana je sa povećanjem broja kopija mtDNK od dva puta

(Cho i sar., 2006). Sa diferencijacijom dolazi i do i povećanja potrošnje kiseonika, kao i produkcije ATP i ROS u mitohondrijama (Cho i sar., 2006).

Može se reći da ESC održavaju konstantno nizak nivo kopija mtDNK u nediferenciranom stanju, a tokom inicijacije diferencijacije dolazi do povećanja mitohondrijalne biogeneze i broja kopija mtDNK, što je praćeno aktivacijom oksidativnog metaboličkog profila. To je u skladu sa rezultatima disertacije kada posmatramo promene nivoa mtDNK, gde izrazito povećanje imamo u monojedarnim ćelijama kod nemobilisanih pacijenata sa HL i NHL, i trend povećanja kod NB. Povećanje nivoa mtDNK praćeno je izrazitom metaboličkom aktivnošću, posebno povećanjem oksidativnog metabolizma u mitohondrijama. Suprotno tome, nizak nivo mtDNK u uzorcima pacijenata koji su primali MP praćen je niskim nivoom oksidativnog mitohondrijalnog metabolizma.

HSC su najviše ispitivane matične ćelije, sa jasno definisanim markerima diferencijacije, ali nedovoljno istraženim metaboličkim profilom (Orkin i sar., 2008). Stoga je ispitivanje metaboličke regulacije, kako kod samoobnavljanja, tako i diferencijacije dodatni imperativ. Činjenica je da HSC imaju redukovani broj mitohondrija, nisku mitohondrijalnu respiraciju, sa glikolizom kao dominantnim metaboličkim putem (Piccoli i sar., 2005).

Jedno od ključnih pitanja je kako HSC inhibiraju funkciju mitohondrija i aerobni metabolizam kada su mobilisane i nalaze se u cirkulaciji gde je koncentracija kiseonika mnogo veća nego u niši kostne srži?

Pored citokina i različitih transkripcionih faktora, smatra se da važnu ulogu u diferencijaciji CD34+ HSC ima redoks regulacija. Između ostalog, pokazano je da NOX igra dominantnu ulogu u vanmitohondrijalnom konzumiranju kiseonika (Piccoli i sar., 2005). Nekoliko izoformi NOX se koeksprimira u HSC i njihova aktivnost omogućava regulaciju intracelularnog nivoa ROS i redoks signalizaciju (Piccoli i sar., 2007a). Znajući da ROS imaju ulogu u stabilizaciji HIF-1 $\alpha$  (inhibicija prolil hidroksilaze), NOX-zavisna produkcija superoksid anjon radikala omogućava delovanje ovog transkripcionog faktora mobilisanih HSC i u normoksičnim uslovima (Piccoli i sar., 2007b). To je u skladu sa činjenicom da HIF-1 $\alpha$  inhibira mitohondrijalnu respiraciju i omogućava visok glikolitički protok u HSC.

U humanim ESC, mitohondrije su u klasterima locirane oko nukleusa (St John i sar., 2006). Diferencijacija humanih ESC praćena je relokizacijom mitohondrija ka periferiji (St John i sar., 2005).

Konfokalnom mikroskopijom, korišćenjem MitoTracker Green (specifična fluorescentna proba za mitohondrije) i imuno-fluorescentne probe za površinski marker HSC, CD34+, pokazan je inverzan odnos između gustine mitohondrija i ekspresije CD34+ (Piccoli i

sar., 2005). Autori su dalje pokazali da je proliferacija i diferencijacija CD34+ povezana sa biogeneom mitohondrija, što je razumljivo, jer ćelije imaju povećane energetske zahteve.

Redoks status ima takođe važnu ulogu i u neurogenezi (Kennedy i sar., 2012). Tokom embrionalne, perinatalne i adultne neurogeneze, promene u nivoima kiseonika i ROS su važni signalni faktori za stvaranje novih neurona. Neuronalne matične ćelije (NSC) kontinuirano stvaraju nove neurone u nišama gde su čvrsto regulisana stanja mirovanja, samoobnavljanja i diferencijacije (Vieira i sar., 2011). Koncentracija kiseonika *in vivo* determiniše sva tri stanja NSC. Postoji dinamička kontrola dostupnosti kiseonika NSC u nišama. Stanja sa nižim koncentracijama kiseonika stimulišu proliferaciju i samoobnavljanje, dok povećanje parcijalnog pritiska kiseonika promoviše diferencijaciju ili apoptozu NSC i progenitora. (Panchision, 2009). HIF-1 $\alpha$  i ROS imaju važnu ulogu i u regulaciji proliferacije i diferencijacije NSC (Panchision, 2009; Vieira i sar., 2011). Proliferativne i samoobnavljajuće NSC održavaju visok status ROS i on je potreban da se održi njihovo obnavljanje i neurogeneza (između ostalog aktivacijom fosfatidilinozitol-3 kinaze) (Le Belle i sar., 2011). Intracelularno produkovane ROS aktivacijom NOX promovišu neuronalnu diferencijaciju. Potvrda tome je nalaz da inhibicija produkcije ROS, inhibicijom enzimske aktivnosti NOX, negativno reguliše diferencijaciju NSC (Le Belle i sar., 2011). Slični mehanizmi i interakcija na nivou kiseonika, ROS, NOX i HIF-1 $\alpha$ , odgovorni su za razvoj neuroblastoma (Vieira i sar., 2011). Rezultati disertacije pokazuju da je ekspresija NOX u mobilisanim matičnim ćelijama hematopoeze skoro potpuno ugašena na nivou iRNK, a izrazito smanjena na nivou proteina.

Dugotrajno samoobnavljajuće HSC imaju nizak nivo ROS unutar ćelija. Međutim, visok nivo ROS tokom terapije može dovesti do starenja HSC. Povećani nivo ROS može izvesti HSC iz mirovanja, redukovati samoobnavljajući kapacitet i dovesti do ozbiljne insuficijencije kostne srži (Yea i sar., 2014).

Fiziološka indukcija ROS u matičnim/progenitorskim ćelijama hematopoeze regulisana je faktorima rasta, ili stimulisana citokinima, promenama u koncentraciji kiseonika, bioenergetskim zahtevima, ćelijskim statusom i diferencijacijom.

Merenjem intracelularnih nivoa vodonik peroksida i superoksid anjon radikala, pokazano je da postoji jasna korelacija nivoa ROS u matičnim/progenitorskim ćelijama hematopoeze, sa njihovim funkcijama ili stanjem diferencijacije. Ispitivanjem kapaciteta diferencije HSC na osnovu nivoa vodonik peroksida, primećeno je da ćelije sa niskim nivoima ROS zadržavaju svoju dugovremensku sposobnost samoobnavljanja (Jang i Sharkis, 2007).

Mutacije koje dovode do povećanja nivoa vodonik peroksida pokreću izlazak HSC iz mirovanja, blokiraju kapacitet za samoobnavljanje i pokreću diferencijaciju matičnih ćelija (Ito i sar., 2006; Tothova i sar., 2007). Primećeno je da je nivo vodonik peroksida dodatno veći u matičnim ćelijama opredeljenim za mijeloidnu lozu u poređenju sa HSC (Tothova i sar., 2007). Uz to, niska koncentracija kiseonika u niši kostne srži ograničava produkciju ROS, obezbeđujući zaštitu HSC od oksidativnih oštećenja (Parmar i sar., 2007; Takubo i sar., 2008; Suda i sar., 2011).

Faktori rasta hematopoeze ili citokini stimulišu signalne puteve koji ćelije vode ka rastu (Sattler i sar., 1999), ili pokreću mobilizaciju HSC u cirkulaciju (Tesio i sar., 2011) preko formiranja vodonik peroksida. Povećavanjem koncentracije vodonik peroksida, stimuliše se regrutovanje i diferencijacija cirkulišućih matičnih/progenitorskih ćelija hematopoeze (Milovanova i sar., 2009). Očigledno je da vodonik peroksid u odgovarajućim nivoima doprinosi proliferaciji i migraciji HSC od kostne srži do cirkulacije, a takođe ima ulogu u navođenju HSC do ciljnih mesta (Urao i Ushio-Fukai, 2013). Suprotno, visoke koncentracije vodonik peroksida ograničavaju životni vek i kapacitet samoobnavljanja ili ekspanziju HSC, što se ogleda u prevremenom starenju ćelije i apoptozi (Ito i sar., 2006; Wang i sar., 2011).

Diferencijacija hematopoetskih ćelija zahteva oksidativni svič. Prelazak HSC u više proliferativno stanje, povezano sa diferencijacijom, nameće posebne metaboličke zahteve. Ćelije u fazi proliferacije ne samo da moraju da stvaraju energiju, već moraju i da aktiviraju veliki broj biosintetskih procesa potrebnih za replikaciju (Renstrom i sar., 2010). Drugim rečima, diferencijacija zahteva visok energetske input da bi se održale specijalizovane funkcije svakog zrelog ćelijskog tipa (Renstrom i sar., 2010). Adaptacija na visoko-energetsko stanje se oslanja na remodeliranje mitohondrija (Jiang i sar., 2011). Mada se o svemu tome malo zna, kada govorimo o HSC, diferencirani adultni kardiomiociti i prekursori neurona imaju strukturno zrele mitohondrije, difuzno raspoređene u citoplazmi (Diaz i Courtneidge, 2012; Coso i sar., 2012). Strukturno remodeliranje mitohondrija praćeno je povećanjem replikacije mitohondrijalne DNK. Dakle, sposobnost diferencijacije HSC zavisi od njihove sposobnosti da aktiviraju mitohondrijalnu OXPHOS (Sareila i sar., 2011).

Mnogi istraživači karakterišu pluripotentne ćelije na osnovu nivoa ROS, antioksidativnih enzima i oksidativnih oštećenja (Saretzki i sar., 2004; Cho i sar., 2006; Prigione i sar., 2010). U poređenju sa diferenciranim fibroblastima, humane ESC imaju značajno niži nivo oksidativno modifikovanih proteina, dok se diferencijacijom taj broj povećava (Prigione i sar., 2010). Isti profil promena je uočen merenjem parametara oštećenja

DNK i lipida (Prigione i sar., 2010). Zapaženo je da je u ESC redukovana i ekspresija antioksidativnih enzima, SOD i GSH-Px (Prigione i sar., 2010).

Rezultati do kojih se došlo u disertaciji pokazuju da se nasuprot smanjenju ekspresije na proteinskom nivou za GSH-Px i CuZnSOD, ekspresioni nivoi katalaze i MnSOD održavaju na kontrolnom nivou. Intracelularna lokalizacija antioksidativnih enzima može biti jedan od parametara koji bliže ukazuje na prirodu oksidativnih procesa u PBSC, a posebno na ulogu koju ima vodonik peroksid. Naime, CuZn SOD i GSH-Px u većini ćelija lokalizovani su dominantno u citoplazmi, a MnSOD u mitohondrijama. Katalaza se s druge strane, isključivo vezuje za peroksizome (Halliwell, 2006). Kada su u pitanju ćelije hematopoeze, distribucija katalaze je drugačija. U različitim ćelijama katalaza se detektuje u citoplazmi, membranskim kompartmentima i granulama različite veličine (npr. azurofilnim u neutrofilima) (Nishimura i sar., 1976). Tokom diferencijacije karakteristična je relokalizacija katalaze, primarno ka citoplazmi (Ballinger i sar., 1994). Očigledno je da pojedina ćelijska stanja i stepen diferencijacije ne determinišu samo katalaza, već i njeno sinergističko delovanje sa drugim antioksidativnim enzimima, posebno MnSOD, podešavanjem unutraćelijske koncentracije vodonik peroksida.

Sari i sar. (2008) su pratili nivo malondialdehida, azot oksida, SOD, GSH-Px i katalaze u plazmi (u mijeloablativnom i nemijeloablativnom režimu kondicioniranja), jedan dan pre transplantacije i 30 dana od alogene transplantacije HSCT. Registrovali su povećanje nivoa malondialdehida (kao parametra lipidne peroksidacije) i azot oksida, dok su aktivnosti SOD, GSH-Px i katalaze smanjene. Iako autori zaključuju da je posttransplantaciono povećan oksidativni pritisak u plazmi, oni ne nalaze (ni pre, ni posle transplantacije) uzajamnu vezu sa režimom kondicioniranja, brzinom prihvatanja kalema, pojavom zavisnih oboljenja, kao ni smrtnošću koja je povezana sa transplantacijom.

Ako posmatramo, ranije opisan, utišani metabolički fenotip sa aspekta potentnosti prihvatanja kalema granulocitne i megakariocitne loze nakon autologne transplantacije, na osnovu rezultata disertacije može se zaključiti da ne postoji jasna korelacija između njih. Naime, prihvatanje kalema obe loze je individualno i vremenski različito kod pacijenata i nezavisno od vrste tumora. Zbog odsustva individualnih razlika na nivou metaboličkih parametara, kako unutar pojedinih grupacija tumora, tako i između njih, metabolički parametri su prikazani kao srednje vrednosti. Moguće je da metabolički fenotip PBSC poseduje različite individualne potencijale da se eksprimira u zavisnosti od opšteg stanja pacijenta, stepena progresije bolesti, infekcija i specifičnosti mikrosredina koje mogu uticati na vreme prihvatanja kalema.

Jedna od činjenica, potvrđena brojnim eksperimentima je da hipoksija reguliše funkciju HSC *in vivo* preko HIF-1 $\alpha$ , koji se u njima snažno eksprimira na mtRNK i proteinskom nivou (Takubo i sar., 2010; Simsek i sar., 2010; Miharada i sar., 2011). Delecija HIF-1 $\alpha$  u HSC dovodi do ubrzanog deljenja HSC i njihovom iscrpljivanju, što se može ispoljiti kao defekt kapaciteta za repopulaciju posle transplantacije kostne srži (Takubo i sar., 2010; Simsek i sar., 2010).

Zbog nemogućnosti da se, kod pacijenata prati razvoj metaboličkog fenotipa posle autologne transplantacije, *in vivo*, a kako u literaturi ne postoje odgovarajući podaci, za sada je teško ove pretpostavke prihvatiti kao činjenice.

Posebnu važnost u disertaciji imaju i rezultati koji se odnose na promene ekspresije dva citokina: IL-6 i TNF $\alpha$ . Na proteinskom nivou, njihova ekspresija je izrazito povećana u monojedarnim ćelijama kod svih ispitivanih grupa pacijenata, bez obzira da li su primali mobilizacioni protokol ili ne.

Interleukin-6, multifunkcionalni citokin produkuje monociti, fibroblasti i ćelije endotela. Makrofazi, dendritske ćelije, T i B limfociti, mezangijalne ćelije, keratinociti, hepatociti, granulociti, glatke mišićne ćelije, eozinofili, hondrociti, osteoblasti, mast i glijalne ćelije, kao i brojne tumorske ćelije produkuju IL-6 samo posle stimulacije (Hattori i sar., 1990; Groblewska i sar., 2012). IL-6 reguliše brojne fiziološke procese u različitim tkivima, uključujući produkciju akutno-faznih proteina, važan je medijator inflamatornih procesa, antigen-specifičnog imunskog odgovora i hematopoeze (Akira i sar., 1993). Regulira aktivaciju i diferencijaciju T limfocita, kao i sazrevanje B limfocita i stimulaciju sinteze i sekrecije imunoglobulina (Uyttenhove i sar., 1988). S druge strane, kod miševa (*in vitro*), mezenhimalne matične ćelije (MSC) produkuju i sekretuju IL-6 koji je direktno povezan sa supresijom proliferacije T ćelija (Djouad i sar., 2007). Takođe, sazrevanje monocita kostne srži u dendritične ćelije parcijalno je inhibirana sekrecijom IL-6 od strane MSC (Djouad i sar., 2007).

Uloga IL-6 u malignim tumorima je dvostruka. S jedne strane IL-6 direktno stimuliše rast mnogih ćelijskih linija malignih tumora, aktivira ekspresiju antiapoptotskih proteina koji pomažu ćelijama tumora da prežive, zaustavlja njihovo starenje doprinoseći rastu tumora, promoviše migraciju i invaziju mnogih ćelija malignih tumora, ima proangiogeni i proinflamatorni efekat kod mnogih solidnih tumora (Taniguchi i Karin, 2014). IL-6 takođe ima važnu ulogu u stvaranju i održavanju matičnih/progenitorskih ćelija, uključujući i ćelije malignih tumora (Mathieu i sar., 2012; Taniguchi i Karin, 2014).



Mnogi biološki efekti IL-6 u različitim ćelijama i tkivima ostvaruju se autokrinim i parakrinim delovanjem ovog citokina. IL-6 može takođe stimulisati ili inhibirati svoju sopstvenu sintezu autokrinim delovanjem, specifično u različitim ćelijskim tipovima (Goblewska i sar., 2012). Treba istaći da pored stimulacije, IL-6 može inhibirati proliferaciju ćelija malignih tumora (Chen i sar., 1988; Miki i sar., 1989; Okamoto i sar., 1997a; Okamoto i sar., 1997b; Lin i sar., 2013).

IL-6 je izvorno identifikovan kao citokin sintetisan u limfocitima, indukuje sazrevanje limfocita u ćelije koje produkuju imunoglobuline (Rose-John i sar., 2006; Lin i sar., 2013). Zato govorimo o njegovim ulogama u regulaciji inflamatornih procesa u ćelijama, indukciji imunog odgovora, modulaciji ćelijskog rasta i hematopoeze (Kishimoto, 2006; Ataie-Kachoie i sar., 2013). Disregulacija stvaranja IL-6 i njegovih signalnih puteva povezuje se hroničnim inflamatornim i autoimunim oboljenjima (Ataie-Kachoie i sar., 2013). Značajna je uloga IL-6 u aktiviranju i diferencijaciji T limfocita, što postiže sinergističkim delovanjem sa drugim citokinima koji su uključeni u proces hematopoeze (Neurath i Finotto, 2011). Podstiče stvaranje kolonija blast ćelija i indukuje diferencijaciju makrofaga i megakariocita (Heike i Nakahata, 2002). IL-6 pripada familiji pozitivnih regulatora rasta zajedno sa G-CSF (*engl.* granulocyte-colony stimulating factor), GM-CSF (*engl.* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), IL-1 i IL-3, stimuliše proliferaciju i diferencijaciju mijeloidnih ćelija (Hassan i Drexler, 1995).

Dvojni efekti IL-6 (pro- i anti - kancerogeni, pro - i anti-inflamatorni, efekti na ćelijski rast i diferencijaciju) zavise od stepena njegove ekspresije, patološkog stanja, ćelija koje ga sintetišu i interakcije sa drugim citokinima i ćelijskim faktorima (Blanchard i sar., 2009). To se posebno odnosi na specifičnu aktivaciju velikog broja signalnih puteva na koje IL - 6 utiče i preko kojih ostvaruje biološke efekte.

Jedan od fizioloških stimulusa za sintezu IL-6, pored IL-1, endotoksina bakterija, faktora rasta trombocita (*engl.* platelet-derived growth factor, PDGF), onkostatina M, je i TNF $\alpha$  (Goblewska i sar., 2012).

Rezultati disertacije pokazuju da konstitutivno veći ekspresioni nivo IL-6 na nivou proteina prati povećan ekspresioni nivo TNF $\alpha$  kod svih pacijenata.

TNF $\alpha$  je kao i IL-6, plejotropni citokin sa velikom ulogom u pokretanju i usaglašavanju kompleksnih događaja u inflamaciji i imunom odgovoru (Aggarwal, 2003; Chena i Oppenheim, 2011). Ćelije imunog sistema makrofagi, T i B limfociti, kao i endotelske, mast, ćelije neuronalnog tkiva i tumorske ćelije, stimulisane patogenima i

inflamatornim signalima produkuju TNF $\alpha$  (Vassalli, 1992; Sethi i sar., 2008; Chena i Oppenheim, 2011). Više autora ukazuje na proinflamatorni efekat TNF $\alpha$ , ali on ostvaruje i antiinflamatorni i imunosupresivni efekat, posebno tokom produženog izlaganja (Clark i sar., 2005; Chena i Oppenheim, 2011).

TNF $\alpha$  svoje biološke efekte ostvaruje posredstvom dva tipa receptora, TNFR - 1 i TNFR-2. Posredstvom TNFR-1 može pokrenuti kako preživljavanje tako i smrt ćelija, a preko TNFR-2 signalizaciju koja omogućava preživljavanje (Gupta i Gollapudi, 2005). Dvostruke uloge koje TNF $\alpha$  može ostvarivati određene su sličnim faktorima kao i za IL-6. Uz to postoji snažna korelacija između ova dva citokina, kada su u pitanju različiti fiziološki procesi, njihova inicijacija i regulacija. Tako, tokom starenja rast produkcije TNF $\alpha$  praćen je TNF $\alpha$  indukovanom apoptozom (Gupta, 2003, 2004). Podaci ukazuju da se nivo TNF $\alpha$  povećava 2-4 puta u starenju, a da ga prati povećanje IL-6 (Gupta i Gollapudi, 2005). Smatra se TNF $\alpha$ , svojim pro-inflamatornim delovanjem povećava stepen smrtnosti, uzrokujući insulin rezistenciju, dislipidemiju i disfunkciju endotela, dok IL-6 deluje anti-inflamatorno, stimulišući lipolizu, preuzimanje glukoze i štiti od TNF $\alpha$  indukovane insulin rezistencije (Gupta i Gollapudi, 2005).

S druge strane, ova dva citokina deluju sinergistički regulišući neke vitalne procese. IL-6 i TNF $\alpha$  su neophodni faktori koji direktno regulišu procese u osteogenim ćelijama (osteoblastima i osteoklastima) i njihovim prekursorima, kontrolišući formiranje, diferencijaciju i funkciju (Kwan i sar., 2004).

Signalni putevi koje pokreću biološki odgovor indukovani sa TNF $\alpha$ , direktno zavise od redoks stanja ćelije. TNF $\alpha$  može biti indukovani reaktivnim vrstama kiseonika, ali može i indukovati njihovu produkciju. Dokazano je da TNF $\alpha$  indukuje produkciju superoksid anjon radikala u mitohondrijama (Garg i Aggarwal, 2002). Uzajamna veza ROS i TNF $\alpha$  je ćelijski specifična, zavisi od stimulusa i odgovor TNF $\alpha$  na ROS može biti proapoptotski, ali i usmeren ka preživljavanju ćelija. Kako ROS imaju važnu ulogu u opredeljivanju, sudbini i diferencijaciji matičnih ćelija hematopoeze, održanje nivoa IL-6 i TNF $\alpha$ , uz konstitutivnu ekspresiju MnSOD i katalaze u njima može predstavljati sinergističku kaskadu usmerenu ka regulisanju njihove diferencijacije, maturacije i održanja metaboličkog profila i funkcije.

## ***6. Zaključci***

Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da se izdvajaju dva dominantna metabolička fenotipa monojedarnih ćelija iz periferne krvi. Prvi je karakterističan za monojedarne ćelije periferne krvi kod svih ispitivanih tumora, hematoloških (HL i NHL) i nehematoloških (NB i ES). Drugi fenotip, istovetan je za monojedarne ćelije svih tipova tumora posle protokola mobilizacije.

Ova dva fenotipa odlikavaju funkciono stanje monojedarnih ćelija periferne krvi na nivou antioksidativne odbrane, energetskog metabolizma (glikolize,  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina, ciklusa limunske kiseline, oksidativne fosforilacije, sinteze ATP), mtDNK, ekspresije NOX, kao i ekspresije citokina: IL-6 i TNF $\alpha$ .

1. Kod prvog metaboličkog fenotipa ekspresioni profili na nivou iRNK i na nivou proteina pokazuju snažnu aktivaciju metabolizma monojedarnih ćelija periferne krvi kod HL, NHL i NB u poređenju sa kontrolnim subjektima. Očigledno je da, iako ove ćelije nisu primarno mesto malignog procesa (kao npr. kod leukemija), one jesu izložene uticaju i indirektno interferiraju sa bolešću.

Uočava se sinhronizacija metaboličkih procesa u monojedarnim ćelijama pacijenata sa HL, NHL i NB.

- Na nivou iRNK, ekspresija svih ispitivanih komponenti kompleksa respiratornog lanca i ATP sintaze je izrazito povećana. Nema promene ekspresije na nivou iRNK kod pacijenata sa NB za subjediničice kompleksa IV kodirane bilo mitohondrijalnim ili nukleusnim genom.
- Ekspresioni profili za proteine kodirane mitohondrijalnim genima istovetni su sa ispitivanim genima iz nukleusa;
- Količina mitohondrijalne DNK u monojedarnim ćelijama pokazuje skoro istovetan obrazac u poređenju sa ekspresijom komponenti respiratornog lanca, dvadeset puta je veća kod pacijenata sa HL, deset sa NHL i pokazuje trend povećanja kod pacijenata sa NB.
- Na nivou proteina ekspresija komponenti respiratornog lanca je izrazito povećana, istovetno kao kod ekspresije iRNK. Jedini izuzetak je, suprotno promenama na nivou iRNK, dramatično smanjenje citohroma *c* kod pacijenata sa HL, NHL i NB tumorima.

2. Aktivacija oksidativnog metaboličkog profila (posebno u mitohondrijama) praćena je povećanjem mitohondrijalne biogeneze i broja kopija mtDNK u monojedarnim ćelijama kod pacijenata sa HL i NHL (sa trendom povećanjem kod NB).

3. Drugi metabolički fenotip monojedarnih ćelija periferne krvi (posle mobilizacije hemioterapijom i G-CSF) kod svih pacijenata karakteriše se skoro potpunim gašenjem

ispitivanih metaboličkih parametara (utišani fenotip) kada se vrednosti porede u odnosu na zdrave osobe i pacijente koji nisu primali MP. Karakteriše ih: nizak nivo glikolize;  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina; ciklusa limunske kiseline; oksidativne fosforilacije (kompleksi respiratornog lanca) i sinteze ATP, uz izuzetak citohroma *c* na iRNK nivou i kompleksa IV na proteinskom nivou. Takođe ih karakteriše smanjen nivo mtDNK, što je u skladu sa činjenicom da se održava konstantno nizak nivo kopija mtDNK u nediferenciranom stanju. Nizak nivo mtDNK u mobilisanim matičnim ćelijama hematopoeze u saglasnosti je sa rezultatima koji potvrđuju nisku stopu oksidativnog metabolizma u mitohondrijama.

U kojoj meri se ove promene mogu smatrati smanjenjem, a u kojoj meri su realno stanje mobilisanih matičnih ćelija u odnosu na rezultate dobijene iz uzoraka pacijenata koji nisu primali MP, kao i kontrolnih uzoraka nije bilo moguće zaključiti. Postoji mogućnost da mobilizacione procedure mogu uticati na biohemijske mehanizme i funkciju matičnih ćelija hematopoeze.

4. Na nivou antioksidativne odbrane, kod svih ispitivanih grupa pacijenata (koji su primali MP i koji nisu), smanjena je ekspresija na proteinskom nivou za GSH-Px, dok se ekspresioni nivoi katalaze i MnSOD održavaju se na kontrolnom nivou. Ekspresija CuZnSOD, smanjena je kod pacijenata koji su primali MP. Može se tvrditi da intracelularna lokalizacija antioksidativnih enzima (CuZnSOD i GSH-Px dominantno u citoplazmi, a MnSOD u mitohondrijama) može biti jedan od parametara koji bliže ukazuje na prirodu oksidativnih procesa u matičnim ćelijama hematopoeze, a posebno na ulogu koju ima vodonik peroksid. Uz to smanjena ekspresija NOX kod svih ispitivanih pacijenata ima važnu ulogu u regulaciji signalnih, redoks-zavisnih puteva.

5. Ekspresija citokina, IL-6 i TNF $\alpha$  na proteinskom nivou izrazito je povećana u monojedarnim ćelijama kod svih ispitivanih grupa pacijenata, sa i bez stimulacije matičnih ćelija hematopoeze.

Na osnovu rezultata disertacije može se zaključiti da ne postoji jasna korelacija između utišanog metaboličkog fenotipa i vremena prihvatanja kalema granulocitne i megakariocitne loze posle autologne transplantacije. Prihvatanje kalema obe loze je individualno i vremenski heterogeno kod pacijenata, nezavisno od vrste tumora.

Moguće je, da iako utišan, metabolički fenotip matičnih ćelija hematopoeze poseduje različite individualne potencijale da se eksprimira u zavisnosti od opšteg stanja pacijenata, stepena progresije oboljenja, infekcija i specifičnosti mikrosredina koje mogu uticati na prihvatanje kalema.

## ***7. Literatura***

- "ADAM A new standard of Automatic cell counter Instruction manual"; Digital Bio, 2008.
- Akahori M, Uedono Y, Yamagami K, Takeyama N, Kitazawa Y, Tanaka T. Hypoxia alters the energy metabolism and aggregation of washed human platelets. *Haematologia (Budap)*. 1995, 26:191-198.
- Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol*. 1993, 54:1-78.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell, *Garland Science* (Fourth Edition), New York, 2002.
- Altenberg B, Greulich KO. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics*. 2004, 84:1014-1020.
- Alves NL, Derks IA, Berk E, Spijker R, Van Lier RA, Eldering E. The Noxa/Mcl-1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells. *Immunity*. 2006, 24:703-716.
- Andus T, Geiger T, Hirano T, Northoff H, Ganter U, Bauer J, Kishimoto T, Heinrich PC. Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/ IFN $\beta$   $\beta$ 2) regulates  $\beta$ -fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. *FEBS Lett*. 1987, 221:18-22.
- Appleby SL, Cockshell MP, Pippal JB, Thompson EJ, Barrett JM, Tooley K, Sen S, Sun WY, Grose R, Nicholson I, Levina V, Cooke I, Talbo G, Lopez AF, Bonder CS. Characterization of a distinct population of circulating human non-adherent endothelial forming cells and their recruitment via intercellular adhesion molecule-3. *PLoS One*. 2012, 7:46996.
- Arch RH, Thompson CB. 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor. *Mol Cell Biol*. 1998, 18:558-565.
- Ataie-Kachoie P, Pourgholami MH, Morris DL. Inhibition of the IL-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer. *Cytokine & Growth Factor Rev*. 2013, 24:163-173.
- Bakker ST, Passegue E. Resilient and resourceful: genome maintenance strategies in hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2013, 41:915-923.
- Balinsky D, Platz CE, Lewis JW. Enzyme activities in normal, dysplastic, and cancerous human breast tissues. *J Natl Cancer Inst*. 1984, 72:217-224.

- Benard J, Raguenez G, Kauffmann A, Valent A, Ripoche H, Joulin V, Job B, Danglot G, Cantais S, Robert T, Terrier-Lacombe MJ, Chassevent A, Koscielny S, Fischer M, Berthold F, Lipinski M, Tursz T, Dessen P, Lazar V, Valteau-Couanet D. MYNC-non-amplified metastatic neuroblastoma with good prognosis and spontaneous regression. A molecular portrait of stage 4S. *Mol Oncol*. 2008, 2:261-271.
- Benito AI, Diaz MA, Gonzales-Vicent M, Sevilla J, Madero L. Hematopoietic stem cell transplantation using umbilical cord blood progenitors: review of current clinical results. *Bone Marrow Transplant*. 2004, 33:675-690.
- Bensinger W, Singer J, Appelbaum F, Lilleby K, Longin K, Rowley S, Clarke E, Clift R, Hansen J, Shields T, Storb R, Weaver C, Weiden P, Buckner CD. Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. *Blood*. 1993, 81:3158-3163.
- Blanchard F, Duplomb L, Baud'huin M, Brounais B. The dual role of IL-6-type cytokines on bone remodeling and bone tumors. *Cytokine Growth Fact Rev*. 2009, 20:19-28.
- Blume KG, Thomas ED. A review of autologous hematopoietic cell transplantation. *Biol Bone Marrow Transplant*. 2000, 6:1-12.
- Bonawitz ND, Clayton DA, Shadel GS. Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Mol Cell*. 2006, 24:813-825.
- Borregaard N, Herlin T. Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. *J Clin Investig*. 1982, 70:550-557.
- Bradham CA, Qian T, Streetz K, Trautwein C, Brenner DA, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release. *Mol Cell Biol*. 1998, 18:6353-6364.
- Bräuninger A, Schmitz R, Bechtel D, Renné C, Hansmann ML, Küppers R. Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*. 2006, 118:1853-1861.
- Burt M, Karpeh M, Ukoha O, Bains MS, Martini N, McCormack PM, Rusch VW, Ginsberg RJ. Medical tumours of the chest wall. Solitary plasmacytoma and Ewing sarcoma. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1993, 105:89-96.
- Cang S, Mukhi N, Kemeng Wang K, Liu D. Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy. *J Hematol Oncol*. 2012, 5:64.



- Carol AB, Mendis-Handagama SMLC, Kalmar JR, Arnold RR, Kinkade Jr. JM. Changes in the localization of catalase during differentiation of neutrophilic granulocytes. *Blood*. 1994, 83:2654-2668.
- Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/ HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett*. 1988, 232:347-350.
- Chacko BK, Kramer PA, Ravi S, Johnson MS, Hardy RW, Ballinger SW, Darley-Usmar VM. Methods for defining distinct bioenergetic profiles in platelets, lymphocytes, monocytes, and neutrophils, and the oxidative burst from human blood. *Lab Investig:J Tech Methods Pathol*. 2013, 93:690-700.
- Chandel NS, Schumacker PT, Arch RH. Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction. *J Biol Chem*. 2001, 276:42728–42736.
- Chen L, Mory Y, Zilberstein A, Revel M. Growth inhibition of human breast carcinoma and leukemia/lymphoma cell lines by recombinant interferon-beta 2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988, 85:8037-8041.
- Chen X, Oppenheim, JJ. Resolving the identity myth: key markers of functional CD4+ FoxP3+ regulatory T cells. *Internat Immunopharma*. 2011, 11:1489-1496.
- Chervenick PA, Boggs DR. In vitro growth of granulocytic and mononuclear cell colonies from blood of normal individuals. *Blood*. 1971, 37:131-135.
- Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999, 96:3120-3125.
- Cho YM, Kwon S, Pak YK, Seol HW, Choi YM, Park DJ, Park KS, Lee HK. Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006, 348:1472-1478.
- Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, Cantley LC. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*. 2008a, 452:230-233.
- Christofk HR, Vander Heiden MG, Wu N, Asara JM, Cantley LC. Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature*. 2008b, 452:181-186.

- Clark JM, Aleksiyadis K, Panesar M, Cope AP. How does tumour necrosis factor uncouple T-cell receptor-induced IL-2 gene expression in murine T cells? *Arthritis Res Therapy*. 2005, 7:1-2.
- Colell A, Green DR, Ricci J-E. Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. *Cell Death Differ*. 2009, 16:1573-1581.
- Coligan JE, Bierer BE, Margulies DH, Sherach EM, Strober W. Current Protocols in Immunology. *John Wiley & Sons*, (Fifth Edition), New Jersey, 2001.
- Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach, *Sunderland: Sinauer Associates* (Second Edition), Massachusetts, 2000.
- Coso S, Harrison I, Harrison CB, Vinh A, Sobey CG, Drummond GR, Williams ED, Selemidis S. NADPH oxidases as regulators of tumor angiogenesis: current and emerging concepts. *Antioxid Redox Signal*. 2012, 16:1229-1247.
- Cuezva JM, Chen G, Alonso AM, Isidoro A, Misek DE, Hanash SM, Beer DG. The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis*. 2004, 25:1157-1163.
- Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 1994, 264:1415-1421.
- De Groof AJ, Te Lindert MM, Van Dommelen MM, Wu M, Willemse M, Smift AL, Winer M, Oerlemans F, Pluk H, Franssen JA, Wieringa B. Increased OXPHOS activity precedes rise in glycolytic rate in H-RasV12/E1A transformed fibroblasts that develop a Warburg phenotype. *Mol Cancer*. 2009, 8:54.
- De Vos K, Goossens V, Boone E, Vercammen D, Vancompernelle K, Vandenaabeele P, Haegeman G, Fiers W, Grooten J. The 55-kDa tumor necrosis factor receptor induces clustering of mitochondria through its membrane-proximal region. *J Biol Chem*. 1998, 273:9673-9680.
- DeVita VT, Lawrence TS. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology, *Lippincott Williams & Wilkins*, (Ninth Edition), Philadelphia, 2011.
- Di Chiro G, DeLaPaz RL, Brooks RA, Sokoloff L, Kornblith PL, Smith BH, Patronas NJ, Kufta CV, Kessler RM, Johnston GS, Manning RG, Wolf AP. Glucose utilization of cerebral gliomas measured by [<sup>18</sup>F] fluorodeoxyglucose and positron emission tomography. *Neurology*. 1982, 32:1323-1329.

- Diaz B, Courtneidge SA. Redox signaling at invasive microdomains in cancer cells. *Free Radic Biol Med.* 2012, 52:247–256.
- Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Plerce PL, Bony C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen C, and Noel D. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem cells.* 2007, 25: 2025-2032.
- Efferth T, Fabry U, Glatte P, Osieka R. Increased induction of apoptosis in mononuclear cells of a glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patient. *J Mol Med.* 1995, 73:47-49.
- Evans CA, Middleton VL. Evaluation of methods for preparing pure lymphocyte suspensions from peripheral blood. *J Clin Pathol.* 1970, 23:822-823.
- Ewing J. Diffuse endothelioma of bone. *Proc New York Pathol Society.* 1921, 21:17-24.
- Facucho-Oliveira JM, Alderson J, Spikings EC, Egginton S, St John JC. Mitochondrial DNA replication during differentiation of murine embryonic stem cells. *J Cell Sci.* 2007, 120:4025-4034.
- Ferrari S, Bertoni F, Palmerini E, Errani C, Bacchini P, Pignotti E, Mercuri M, Longhi A, Cesari M, Picci P. Predictive factors of histologic response to primary chemotherapy in patients with Ewing sarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2007. 29:364-368.
- Fico A, Paglialunga F, Cigliano L, Abrescia P, Verde P, Martini G, Iaccarino I, Filosa S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a crucial role in protection from redox-stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2004, 11:823-831.
- Fogal V, Richardson AD, Karmali PP, Scheffler IE, Smith JW, Ruoslahti E. Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 2010, 30:1303-1318.
- Fossati G, Moulding DA, Spiller DG, Moots RJ, White MR, Edwards SW. The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis. *J Immunol.* 2003, 170:1964-1972.
- Friedman GK, Castleberry RP. Changing trends of research and treatment in infant neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2007, 49:1060-1065.

- Fruehauf S, Seggewiss R. Its moving day: factors affecting peripheral blood stem cell mobilization and strategies for improvement. *Br J Haematol*. 2003, 122:360-375.
- Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2011, 15:1583-1606.
- Funes JM, Quintero M, Henderson S, Martinez D, Qureshi U, Westwood C, Clements MO, Bourboullia D, Pedley RB, Moncada S, Boshoff C. Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, 104:6223-6228.
- Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, Lee YS, Kita K, Ochi T, Zeller KI, De Marzo AM, Van Eyk JE, Mendell JT, Dang CV. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*. 2009, 458:762-765.
- Garg AK, Aggarwal BB. Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. *Molec Immunol*. 2002, 39:509-517.
- Germann A, Oh Y-J, Schmidt T, Schön U, Zimmermann H, Von Briesen H. Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function. *Cryobiology*. 2013, 67:193-200.
- Goldman JM, Horowitz MM. The international bone marrow registry. *Int J Hematol*. 2002, 76:393-397.
- Gregersen N, Andresen BS, Corydon MJ, Corydon TJ, Olsen RK, Bolund L, Bross P. Mutation analysis in mitochondrial fatty acid oxidation defects: Exemplified by acyl-CoA dehydrogenase deficiencies, with special focus on genotype-phenotype relationship. *Hum Mutat*. 2001, 18:169-189.
- Groblewska M, Barbara Mroczko B, Sosnowska D, Szmitkowski M. Interleukin 6 and C-reactive protein in esophageal cancer. *Clin Chim Acta*. 2012, 413:1583-1590.
- Guan Y, Hickey MJ, Borgstahl GE, Hallewell RA, Lepock JR, O'Connor D, Hsieh Y, Nick HS, Silverman DN, Tainer JA. Crystal structure of Y34F mutant human mitochondrial manganese superoxide dismutase and the functional role of tyrosine 34. *Biochemistry*. 1998, 37:4722-4730.
- Gupta S, Gollapudi S. Molecular mechanisms of TNF-induced apoptosis in aging human T cell subsets. *The Intl J Biochem Cell Biology*. 2005, 37:1034-1042.
- Gupta S. A road to ruins: An insight in to immuno sence. *Adv Cell Aging Gerontol*. 2003, 13:169-185.

- Gupta S. A role of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins in increased lymphocyte apoptosis in aged humans. *Mech Ageing Dev.* 2004, 125:99-101.
- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* 1992, 119:598-620.
- Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 1990, 280:1-8.
- Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006, 141:312-322.
- Hassan HT, Drexler HG. Interleukins and colony stimulating factors in human myeloid leukemia cell lines. *Leuk lymphoma,* 1995, 20:1-15.
- Hattori M, Abraham LJ, Northemann W, Fey GH. Acute-phase reaction induces a specific complex between hepatic nuclear proteins and the interleukin 6 response element of the rat alpha 2-macroglobulin gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990, 87:2364-2368.
- Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer ED, Andreadis C, Shaw NAD, Hingorani RS, David A, Tuveson AD, Thompson BC. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer cell.* 2005, 8:311–321.
- Heike T, Nakahata T. *Ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. *Biochim Biophys Acta - Molecular Cell Research,* 2002, 1592:313-321.
- Higuchi M, Proske RJ, Yeh ET. Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. *Oncogene.* 1998, 17:2515-2524.
- Hsu PP, Sabatini MD. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell.* 2008, 134:703-707.
- Ibelgauft H. Cytokines and cells online pathfinder encyclopedia (COPE). 2013, <http://www.copewithcytokines.de/>
- Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Thierfelder WE, Kreider B, Silvennoinen O. Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem Sci.* 1994, 19:222-227.
- Ikeda K, Kozuka T, Harada M. Factors for PBSC collection efficiency and collection predictors. *Transf Apher Sci.* 2004; 31:245-259.

- Ishibashi T, Kimura H, Shikama Y, Uchida T, Kariyone S, Hirano T, Kishimoto T, Takatsuki F, Akiyama Y. Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor *in vivo* in mice. *Blood*. 1989, 74:1241-1244.
- Ishibashi T, Kimura H, Uchida T, Kariyone S, Friese P, Burstein SA. Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987, 86:5953-5957.
- Isidoro A, Martinez M, Fernandez PL, Ortega AD, Santamaria G, Chamorro M, Reed JC, Cuezva JM. Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J*. 2004, 378:17-20.
- Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, Suda T. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med*. 2006, 12:446-451.
- Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*. 2007, 110:3056-3063.
- Jiang F, Zhang Y, Dusting GJ. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol Rev*. 2011, 63:218-242.
- Johnson P. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2002, 133:493- 505.
- Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoku H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H, Kuramoto A, Kishimoto T. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature*. 1988, 332:83-85.
- Kemshead JT, Patel K, Phimister B. Neuroblastoma in the very young child: biological considerations. *Br J Cancer*. 1992, 66:102-105.
- Kennedy J. Peripheral blood progenitor cell mobilization: a clinical review. *Pharmacotherapy*. 1998, 18:3-8.
- Kennedy KA, Sandiford SD, Skerjanc IS, Li SS. Reactive oxygen species and the neuronal fate. *Cell Mol Life Sci*. 2012, 69:215-221.
- Kessinger A, Armitage JO. The evolving role of autologous peripheral blood stem cell transplantation following high-dose therapy for malignancies. *Blood*. 1991, 77:211-213.

- Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006, 3:177-185.
- Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T: Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood.* 1995. 86:1243-1254.
- Kramer PA, Ravi S, Chacko B, Johnson MS, Darley-USmar VM. A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: Implications for their use as bioenergetic biomarkers. *Redox Biol.* 2014, 2:206-210.
- Krauss S, Brand MD, Buttgerit F. Signaling takes a breath-new quantitative perspectives on bioenergetics and signal transduction. *Immunity.* 2001, 15:497-502.
- Küppers R, Schwering I, Bräuninger A, Rajewsky K, Hansmann ML. Biology of Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* 2002, 13:11-18.
- Kurnick JE, Robinson WA. Colony growth of human peripheral white blood cells in vitro. *Blood.* 1971, 37:136-141.
- Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004, 15:49-60.
- Landestein R, Pötscher U, Hartman O. 28 year of high dose therapy and SCT for neuroblastoma in Europe: lessons from more than 4000 procedures. *Bone Marrow Transplant.* 2008, 41:118-127.
- Lash BW, Dessain SK, Argiris A, Besa EC. Hodgkin Lymphoma Clinical Presentation; <http://emedicine.medscape.com/article/201886-clinical>
- Le Belle JE, Orozco NM, Paucar AA, Saxe JP, Mottahedeh J, Pyle AD, Wu H, Kornblum HI. Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. *Cell Stem Cell.* 2011, 8:59-71.
- Lewis ID, Rawling T, Dyson PG, Haylock DN, Juttner CA, To LB. Standardization of the CFU-GM assay using hematopoietic growth factors. *J Hematother.* 1996, 5:625-630.
- Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005, 21:605-631.

- Lin YM, Chang ZL, Liao YY, Chou MC, Tang CH. IL-6 promotes ICAM-1 expression and cell motility in human osteosarcoma. *Cancer Lett.* 2013, 328:135-143.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001, 104:487-501.
- Longtin R. Ewing sarcoma: a miracle drug waiting to happen? *J Natl Cancer Inst.* 2003, 95:1574-1576.
- Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Bowman LC, Smith EI, Brodeur GM. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 1991, 9:581-591.
- Macewan DJ. TNF receptor subtype signalling: Differences and cellular consequences. *Cell Signall.* 2002, 14:477-492.
- Macintyre AN, Rathmell JC. Activated lymphocytes as a metabolic model for carcinogenesis. *Cancer Metab.* 2013, 1:5.
- Majima HJ, Oberley TD, Furukawa K, Mattson MP, Yen HC, Szweda LI, St Clair DK. Prevention of mitochondrial injury by manganese superoxide dismutase reveals a primary mechanism for alkaline-induced cell death. *J Biol Chem.* 1998, 273:8217-8224.
- Manganelli G, Fico A, Masullo U, Pizzolongo F, Cimmino A, Filosa S. Modulation of the pentose phosphate pathway induces endodermal differentiation in embryonic stem cells. *PLoS One.* 2012, 7:29321.
- Marin-Hernandez A, Gallardo-Perez JC, Ralph SJ, Rodriguez-Enriquez S, Moreno-Sanchez R. HIF-1 $\alpha$  modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Med Chem.* 2009, 9:1084-1101.
- Marin-Hernandez A, Rodriguez-Enriquez S, Vital-Gonzalez PA, Flores-Rodriguez FL, Macias-Silva M, Sosa-Garrocho M, Moreno-Sanchez R. Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells: flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J.* 2006, 273:1975-1988.
- Marisavljević D, Mihaljević B, Elezović I, Popović S, Suvajdžić-Vuković N, Vujić D, Janjić D, Milenković P, Mostarica M, Bogdanović G. Klinička hematologija. *Zavod za udžbenike* (Prvo izdanje), Beograd, 2012.



- Martínez MC, Andriantsitohaina R. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2009, 11:669-702.
- Mathieu ME, Saucourt C, Mournetas V, Gauthereau X, Thézé N, Praloran V, Thiébaud P, Beuf H. LIF-dependent signaling: new pieces in the Lego. *Stem Cell Rev*. 2012, 8:1-15.
- Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science*. 2006, 312:1650-1653.
- Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin. Cancer Biol*. 2005, 15:300-308.
- McCredie KB, Hersch EM, Freireich EJ. Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science*. 1971, 171:293-294.
- Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007, 7:763-777.
- Metcalf D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? *Blood*. 1993, 82:3515–3523.
- Miharada K, Karlsson G, Rehn M, Rorby E, Siva K, Cammenga J, Karlsson S. Cripto regulates hematopoietic stem cells as a hypoxic-niche-related factor through cell surface receptor GRP78. *Cell Stem Cell*. 2011, 9:330-344.
- Miki S, Iwano M, Miki Y, Yamamoto M, Tang B, Yokokawa K, Sonoda T, Hirano T, Kishimoto T. Interleukin-6 (IL-6) functions as an in vitro autocrine growth factor in renal cell carcinomas. *FEBS Lett*. 1989, 250:607-610.
- Milovanova TN, Bhopale VM, Sorokina E M, Moore JS, Hunt TK, HauerJensen M, Velazquez OC, Thom SR. Hyperbaric oxygen stimulates vasculogenic stem cell growth and differentiation in vivo. *J Appl Physiol*. 2009, 106:711-728.
- Mohamed Amr El-Missiry. Antioxidant enzyme, *InTech Prepress* (First Edition), Rijeka, 2012.
- Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*. 2007, 274:1393-1418.
- Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am*. 2004, 86:1541-1558.

- Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res.* 2002; 4:233-242.
- National Cancer Institute at the National Institute of Health <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/child-non-hodgkins/Patient/page5>
- Neill LA, Hardie DG. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature.* 2013, 493:346–355.
- Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry, *Freeman Publishers.* (Sixth Edition), New York, 2013.
- NetCord-FACT International Standards for Cord Blood Collection, Banking, and Release for Administration. *International Netcord of Cord Blood Collection, Banking, and Release for Administration (FACT) Foundation, University of Nebraska Medical center* (Fifth Edition), Lincoln, 2013.
- Neurath MF, Finotto S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011, 22:83-89.
- Nicola NA, Metcalf D, Matsumoto M, Johnson GR. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. *J Biol Chem.* 1983, 258:9017-9023.
- Nishimura ET, Whest GM, Yang HY. Ultrastructural localization of peroxidatic catalase in human peripheral blood leukocytes. *Lab Invest.* 1976, 34:60-68.
- Noma T, Mizuta T, Rosen A, Hirano T, Kishimoto T, Honjo T. Enhancement of the interleukin-2 receptor expression on T cells by multiple B-lymphotropic lymphokines. *Immunol Lett.* 1987, 15:249-253.
- Nordan RP, Pumphrey JG, Rudikoff S. Purification and NH<sub>2</sub>-terminal sequence of a plasmacytoma growth factor derived from the murine macrophage cell line P388D1. *J Immunol.* 1987, 139:813-817.
- Norddahl GL, Pronk CJ, Wahlestedt M, Sten G, Nygren JM, Ugale A, Sigvardsson M, Bryder D. Accumulating mitochondrial DNA mutations drive premature hematopoietic aging phenotypes distinct from physiological stem cell aging. *Cell Stem Cell.* 2011, 8:499-510.
- Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood.* 1993, 81:2844-2853.
- Ohno T, Rao VN, Reddy ES. EWS/Fli-1 chimeric protein is a transcriptional activator. *Cancer Res.* 1993, 53: 5859-5863.

- Okada M, Kitahara M, Kishimoto S, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. BSF-2/IL-6 functions as killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *J Immunol.* 1988, 141:1543.
- Okamoto M, Lee C, Oyasu R. Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells in vitro. *Cancer Res.* 1997a, 57:141-146.
- Okamoto M, Hattori K, Oyasu R. Interleukin-6 functions as an autocrine growth factor in human bladder carcinoma cell lines in vitro. *Int J Cancer.* 1997b, 72:149-154.
- Orford KW and Scadden DT. Deconstructing stem cell self renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet.* 2008, 9:115-128.
- Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell.* 2008, 132:631-644.
- Panchision DM. The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *J Cell Physiol.* 2009, 220:562-568.
- Papayannopoulou T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood.* 2004; 103:1580-1585.
- Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci.USA.* 2007, 104:5431-5436.
- Pastorino JG, Simbula G, Yamamoto K, Glascott Jr. PA, Rothman RJ, Farber JL. The cytotoxicity of tumor necrosis factor depends on induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem.* 1996, 271:29792-29798.
- Patte C, Auperin A, Gerrard M, Michon J, Pinkerton R, Sposto R, Weston C, Raphael M, Perkins SL, McCarthy K, Cairo MS. Results of the randomized international FAB/LMB96 trial for intermediate risk B-cell non-Hodgkin lymphoma in children and adolescents: it is possible to reduce treatment for the early responding patients. *Blood.* 2007, 109: 2773-2780.
- Pearce EL, Poffenberger MC, Chang CH, Jones RG. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science.* 2013, 342:1242454
- Pearce EL. Metabolism in T cell activation and differentiation. *Curr Opin Immunol.* 2010, 22:314–320.
- Pedersen PL. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect",

- i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J Bioenerg Biomembr.* 2007, 39:211-212.
- Phelps ME, Hoffman EF, Mullani NA, Ter-Pogossian MM. Non-invasive brain imaging, radionuclides and computed tomography. *J Biol Chem.* 1975, 242:1635-1645.
  - Phillip West A, Shadel GS, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nature Rev Immunol.* 2011, 11:389-402.
  - Piccoli C, D'Aprile A, Ripoli M, Scrima R, Lecce L, Boffoli D, Tabilio A, Capitanio N. Bone-marrow derived hematopoietic stem/ progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007a, 353:965-972.
  - Piccoli C, D'Aprile A, Ripoli M, Scrima R, Boffoli D, Tabilio A, Capitanio N. The hypoxia-inducible factor is stabilized in circulating hematopoietic stem cells under normoxic conditions. *FEBS Lett.* 2007b, 581:3111-3119.
  - Piccoli C, Ria R, Scrima R, Cela O, D'Aprile A, Boffoli D, Falzetti F, Tabilio A, Capitanio N. Characterization of mitochondrial and extramitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity. *J Biol Chem.* 2005, 280:26467-26476.
  - Piko L, Matsumoto L. Number of mitochondria and some properties of mitochondrial DNA in the mouse egg. *Dev Biol.* 1976, 49:1-10.
  - Porth CM, Matfin G. Pathophysiology, Concepts of Altered Health States. *Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins* (Eight Edition), Wisconsin, 2009.
  - Prigione A, Fauler B, Lurz R, Lehrach H, Adjaye J. The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 2010, 28:721-733.
  - Rassidakis G Z, Medeiros L J, Viviani S, Bonfante V, Gian-Paolo Nadali G-P, Vassilakopoulos TP, Mesina O, Herling M, Angelopoulou MK, Giardini R, Chilosi M, Kittas C, McLaughlin P, Rodriguez MA, Romaguera J, Bonadonna G, Gianni AM, Pizzolo G, Pangalis GA, Cabanillas F, and Sarris AH. CD20 Expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease: associations with presenting features and clinical outcome. *J Clin Oncol.* 2002, 20:1278-1287.
  - Rathmell CJ, Vander Heiden GM, Harris HM, Frauwirth AK, and Thompson BC. In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Mol Cell.* 2000, 6:683-692.

- Renstrom J, Kroger M, Peschel C, Oostendorp RA. How the niche regulates hematopoietic stem cells. *Chem Biol Interact.* 2010, 184:7-15.
- Reuter H, Gross R. Platelet metabolism. *Suppl Thromb Haemost.* 1978, 63:87–95.
- Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci. STKE.* 2000, 2000:1.
- Ringden O, Remberger M, Runde V, Bornhauser M, Blau IW, Basara N. Faster engraftment of neutrophils and platelets with peripheral blood stem cells from unrelated donors: a comparison with marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000, 26:6-8.
- Rodriguez-Prados JC, Traves PG, Cuenca J, Rico D, Aragonés J, MartínSanz P, Cascante M, Bosca L. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation, *J Immunol.* 2010, 185:605-614.
- Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leu Biol.* 2006, 80:227-236.
- Rutka JT, Giblin JR, Berens ME, Bar-Shiva E, Tokuda K, McCulloch JR, Rosenblum ML, Eessalu TE, Aggarwal BB, Bodell WJ. The effects of human recombinant tumor necrosis factor on glioma-derived cell lines: cellular proliferation, cytotoxicity, morphological and radioreceptor studies. *Int J Cancer.* 1988, 41:573-582.
- Sanchez-Cenizo L, Formentini L, Aldea M, Ortega AD, Garcia-Huerta P, Sanchez-Arago M, Cuezva JM. The up-regulation of the ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1) of the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype. *J Biol Chem.* 2010, 285:25308-25313.
- Sareila O, Kelkka T, Pizzolla A, Hultqvist M, Holmdahl R. NOX2 complex derived ROS as immune regulators. *Antiox Redox Signal.* 2011, 15:2197-2208.
- Saretzki G, Armstrong L, Leake A, Lako M, Von Zglinicki T. Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells. *Stem Cells.* 2004, 22:962-971.
- Sari I, Cetin A, Kaynar L, Saraymen R, Hacioglu SK, Ozturk A, Kocyigit I, Altuntas F, Eser B. Disturbance of pro-oxidative/antioxidative balance in allogeneic peripheral blood. *Stem Cell Transplant Annals Clin Lab Science.* 2008, 38:2.

- Sattler M, Winkler T, Verma S, Byrne CH, Shrikhande G, Salgia R, Griffin JD. Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species. *Blood*. 1999, 93:2928-2935.
- Schindler C, Darnell JE Jr: Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem*. 1995, 64:621-651.
- Schultz B, Chan S. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2001, 30:23-65.
- Seaberg R M, Van Der Kooy D. Stem and progenitor cells: The premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosc*. 2003, 26:125-131.
- Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, Giallongo A. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1996, 271:32529-32537.
- Semenza GL. Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *J Clin Invest*. 2008, 118:3835-3837.
- Shapiro H, Lutaty A, Ariel A. Macrophages, meta-inflammation, and immunometabolism. *Sci World J*. 2011, 11:2509-2529.
- Shimoda LA, Fallon M, Pisarcik S, Wang J, and Semenza GL. HIF-1 regulates hypoxic induction of NHE1 expression and alkalization of intracellular pH in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006, 291:941-949.
- Shyh-Chang N, Daley GQ, Cantley LC. Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development*. 2013, 140:2535-2547.
- Silverthorn DU. Human Physiology: An Integrated Approach, *Benjamin-Cummings Publishing Company* (Fourth Edition), San Francisco, 2006.
- Simsek T, Kocabas F, Zheng J, Deberardinis RJ, Mahmoud AI, Olson EN, Schneider JW, Zhang CC, Sadek HA. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. 2010, 7:380-390.
- Smith MA, Seibel NL, Altekrose SF, Ries LA, Melbert DL, O'Leary M, Smith FO, Reaman GH. Outcomes for children and adolescents with cancer: challenges for the twenty-first century. *J Clin Oncol*. 2010, 28:2625-2634.
- St John JC, Amaral A, Bowles E, Oliveira JF, Lloyd R, Freitas M, Gray HL, Navara CS, Oliveira G, Schatten GP, Spikings E, Ramalho-Santos J. The analysis of

- mitochondria and mitochondrial DNA in human embryonic stem cells. *Meth Mol Biol.* 2006, 331:34-374.
- St John JC, Ramalho-Santos J, Gray HL, Petrosko P, Rawe VY, Navara CS, Simerly CR, Schatten GP. The expression of mitochondrial DNA transcription factors during early cardiomyocyte in vitro differentiation from human embryonic stem cells. *Clon Stem Cells.* 2005, 7:141-153.
  - Strenger V, Kerbil R, Dornbusch HJ, Ladenstein R, Ambros PF, Ambros IM, Urban C. Diagnosis and prognostic impact of urinary catecholamines in neuroblastoma patients. *Pediatr Blood Cancer.* 2007, 48:504-509.
  - Stubbs M, Bashford CL, Griffiths JR. Understanding the tumor-metabolic phenotype in the genomic era. *Curr Mol Med.* 2003, 3:49-59.
  - Suda T, Arai F, Hirao A. Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends Immunol.* 2005, 26:426-433.
  - Suda T, Takubo K, Semenza GL. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell.* 2011, 9:298-310.
  - Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayaar R, Chin-Yee I. The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry. *J Hematotherapy.* 1996, 5:213-226.
  - Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006, 126:663-676.
  - Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, Shima H, Johnson R S, A. Hirao, Suematsu M, Johnson RS, Hirao A, Suematsu M, Suda T. Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010, 7:391-402.
  - Takubo K, Ohmura M, Azuma M, Nagamatsu G, Yamada W, Arai F, Hirao A, Suda T. Stem cell defects in ATM-deficient undifferentiated spermatogonia through DNA damage-induced cell-cycle arrest. *Cell Stem Cell.* 2008, 2:170-182.
  - Takubo K, Nagamatsu G, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Kobayashi H, Ikeda E, Goda N, Rahimi Y, Johnson RS, Soga T, Hirao A, Suematsu M, Suda T. Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2013, 12:49-61.
  - Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, Miyaura C, Tanaka S, Yamada Y, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kumaki K, Taga T, Kishimoto T, Suda T. Soluble interleukin-6 receptor

- triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993, 90:11924-11928.
- Taniguchi K, Karin M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Semin Immunol*. 2014. 26:54-74.
  - Telang S, Lane AN, Nelson KK, Arumugam S, Chesney J. The oncoprotein HRasV12 increases mitochondrial metabolism. *Mol Cancer*. 2007, 6:77.
  - Tesio M, Golan K, Corso S, Giordano S, Schajnovitz A, Vagima Y, Shivtiel S, Kalinkovich A, Caione L, Gammaitoni L, Laurenti E, Buss EC, Shezen E, Itkin T, Kollet O, Petit I, Trumpp A, Christensen J, Aglietta M, Piacibello W, Lapidot T. Enhanced c-Met activity promotes G-CSF-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells via ROS signaling. *Blood*. 2011, 117:419-428.
  - Thomas J, Liu F, Link DC. Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol*. 2002, 9:183-189.
  - Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1964, 51:29-36.
  - To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood*. 1997, 89:2233-2258.
  - Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, McDowell EP, Lazo-Kallanian S, Williams IR, Sears C, Armstrong SA, Passegue E, DePinho RA, Gilliland DG. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell*. 2007, 128:325-339.
  - Urao N, Ushio-Fukai Masuko. Redox regulation of stem/progenitor cells and bone marrow niche. *Free Rad Biol Med*. 2013, 54:26-39.
  - Ushio-Fukai M. Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res*. 2006, 71:226-235.
  - Uyttenhove C, Coulie PG, Van Snick J. T cell growth and differentiation induced by interleukin-HP1/IL-6: the murine hybridoma/plasmacytoma growth factor. *J Exp Med*. 1988, 167:1417-1427.
  - Van der Windt GJ, Pearce EL. Metabolic switching and fuel choice during T-cell differentiation and memory development. *Immunol Rev*. 2012a, 249:27-42.



- Van der Windt GJ, Everts B, Chang CH, Curtis J D, Freitas TC, Amiel E, Pearce EJ, Pearce E L. Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8+ T cell memory development. *Immunity*. 2012b, 36:68-78.
- Van Raam BJ, Sluiter W, De Wit E, Roos D, Verhoeven AJ, Kuijpers TW. Mitochondrial membrane potential in human neutrophils is maintained by complex III activity in the absence of supercomplex organisation. *PLoS One*. 2008, 3:2013.
- Van Raam NA, Geissler J, Srinivasula SM, Alnemri ES, Roos D, Kuijpers TW. Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. *Cell Death Differ*. 2004, 11:143-153.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009, 324:1029-1033.
- Vander Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH, Thompson CB. Growth Factors Can Influence Cell Growth and Survival through Effects on Glucose Metabolism. *Mol Cell Biol*. 2001, 21:5899-5912.
- Veljkovic D, Vujic D, Nonkovic OS, Jevtic D, Zecevic Z, Lazic E. Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells in pediatric patients with solid tumors. *Therapy Apher Dial*. 2011, 15:579-586.
- Vieira HL, Alves PM, Vercelli A. Modulation of neuronal stem cell differentiation by hypoxia and reactive oxygen species. *Prog Neurobiol*. 2011, 93:444-455.
- Wallace DC. Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2005, 70:363-74.
- Wang Y, Kellner J, Liu L, Zhou D. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase promotes ex vivo hematopoietic stem cell expansion. *Stem Cells Dev*. 2011, 20:1143-1152.
- Warburg O. On the origin of cancer cells; *Science*. 1956, 123:309-314.
- Welte K, Gabrilove J, Bronchud MH, Platzer E, Morstyn G. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood*. 1996, 88:1907-1929.
- Willers IM, Isidoro A, Ortega AD, Fernandez PL, Cuezva JM. Selective inhibition of beta-F1-ATPase mRNA translation in human tumours. *Biochem J*. 2010, 426:319-326.
- Wilson A, Laurenti E, Oser G, Van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lió P, Macdonald HR, Trumpp A.

Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*. 2008, 135:1118-1129.

- Ye ZW, Zhang J, Townsendb Md, Tewa KD. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochem Biophys Acta*, 2014, 1850:1607-1621.
- Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, Semenza GL. Mitochondrial autophagy is a HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem*. 2008, 283:10892-10903.

## LISTA SKRAĆENICA

<i>Skraćenica</i>	<i>Pun naziv na srpskom (ispod) i/ i li engleskom (iznad)</i>
ACADM	<i>engl. acyl-CoA dehydrogenase medium-chain</i> acil-CoA dehidrogenaza masnih kiselina srednjeg lanca;
ACC	<i>engl. acetyl-CoA carboxylase</i> acetil-CoA karboksilaza;
AD	<i>engl. antioxidant defense</i> antioksidativna odbrana;
Aox	<i>engl. acyl-CoA oxidase</i> acil-CoA oksidaza
BFU-E	<i>engl. burst-forming unit-erythroid</i> kolonije blasta eritrocita
CFU-E	<i>engl. colony-forming unit-erythroid</i> kolonije eritrocita
CFU-GEMM	<i>engl. colony-forming unit-granulocytes erythrocytes, macrophages, megakariocytes</i> kolonije granulocita, eritrocita, makrofaga, megakariocita
CFU-GM	<i>engl. colony-forming unit-granulocytes, macrophages</i> kolonije granulocita, makrofaga
COX	<i>engl. cytochrome c oxidase</i> citohrom c oksidaza;
CRP	<i>engl. C reactive protein</i> C reaktivni protein
CuZnSOD	<i>engl. CuZn Superoxide dismutase</i> CuZn superoksid dismutaza;
MnSOD	<i>engl. Mn superoxide dismutase</i> Mn superoksid dismutaza
eNOS	<i>engl. endothelial nitric oxide synthase</i> endotelijalna azot oksid sintaza;
i NOS	<i>engl. inducible nitric oxide synthase</i> inducibilna azot oksid sintaza;
ESC	<i>engl. embrional stem cell</i> enembrionalne matične ćelije
FADH <sub>2</sub>	<i>engl. flavin adenine dinucleotide</i> flavin adenin dinukleotid
GAPDH	<i>engl. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza
G-CSF	<i>engl. granulocyte-colony stimulating factor</i> faktor stimulacije granulocita
GM-CSF	<i>engl. granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> faktor stimulacije granulocita, makrofaga
GSH-Px	<i>engl. glutathione peroxidase</i> glutation peroksidaza;
HIF-1 $\alpha$	<i>engl. hypoxia-inducible factor 1<math>\alpha</math></i> hipoksija inducibilni transkripcioni faktor 1 $\alpha$
HPC	<i>engl. human progenitor cell</i> humane progenitorske ćelije

HSC	<i>engl. human stem cell</i> humane matične ćelije
JAK /STAT	<i>engl. Janus family tyrosine kinases/Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
MAPK	<i>engl. mitogen-activated protein kinases</i> mitogen aktivirajuće protein kinaze
MSC	<i>engl. mesenchymal stem cells</i> mezenhimalne matične ćelije
NAD	<i>engl. nicotinamide adenine dinucleotide</i> nikotinamid adenin dinukleotid
Ndufa6	<i>engl. NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6</i> subjedinica 6 ubikinona
OXPPOS	<i>engl. oxidative phosphorylation</i> oksidativna fosforilacija
PBSC	<i>eng. peripheral blood stem cell</i> matične ćelije periferne krvi
PDGF	<i>engl. platelet-derived growth factor</i> faktor rasta trombocita
PDH	<i>engl. pyruvate dehydrogenase</i> piruvat dehidrogenaza;
PEP	<i>engl. phosphoenolpyruvate</i> fosfoenolpiruvat
PFK-1	<i>engl. phosphofructokinase-1</i> fosfofruktokinaza-1
PK	<i>engl. pyruvate kinase</i> piruvat kinaza
PNET	<i>engl. primitive neuroectodermal tumor</i> primitivni neuroektodermalni tumor
PTPRC	<i>engl. protein tyrosine phosphatase, receptor type C</i> protein tirozin fosfataza, receptor tipa C
SCAS	<i>engl. sukcinil-CoA sintetaze</i> sukcinil-CoA sintetaza
TNF $\alpha$	<i>engl. tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> faktor nekroze tumora
VDAC	<i>engl. voltage-dependent anion channels</i> voltažno zavisni anjonski kanal

## **Biografija autora:**

Diplomirani molekularni biolog Emilija Lazić rođena je 4. februara 1963. godine, u Sokobanji, gde je završila osnovnu i srednju stručnu skolu (tehničar molekularni biolog). Diplomirala je školske 1995/1996.godine na studijskoj grupi za Molekularnu biologiju i fiziologiju, smer Eksperimentalna biohemija, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

2004/2005 upisuje se na doktorske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer Animalna i humana fiziologija, modul Eksperimentalna endokrinologija.

Emilija Lazić je od 1989. do 2008. godine bila zaposlena u Institutu za nuklearne nauke "Vinča", u Laboratoriji za radioizotope na poslovima tehničara na projektu Biotehnologija hibridoma - dobijanje monoklonskih antitela protiv tumor specifičnih markera Br 1404 (1991-1995), pri odboru za Genetičko inženjerstvo i nove biotehnologije, čiji je rukovodilac bila dr Ljiljana Vuksanović, viši naučni saradnik. U okviru ovog projekta i pod rukovodstvom dr Vuksanović urađen je diplomski rad pod naslovom "*Dobijanje i primena monoklonskih antitela BG serije*".

Od 1997 do 2000. godine aktivno je učestvovala na projektnom zadatku "Proizvodnja radioizotopa i radiofarmaceutika na Ciklotronu VINCY" u okviru projekta "Izgradnja i korišćenje akceleratorne instalacije "TESLA"-Projekat "TESLA".

2008. godine stekla je istraživačko zvanje istraživač saradnik.

Od 2008. godine zaposlena je u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke u deteta Srbije "dr Vukan Čupić", na Odeljenju za transplantaciju kostne srži sa laboratorijom za kriobiologiju.

Iz naučno-istraživačke aktivnosti kandidata, proistekli su rezultati objavljeni u koautorstvu: 1 tehničko rešenje, 1 poglavlje u monografiji, 3 rada štampana u časopisima nacionalnog značaja, 11 saopštenja štampanih u vidu apstrakta sa domaćih i međunarodnih naučnih skupova, 4 rada u međunarodnim časopisima, 3 poglavlja u knjigama i 3 revizije za časopis *Stem Cells Translational Medicine*.

Prilog 1.

## 1. Izjava o autorstvu

Potpisana Emilija Lazić

broj upisa AA060138

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom: Energetski metabolizam matičnih ćelija hematopojeze periferne krvi bolesnika sa malignim oboljenjima

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranta

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Prilog 2.

## 2. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Emilija Lazić

Broj upisa AA060138

Studijski program Animalna i humana fiziologija

Naslov rada Energetski metabolizam matičnih ćelija hematopoeze periferne krvi bolesnika sa malignim oboljenjima

Mentori: Dr Bato Korać, vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Dragana Vujić, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Potpisani Emilija Lazić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**. Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada. Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranta

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Prilog 3.

### 3. Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: "Energetski metabolizam matičnih ćelija hematopoeze periferne krvi bolesnika sa malignim oboljenjima". koja je moje autorsko delo. Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje. Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima (Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranta

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_