

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Sanja N. Vignjević

**ĆELIJSKI I MOLEKULARNI MEHANIZMI  
REGULACIJE ERITROCITOPOEZE U  
USLOVIMA HRONIČNOG STRESA**

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF MEDICINE

Sanja N. Vignjević

**CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS  
UNDERLYING ERYTHROPOIETIC  
RESPONSE TO CHRONIC STRESS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

**Mentor:**

Prof. dr Mirjana Gotić, specijalista interne medicine-hematolog, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

**Komentor:**

Dr sci. med. Mirela Budeč, specijalista imunologije, naučni savetnik Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu

**Članovi Komisije:**

1. Prof. dr Ivana Novaković, Institut za humanu genetiku, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Andrija Bogdanović, Klinika za hematologiju KCS, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Doc. dr Predrag Miljić, Klinika za hematologiju KCS, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
4. VNS dr Vladan Čokić, Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu
5. Prof. dr Aleksandar Savić, Klinika za hematologiju KCV, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu

*Doktorska disertacija je urađena u Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu pod rukovodstvom naučnog savetnika Dr Mirele Budeč. Rad je finansiran sredstvima Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije u okviru naučnoistraživačkog projekta „Ispitivanje patogeneze hematoloških maligniteta” (br. 175053).*

*Ovom prilikom želim da se zahvalim prvenstveno Dr Mireli Budeč, koja je kontinuiranom podrškom, permanentnim zalaganjem i nesebičnom stručnom pomoći omogućila realizaciju ove teze.*

*Prof. dr Mirjani Gotić se zahvaljujem na razumevanju, ukazanom poverenju i korisnim sugestijama u toku izrade ove disertacije.*

*Posebnu zahvalnost za ukazano poverenje i veliku stručnu pomoć u svim fazama izrade ovog rada dugujem Dr Gordani Jovčić, direktoru Instituta za medicinska istraživanja.*

*Dr Vladanu Čokiću se zahvaljujem na izvanrednoj saradnji, pomoći i sveobuhvatnoj podršci u toku izrade disertacije.*

*Veliko hvala Dr Dragani Marković koja je svojim velikim iskustvom značajno doprinela analizi proteinske ekspresije regulatora eritrocitopoeze.*

*Dr Stanislava Stošić Grujičić je svojim kreativnim pristupom inicirala istraživanje uloge faktora inhibicije migracije makrofaga u regulaciji procesa eritrocitopoeze na čemu joj se posebno zahvaljujem.*

*Takođe, zahvaljujem se i svim saradnicima Instituta za medicinska istraživanja koji su učestvovali u realizaciji pojedinih faza eksperimentalnog rada.*



## ĆELIJSKI I MOLEKULARNI MEHANIZMI REGULACIJE ERITROCITOPOEZE U USLOVIMA HRONIČNOG STRESA

### REZIME

Stres je sastavni deo svakodnevnog života. Psihološki stresori pokreću kompleksan odgovor organizma na stres koji utiče na različite fiziološke procese uključujući hematopoezu. Poznato je da se u bazalnim uslovima proces eritrocitopoeze odvija prevashodno u kostnoj srži, dok se u stanjima povećanih potreba organizma za eritrocitopoezom ovaj proces, nazvan stres eritrocitopoeza (SE), aktivira i u slezini. Prema najnovijim saznanjima, neadekvatna regulacija SE može rezultirati prekomernom ekspanzijom i malignom transformacijom nezrelih ćelija crvene krvne loze. Do sada je proces SE ispitivan prevashodno na mišjim modelima anemije dok su literaturni podaci o efektima hroničnog psihološkog stresa na proces eritrocitopoeze veoma oskudni. Cilj ove studije je bio: 1) da se ispita uticaj hroničnog psihološkog stresa na proces eritrocitopoeze u kostnoj srži i slezini, i 2) da se istraže ćelijski i molekularni mehanizmi regulacije ispitivanog procesa. U tu svrhu su korišćeni odrasli mužjaci miševa visokorodnih sojeva CBA i C57/BL6, kao i MIF *knockout* miševi koji su bili podvrgnuti *restraint* stresu 7 ili 14 dana uzastopno, u trajanju od 2 sata dnevno. Za detekciju progenitorskih ćelija eritrocitne loze primenjen je metod kultivacije hematopoetskih ćelija na podlozi od metilceluloze obogaćene odgovarajućim citokinima. Metodama protočne citofluorometrije i imunohistohemije izvršena je detekcija i kvantifikacija eritroblasta u ispitivanim uzorcima kostne srži i slezine. Ekspresija ciljnih proteina je analizirana primenom *Western blot*-a i imunohistohemije dok je relativna ekspresija ispitivanih gena određena metodom *Real-Time* PCR. Naši rezultati su pokazali da hronični psihološki stres redukuje koncentraciju gvožđa i hemoglobina u krvi, i da dovodi do stimulacije eritrocitopoeze u kostnoj srži i slezini miša. Inhibicija sinteze azot monoksida u potpunosti je sprečila stimulišući efekat hroničnog stresa na progenitorske ćelije crvene krvne loze u kostnoj srži, ukazujući prvi put da ovaj signalni molekul ima značajnu ulogu u ekspanziji eritroidnih progenitora tokom hroničnog psihološkog stresa. Pored povećanog broja

progenitorskih ćelija, u slezini hronično stresiranih životinja smo detektovali i znatno veći procenat eritroblasta što ukazuje da hronični psihološki stres ima izraženiji efekat na ekstramedularnu eritrocitopoezu. Stimulisana ekstramedularna eritrocitopoeza je bila praćena značajnim povećanjem nivoa kortikosterona i eritropoetina u cirkulaciji hronično stresiranih miševa, kao i istovremenim smanjenjem ekspresije glukokortikoidnog i eritropoetinskog receptora u slezini ovih životinja. Blokada glukokortikoidnog receptora pre svakodnevne primene stresora je ukazala na ključnu ulogu ovog receptora u ekspanziji kasnih eritroidnih progenitora tokom hroničnog stresa. Takođe, dokazan je povećan broj c-Kit-imunoreaktivnih ćelija u crvenoj pulpi hronično stresiranih miševa. Pored navedenog, naši rezultati su pokazali prvi put da hronični psihološki stres povećava ekspresiju BMP4 u crvenoj pulpi i dovodi do višestrukog povećanja ekspresije iRNK za njegove receptore u slezini. Hronični *restraint* stres je povećao sintezu faktora inhibicije migracije makrofaga (MIF) u slezini *wild-type* životinja, a delecija gena za MIF je rezultirala dodatnom ekspanzijom nezrelih ćelija eritrocitne loze što jasno ukazuje da ovaj citokin deluje kao negativni regulator ekstramedularne eritrocitopoeze u hroničnom stresu. Sveopšte uzev, rezultati naših istraživanja pokazuju da hronični psihološki stres povećava broj eritroidnih progenitora u kostnoj srži i dovodi do permanentne aktivacije procesa SE u slezini, što predstavlja potencijalne faktore rizika za malignu transformaciju nezrelih ćelija eritrocitne loze u hroničnom psihološkom stresu. Pored toga, prvi put je pokazana uloga MIF kao negativnog regulatora SE koji sprečava prekomernu ekspanziju nezrelih ćelija eritrocitne loze u hroničnom stresu. Rezultati, prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji, doprinose opštem sagledavanju fiziološkog odgovora organizma na stres i otvaraju mogućnosti za dalja istraživanja molekularnih mehanizama čija bi neadekvatna aktivacija mogla rezultirati klonalnim rastom i malignom transformacijom nezrelih ćelija crvene krvne loze u toku hroničnog psihološkog stresa.

**Ključne reči:** eritrocitopoeza, hronični stres, slezina, kostna srž, glukokortikoidi, BMP4, MIF, NO

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Hematologija

**UDK broj:** 616.15/341:612.41:577:159.944(043.3)

## **CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS UNDERLYING ERYTHROPOIETIC RESPONSE TO CHRONIC STRESS**

### **ABSTRACT**

Stress has become an important aspect of daily life. Exposure to a psychological stressor initiates an integrated response that affects different physiological processes including hematopoiesis. The majority of steady-state erythropoiesis occurs in the bone marrow. However, recent studies have shown that the adult spleen serves as the main site of red blood cell production under different stress conditions, collectively referred to as stress erythropoiesis (SE). Furthermore, emerging evidence suggests that inappropriate activation of SE may predispose to leukemic transformation. Much of what we know about SE comes from the analysis of murine models of anemia, but the erythropoietic effects of chronic psychological stress remain largely unknown. The aim of the current study was to examine the influence of chronic psychological stress on erythropoiesis in adult bone marrow and spleen, as well as to investigate cellular and molecular mechanisms underlying the observed effects. For this purpose, adult male CBA and C57BL/6 mice were subjected to 2 hrs. daily restraint stress for 7 or 14 consecutive days. In addition, we used macrophage migration inhibitory factor (MIF)-knockout mice on a C57BL/6 background to examine whether MIF is involved in the control of stress-induced erythropoiesis. The number of erythroid progenitors was determined using colony assays, whereas CD71/Ter119 profiles of bone marrow and splenic cells were analyzed by flow cytometry. The expression of target proteins were assessed by Western blot and immunohistochemistry, while gene expression analysis was performed using real-time PCR. Our results showed that chronic exposure to restraint stress decreased the concentration of iron and hemoglobin in the blood, and resulted in markedly increased number of erythroid progenitors in murine bone marrow and spleen. Blockade of nitric oxide synthesis completely abolished the stimulatory effect of chronic restraint stress on erythroid progenitors in the bone marrow, suggesting a role of nitric oxide in stress-induced erythroid cell growth. Although repeated restraint stress initiated an erythroid

stress response in both bone marrow and spleen, the effects on growth and maturation of erythroid cells were more prominent in the spleen, showing that chronic psychological stress stimulates mainly extramedullary erythropoiesis. A robust expansion of immature erythroid cells was associated with significantly increased plasma erythropoietin and corticosterone levels as well as with markedly decreased expression of erythropoietin receptor and glucocorticoid receptor in the spleen of restrained mice. Blockade of glucocorticoid receptor prior to daily restraint revealed an essential role of this receptor in the expansion of splenic late-stage erythroid progenitors during chronic stress. Chronic stress enhanced the expression of stem cell factor receptor in the splenic red pulp. Furthermore, chronically stressed animals exhibited significantly increased expression of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) in the red pulp and substantially enhanced mRNA expression levels of its receptors in the spleen. Repeated restraint stress increased the expression of MIF in the spleen of wild-type animals, and mice lacking the MIF gene showed a more pronounced splenic erythroid response to chronic stress, clearly indicating that MIF is a negative regulator of stress-induced extramedullary erythropoiesis. Taken together, our results show that chronic psychological stress initiates robust expansion of erythroid progenitors in the bone marrow, activates BMP4-dependent extramedullary erythropoiesis and leads to the prolonged activation of SE pathways in the spleen. Prolonged activation of these pathways along with an excessive production of immature erythroid cells may predispose chronically stressed subjects to a higher risk of leukemic transformation. Furthermore, obtained findings demonstrate for the first time that MIF acts as a negative regulator of stress-induced extramedullary erythropoiesis, preventing an overexpansion of immature erythroid cells during chronic psychological stress. In addition to introducing the topic for future studies on additional downstream erythropoietic responses, these results increase our understanding of the physiological mechanisms underlying chronic psychological stress.

**Key words:** erythropoiesis, chronic stress, spleen, bone marrow, glucocorticoids, BMP4, MIF, NO

**Scientific field:** Medicine / Hematology

**UDK number:** 616.15/341:612.41:577:159.944(043.3)

# SADRŽAJ

## 1. UVOD

1.1. ERITROCITOPOEZA.....	1
1.1.1. Proces formiranja zrelih eritrocita tokom razvića.....	1
1.1.2. Proces formiranja zrelih eritrocita u adultnom periodu.....	5
1.1.3. Regulacija eritrocitopoeze u bazalnim uslovima.....	8
1.1.4. Stres eritrocitopoeza i mehanizmi formiranja eritrocita u stanjima povećanih potreba organizma za eritrocitopoezom.....	11
1.1.5. Uloga signalnog molekula BMP4 u regulaciji stres eritrocitopoeze.....	15
1.2. STRES.....	17
1.2.1. Vrste stresora.....	17
1.2.2. Neuroendokrini odgovor organizma na stres.....	19
1.2.3. Glukokortikoidni hormoni kao medijatori stresa.....	21
1.3. INTERAKCIJE IZMEĐU GLUKOKORTIKOIDNIH HORMONA I FAKTORA INHIBICIJE MIGRACIJE MAKROFAGA.....	23
1.3.1. Uticaj glukokortikoidnih hormona na faktor inhibicije migracije makrofaga.....	24
1.3.2. Uticaj faktora inhibicije migracije makrofaga na glukokortikoidne hormone.....	25
1.4. ULOGA AZOT MONOKSIDA U ERITROCITOPOEZI I STRESU.....	28
1.4.1. Azot monoksid kao regulator eritrocitopoeze.....	28
1.4.2. Azot monoksid kao modulator aktivnosti HPA osovine u stresu.....	30
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>33</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>35</b>
3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE.....	35
3.2. EKSPERIMENTALNI DIZAJN.....	35
3.2.1. Ispitivanje efekata hroničnog stresa na proces eritrocitopoeze.....	35
3.2.2. Ispitivanje uloge GR u delovanju hroničnog stresa na opredeljene matične ćelije eritrocitne loze.....	36
3.2.3. Ispitivanje uloge MIF u procesu eritrocitopoeze u toku hroničnog stresa.....	36

3.2.4. Ispitivanje uloge NO u regulaciji eritrocitopoeze u uslovima hroničnog stresa.....	37
<b>3.3. METODE</b> .....	<b>37</b>
3.3.1. Hematološki parametri i ispitivanje statusa gvožđa.....	37
3.3.2. Određivanje nivoa hormona.....	38
3.3.2.1. Određivanje koncentracije kortikosterona u plazmi.....	38
3.3.2.2. Određivanje koncentracije eritropoetina u plazmi.....	39
3.3.3. Čelije i kulture ćelija.....	39
3.3.3.1. Izolovanje i priprema suspenzije ćelija kostne srži i slezine miša.....	39
3.3.3.2. Kulture ćelija na polučvrstoj podlozi od metilceluloze.....	39
3.3.4. Protočna citometrija.....	40
3.3.5. Histološka i imunohistohemijska analiza.....	41
3.3.5.1. Histološka analiza.....	41
3.3.5.2. Imunohistohemijska analiza.....	42
3.3.5.3. Morfometrijska analiza.....	43
3.3.6. Western blot analiza.....	44
3.3.6.1. Izolacija proteina.....	44
3.3.6.2. Elektroforeza i transfer.....	45
3.3.6.3. Imunoblot i detekcija proteina.....	45
3.3.7. Analiza ekspresije gena.....	46
3.3.7.1. Izolacija RNK i reakcija reverzne transkripcije.....	46
3.3.7.2. Reakcija lančanog umnožavanja sa detekcijom produkata u realnom vremenu.....	47
<b>3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA</b> .....	<b>48</b>
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>49</b>
<b>4.1. EFEKTI HRONIČNOG PSIHOLOŠKOG STRESA NA ERITROCITOPOEZU</b> .....	<b>49</b>
4.1.1. Uticaj hroničnog stresa na hematološke parametare i status gvožđa.....	49
4.1.2. Hronični stres stimuliše rast BFU-E i CFU-E ćelija u kostnoj srži i slezini miša.....	50
4.1.3. Dejstvo hroničnog stresa na različite subpopulacije Ter119-pozitivnih ćelija u kostnoj srži i slezini miša.....	52



4.2. MEDIJATORI DEJSTVA HRONIČNOG STRESA NA EKSTRAMEDULARNU ERITROCITOPOEZU .....	57
4.2.1. Hronični stres povećava nivo kortikosterona i eritropoetina u cirkulaciji, a smanjuje ekspresiju GR i EpoR u slezini miša.....	57
4.2.2. Povećana ekspresija c-Kit receptora u slezini miša tokom hroničnog stresa.....	60
4.2.3. Signalni molekul BMP4 učestvuje u aktivaciji ekstramedularne eritrocitopoeze indukovane hroničnim stresom.....	61
4.3. ULOGA GR U DEJSTVU HRONIČNOG STRESA NA RAST BFU-E I CFU-E ĆELIJA U SLEZINI.....	63
4.4. ULOGA MIF U DEJSTVU HRONIČNOG STRESA NA ERITROCITOPOEZU U KOSTNOJ SRŽI I SLEZINI.....	67
4.4.1. MIF ne učestvuje u regulaciji eritrocitopoeze indukovane hroničnim stresom u kostnoj srži.....	67
4.4.2. MIF je negativan regulator ekstramedularne eritropoeze indukovane hroničnim stresom.....	71
4.5. ULOGA NO U DEJSTVU HRONIČNOG STRESA NA RAST BFU-E I CFU-E ĆELIJA U KOSTNOJ SRŽI.....	76
4.5.1. Blokada sinteze NO sprečava efekat hroničnog stresa na rast BFU-E i CFU-E ćelija u kostnoj srži.....	76
4.5.2. Uticaj hroničnog stresa na ekspresiju eNOS i nNOS u kostnoj srži.....	77
4.5.3. Dejstvo hroničnog stresa na aktivaciju transkripcionog faktora NFκB u ćelijama kostne srži.....	79
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>80</b>
5.1. UTICAJ HRONIČNOG PSIHOLOŠKOG STRESA NA ERITROCITOPOEZU.....	80
5.2. REGULACIJA ERITROCITOPOEZE U USLOVIMA HRONIČNOG STRESA.....	86
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>98</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>100</b>

# 1. UVOD

## 1.1. ERITROCITOPOEZA

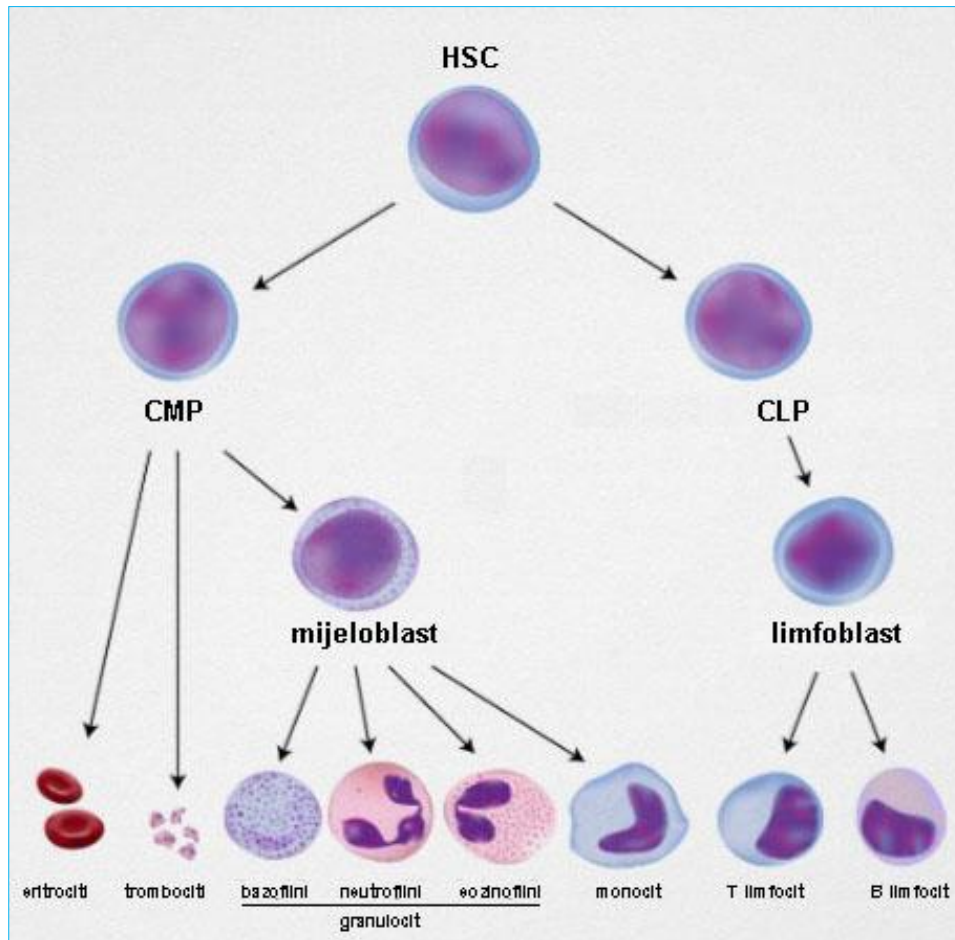
### 1.1.1. Proces formiranja zrelih eritrocita tokom razvića

Eritrociti su ćelije bez jedra, čija osnovna uloga obuhvata transport i razmenu gasova (kiseonika i ugljen-dioksida). U stanju mirovanja eritrociti imaju bikonkavan oblik kojim se obezbeđuje veća ukupna površina membrane u odnosu na zapreminu ćelije, što olakšava i ubrzava razmenu gasova eritrocita sa okolinom. Zahvaljujući svojoj fleksibilnosti, eritrociti koji se nalaze u cirkulaciji menjaju oblik, zauzimajući najpovoljniji položaj za prolazak kroz odgovarajući krvni sud. Oko jedne trećine zapremine eritrocita čini hemoglobin, protein koji reverzibilno vezuje i prenosi kiseonik i ugljen-dioksid. Zbog prisustva hemoglobina citoplazma eritrocita je acidofilna, a eritrociti na nativnom preparatu imaju narandžastu boju. Posmatranjem eritrocita transmisionim elektronskim mikroskopom uočava se uniformno elektronski gusta citoplazma. Elektronska gustina citoplazme potiče od gvožđa koje se nalazi u hemoglobinu.

Sazrevanje eritrocita predstavlja dinamičan i kontinuiran proces, u okviru kojega ćelije prolaze kroz niz sukcesivnih stadijuma. Prema opšteprihvaćenom mišljenju, sve ćelije krvi potiču od jedne zajedničke pluripotentne matične ćelije hematopoeze (HSC, engl. hematopoietic stem cell). Ova ćelija ima sposobnost asimetrične deobe, pri čemu jednim delom nastaju ćelije identičnih svojstava (samoobnavljanje), a drugim delom nastaju opredeljene ćelije koje će se diferencirati u matične ćelije pojedinih loza. Pluripotentne matične ćelije su malobrojne i relativno retko se dele u cilju samoodržavanja i stvaranja unipotentnih matičnih ćelija. Za razliku od njih, opredeljene matične ćelije za određenu lozu predstavljaju depoe ćelija u kostnoj srži i slezini, koje se po potrebi mogu brzo aktivirati u cilju samoobnove i/ili diferencijacije u zrele ćelije odgovarajuće loze. Celokupan proces nastanka uobličjenih elemenata krvi iz jedne zajedničke HSC se naziva hematopoeza (**Slika 1**).

Tokom razvića kičmenjaka, proces hematopoeze se odvija u nekoliko stadijuma na različitim anatomskim lokacijama (**Slika 2**). Prvobitno diferenciranje

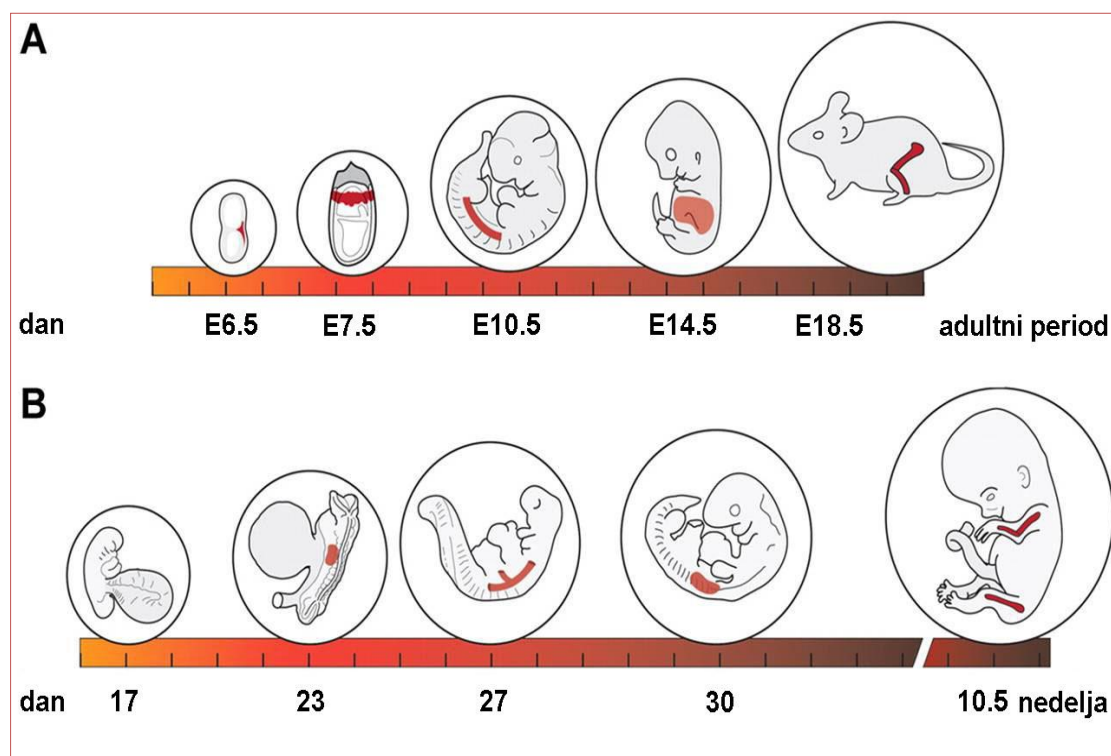
ćelija krvi nastaje u mezodermu žumančane kese. Naime, ćelije mezoderma se izdvajaju jedna od



**Slika 1.** Shematski prikaz procesa hematopoeze

druge i postaju slobodne, pri čemu se u ovim ćelijama zapažaju promene karakteristične za nastajanje primitivnih oblika pojedinih krvnih elemenata, a među njima se diferenciraju i primitivne ćelije eritroidne loze. U predelima gde nastaju ovi procesi diferenciranja dolazi do nagomilavanja tečnosti heterogenog sastava koja predstavlja buduću plazmu. Tokom razvića miša, prve primitivne ćelije eritroidne loze se mogu detektovati u žumančanoj kesi između 7. i 8. dana embriogeneze (E7,5). Ove primitivne ćelije, označene kao EryP ćelije, sačinjavaju posebnu populaciju ćelija koje se po mestu porekla i brojnim karakteristikama razlikuju od tzv. definitivnih eritroidnih ćelija (EryD). Tako, EryP ćelije nastaju

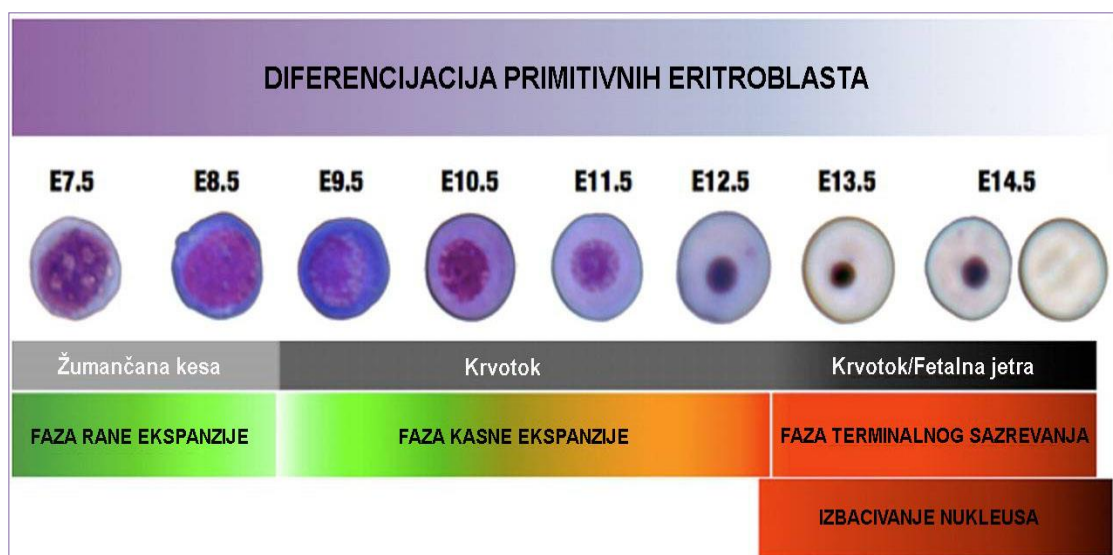
isključivo u žumančanoj kesi i veće su u poređenju sa EryD ćelijama, koje nastaju diferenciranjem progenitorskih ćelija u žumančanoj kesi i/ili fetalnoj jetri. Pored toga, populacije EryP i EryD ćelija se razlikuju po sastavu hemoglobina, kapacitetu za vezivanje kiseonika, kao i u specifičnoj regulaciji njihove diferencijacije (Baron i sar., 2012).



**Slika 2.** Uporedni prikaz procesa hematopoeze tokom razvića miša (A) i čoveka (B).  
Modifikovano prema: Baron i sar. *Blood* 2012; 119:4828-4837.

Sazrevanje EryP ćelija, ili primitivna eritrocitopoeza, predstavlja višefazni proces koji je vremenski precizno regulisan. Tako, primitivni eritroblasti nastali u žumančanoj kesi miša ulaze u krvotok oko 9. dana embriogeneze kao nepotpuno zrele ćelije koje sadrže jedro. Većina ovih ćelija dovršava proces sazrevanja i gubi jedro polovinom gestacijskog perioda, ali se određen broj primitivnih eritroblasta može detektovati u cirkulaciji fetusa i u kasnom gestacijskom dobu, kao i nekoliko dana nakon rođenja (Kingsley i sar., 2004). S obzirom da polovinom gestacijskog perioda fetalna jetra preuzima ulogu vodećeg hematopoeznog organa koji obezbeđuje optimalnu mikrosredinu za diferencijaciju i sazrevanje primitivnih eritroblasta, smatra se da u ovom periodu EryP ćelije iz krvotoka prelaze u jetru

gde gube nukleus i dovršavaju proces sazrevanja. U skladu sa tim, tokom druge polovine prenatalnog razvića u cirkulaciji fetusa se pored EryP ćelija istovremeno nalazi i sve veći broj zrelih ćelija bez jedra – EryD ćelija. Uporedo sa odgovarajućom promenom morfoloških karakteristika ćelije (**Slika 3**), tokom sazrevanja primitivnih eritroblasta dolazi i do kontrolisane redistribucije ćelijskih adhezionih molekula na njihovoj membrani, što omogućuje lakši izlazak iz krvnih sudova i obezbeđuje neposredan kontakt EryP ćelija sa makrofagima prilikom njihovog prolaska kroz fetalnu jetru (Isern i sar., 2008). U perinatalnom periodu kostna srž i slezina postaju primarna mesta za nastanak zrelih EryD ćelija, da bi kostna srž i nakon rođenja zadržala ulogu osnovnog hematopoeznog organa, obezbeđujući adekvatno snabdevanje organizma eritrocitima u bazalnim uslovima.



**Slika 3.** Stadijumi diferencijacije primitivnih eritroblasta.  
 Modifikovano prema: Baron i sar. *Blood* 2012; 119:4828-4837.

Regulacija procesa sazrevanja eritrocita tokom ontogeneze se ostvaruje zahvaljujući vremenski i prostorno preciznoj koordinisanoj ekspresiji odgovarajućih gena i posledičnoj aktivaciji određenih signalnih puteva. Tako, tokom perioda gastrulacije, ekspresija gena *Indian Hedgehog* signalnog puta u visceralnom endodermu mišjeg embriona indukuje ekspresiju signalnog molekula *Bone morphogenetic protein 4* (BMP4) u okolnom mezodermu, čime se stvaraju uslovi za nastanak primitivnih eritroblasta. Nakon toga, veliki broj transkripcionih

faktora učestvuje u specifikaciji i diferencijaciji ćelija eritroidne loze, a među njima najznačajniju ulogu imaju GATA1 i GATA2, kao i *Krüppel-like factor 1* (KLF1) (Baron i sar., 2012; Dzierzak i Philipsen, 2013). Ekspresija transkripcionog faktora GATA2 se detektuje u ranim stadijumima embriogeneze, a istraživanja na miševima pokazuju da je ovaj transkripcioni faktor neophodan za proliferaciju HSC i uspostavljanje procesa hematopoeze u celini (Ling i sar., 2004). Za razliku od GATA2, transkripcioni faktor GATA1, čija se ekspresija uočava nešto kasnije u odnosu na pojavu ekspresije GATA2, usmerava diferencijaciju pluripotentnih HSC ka eritroidnoj i megakariocitnoj lozi (Bresnick i sar., 2010). Nakon formiranja zajedničkih progenitorskih ćelija za eritroidnu i mekakarocitnu lozu, transkripcioni faktor KLF1 vrši supresiju megakariocitopoeze i usmerava dalju diferencijaciju ćelija ka eritroidnoj lozi (Baron i sar., 2012).

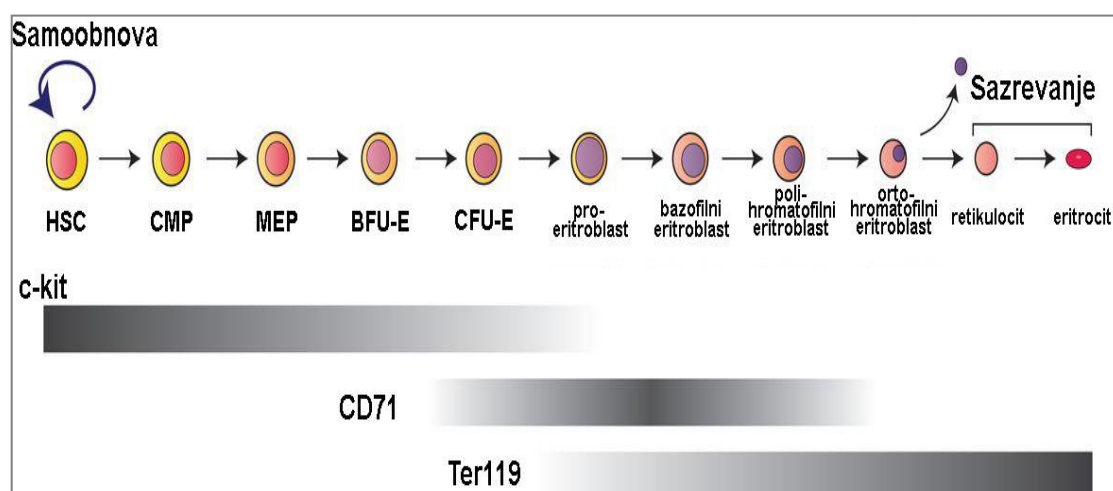
### **1.1.2. Proces formiranja zrelih eritrocita u adultnom periodu**

Ograničen životni vek zrelih eritrocita uslovljava potrebu za njihovim neprekidnim obnavljanjem koje se odvija procesom eritrocitopoeze. Za razliku od fetalnog perioda, tokom koga najveći broj zrelih eritrocita nastaje u jetri, u adultnom organizmu se proces diferencijacije i sazrevanja eritrocita odvija prevashodno u kostnoj srži. Kostna srž je lokalizovana u sunderastom koštanom tkivu dugih kostiju, u kičmenim pršljenovima i u grudnoj kosti, a sačinjena je od hematopoetskih ćelija i vezivne strome.

Kontinuiran proces eritrocitopoeze obezbeđuje optimalan broj eritrocita u bazalnim uslovima i adekvatno snabdevanje organizma kiseonikom. Tokom ovog procesa, koordinisanim delovanjem različitih regulatornih molekula iz HSC nastaju prvo progenitorske (opredeljene matične ćelije), a zatim prekursorske ćelije crvene krvne loze, da bi se na kraju formirali zreli eritrociti. Sazrevanje ćelija eritroidne loze je praćeno karakterističnim morfološkim promenama koje se ogledaju u postupnom smanjenju veličine ćelije i nukleusa (**Slika 4**). Nukleusi vremenom postaju piknotični i na kraju bivaju odstranjeni, a citoplazma, u kojoj ima sve manje organela, biva ispunjena sve većom količinom hemoglobina.

Prve morfološki prepoznatljive opredeljene matične ćelije za eritroidnu lozu su tzv. BFU-E ćelije (engl. burst forming unit-erythroid). Ove ćelije se

karakterišu visokim kapacitetom proliferacije i izraženom mitotskom aktivnošću, što istovremeno omogućava njihovu samoobnovu i diferencijaciju ka zrelijim progenitorima – CFU-E ćelijama (engl. colony forming unit-erythroid) koje su manjih dimenzija u poređenju sa BFU-E ćelijama, i u odnosu na citoplazmu imaju krupan nukleus. Premda BFU-E i CFU-E ćelije odraslog organizma pokazuju sličnosti sa ovim progenitorskim ćelijama u fetalnom periodu, postoje izvesne morfološke i funkcionalne razlike između fetalnih i adultnih opredeljenih matičnih ćelija za eritroidnu lozu. Tako, fetalne BFU-E ćelije su krupnije i imaju veći proliferativni kapacitet u odnosu na odgovarajuće ćelije odraslog organizma, dok CFU-E ćelije u fetalnom periodu pokazuju veću senzitivnost na dejstvo eritropoetina. Takođe, za razliku od adultnih BFU-E ćelija, za čiji je rast neophodno prisustvo nekoliko specifičnih faktora rasta, uključujući i eritropoetin, fetalne BFU-E se mogu detektovati u medijumu koji sadrži samo eritropoetin. Deobom CFU-E ćelija nastaju proeritroblasti, prve ćelije crvene krvne loze koje se sa sigurnošću mogu detektovati na preparatima posmatranim pod svetlosnim mikroskopom.



**Slika 4.** Diferencijacija ćelija eritroidne loze kod odraslog miša.  
 Modifikovano prema: Dzierzak i Philipsen. *Cold Spring Harb Perspect Med*  
 2013;3:a011601.

Proeritroblasti su ćelije sa krupnim nukleusom i bazofilnom citoplazmom koja se odlikuje prisustvom velike količine ribozoma i poliribozoma. Ove ćelije prolaze kroz dva deobna ciklusa formirajući bazofilni eritroblast. Bazofilni eritroblast je nešto manjih dimenzija u odnosu na svog prethodnika. Citoplazma je

bazofilnija, premda se u njoj zapaža sve manji broj organela. Deobom bazofilnog eritroblasta nastaje polihromatofilni eritroblast koji je manji od bazofilnog eritroblasta, sa prečnikom od 10-12  $\mu\text{m}$ . Nukleusi polihromatofilnih eritroblasta su ekscentrično postavljeni i odlikuju se većom količinom heterohromatskih regiona. Na preparatima posmatranim pod svetlosnim mikroskopom citoplazma ovih ćelija je obojena delimično bazofilno, a delimično acidofilno, što predstavlja rezultat postupnog nakupljanja novosintetisanog hemoglobina. Daljom deobom ovih ćelija nastaju ortohromatofilni eritroblasti. Ortohromatofilni eritroblast, koji se često naziva i eozinofilnim eritroblastom, nema sposobnost deobe, ali se u njemu odigravaju procesi diferenciranja koji posledično vode ka formiranju zrelog eritrocita. Citoplazma ortohromatofilnih eritroblasta je u potpunosti acidofilna zbog značajnog prisustva hemoglobina. Nukleus ovih ćelija je heterohromatičan, postupno biva potiskivan ka periferiji ćelije i na kraju izbačen (**Slika 4**). Po izbacivanju nukleusa, novonastala ćelija – retikulocit ima dijametar 7-9  $\mu\text{m}$ , a njegovim daljim sazrevanjem dolazi do formiranja zrelog eritrocita (Junqueira i Carneiro, 2005).

Uporedo sa navedenim promenama morfoloških karakteristika ćelija, proces sazrevanja eritrocita je praćen postepenim smanjenjem ekspresije receptora za *stem cell factor* - c-Kit (CD117), kontinuiranim povećanjem i posledičnim smanjenjem ekspresije transferinskog receptora (CD71), uz istovremeno postepeno povećanje ekspresije eritroidnog antigena Ter119 na membrani ćelija (**Slika 4**). Tako, ekspresija receptora c-Kit je karakteristična za pluripotentne matične ćelije hematopoeze, kao i za nezrele forme ćelija eritroidne loze, sve do stadijuma bazofilnog eritroblasta. Trostruko povećanje ekspresije CD71 se detektuje na membrani eritroidnih ćelija od proeritroblasta do stadijuma bazofilnog eritroblasta. Nakon toga, ekspresija ovog receptora se postepeno smanjuje, tako da u stadijumu ortohromatofilnog eritroblasta dostiže nivo sličan onome koji karakteriše proeritroblaste. Za razliku od navedenih markera, sazrevanje eritroidnih ćelija se karakteriše kontinuiranim povećanjem ekspresije membranskog antigena Ter119, počev od proeritroblasta pa sve do zrelog eritrocita (Chen i sar., 2009).



### 1.1.3. Regulacija eritrocitopoeze u bazalnim uslovima

Stalno obnavljanje eritrocita je strogo kontrolisan proces koji omogućava dinamičku ravnotežu između broja novoformiranih ćelija i starih eritrocita koji se uklanjaju procesom fagocitoze. Na ovaj način se u bazalnim uslovima svakodnevno obnavlja oko 1% eritrocita, obezbeđujući kontinuiranu produkciju ovih ćelija u skladu sa fiziološkim potrebama organizma. Kompleksna regulacija eritrocitopoeze se ostvaruje posredstvom hemijskih medijatora – hormona, citokina i faktora rasta.

Najznačajniju ulogu u regulaciji eritrocitopoeze ima eritropoetin, hormon koji se sintetiše u endotelnim ćelijama kapilarne mreže intersticijuma bubrega. Eritropoetin je po hemijskom sastavu glikoprotein koji se sastoji od 165 aminokiselina i 4 oligosaharidna lanca neophodna za njegovu aktivnost *in vivo*. Ovaj hormon povećava broj eritropoetin-senzitivnih matičnih ćelija u kostnoj srži, usmeravajući njihovu diferencijaciju u prekursorske ćelije crvene krvne loze. Receptor za eritropoetin (EpoR) je protein sa jednim transmembranskim domenom i pripada familiji receptora sa tirozin kinaznom aktivnošću. Vezivanjem za EpoR koji se nalazi na membrani opredeljenih matičnih ćelija za eritrocitnu lozu, eritropoetin pokreće kaskadu intracelularnih signalnih puteva, stimulišući na taj način proliferaciju i preživljavanje ovih ćelija. Naime, u odsustvu eritropoetina CFU-E ćelije podležu procesu programirane ćelijske smrti. Vezivanje eritropoetina za receptor na membrani CFU-E ćelija stimuliše transkripciju određenih gena, kao što je *Bcl-xL*, koji kodirajući istoimeni protein sprečava apoptozu i na taj način omogućava preživljavanje i dalju diferencijaciju ovih ćelija (Gregory i sar., 1999). Pored toga, eritropoetin reguliše i sazrevanje prekursorskih ćelija, indukujući ekspresiju gena za globine i glikoforin - proteine koji ulaze u sastav eritrocita.

Nasuprot CFU-E ćelijama, čiji je rast uslovljen prevashodno dejstvom eritropoetina, za rast BFU-E ćelija je, pored eritropoetina, neophodno prisustvo i drugih regulatornih faktora kao što su: faktor rasta matičnih ćelija (engl. stem cell factor, SCF), interleukin 3, glukokortikoidni hormoni i dr. Pokazano je da SCF ispoljava direktno dejstvo na BFU-E progenitore, stimulišući njihov rast i preživljavanje (Dai i sar., 1991). Ispitivanja na *knockout* miševima kojima nedostaje gen za SCF i/ili njegov receptor (c-Kit) potvrđuju ključnu ulogu ovog

citokina u eritrocitopoezi. Delecija navedenih gena uzrokuje težak oblik anemije i dovodi do smrtnog ishoda u fetalnom ili perinatalnom periodu razvića ovih genetski modifikovanih miševa (Broudy, 1997). Takođe, rezultati istraživanja *in vitro* ukazuju na direktnu interakciju između c-Kit, EpoR i glukokortikoidnog receptora (GR) u procesu proliferacije BFU-E ćelija, odnosno na kooperativno dejstvo SCF, eritropoetina i glukokortikoida u regulaciji eritrocitopoeze (von Lindern i sar., 1999).

Regulacija eritrocitopoeze umnogome zavisi od ćelija mikrosredine u okviru koje se ovaj proces odvija. U skladu sa tim, brojna eritroblastna ostrva, prisutna u kostnoj srži i slezini, predstavljaju specijalizovane niše, odnosno posebne morfološke i funkcionalne jedinice koje pospešuju proliferaciju, diferencijaciju i sazrevanje eritroblasta. Svako ostrvo se sastoji od centralno pozicioniranog makrofaga koji je okružen eritroblastima u različitim stadijumima zrelosti. Ostrva se detektuju duž čitave kostne srži, a elektronskomikroskopskom analizom su uočene razlike u stepenu zrelosti eritroblasta između ostrva lokalizovanih u neposrednoj blizini venskih sinusoida i ostrva koja se nalaze na većoj udaljenosti od njih. Tako, eritroblastna ostrva koja su udaljena od sinusoida u svom sastavu imaju značajno veći broj proeritroblasta, a ona koja se nalaze u neposrednom kontaktu sa sinusoidima sadrže veći procenat zrelijih prekursora. Ovaj podatak ukazuje na činjenicu da blizina venskog sinusoida može biti od presudnog značaja za sazrevanje prekursorskih ćelija eritroidne loze, kao i na mogućnost da eritroblastna ostrva predstavljaju pokretne strukture koje se uporedo sa procesom diferencijacije eritroblasta kreću prema venskim sinusoidima. Kretanje ovih ostrva se može ostvariti zahvaljujući migraciji centralno pozicioniranog makrofaga (Yokoyama i sar., 2003; Chasis i Mohandas, 2008).

Makrofag eritroblastnog ostrva potiče od prekursorske ćelije monocitno-makrofagne loze i deo je posebne subpopulacije makrofaga lokalizovane u hematopoeznim tkivima. Njegova uloga se ogleda prevashodno u stimulaciji sazrevanja eritroblasta, što se ostvaruje kroz neposredni kontakt membrane makrofaga sa membranom nezrelih ćelija eritroidne loze (Chow i sar., 2013). Naime, poznato je da eritroblasti prilikom sazrevanja eksprimiraju različite adhezione molekule na svojoj površini, ostvarujući direktne homotipske i

heterotipske ćelijske intrakcije. Rezultati brojnih studija pokazuju da međućelijske interakcije u okviru eritroblastnog ostrva imaju značajnu ulogu u regulaciji terminalne diferencijacije ćelija crvene krvne loze (Hanspal i Hanspal, 1994; Soni i sar., 2008; Wang i sar., 2013). Dokazano je da neposredni kontakt eritroblasta sa makrofagom stimuliše proliferaciju ovih prekursorskih ćelija, što posledično dovodi do povećane produkcije zrelih eritrocita. Ispitivanjem regulatornog mehanizma koji se nalazi u osnovi stimulisane proliferacije eritroblasta nakon njihove interakcije sa makrofagima, ustanovljeno je da neposredni kontakt sa makrofagom utiče direktno na ćeliski ciklus eritroblasta, ubrzavajući prelazak iz G0 u G1 fazu, kao i da je ovaj mehanizam nezavisan od lokalne koncentracije eritropoetina (Rhodes i sar., 2008). Pored toga, proliferacija eritroblasta je regulisana i interakcijama koje se ostvaruju između samih eritroblasta. Ove homotipske interakcije u okviru eritroblastnog ostrva pokreću signalni mehanizam koji učestvuje u regulaciji aktivnosti transkripcionog faktora GATA-1 (Gutiérrez i sar., 2004).

Ćelije eritroblastne niše sintetišu i brojne solubilne faktore koji mehanizmima pozitivne i negativne povratne sprege regulišu proces eritrocitopoeze. Tako, eritroblasti u prisustvu eritropoetina sekretuju protein Gas6 (engl. growth arrest-specific). Ovaj protein se vezuje za svoj receptor na eritroblastima i aktivacijom fosfatidil inozitol-3 kinaze pojačava prenos signala preko EpoR. Takođe, vezujući se za odgovarajući receptor na makrofagima, Gas6 smanjuje sekreciju nekih regulatornih faktora sa inhibitornim dejstvom na eritrocitopoezu (Angelillo-Scherrer i sar., 2008). Eritroblasti sintetišu i vaskularni endotelni faktor rasta koji indukuje migraciju monocita i na taj način parakrinim mehanizmom utiče na formiranje eritroblastne niše. Pored toga, ovaj signalni protein povećava mikrovaskularnu permeabilnost, olakšavajući prolaz retikulocita kroz venske sinusoide. U okviru eritroblastnog ostrva se aktiviraju i različiti mehanizmi negativne povratne sprege. U skladu sa tim, makrofagi sekretuju brojne proinflamatorne citokine, kao što su: interleukin 6, faktor nekroze tumora  $\alpha$ , interferon  $\gamma$  i dr., koji različitim molekularnim mehanizmima suprimiraju eritrocitopoezu (Chasis i Mohandas, 2008).

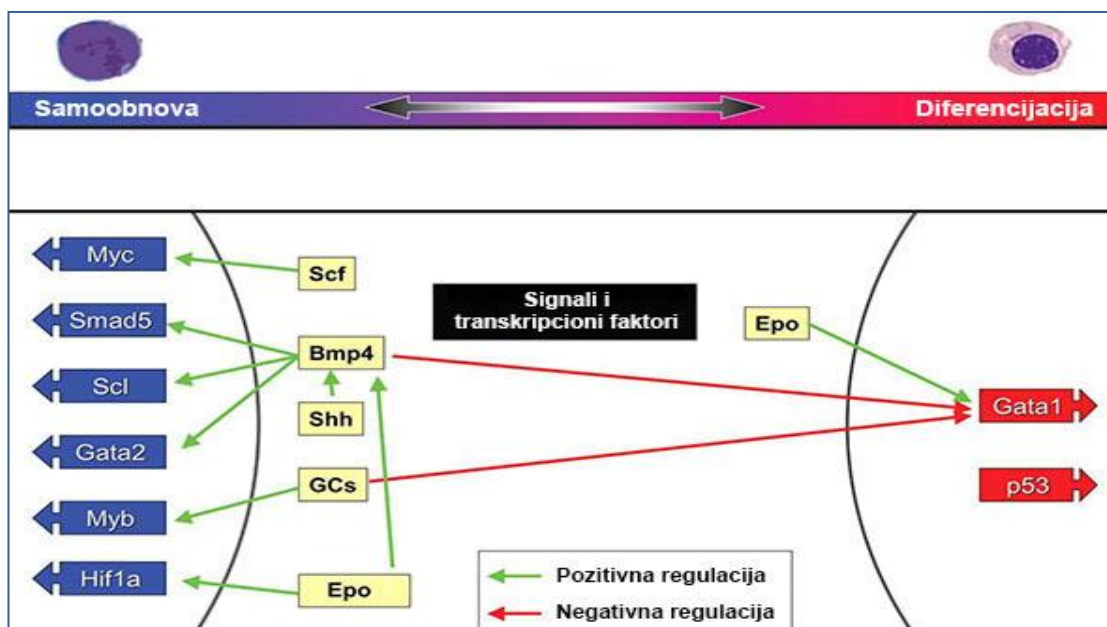
#### **1.1.4. Stres eritrocitopoeza i mehanizmi formiranja eritrocita u stanjima povećanih potreba organizma za eritrocitopoezom**

Dinamika eritrocitopoeze je u potpunosti prilagođena potrebama organizma. Tako, na primer, hipoksija tkiva stimuliše stvaranje eritropoetina koji obezbeđuje proliferaciju i preživljavanje većeg broja opredeljenih matičnih ćelija eritrocitopoeze, čime se uspostavlja bolje snabdevanje tkiva kiseonikom. Stanje anemije indukuje fiziološki odgovor koji se ogleda u ubrzanom stvaranju novih eritrocita, a koji takođe podrazumeva povećanu proliferaciju i diferencijaciju nezrelih ćelija eritroidne loze. Pored toga, stanja hronične inflamacije, uzrokovana infektivnim agensima ili tumorskim promenama, za posledicu imaju dugotrajnu anemiju koja povećava zahteve organizma za eritrocitopoezom. Produkcija eritrocita u prethodno navedenim stanjima, kao i u drugim fiziološkim i patološkim stanjima koja uključuju povećanu potrebu organizma za stvaranjem eritrocita, vrši se procesom tzv. stres eritrocitopoeze (SE) (Bozzini i sar., 1994).

Najnovija istraživanja ukazuju na SE kao na jedinstven proces koji se umnogome razlikuje od procesa eritrocitopoeze u bazalnim uslovima (Paulson i sar., 2011). Dosadašnja saznanja o SE potiču uglavnom iz rezultata dobijenih u eksperimentima na miševima, i to prevashodno na mišjim modelima akutne i hronične anemije. Rezultati ovih ispitivanja pokazuju da je SE proces koji se odvija predominantno u slezini i da po mnogim karakteristikama nalikuje procesu eritrocitopoeze u fetalnom periodu. Naime, pokazano je da se u toku ovog procesa u slezini regrutuje specijalizovana populacija eritroidnih progenitora, nazvanih „stres” BFU-E ćelije. Ove ćelije se poput fetalnih BFU-E progenitora mogu detektovati u medijumu koji sadrži samo eritropoetin (Perry i sar., 2007). Takođe, eritroidni prekursori nastali procesom SE u nekim patološkim stanjima, kao što je anemija srpastih ćelija, sadrže značajne količine fetalnog hemoglobina (Luck i sar., 2004; Frenette i sar., 2007). Nalaz povećane produkcije fetalnog hemoglobina tokom SE potvrđuju i rezultati istraživanja ovog procesa na primatima (DeSimone i sar., 1982). Pored navedenih sličnosti sa eritrocitopoezom u fetalnom periodu, SE se, za razliku od adultne eritrocitopoeze u bazalnim uslovima, ne odvija u kostnoj srži već ekstramedularno. Naime, eritrocitopoeza u kostnoj srži je homeostatski proces koji omogućava optimalnu produkciju eritrocita u bazalnim uslovima.

Međutim, kostna srž ne može da obezbedi adekvatno snabdevanje organizma eritrocitima u različitim fiziološkim i patološkim stanjima koja zahtevaju ubranu eritrocitopoezu. U takvim uslovima dolazi do aktivacije procesa SE u slezini. Slezina predstavlja specifičnu mikrosredinu koja može podržati ubranu produkciju eritrocita i na taj način adekvatno odgovoriti na povećane zahteve organizma za eritrocitopoezom (O'Neill, 2012).

S obzirom da je stvaranje eritrocita regulisano signalima iz mikrosredine u kojoj se ovaj proces odvija, mehanizmi regulacije SE u slezini se značajno razlikuju od mehanizama koji regulišu bazalnu eritrocitopoezu u kostnoj srži (Socolovsky, 2007; Paulson i sar., 2011). Tako, u kostnoj srži mehanizmima ograničene samoobnove nastaje manji broj progenitorskih ćelija koji je optimalan za obnavljanje eritrocita u bazalnim uslovima. Međutim, da bi odgovor organizma na povećane zahteve za eritrocitopoezom bio adekvatan, neophodan preduslov je da se procesom SE uveća pul ranih progenitora koji će daljom diferencijacijom obezbediti veći broj zrelih eritrocita. Stoga se u SE aktivacijom različitih mehanizama vrši kontinuirana samoobnova BFU-E progenitora (**Slika 5**), čime se značajno povećava njihov broj u slezini.



**Slika 5.** Mehanizmi samoobnove BFU-E ćelija.  
Modifikovano prema: Hattangadi i sar. *Blood* 2011; 118:6258-6268.

Najznačajniju ulogu u procesu samoobnove eritroidnih progenitora imaju glukokortikoidni hormoni. Vezujući se za GR, ovi hormoni pokreću kaskadu intracelularnih signalnih puteva delujući na različite fiziološke procese u organizmu. Rezultati eksperimentalnih studija ukazuju na ključnu ulogu glukokortikoida u stimulaciji eritrocitopoeze (Bauer i sar., 1999), što je utemeljeno i u činjenici da policitemija može predstavljati prvu kliničku manifestaciju kod pacijenata sa *Cushing*-ovim sindromom (Gursoy i sar., 2006). U skladu sa tim, terapija glukokortikoidima ima protektivno dejstvo kod pacijenata obolelih od određenih oblika anemije (Liang i sar., 1994). Istraživanja *in vitro* pokazuju da glukokortikoidni hormoni podstiču formiranje BFU-E i CFU-E kolonija, odnosno da u prisustvu malih količina eritropoetina stimulišu proliferaciju eritroidnih progenitorskih ćelija (Golde i sar., 1976; Udupa i sar., 1986). Ispitivanjem molekularnih mehanizama, utvrđeno je da glukokortikoidi u nezrelim ćelijama eritroidne loze indukuju ekspresiju transkripcionih faktora Myb i Lmo2, a smanjuju ekspresiju GATA1 što omogućava ekspanziju ovih ćelija tokom SE (**Slika 5**).

Posebna pažnja usmerena je na ispitivanje uloge GR u SE, s obzirom na činjenicu da genetski modifikovani miševi sa funkcionalnom inaktivacijom GR imaju normalan broj eritrocita u bazalnim uslovima, ali ne mogu efikasno povećati broj ovih ćelija u stanju anemije (Bauer i sar., 1999). Wesseley i sar. (1997) su pokazali da upravo ovaj receptor ima ulogu ključnog regulatora u odnosu između proliferacije i diferencijacije nezrelih ćelija eritroidne loze. Naime, koristeći *in vitro* pristup, ovi autori su dokazali da samoobnova eritroidnih progenitora nije moguća u medijumu koji ne sadrži glukokortikoide, kao ni u medijumu koji pored deksametazona sadrži i blokator GR. Činjenica da se proces SE brže odvija u slezini *p53*<sup>-/-</sup> miševa ukazuje na inhibitornu ulogu tumor supresornog proteina p53 u sazrevanju progenitorskih ćelija eritroidne loze, kao i na značaj njegovog antagonizma sa GR u održavanju balansa između proliferacije i diferencijacije ovih progenitorskih ćelija (Ganguli i sar., 2002). Takođe, utvrđeno je da su efekti glukokortikoida na proliferaciju nezrelih ćelija crvene krvne loze posredovani direktnom interakcijom GR sa receptorima koji poseduju tirozin kinaznu aktivnost (von Lindern i sar., 1999). U skladu sa tim, na membrani humanih eritroblasta

pokazana je direktna interakcija između GR i EpoR, koja u procesu SE dovodi do kontinuirane deobe ovih ćelija i odlaže njihovo terminalno sazrevanje (Stellacci i sar., 2009). Međutim, i pored navedenih istraživanja čiji rezultati jasno ukazuju na ključnu ulogu GR u SE, ciljane ćelije i fiziološki efekti glukokortikoida u ovom procesu još uvek nisu razjašnjeni (Lodish i sar., 2010).

Za razliku od nepotpuno rasvetljene uloge glukokortikoida, povećana produkcija eritropoetina u SE pokreće niz dobro definisanih regulatornih mehanizama koji obezbeđuju efikasnost eritrocitopoeze tokom ovog procesa. Aktivirajući EpoR, eritropoetin svoje dejstvo u SE ispoljava na širem spektru nezrelih ćelija eritroidne loze, u poređenju sa ćelijama na koje ovaj hormon deluje u uslovima homeostaze (Socolovsky, 2007). Tako, na primer, delecija gena za eritropoetin ili njegov receptor dovodi do intrauterine smrti miševa zbog potpunog odsustva zrelih ćelija crvene krvne loze, ali je kod genetski modifikovanih embriona uočen normalan broj BFU-E i CFU-E ćelija. Neizmenjen broj ovih ćelija kod eritropoetin<sup>-/-</sup> i EpoR<sup>-/-</sup> embriona ukazuje na činjenicu da eritropoetin nije neophodan za nastanak i proliferaciju eritroidnih progenitora u bazalnim uslovima (Wu i sar., 1995). Nasuprot tome, rezultati brojnih studija pokazuju značajnu ulogu ovog hormona i njegovog receptora u ekspanziji BFU-E i CFU-E ćelija tokom SE. Naime, EpoR se može detektovati na membrani ćelija u veoma ranim fazama hematopoeze, uključujući HSC ćelije i eritroidne progenitore (Stopka i sar., 1998). U uslovima SE, uporedo sa povećanom produkcijom eritropoetina, zapaža se i drastično povećanje broja ovih ćelija u slezini. Uvećanje pula eritroidnih progenitora se ostvaruje aktivacijom EpoR i njegovog intracelularnog signalnog puta koji uključuje i fosforilaciju transkripcionog faktora STAT5. U skladu sa tim, procenjuje se da je svega oko 6% EpoR aktivirano tokom bazalne eritrocitopoeze (Syed i sar., 1998), dok se u uslovima povećane produkcije eritropoetina broj aktiviranih EpoR uvećava i do hiljadu puta. Pored mehanizma ekspanzije progenitorskih ćelija, za ubrzanu produkciju eritrocita u SE odgovoran je i mehanizam povećanog preživljavanja eritroblasta. Tako, za razliku od bazalne eritrocitopoeze, gde se određeni procenat ranih prekursora kontinuirano uklanja procesom apoptoze, visoka koncentracija eritropoetina tokom SE suprimira ekspresiju receptora Fas na membrani ranih eritroblasta, i na taj način omogućava

preživljavanje i dalju ekspanziju ovih ćelija. Istovremeno sa aktivacijom navedenih pozitivnih regulatornih mehanizama, eritropoetin pokreće i mehanizme negativne povratne sprege kojima se sprečava prekomerna aktivnost EpoR u SE, a samim tim i potencijalna maligna transformacija nezrelih ćelija eritrocitne loze. Jedan od ovih mehanizama podrazumeva nishodnu regulaciju i posledičnu degradaciju aktiviranih EpoR (Walrafen i sar., 2005; Socolovsky, 2007).

Pored aktivacije GR i EpoR, za optimalnu produkciju eritrocita tokom SE neophodna je i kooperativna interakcija ovih receptora sa CD117 (c-Kit) (Kolbus i sar., 2003). Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da je aktivacija SCF/c-Kit signalnog puta od presudnog značaja za preživljavanje i samoobnovu ćelija u ranim fazama procesa SE. Vezivanje SCF za c-Kit aktivira intracelularni prenos signala i na taj način reguliše ekspresiju proteina Bcl-2 koji obezbeđuje preživljavanje progenitorskih ćelija hematopoeze. U skladu sa tim, c-Kit receptor je prisutan i na membrani specijalizovane populacije BFU-E progenitora u slezini i njegovom aktivacijom se omogućava adekvatna ekspanzija ovih ćelija u odgovoru na stres (Paulson i sar., 2011). Naime, pokazano je da se aktivacijom c-Kit receptora održava ekspresija transkripcionog faktora STAT5, indukovana eritropoetinom, što dovodi do dužeg preživljavanja i kontinuirane proliferacije eritroidnih progenitora u SE (Kapur i Zhang, 2001).

#### **1.1.5. Uloga signalnog molekula BMP4 u regulaciji stres eritrocitopoeze**

Proces SE se odvija ekstramedularno, a aktivacija i regulacija ovog procesa u slezini zavise od specifičnih signala nastalih u njenoj mikrosredini. Poznato je da u uslovima povećane potrebe organizma za eritrocitopoezom, pod uticajem signalnog molekula BMP4 i sinergičkog dejstva eritropoetina, glukokortikoida i SCF dolazi do nagle ekspanzije „stres” BFU-E progenitora u slezini i posledične diferencijacije ovih ćelija ka CFU-E i eritroblastima (Socolovsky, 2007; Paulson i sar., 2011).

Ključna uloga BMP4 u aktivaciji procesa SE je prvi put pokazana ispitivanjem mutacije kod tzv. *flexed-tail* (f/f) miševa. Primećeno je da ovi miševi tokom fetalnog i neonatalnog perioda razvića imaju tranzitornu anemiju koja se spontano povlači dve nedelje nakon rođenja (Cole i Regan, 1976). Takođe, u



bazalnim uslovima f/f miševi imaju potpuno očuvanu eritrocitopoezu, ali je nakon eksperimentalno indukovane anemije uočen izvestan zastoj u oporavku ovih miševa. Dalja istraživanja su pokazala da zastoj u oporavku f/f miševa nastaje usled defekta u ekspanziji BFU-E ćelija u slezini, kao i da ovi progenitori predstavljaju specijalizovanu populaciju ćelija koje su po morfološkim i fenotipskim karakteristikama veoma slične fetalnim BFU-E ćelijama (Lenox i sar., 2005). Ispitivanja mutacije f/f miševa dovela su do saznanja da genski lokus koji je zahvaćen mutacijom kod genetski neizmenjenih miševa kodira sintezu proteina Smad5, transkripcionog faktora u nishodnom putu aktivacije signalnog molekula BMP4 (Hegde i sar., 2007).

Molekul BMP4 pripada tzv. TGF- $\beta$  (engl. transforming growth factor beta) familiji proteina koja ima značajnu ulogu u toku razvića (Hogan, 1996). Pored široke zastupljenosti ovih proteina u embrionalnim tkivima, BMP4 je prisutan i u nekim tkivima adultnog organizma, kao što je crvena pulpa slezine gde učestvuje u regulaciji tkivne homeostaze (Alarino i sar., 2013). Markantno povećanje ekspresije proteina BMP4 u slezini karakteriše različita fiziološka i patološka stanja koja aktiviraju proces SE. Tako je pokazano da se u uslovima hipoksije u slezini prvo aktivira signalni put *Hedgehog*, koji zatim dovodi do povećanja ekspresije ovog proteina u crvenoj pulpi (Paulson i sar., 2011). BMP4 svoje dejstvo ostvaruje vezivanjem za specifične receptore - BMPR (engl. bone morphogenetic protein receptor) tipa I i II. S obzirom da receptori tipa I imaju veći afinitet za BMP2 i BMP4, prvi vežu BMP4, a zatim privlače receptore tipa II i na taj način formiraju heteromerni receptorski kompleks. Nakon toga, BMPR tipa II kao konstitutivno aktivna kinaza vrši fosforilaciju receptora tipa I, čime se pokreće kaskada intracelularnih signala i omogućava aktivacija sekundarnog glasnika – molekula Smad5 (Sieber i sar., 2009).

Istraživanja *in vivo* su potvrdila da indukcija signala *Hedgehog* u slezini i posledično formiranje kompleksa BMP4/BMPR predstavljaju neophodne preduslove za aktivaciju procesa SE. Naime, na mišjem modelu anemije je pokazano da aktivacija ovih signala u slezini prethodi nagloj ekspanziji „stres” BFU-E ćelija. Takođe, dokazano je da BFU-E ćelije u kostnoj srži nisu osjetljive na dejstvo signalnog molekula BMP4, već da se u odgovoru na anemiju jedan deo ovih

progenitora mobilise iz kostne srži i prelazi u slezinu, gde pod uticajem *Hedgehog* signala stiču karakteristike „stres” BFU-E ćelija. Rezultati ovih istraživanja ukazuju na slezinu kao specifičnu mikrosredinu koja obezbeđuje signale neophodne za nastanak „stres” BFU-E progenitora i za regulaciju procesa SE u celini (Paulson i sar., 2011).

Značaj koordinacije svih navedenih faktora u regulaciji SE se ogleda u činjenici da bi neadekvatna aktivacija ovog procesa mogla rezultirati prekomernom ekspanzijom i malignom transformacijom nezrelih ćelija eritroidne loze (Socolovsky, 2007).

## **1.2. STRES**

Savremen način života uslovljava svakodnevnu izloženost različitim stresnim situacijama, a neadekvatan odgovor organizma na stres se nalazi u osnovi patogeneze mnogih obolenja (Mayer, 2000; Steptoe i Kivimäki, 2012; Goyal i sar., 2013). U skladu sa tim, brojna istraživanja su usmerena na ispitivanje mehanizama odgovornih za dejstvo stresa na različite procese na celularnom i molekularnom nivou, uključujući rast, diferencijaciju i malignu transformaciju ćelija (Feng i sar., 2012; Vojta i Zoldoš, 2013).

Naziv stres potiče od reči *stresse* iz srednjovekovnog engleskog jezika, koja je označavala napor, teskobu ili ograničenje. U medicini 19. veka stres je smatran osnovom slabog zdravlja, a tek početkom 20. veka pojam stresa je doveden u vezu sa poremećajem homeostaze organizma. Naime, tridesetih godina 20. veka, kanadski lekar Hans Selye je utvrdio da široka paleta različitih štetnih stimulusa dovodi do veoma sličnih fizioloških promena u organizmu i definisao model tzv. opšteg sindroma adaptacije, a stimulse koji uzrokuju ovaj sindrom nazvao je stresorima (Szabo i sar., 2012).

### **1.2.1. Vrste stresora**

Život opstaje zahvaljujući održavanju kompleksnog dinamičkog ekvilibrijuma - homeostaze koja je neprekidno izložena uticajima različitih unutrašnjih i spoljašnjih stresora. Stresor je u najširem smislu reči svaki stimulus

koji može narušiti homeostazu, a stanje organizma iz kojeg proizilazi fiziološki odgovor kao reakcija na novonastalu situaciju nazivamo stresom.

Izloženost stresoru dovodi do kompleksnih interakcija između različitih fizioloških sistema u organizmu, a koje su specifične u odnosu na tip i prirodu stresora (Joëls i Baram, 2009). Stresori mogu biti fizičke (npr. visoka i niska temperatura, radijacija, vibracija), psihološke (npr. frustracije, sukobi sa osobama u okruženju) ili socijalne prirode (npr. ekonomske krize, društvene transformacije, ratovi). Istorijski gledano, adaptacija na fizičke stresore je imala ključnu ulogu u opstanku svih vrsta, uključujući i ljudski rod. Sa razvojem civilizacije, situacija se menja, tako da psihološki i socijalni stresori postaju sve zastupljeniji i samim tim dobijaju sve veći značaj. Stresori se takođe mogu podeliti na systemske, odnosno limbički-nesenzitivne i procesivne ili tzv. limbički-senzitivne stresore. Limbički-nesenzitivni stresori predstavljaju direktnu opasnost za preživljavanje i ne zahtevaju obradu informacija u okviru limbičkog sistema. U ove stresore se ubrajaju hipoksija, hemoragija, inflamacija i dr. Nasuprot tome, limbički-senzitivni stresori zahtevaju kognitivnu obradu informacija i uključuju odgovor limbičkog sistema na novi ili preteći stimulus koji se dovodi u vezu sa prethodnim iskustvom (Đorđević, 2011). U odnosu na mesto delovanja, stresori mogu biti spoljašnji (npr. buka, aerozagadenje) i unutrašnji (npr. hipoglikemija, gubitak tečnosti i elektrolita). Zavisno od dužine trajanja, sve stresore možemo podeliti na akutne i hronične, a prema intenzitetu njihovog dejstva na stresore niskog, srednjeg i visokog intenziteta.

S obzirom da svaki stresor indukuje specifičan obrazac fiziološkog odgovora organizma (Joëls i Baram, 2009), uspostavljeni su brojni eksperimentalni modeli za izučavanje mehanizma koji se nalaze u osnovi adaptivnog odgovora na stres. Jedan od najčešće korišćenih eksperimentalnih modela za ispitivanje ovih mehanizama je model tzv. *restraint* stresa, odnosno stresa izazvanog delimičnom imobilizacijom životinje. Delimična imobilizacija životinje pripada grupi kombinovanih stresora srednjeg intenziteta, sa izrazito naglašenom psihološkom komponentom (Buynitsky i Mostofsky, 2009). Pokazano je da *restraint*, pored odgovora neuroendokrinog sistema, pokreće čitav niz različitih fizioloških interakcija u organizmu, i kao takav predstavlja reprezentativan model za

izučavanje mehanizama uključenih u odgovor na stres (Patchev i Patchev, 2006; Buynitsky i Mostofsky, 2009).

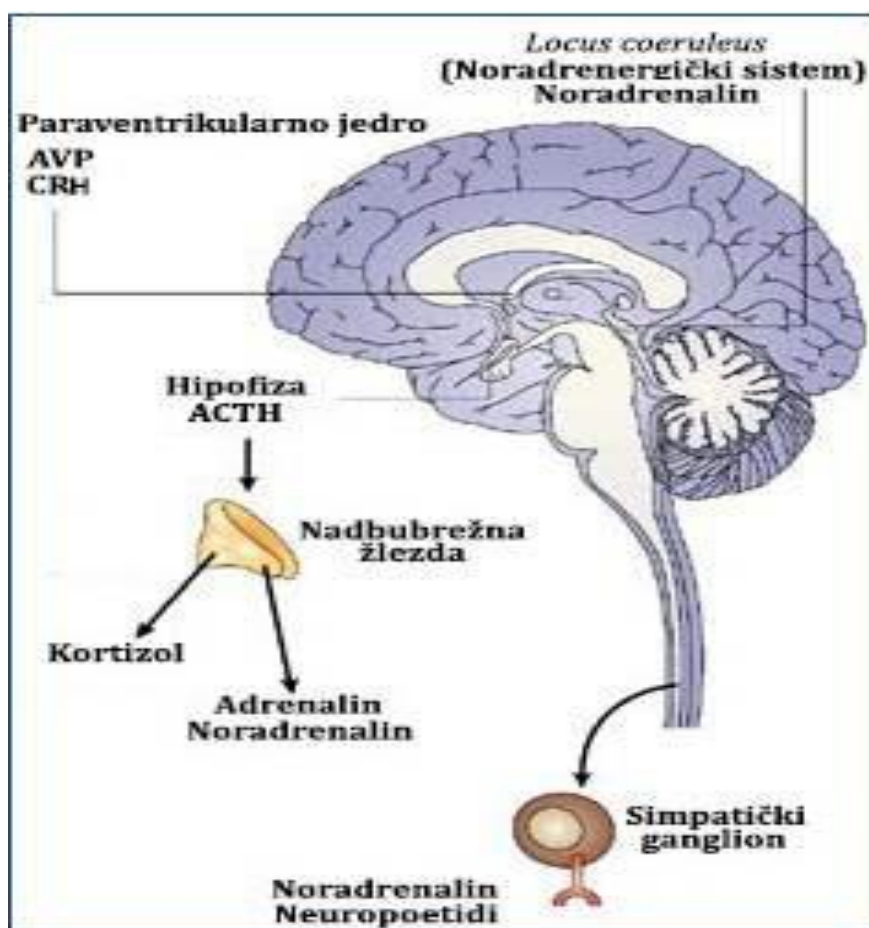
### 1.2.2. Neuroendokrini odgovor organizma na stres

Održavanje stabilnosti unutrašnje sredine organizma je dinamički proces koji se ostvaruje zahvaljujući aktivaciji homeostatskih i alostatskih mehanizama. Nasuprot homeostazi, u kojoj se stabilnost uspostavlja aktivacijom fizioloških procesa koji se suprotstavljaju promenama, alostaza podrazumeva postizanje stabilnosti putem stalnih promena (McEwen i Wingfield, 2003). Sastavni deo alostaze je i adaptacija na stres koja obuhvata sve fiziološke, psihološke i bihejvioralne promene nastale usled izlaganja organizma stresoru. Pri tome, adaptivna reakcija na stres ne podrazumeva samo spremnost organizma da odgovori na dejstvo stresora, nego i njegovu sposobnost da vrši koordinaciju i adekvatnu kontrolu stresnog odgovora (O'Connor i sar., 2000).

Odgovor organizma na stres je koordinisan prevashodno aktivacijom nervnog i endokrinog sistema. Centri koji regulišu stresni odgovor smešteni su u hipotalamusu i moždanom stablu, a obuhvataju neurone paraventrikularnog jedra i *locus coeruleus*-a. Ova dva regulatorna centra su međusobno povezana nervnim putevima što omogućava sinhronu aktivaciju njihovih efektornih sistema – osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda (engl. hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) i simpatičko-adrenomedularnog sistema (**Slika 6**).

U odgovoru na stres, neuroni paraventrikularnog jedra hipotalamusa luče hormon koji stimuliše oslobađanje adrenokortikotropnog hormona (engl. corticotropin releasing hormone, CRH) i arginin vazopresin (AVP). Hormon CRH je po strukturi peptid, sačinjen od 41 aminokiseline, i primarno se sintetiše u parvocelularnom delu paraventrikularnog jedra hipotalamusa. Nakon sinteze, CRH se iz parvocelularnih neurona oslobađa u krvotok i vezuje se za transportni protein, tzv. *CRH-binding protein* što mu pored transporta omogućava i izvesnu stabilnost u cirkulaciji. Sekretija ovog hormona je regulisana mnogobrojnim stimulatornim i inhibitornim signalima koji potiču iz moždanog stabla, iz hipokampusu i amigdala. CRH deluje preko specifičnih receptora povezanih sa proteinom G i stimulacijom adenilat ciklaze oslobađa ciklični adenozin-monofosfat

koji nakon toga aktivira protein kinazu A. Na ovaj način, vezivanjem za svoj receptor koji se nalazi na membrani adrenokortikotropnih ćelija hipofize, CRH povećava ekspresiju gena za proopiomelanokortin (POMC) i posledičnu produkciju adrenokortikotropnog hormona - ACTH (Ćirić, 2000; Hillhouse i sar., 2002).



**Slika 6.** Neuroendokrini odgovor organizma na stres.  
Modifikovano prema: Antoni i sar. *Nature Reviews Cancer* 2006; 6:240-248

Pored navedenog, CRH stimuliše sekreciju AVP iz magnocelularnih neurona paraventrikularnog jedra i sinergistički sa AVP utiče na oslobađanje ACTH. Tako je pokazano da u bazalnim uslovima oko 50% neurona uključenih u regulaciju sekrecije ACTH eksprimira istovremeno CRH i AVP (Whitnall i sar., 1987). Koekspresija ova dva peptida u hipotalamusu se markantno povećava tokom hroničnog stresa što potvrđuje značaj sinergičkog dejstva CRH i AVP u stimulaciji sekrecije ACTH (Dinan i Scott, 2005; Merali i sar., 2009).

ACTH nastaje enzimskom razgradnjom prohormona - POMC i luči se epizodično, u cirkadijalnom ritmu koji se generiše u suprashiazmatičkom jedru hipotalamusa. Porast sekrecije ACTH se postiže povećanjem amplitude i dostiže maksimum u ranim jutarnjim časovima. Regulacija lučenja ovog hormona je kompleksna i pod konstantim je uticajem brojnih centralnih i perifernih signala koji deluju suprotno. Najznačajniji sekretagog ACTH je CRH, dok *corticotropin release inhibiting factor* (CRIF), somatostatin, oksitocin, supstanca P i atrijalni natriuretički peptid ispoljavaju inhibitorni uticaj na sintezu ovog hormona. Visina porasta ACTH na stimulaciju CRH je u inverznoj korelaciji sa nivoom glukokortikoida u cirkulaciji, jer glukokortikoidi smanjuju osetljivost adenokortikotropnih ćelija na dejstvo CRH. Među centralnim inhibitornim signalima, najveći efekat na supresiju ACTH ima CRIF, koji smanjuje i bazalnu i stimulisanu sekreciju ovog hormona (Ćirić, 2000). U stresu se povećava sekrecija ACTH, pri čemu intenzitet i trajanje kortikotropnog odgovora zavise od brojnih faktora (Budeč i sar., 1994; Kudielka i Kirschbaum, 2005), uključujući i vrstu stresora (Jasnić i sar., 2012). Naime, primena različitih eksperimentalnih modela je ukazala na varijabilnost odgovora HPA osovine u stresu, odnosno na činjenicu da svaki stresor ima sopstveni neuroendokrini obrazac aktivacije sa kvantitativno i kvalitativno različitim mehanizmima delovanja (Pacák i Palkovits, 2001; Đordjević i sar., 2003). Nakon sinteze u adrenokortikotropnim ćelijama, ACTH se oslobađa u krvotok i vezivanjem za melanokortinske receptore tipa 2 utiče na strukturu i funkciju nadbubrežne žlezde. Tako, pored stimulatornog dejstva na sintezu i sekreciju glukokortikoidnih hormona, ACTH reguliše lučenje androgena, pospešuje produkciju aldosterona, povećava protok krvi kroz nadbubrežnu žlezdu i dovodi do njene hipertrofije.

### **1.2.3. Glukokortikoidni hormoni kao medijatori stresa**

Stimulisana sekrecija ACTH u stresu podstiče ćelije zone fascikulate nadbubrežne žlezde da pojačano sintetišu i luče glukokortikoidne hormone. Kao i svi ostali steroidni hormoni, glukokortikoidi nastaju biosintezom iz holesterola i stoga u svojoj osnovi imaju ciklopentanoperhidrofenantrensku prstenastu strukturu. Holesterol se u vidu kompleksa sa lipoproteinima male gustine (engl.

low density lipoprotein, LDL) vezuje za LDL receptore na adrenokortikalnim ćelijama, a zatim se nakon ulaska u ćeliju enzimskim procesom oslobađa iz LDL kompleksa. Dalja transformacija holesterola u steroidne hormone vrši se u mitohondrijama i zahteva učešće oksidativnih enzima iz familije citohroma P-450. ACTH stimuliše sintezu glukokortikoida povećanjem ekspresije LDL receptora, regulacijom transporta holesterola u mitohondrijama, kao i aktivacijom određenih enzima - holesterol esteraze i mitohondrijalnih enzima koji konvertuju holesterol u kortizol, odnosno u kortikosteron. Naime, kortizol je osnovni glukokortikoidni hormon u organizmu čoveka, a kortikosteron u organizmu glodara. Nezavisno od ACTH, mehanizmi nervnog i imunskog sistema takođe regulišu aktivnost korteksa nadbubrežne žlezde, čime se može objasniti disocijacija u sekreciji ACTH i glukokortikoida, prisutna u određenim patološkim stanjima poput generalizovane inflamacije ili tokom prolongiranog stresa (Bornstein i sar., 2008).

Glukokortikoidi se smatraju opštim markerima stresa (O'Connor i sar., 2000). Brojni, eksperimentalno dobijeni podaci jasno ukazuju na povećanje koncentracije glukokortikoida u cirkulaciji životinja izloženih različitim vrstama stresora (Kant i sar., 1985). Ranija istraživanja Amario i sar. (1986) su pokazala da je odgovor kortikosterona na stres u direktnoj vezi sa intenzitetom stresa, dok su rezultati nešto kasnijih ispitivanja potvrdili da koncentracija kortikosterona u plazmi može biti pouzdan marker intenziteta stresa samo ukoliko su eksperimentalne životinje izložene stresoru slabog ili srednjeg intenziteta (Marti i Amario, 1998).

Povećana sekrecija glukokortikoida u stresu predstavlja deo adaptivne reakcije organizma. U prvoj fazi stresnog odgovora glukokortikoidi povećavaju senzitivnost kardiovaskularnog sistema na dejstvo kateholamina i na taj način doprinose porastu arterijskog pritiska, ubrzanju srčane frekvence i povećanju udarnog volumena srca (Sapolsky i sar., 2000). Tokom druge faze, tzv. faze adaptacije na stres, glukokortikoidni hormoni podstiču procese lipolize, proteolize, glikogenolize i glukoneogeneze, odnosno mobilišu energetske rezerve organizma i pospešuju dostavu energije centralnom nervnom sistemu i aktiviranim mišićima. Takođe, ovi hormoni inhibiraju dugoročno anabolizam koji, između ostalog, obuhvata procese rasta i zarastanja tkiva. Glukokortikoidi, dakle, učestvuju u

održavanju alostaze tako što efektornim ćelijama obezbeđuju dostupnost energetske rezerve organizma i utiču na preraspodelu energije tokom stresa (Kyrou i Tsigos, 2009). Treća faza stresnog odgovora, u kojoj dolazi do trajnog narušavanja homeostatskih mehanizama, nastaje u situaciji kada je stresor izuzetno visokog intenziteta ili ako njegovo dejstvo predugo traje. Visok nivo kortizola, odnosno dugotrajna kontinuirana sekrecija glukokortikoidnih hormona dovodi do tzv. „degenerativne kaskade” sa oštećenjem neurona, atrofijom hipokampusa i posledičnim poremećajem kognitivnih funkcija (Conrad, 2008). Pored navedenog, glukokortikoidi mehanizmima negativne povratne sprege regulišu aktivnost HPA osovine u stresu. Aktivacijom brzih (negenomskih) ili klasičnih (genomskih) mehanizama glukokortikoidi svoje inhibitorno dejstvo mogu ispoljiti na svim nivoima HPA osovine. Tako, u hipotalamusu inhibiraju sintezu i oslobađanje CRH i AVP (Erkut i sar., 1998; Itoi i sar., 2004), što se posredno odražava i na sekretornu aktivnost kortikotropnih ćelija adenohipofize. Takođe, pokazano je da glukokortikoidi posredstvom aktivacije nukleusnog receptora Dax-1 pokreću mehanizme intraadrenalne negativne povratne sprege i na taj način suprimiraju proces steroidogeneze u ćelijama korteksa nadbubrežne žlezde (Gummow i sar., 2006).

Sve navedene efekte glukokortikoidi ostvaruju vezivanjem za specifične receptore: receptore tipa 1 (mineralokortikoidni receptori, MR) i receptore tipa 2 (GR). Široka rasprostranjenost ovih receptora u različitim tkivima omogućava glukokortikoidima da deluju na skoro sve ćelije u organizmu. U bazalnim uslovima, kada je koncentracija glukokortikoidnih hormona niska, MR su glavni medijatori njihovog dejstva. U stresu, sa porastom koncentracije glukokortikoida dolazi do saturacije MR i aktivacije sve većeg broja GR, koji preuzimaju ulogu primarnih medijatora u odgovoru glukokortikoidnih hormona na stres (Joels i Kloet, 1994).

### **1.3. INTERAKCIJE IZMEĐU GLUKOKORTIKOIDNIH HORMONA I FAKTORA INHIBICIJE MIGRACIJE MAKROFAGA**

Glukokortikoidni hormoni imaju širok spektar antiinflamatornih i imunoregulatornih efekata. Dejstva glukokortikoida na zapaljenske i imunološke procese obuhvataju inhibiciju produkcije proinflamatornih citokina, preraspodelu



različitih populacija leukocita i modulaciju funkcije imunokompetentnih ćelija. Tako je pokazano da deksametazon u dozi 30 mg smanjuje produkciju IL-1, IL-6, IL-8 i IFN $\gamma$ , a u većim dozama inhibitorno deluje i na IL-2, IL-3 i TNF $\alpha$  (Kunicka i sar., 1993). Međutim, za razliku od ostalih proinflammatoryh citokina, čija se aktivnost pod uticajem glukokortikoida smanjuje, sa porastom nivoa glukokortikoidnih hormona povećava se produkcija jednog citokina sa proinflammatorym dejstvom - faktora inhibicije migracije makrofaga (engl. macrophage migration inhibitory factor, MIF). MIF, zatim, antagonizuje antiinflammatory i imunosupresivna dejstva glukokortikoida i na taj način omogućava adekvatan inflamatorni i imunski odgovor organizma u uslovima povećane koncentracije glukokortikoidnih hormona u cirkulaciji (Bacher i sar., 1996; Flaster i sar., 2007).

### **1.3.1. Uticaj glukokortikoidnih hormona na faktor inhibicije migracije makrofaga**

S obzirom da inhibiraju sintezu većine citokina uključenih u zapaljenske procese, glukokortikoidi imaju veoma izražena antiinflammatory svojsva i široku terapijsku primenu. Tretman glukokortikoidima dovodi do porasta broja neutrofilnih leukocita, uz istovremeno smanjenje broja limfocita i monocita u cirkulaciji. Takođe, glukokortikoidi inhibišu adheziju leukocita za endotel krvnog suda, odnosno njihovu migraciju na mesto inflamacije, i na taj način smanjuju intenzitet inflamatornog odgovora. Mehanizam antiinflammatory dejstva ovih hormona zasniva se prevashodno na inhibiciji ekspresije tzv. proinflammatoryh gena koji kodiraju različite citokine, enzime i adhezione molekule odgovorne za nastanak zapaljenskog procesa (Barnes, 1998).

Regulacija inflamatornog odgovora je veoma kompleksna i pod konstantim je uticajem brojnih fizioloških činilaca sa oprečnim dejstvom. Tako, u kontroli zapaljenskog procesa glukokortikoidi ostvaruju značajan fiziološki antagonizam sa MIF (Calandra i Bucala, 1996; Aeberli i sar., 2006). Ispitivanjem direktne interakcije ovih fizioloških antagonista u *in vitro* uslovima, pokazano je da glukokortikoidi, nasuprot inhibitornom uticaju na ostale proinflammatory citokine, indukuju sintezu i oslobađanje MIF (Calandra i sar., 1995). Pored toga, uočeno je

da efekat glukokortikoida na MIF zavisi od primenjene koncentracije hormona. Da bi ispitali interakciju glukokortikoida i MIF-a u *in vivo* uslovima, Fingerle-Rowson i sar. (2003) su eksperimentalne životinje tretirali deksametazonom i nakon toga analizirali ekspresiju MIF u nekoliko različitih tkiva. Prvo su prisustvo ovog citokina dokazali u: slezini, jetri, timusu, nadbubrežnoj žlezdi, mišićnom tkivu i koži kontrolnih životinja, čime je potvrđena konstitutivna ekspresija MIF u navedenim tkivima. Međutim, ekspresija MIF je ostala neizmenjena i nakon obostrane adrenalektomije kontrolnih životinja, pokazujući da glukokortikoidni hormoni ne utiču na bazalnu sintezu ovog citokina. Nasuprot tome, porast nivoa glukokortikoida u cirkulaciji životinja tretiranih deksametazonom doveo je do markantnog povećanja ekspresije MIF u svim ispitivanim tkivima. Takođe, praćenjem brzine odgovora MIF kod tretiranih životinja, uočeno je da se sinteza ovog proteina u timusu i slezini povećava već nekoliko sati nakon primene deksametazona, dok se u koži i mišićima porast proteinske ekspresije MIF zapaža kasnije, što odražava različitu osetljivost ispitivanih tkiva na dejstvo glukokortikoidnih hormona. U skladu sa navedenim rezultatima Fingerle-Rowson i sar. (2003), pokazano je da ćelije različitih tkiva povećano sintetišu MIF tokom stresa, odnosno da dejstvo psihološkog stresora povećava koncentraciju ovog citokina u cirkulaciji (Edwards i sar., 2010; Alexander i sar., 2012; Lu i sar., 2013). Povećana koncentracija MIF u krvi pacijenata obolelih od depresije, koja se karakteriše povećanom aktivnošću HPA osovine (Alexander i sar., 2012; Bloom i Al-Abed, 2014), obezbeđuje dodatnu potvrdu značajne uloge glukokortikoidnih hormona u stimulaciji sekrecije ovog citokina.

### **1.3.2. Uticaj faktora inhibicije migracije makrofaga na glukokortikoidne hormone**

MIF je prvi put opisan 1966. godine, kao citokin koji se sintetiše u T-limfocitima, a koji inhibira migraciju makrofaga. Danas se zna da pored limfocita MIF sekretuju i druge ćelije: monociti/makrofagi, eozinofili, bazofili, epitelne i endotelne ćelije, fibroblasti i dr. (Calandra i Roger, 2003). Ovaj citokin je homotrimerni protein koji ne pokazuje strukturnu sličnost sa ostalim proinflamatornim citokinima. Izgrađen je od tri identična polipeptina lanaca –

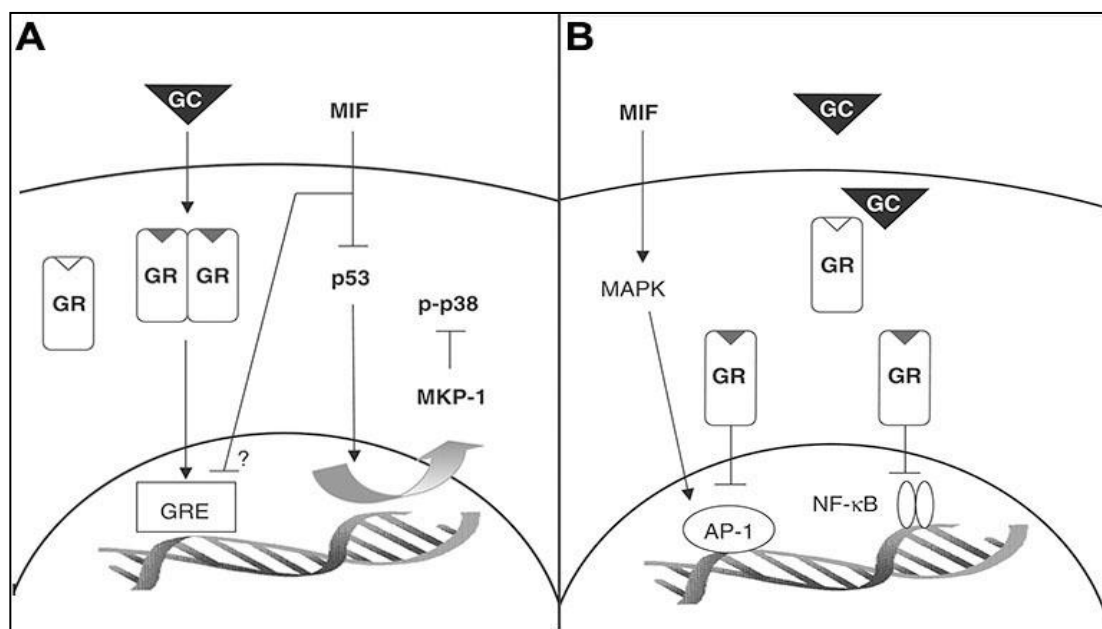
monomera, sačinjena od 115 aminokiselina. Svoju biološku funkciju MIF osvaruje vezivanjem za specifičan receptor – CD74, a nastali kompleks MIF/CD74 postaje aktivan tek nakon formiranja signalnog kompleksa sa molekulom CD44 (Leng i sar., 2003; Shi i sar., 2006). Ovako formirani signalni kompleks MIF/CD74/CD44 aktivira intracelularne kinaze: Src protein kinazu, mitogenom aktivirane protein (MAP) kinaze i fosfatidilinozitol-3 kinazu. Pored ovog klasičnog mehanizma, može da se aktivira i alternativni signalni put koji nastaje nakon endocitoze nezavisne od receptora, a koji podrazumeva vezivanje MIF za citoplazmatski protein JAB-1 (engl. Jun-c activation domen binding) čime se objašnjava uloga ovog citokina u inhibiciji proliferacije tumorskih ćelija (Shackleford i Claret, 2010).

Osnovna uloga MIF je regulacija aktivacije makrofaga i limfocita u inflamatornom i imunskom odgovoru. Pored toga, ovaj proinflamatorni citokin je široko zastupljen u tkivima neuroendokrinog sistema i učestvuje u regulaciji HPA osovine (Savaskan i sar., 2012). Sekretovan iz makrofaga, MIF može da deluje autokrino ili parakrino, stimulišući sopstvenu sintezu i sintezu drugih inflamatornih medijatora. Sintetiše se konstitutivno, a nakon stimulacije endotoksinima, egzotoksinima i nekim proinflamatornim citokinima kao npr. TNF $\alpha$  i IFN $\gamma$ , sintetisan MIF se oslobađa iz citoplazmatskih depoa. Osim što podstiče produkciju proinflamatornih citokina iz aktiviranih ćelija, MIF stimuliše i migraciju leukocita na mesto inflamacije. Pokazano je da utiče i na migraciju fibroblasta, ubrzavajući proces regeneracije oštećenih tkiva (Gilliver i sar., 2011). Ovaj proinflamatorni citokin ima značajnu ulogu u nastanku i razvoju sepse (Martin, 2000), a učestvuje i u mehanizmima patogeneze nekih autoimunskih obolenja kao što je reumatoidni artritis (Kasama i sar., 2010; Llamas-Covarrubias i sar., 2013).

Budući da su proinflamatorna i imunomodulatorna dejstva MIF u potpunosti suprotna dejstvima glukokortikoida, MIF se smatra najznačajnijim fiziološkim antagonistom ovih hormona. Njihovo antagonističko dejstvo je pokazano na različitim tipovima ćelija uključujući T-limfocite, makrofage i fibroblaste (Leech i sar., 1999). Tako je korišćenjem eksperimentalnih modela endotoksičnog šoka i reumatoidnog artritisa utvrđeno da MIF antagonizuje protektivne efekte glukokortikoidnih hormona u navedenim patološkim stanjima (Calandra i Bucala, 1996; Santos i sar., 2001). U skladu sa tim, Fingerle-Rowson i

sar. (2003) su pokazali da se primenom anti-MIF antitela, i posledičnom neutralizacijom funkcije ovog citokina u cirkulaciji, pojačava antiinflamatorni efekat glukokortikoida što ima potencijalni terapijski značaj, posebno imajući u vidu širok spektar neželjenih dejstava koja mogu nastati usled dugotrajne primene glukokortikoidnih hormona (Morand i sar., 2003).

S obzirom na potencijalni terapijski značaj MIF, sve veći broj istraživanja usmeren je na ispitivanje mehanizama koji se nalaze u osnovi njegove fiziološke interakcije sa glukokortikoidima. Tako je dokazano da MIF smanjuje osetljivost ćelija na dejstvo glukokortikoidnih hormona. Naime, Aeberli i sar. (2006) su nakon izolacije makrofaga iz peritoneuma MIF<sup>-/-</sup> i MIF<sup>+/+</sup> miševa pratili efekat glukokortikoida na sekreciju proinflamatornih citokina iz izolovanih ćelija i pokazali da delecija gena za MIF povećava odgovor makrofaga na dejstvo glukokortikoidnih hormona. Kako su biološki efekti glukokortikoida posredovani aktivacijom GR, dalja istraživanja su obuhvatila rasvetljavanje signalnih mehanizama kojima MIF antagonizuje efekte aktiviranog GR na transkripciju ciljnih gena (**Slika 7**).



**Slika 7.** Mehanizmi antagonističkog dejstva MIF na GR-posredovanu aktivaciju (A) ili represiju (B) ciljnih gena. Modifikovano prema: Aeberli i sar. *Rheumatology* 2006;45:937-43.

Jedan od potencijalnih mehanizama podrazumeva inhibitorni efekat MIF na glukokortikoidima indukovanu aktivaciju transkripcije gena za fosfatazu MAP kinaze 1 (engl. MAP kinase phosphatase 1, MKP-1), ali još uvek nije utvrđeno da li se ovaj efekat MIF ostvaruje direktno ili posredstvom inhibicije proteina p53 (**Slika 7A**). Drugi mehanizam bi obuhvatao antagonističke efekte MIF na glukokortikoidima posredovanu inhibiciju transkripcionih faktora AP-1 i NF $\kappa$ B (**Slika 7B**) (Daun i sar., 2000; Aeberli i sar. 2006).

#### **1.4. ULOGA AZOT MONOKSIDA U ERITROCITOPOEZI I STRESU**

Azot monoksid (engl. nitric oxide, NO) je signalni molekul koji učestvuje u održavanju homeostaze organizma (Jensen i sar., 2009; Đikić i sar., 2013). Sintetiše se oksidacijom L-arginina, a reakciju oksidacije katalizuju tri izoforme enzima NO sintaze (NOS): dve konstitutivne – neuralna (nNOS) i endotelna (eNOS), i jedna inducibilna (iNOS) izoforma. Prema novijim saznanjima, NO može nastati i konverzijom nitrita i nitrata (Lundberg i Weitzberg, 2010) što predstavlja njegov alternativni izvor u uslovima hipoksije. Ovaj signalni molekul učestvuje u regulaciji različitih bioloških procesa u organizmu. Tako je pokazano da NO utiče na rast i diferencijaciju nezrelih ćelija eritroidne loze (Shami i Weinberg, 1996). Takođe, poznato je da NO parakrinim mehanizmima reguliše neuroendokrinoimunološke interakcije u uslovima stresa (Rettori i sar., 2009) i da psihološki stres moduliše aktivnost transkripcionog faktora NF $\kappa$ B i posledičnu produkciju NO u različitim tipovima ćelija (Bierhaus i sar., 2003; Echeverry i sar., 2004), ali uloga ovih signalnih molekula u regulaciji eritrocitopoeze tokom hroničnog stresa još uvek nije razjašnjena.

##### **1.4.1. Azot monoksid kao regulator eritrocitopoeze**

Azot monoksid je rastvorljiv i veoma reaktivan gas koji nakon sinteze odmah difunduje iz ćelije. Poluživot NO u velikoj meri zavisi od hemijskog okruženja i kreće se od nekoliko sekundi u krvi do nekoliko minuta u pojedinim tkivima (Kelm, 1999). Široko je rasprostranjen u organizmu i deluje kao parakrini regulator većine fizioloških procesa. Mehanizmi delovanja NO su različiti, a obuhvataju: 1) aktivaciju solubilne gvanilat ciklaze i stvaranje cikličnog guanozin-

monofosfata, 2) direktno vezivanje za hem grupu mnogih enzima, 3) formiranje peroksinitritnog anjona u reakciji sa superoksidnim anjonom i 4) nitrozilaciju proteina, lipida i nukleinskih kiselina (Thippeswamy i sar., 2006). S obzirom da lako podleže oksidativnom procesu stvarajući tzv. reaktivna jedinjenja azota, prekomerna i/ili produžena produkcija NO može da prouzrokuje brojne patološke promene u organizmu (Pacher i sar., 2007). Stoga su veoma značajni mehanizmi uklanjanja NO sa mesta njegove produkcije, a jedan od tih mehanizama podrazumeva vezivanje ovog molekula za hemoglobin u eritrocitima. Naime, hem grupa hemoglobina ima veoma visok afinitet vezivanja za NO što eritrocite čini prenosiocima ovog signalnog molekula, a direktno vezivanje NO za hemoglobin može poslužiti i kao mehanizam zaštite od toksičnog dejstva njegove prekomerne produkcije. Pokazano je da NO reaguje i sa cisteinom (Cys)-93 u sastavu  $\beta$ -subjedinice hemoglobina, i dok reakcija sa gvožđem iz hema može inaktivirati NO, S-nitrozilacija Cys-93 predstavlja mehanizam očuvanja bioaktivnosti ovog signalnog molekula (Čokić i Schechter, 2008; Helms i Kim-Shapiro, 2013).

Interakcija između NO i eritrocita je veoma kompleksna. Danas se smatra da eritrociti, pored transporta i skladištenja NO, mogu vršiti i njegovu sintezu *de novo* (Kleinbongard i sar., 2006; Cortese-Krott i Kelm, 2014). Sa druge strane, NO utiče na funkciju eritrocita (Kahn i sar., 2013) i reguliše proces njihovog sazrevanja (Čokić i Schechter, 2008). Naime, rezultati *in vitro* studija pokazuju inhibitorno dejstvo NO na rast i diferencijaciju progenitorskih ćelija eritroidne loze. Ispitivanjem uticaja donora egzogenog NO na ćelije kostne srži, Maciejewski i sar. (1995) su uočili direktan i dozno-zavisan efekat NO donora na apoptozu progenitorskih ćelija i na formiranje eritroidnih kolonija. Inhibitorni uticaj NO na rast BFU-E i CFU-E kolonija potvrđen je godinu dana kasnije, kultivisanjem CD34+ ćelija izolovanih iz perifernog krvotoka čoveka (Shami i Weinberg, 1996). Takođe, korišćenjem ćelijske linije humane eritroleukemije (K562), utvrđeno je da NO inhibira sintezu hemoglobina i na taj način suprimira diferencijaciju K562 ćelija indukovanu različitim hemijskim agensima (Chénais i sar., 1999). U skladu sa tim, Küçükaya i sar. (2006) su merili endogenu produkciju NO tokom diferencijacije K562 ćelija i pokazali da je nivo NO u obrnutoj korelaciji sa koncentracijom hemoglobina i stepenom diferencijacije ovih ćelija.

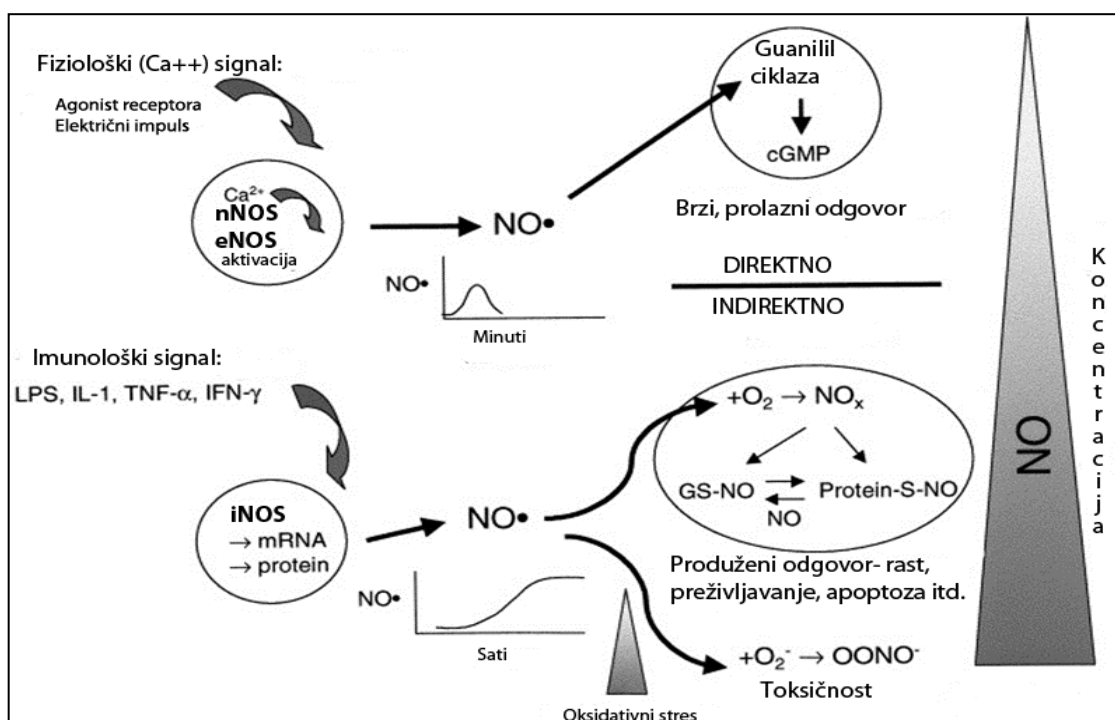
Uloga NO u regulaciji hematopoeze dokazana je i u *in vivo* uslovima. Tako blokada aktivnosti NOS *in vivo* povećava broj pluripotentnih matičnih ćelija u kostnoj srži miša i podstiče njihovu diferencijaciju u progenitorske ćelije za eritrocitnu lozu (Michurina i sar., 2004; Krstić i sar., 2010). Ispitivanjem pojedinačnog udela različitih izoformi NOS u parakrinoj regulaciji hematopoeze, utvrđeno je da nNOS ima najveći uticaj na proces sazrevanja svih hematopoetskih ćelija, uključujući i ćelije eritroidne loze. Poznato je da se regulacija sazrevanja eritroidnih progenitora ostvaruje posredstvom brojnih medijatora koji se sintetišu u stromalnim ćelijama kostne srži, tako da se ove ćelije, smatraju i najznačajnijim izvorom lokalno produkovanog NO. U skladu sa tim, Krasnov i sar. (2008) su analizirali ekspresiju sve tri izoforme enzima NOS u ćelijama strome kostne srži i uočili da je nNOS direktno uključena u proces diferencijacije progenitorskih ćelija hematopoeze. Takođe, poređenjem hematopoeze kod nNOS<sup>+/+</sup> i nNOS<sup>-/-</sup> miševa, pokazan je značajno veći broj progenitora u kostnoj srži genetski modifikovanih miševa, što potvrđuje ulogu nNOS u produkciji NO i parakrinoj regulaciji hematopoeze.

#### **1.4.2. Azot monoksid kao modulator aktivnosti HPA osovine u stresu**

Široka zastupljenost NOS u tkivima obezbeđuje adekvatnu produkciju NO u odgovoru na brojne fiziološke i imunološke stimuluse (**Slika 8**). Lokalno produkovani NO, u zavisnosti od koncentracije, aktivira različite signalne mehanizme i deluje kao auto/parakrini regulator čitavog niza fizioloških procesa u organizmu (Coleman, 2001). Tako, pored efekata na kardiovaskularni, respiratorni, urogenitalni, gastrointestinalni i imunski sistem (Thippeswamy i sar., 2006; Budeč i sar., 2009), NO utiče i na neuroendokrini sistem (Rivier, 2001).

U fiziološkim uslovima, NO se sintetiše u različitim strukturama centralnog nervnog sistema i deluje kao neadrenergički neholinergički neurotransmiter. Ovaj signalni molekul se smatra atipičnim neurotransmiterom, jer se, za razliku od klasičnih neurotransmitera, ne nalazi u vezikulama i nema specifične receptore (Thippeswamy i sar., 2006). Pored toga, NO učestvuje u međusobnim interakcijama neurona i glijalnih ćelija, a deluje i kao parakrini regulator kompleksnih neuroendokrinih interakcija u okviru HPA osovine. Konstitutivna

ekspresija NOS u neuronskim telima hipotalamusnih jedara, u eminenciji medijani i hipofizi ukazuje na ulogu NO u regulaciji sekrecije hipotalamusnih i hipofiznih hormona (Bugajski i sar., 2004). Uticaj ovog molekula na aktivnost HPA osovine ispitan je prevashodno u *in vivo* uslovima, intracerebroventrikularnom, intravenskom ili subkutanom primenom različitih donora NO i inhibitora aktivnosti NOS (Lopez-Figueroa i sar., 1998). Međutim, njegova uloga u regulaciji HPA osovine je, usled oprečnih rezultata brojnih eksperimentalnih istraživanja, ostala nerazjašnjena. Tako je pokazan i stimulatorni i inhibitorni uticaj NO na aktivnost HPA osovine, a dobijeni podaci su se, između ostalog, razlikovali i u zavisnosti od načina aplikacije NO donora ili NOS inhibitora (Rivier, 2003; Mancuso i sar., 2010).



**Slika 8.** *Produkcija NO u odgovoru na različite stimulse. Modifikovano prema: Coleman JW. Int Immunopharmacol 2001; 1:1397-1406.*

Pored uticaja na bazalnu aktivnost HPA osovine, NO ispoljava i modulatorne efekte na aktivaciju neuroendokrinog sistema u stresu (Tsuchiya i sar., 1997; Gulati i sar., 2006). Naime, opšte prihvaćeno da NO učestvuje u adaptacionom odgovoru organizma na stres, i to na dva načina: 1) indirektno, eNOS-posredovanom regulacijom vaskularnog tonusa, sa posledičnom modulacijom



regionalnog protoka krvi, što se posredno odražava na aktivnost HPA osovine i 2) direktno, kao rezultat povećane aktivnosti nNOS i neposrednog efekta lokalno produkovanog NO (Joung i sar., 2012). Lokalno sintetisan NO može ispoljavati i stimulatorne i inhibitorne efekte na aktivnost HPA osovine u stresu, u zavisnosti od vrste stresora i ispitivanog tkiva (Mancuso i sar., 2010).

Psihološki stresori stimulišu aktivnost HPA osovine i utiču na produkciju NO u različitim tipovima ćelija (Gađek-Michalska i sar., 2012). Tako, stres izazvan delimičnom imobilizacijom povećava ekspresiju enzima NOS u moždanom tkivu stresiranih životinja (Madrigal i sar., 2001; Echeverry i sar., 2004). Pored uticaja na produkciju NO u različitim regionima mozga, pokazano je da psihološki stres moduliše aktivnost NOS i u ostalim tkivima (Custodis i sar., 2011; Mao i sar., 2012). Mehanizmi aktivacije NOS su kompleksni, a rezultati brojnih istraživanja ukazuju na ključnu ulogu transkripcionog faktora NFκB u regulaciji ekspresije ovih enzima (Carbone i sar., 2008; Parohova i sar., 2009). Takođe, prolongirana izloženost psihološkom stresoru može uzrokovati različite patološke procese u organizmu, a ispitivanja na molekularnom nivou pokazuju da NO i NFκB učestvuju u patogenezi ovih poremećaja (Bierhaus i sar., 2004; Koo i sar., 2010; Barbieri i sar., 2012; Peng i sar., 2012).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Stres eritrocitopoeza predstavlja jedinstven proces čija se regulacija umnogome razlikuje od regulacije eritrocitopoeze u bazalnim uslovima. Rezultati novijih istraživanja pokazuju da se SE odvija predominantno u slezini i da neadekvatna aktivacija ovog procesa može uzrokovati prekomernu ekspanziju i malignu transformaciju nezrelih ćelija eritroidne loze. Dosadašnja saznanja o SE su dobijena ispitivanjem ovog procesa prevashodno na mišjim modelima anemije, dok su literaturni podaci o efektima psihološkog stresa na proces eritrocitopoeze veoma oskudni.

Imajući u vidu da mehanizmi regulacije eritrocitopoeze u uslovima hroničnog psihološkog stresa nisu poznati, istraživanja obuhvaćena ovom disertacijom imala su za cilj dobijanje podataka koji bi doprineli bojem razumevanju ćelijskih i molekularnih mehanizama uključenih u regulaciju procesa eritrocitopoeze tokom hroničnog stresa. U planiranim istraživanjima smo pošli od pretpostavke da bi hronična izloženost psihološkom stresoru mogla dovesti do stimulacije eritrocitopoeze u kostnoj srži i slezini, i to prevashodno putem aktivacije GR i njegove interakcije sa drugim regulatornim molekulima. Takođe, pretpostavili smo da se u toku hroničnog stresa aktiviraju i inhibitorni mehanizmi kako bi sprečili prekomernu ekspanziju progenitorskih ćelija eritrocitne loze, a koji bi mogli biti posredovani aktivacijom transkripcionog faktora NF- $\kappa$ B i posledičnom produkcijom NO u ćelijama kostne srži i/ili povećanom sintezom i oslobađanjem MIF u slezini.

Polazeći od navedenih činjenica, formulisali smo sledeće ciljeve istraživanja:

- ispitivanje uticaja hroničnog psihološkog stresa na proces eritrocitopoeze u kostnoj srži i slezini miša
- definisanje uloge GR u delovanju hroničnog stresa na različite kategorije opredeljenih matičnih ćelija za eritrocitnu lozu
- ispitivanje uloge NO u regulaciji eritrocitopoeze u uslovima hroničnog stresa
- ispitivanje uloge MIF u procesu eritrocitopoeze u toku hroničnog stresa

Da bi se postigli navedeni ciljevi, istraživanja su se odvijala u sledećim pravcima:

- definisanje modela *restraint* stresa određivanjem nivoa kortikosterona u serumu eksperimentalnih životinja
- analiza uticaja hroničnog stresa na koncentraciju eritropoetina, vrednosti hematoloških parametara i status gvožđa u cirkulaciji ispitivanih miševa
- praćenje efekata hroničnog stresa na broj BFU-E, CFU-E i eritroblasta u kostnoj srži i slezini miša
- analiza ekspresije GR, EpoR i C-kit u slezini hronično stresiranih miševa
- ispitivanje dejstva hroničnog stresa na ekspresiju BMP4 i njegovih receptora u slezini miša
- ispitivanje efekata blokade GR (RU486) na dejstvo hroničnog stresa na rast BFU-E i CFU-E u slezini miša
- analiza uticaja neselektivnog inhibitora NOS (L-NAME) na dejstvo hroničnog stresa na rast BFU-E i CFU-E u kostnoj srži miša
- ispitivanje dejstva hroničnog stresa na aktivaciju transkripcionog faktora NFκB i na ekspresiju nNOS i eNOS u ćelijama kostne srži miša
- ispitivanje uticaja hroničnog stresa na ekspresiju MIF u slezini miša
- ispitivanje dejstva hroničnog stresa na broj BFU-E, CFU-E i eritroblasta u kostnoj srži i slezini MIF *knockout* miševa

## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

Za izučavanje mehanizama regulacije eritrocitopoeze u toku hroničnog stresa korišćeni su miševi visokorodnih sojeva CBA i C57/Bl6, kao i MIF *knockout* miševi. Eksperimentalne životinje, preuzete iz Odeljenja za uzgoj laboratorijskih i eksperimentalnih životinja Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu, čuvane su pod standardnim uslovima sa konstantnom temperaturom od 25°C i svetlosnim režimom 12 h svetlost/12 h tama, uz slobodan pristup vodi i hrani. Istraživanja su obuhvatila 4 eksperimentalna pristupa i sprovedena su u saglasnosti sa Direktivom 2010/63/EU Evropskog parlamenta i Saveta o zaštiti životinja, uz odobrenja Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu i Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

### 3.2. EKSPERIMENTALNI DIZAJN

#### 3.2.1. Ispitivanje efekata hroničnog stresa na proces eritrocitopoeze

U cilju ispitivanja efekata hroničnog stresa na proces eritrocitopoeze, odrasli mužjaci miševa CBA soja, starosti 6-8 nedelja, podvrgnuti su *restraint* stresu, odnosno stresu izazvanom delimičnom imobilizacijom, svakodnevnim stavljanjem u ventilirane tubice zapremine 50 ml (Sartstedt, Nemačka), u trajanju od 2 h. Kako bi se izbeglo navikavanje na dejstvo stresora, eksperimenti su vršeni u toku prepodneva pri čemu je svakog dana menjano vreme početka izlaganja *restraint* stresu. Životinje su nasumično podeljene u tri grupe:

- kontrolne, netretirane
- životinje podvrgnute *restraint* stresu 7 dana uzastopno
- životinje podvrgnute *restraint* stresu 14 dana uzastopno

Nakon poslednjeg tretmana, izvršena je eutanazija životinja metodom cervikalne dislokacije i za analizu su uzete krv, slezina i kostna srž. Ispitivan je efekat hroničnog stresa na rast i diferencijaciju BFU-E, CFU-E i eritroblasta u kostnoj srži i

slezini miša. Pored toga, analizirana je ekspresija proteina BMP4, kao i ekspresija receptora za EPO, SCF i BMP4 u slezini kontrolnih i hronično stresiranih miševa.

### **3.2.2. Ispitivanje uloge GR u delovanju hroničnog stresa na opredeljene matične ćelije eritrocitne loze**

Da bi se definisala uloga GR u dejstvu hroničnog stresa na opredeljene matične ćelije eritrocitne loze eksperimentalne životinje su podeljene u četiri grupe:

- kontrolne, netretirane
- životinje podvrgnute *restraint* stresu 7 dana uzastopno
- životinje tretirane sa blokatorom GR (RU486), 60 minuta pre svakodnevne primene stresora
- životinje tretirane sa blokatorom GR 7 dana uzastopno

Neposredno pre početka eksperimenta izmerena je telesna masa životinja na osnovu koje su izračunate dnevne doze blokatora GR (RU486, mifepriston, Sigma-Aldrich, SAD). Mifepriston je rastvoren u dimetil-sulfoksidu, a zatim u pojedinačnoj dnevnoj dozi od 50 mg/kg potkožno aplikovan miševima 60 minuta pre svakog izlaganja stresoru. Nakon poslednjeg tretmana, životinje su žrtvovane i izolovane su ćelije slezine za kultivisanje i analizu. U okviru ovog eksperimentalnog pristupa ispitivano je dejstvo hroničnog stresa na ekspresiju GR u slezini, kao i efekat blokade ovog receptora u dejstvu hroničnog stresa na rast BFU-E i CFU-E u slezini miša.

### **3.2.3. Ispitivanje uloge MIF u procesu eritrocitopoeze u toku hroničnog stresa**

Uloga MIF u regulaciji eritrocitopoeze u uslovima hroničnog stresa ispitivana je na posredan način, korišćenjem MIF *knockout* miševa. S obzirom da miševi kojima je inaktivisan gen za MIF pripadaju soju C57/Bl6, u ovom eksperimentalnom pristupu su istovremeno ispitivani MIF *knockout* i *wild-type* miševi soja C57/Bl6 koji su podeljeni u tri grupe:

- kontrolni, netretirani
- miševi podvrgnuti *restraint* stresu 7 dana uzastopno
- miševi podvrgnuti *restraint* stresu 14 dana uzastopno

Nakon žrtvovanja, ispitan je efekat hroničnog stresa na rast BFU-E, CFU-E i eritroblasta u slezini *wild type* i MIF *knockout* miševa. Pored toga, praćen je stepen ekspresije MIF u splencitima kontrolnih i hronično stresiranih *wild-type* miševa.

#### **3.2.4. Ispitivaje uloge NO u regulaciji eritrocitopoeze u uslovima hroničnog stresa**

Da bi se ispitala uloga NO u dejstvu hroničnog stresa na proces eritrocitopoeze, miševi CBA soja su podeljeni u četiri homogene grupe:

- kontrolne, netretirane
- životinje podvrgnute *restraint* stresu 7 dana uzastopno
- životinje tretirane sa inhibitorom sinteze NO (L-NAME), 30 minuta pre svakodnevnog primene stresora
- životinje tretirane sa L-NAME 7 dana uzastopno

Pre početka eksperimenta, izmerena je telesna masa životinja i izračunate su dnevne doze neselektivnog inhibitora sinteze NO (L-NAME, Sigma-Aldrich, USA) koji je rastvoren u fiziološkom rastvoru i u pojedinačnoj dnevnoj dozi od 50 mg/kg potkožno aplikovan miševima. Nakon žrtvovanja, izolovana suspenzija kostne srži miševa korišćena je za kultivaciju i kvantifikaciju BFU-E i CFU-E progenitora, ispitivanje aktivacije transkripcionog faktora NF- $\kappa$ B, kao i za detekciju ekspresije eNOS i nNOS.

### **3.3. METODE**

#### **3.3.1. Hematološki parametri i ispitivanje statusa gvožđa**

Krv ispitivanih miševa prikupljena je iz orbitalnog sinusa u MiniCollect® mikro epruvete (Greiner Bio-One GmbH, Nemačka) sa antikoagulansom. Broj leukocita, eritrocita i trombocita je određen u hemocitometru, a određivanje hematokrita (Hct) vršeno je postupkom centrifugiranja krvi korišćenjem mikrohematokrit centrifuge. Koncentracija hemoglobina (Hb) je određena metodom po Drabkinu koja se zasniva na prevođenju hemoglobina u cijanmethemoglobin i poređenju intenziteta boje sa bojom standardnog rastvora poznate koncentracije. Intenzitet boje je očitavan na spektrofotometru pri talasnoj

dužini od 540 nm. Srednje vrednosti zapremine eritrocita-MCV (engl. mean cell volume), koncentracije hemoglobina u eritrocitu-MCHC (engl. mean corpuscular hemoglobin concentration), količine hemoglobina u eritrocitu - MCH (engl. mean corpuscular hemoglobin) i širina distribucije eritrocita- RDW (engl. red cell distribution width) izračunate su primenom odgovarajućih formula:

$MCV = \text{hematokrit} / \text{broj eritrocita}$

$MCHC = \text{koncentracija hemoglobina} / \text{hematokrit}$

$MCH = \text{koncentracija hemoglobina} / \text{broj eritrocita}$

$RWC = SD / MCV \times 100$

Biohemijski parametri statusa gvožđa, ispitivani u plazmi miševa, obuhvatili su koncentraciju gvožđa, ukupni kapacitet njegovog vezivanja (TIBC) i saturaciju transferina (TS) i određeni su korišćenjem automatskog biohemijskog analizatora COBAS Integra 400 plus (Roche, Švajcarska).

### **3.3.2. Određivanje nivoa hormona**

#### **3.3.2.1. Određivanje koncentracije kortikosterona u plazmi**

Koncentracija kortikosterona u plazmi ispitivanih miševa određena je veoma osetljivom i specifičnom radioimunološkom (engl. radioimmunoassay- RIA) metodom, korišćenjem odgovarajućeg komercijalnog kita (*Corticosterone I<sup>125</sup> RIA kit for Rats and Mice*, MP Biomedicals, LLC). Metoda se zasniva na imunskoj reakciji između antigena i specifičnog antitela. U analizi se koristi ograničena količina antitela koja reaguje sa ispitivanim antigenom i formira imunski kompleks. Zatim se dodaje poznata količina antigena obeleženog sa I<sup>125</sup>, koji konkuriše neobeleženom antigenu za vezujuća mesta na antitelu. Kako se antigeni vezuju za isto antitelo, procenat njihovog vezivanja za antitelo određen je odnosom njihovih koncentracija. Precipitacijom se zatim odvajaju vezana i nevezana frakcija obeleženog antigena. Pomoću gama scintilacionog brojača određuje se radioaktivnost precipitata, konstruiše se standardna kriva i na osnovu nje

određuje koncentracija kortikosterona u uzorku. Intraesej varijacija iznosila je 6,5% a interesej varijacija 4,1%.

### **3.3.2.2. Određivanje koncentracije eritropoetina u plazmi**

Koncentracija eritropoetina u plazmi merena je enzimskim imunotestom (engl. enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA), prema uputstvu proizvođača odgovarajućeg komercijalnog kita (*Quantikine Mouse/Rat Epo Immunoassay*, R&D Systems, Velika Britanija). ELISA test se zasniva na principu vezivanja antigena i specifičnog antitela obeleženog enzimom. Dodavanjem odgovarajućeg supstrata razvija se enzimaska reakcija i na bazi očitavanja optičke gustine na ELISA čitaču izračunava se koncentracija eritropoetina.

### **3.3.3. Čelije i kulture ćelija**

#### **3.3.3.1. Izolovanje i priprema suspenzije ćelija kostne srži i slezine miša**

Nakon žrtvovanja, u aseptičnim uslovima su izolovani femuri i slezina miša. Daljim postupkom istiskivanja kostne srži pomoću šprica i igle pripremljena je suspenzija ukupnih ćelija kostne srži u odgovarajućem medijumu (engl. Dulbecco's modified Eagle's medium – DMEM, Invitrogen, CA, USA) obogaćenom sa 5% fetalnog telećeg seruma (engl. fetal calf serum – FCS, Invitrogen). Nakon izolacije slezine, od kompaktnog tkiva se postupcima ustinjavanja kroz čeličnu mrežicu, prikupljanja i ponavljanog ispiranja pomoću šprica i igle dobila suspenzija pojedinačnih ćelija u rastvoru DMEM-a obogaćenog sa 5% FCS. U izolovanim suspenzijama ćelija kostne srži i slezine određen je ukupan broj ćelija sa jedrom, na osnovu kojega je podešavana odgovarajuća koncentracija ćelija za postavljanje kultura.

#### **3.3.3.2. Kulture ćelija na polučvrstoj podlozi od metilceluloze**

Za detekciju opredeljenih matičnih ćelija eritrocitne loze, BFU-E i CFU-E ćelija, primenjen je metod kultivacije hematopoetskih ćelija na podlozi od metilceluloze obogaćene odgovarajućim citokinima. Budući da se opredeljene matične ćelije hematopoeze mogu detektovati i definisati isključivo na osnovu



njihovih funkcionalnih osobina, ovaj metod se zasniva na svojstvu hematopoetskih ćelija da u prisustvu odgovarajućih stimulatora rasta na polučvrstim podlogama stvaraju kolonije sačinjene od morfološki prepoznatljivih ćelija određene loze. S obzirom da svaka kolonija nastaje od jedne opredeljene matične ćelije hematopoeze, broj kolonija odgovara broju hematopoetskih prethodnika u zasađenom uzorku ćelija.

U cilju kultivisanja BFU-E i CFU-E ćelija korišćeni su komercijalni *MethoCult* proizvodi (*Stem Cell Technologies*, Kanada), medijumi koji obezbeđuju optimalan rast navedenih opredeljenih matičnih ćelija miša. Za kultivaciju BFU-E upotrebljen je *MethoCult* M3434 koji pored metilceluloze sadrži rekombinantni mišji SCF (50 ng/ml), rekombinantni mišji IL-3 (10 ng/ml), rekombinantni mišji IL-6 (10 ng/ml) i rekombinantni humani EPO (3 U/ml). Detekcija CFU-E je vršena nakon kultivacije ćelija kostne srži i slezine u *MethoCult* M3334 koji od rekombinantnih citokina sadrži samo rekombinantni humani EPO (3 U/ml).

Smeše za kultivaciju ćelija pripremane su suspendovanjem  $2 \times 10^5$  ukupnih ćelija kostne srži, odnosno  $4 \times 10^5$  ukupnih ćelija slezine u 1 ml odgovarajućeg *MethoCult* medijuma. Tako pripremljene smeše razlivane su u plastične Petri posude za kulturu tkiva (Spektar, Srbija), prečnika 35 mm, i inkubirane na temperaturi 37°C, u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> i 100% vlažnosti. Nakon 7 dana inkubacije u *MethoCult* M3434, skorovane su BFU-E-formirane kolonije pod inverznim mikroskopom. Kolonije nastale iz CFU-E skorovane su pod invertnim mikroskopom nakon 2 dana inkubacije u medijumu *MethoCult* M3334. Za svaku eksperimentalnu grupu postavljane su kulture ćelija u duplikatu.

#### **3.3.4. Protočna citometrija**

Metoda protočne citometrije primenjena je za detekciju i kvantifikaciju prekursorskih ćelija eritrocitne loze u kostnoj srži i slezini miša. Ćelije kostne srži i slezine, izolovane i pripremljene na prethodno opisan način, ispirane su u odgovarajućem puferu za ispiranje (engl. phosphate-buffered saline, PBS, –sa 1mM EDTA i 5 mM glukozom). Nakon toga, izdvojeni su alikvoti ćelija ( $1 \times 10^6$  ćelija) i resuspendovani u 100 µl pufera za inkubaciju (PBS sa 0,5% BSA – engl. Bovine Serum Albumine, i 5mM glukozom) u koji je dodata odgovarajuća kombinacija

primarnih i izotipskih kontrolnih antitela konjugovanih sa specifičnim fluorescentnim markerima (**Tabela 1**). Po završetku perioda inkubacije od 45 min (+4°C), nevezana frakcija antitela je odstranjenja ispiranjem, a ćelije su resuspendovane u 1 ml PBS-a i analizirane korišćenjem protočnog citometra CyFlow CL (Partec, Nemačka).

**Tabela 1.** Antitela primenjena za detekciju i kvantifikaciju prekursorskih ćelija eritrocitne loze protočnom citometrijom

Antitelo (At)	Razblaženje At	Kataloški broj	Proizvođač
PE*-obeleženi anti-mišji Ter119	1:100	553673	BD Pharmingen, SAD
PE/Cy7**-obeleženi anti-mišji CD71	1:100	113812	BioLegend, SAD
PE-obeleženi IgG2b κ izotipska kontrola	1:100	553989	BD Pharmingen; SAD
PE/Cy7-obeleženi IgG2a κ izotipska kontrola	1:100	400521	BioLegend, SAD

\*fikoeritrin, \*\*fikoeritrin/cijanin 7

### 3.3.5. Histološka i imunohistohemijska analiza

Nakon žrtvovanja, slezine ispitivanih miševa su izolovane u aseptičnim uslovima, centralni deo slezine je fiksiran u 4% rastvoru formalina i ukalupljen u parafinu. Izolovani femuri su posle fiksacije u 4% rastvoru formalina bili podvrgnuti procesu dekalifikacije, nakon čega su ukalupljeni u parafinu. Od ukalupljenog tkiva slezine i kostne srži načinjeni su preseci, debljine 3 μm, koji su zatim montirani na visokoadherentne pločice i sušeni na temperaturi od 56°C u toku jednog sata. Tkivni iseći pripremljeni na ovakav način korišćeni su za histološku analizu i za imunohistohemijska ispitivanja.

#### 3.3.5.1. Histološka analiza

U cilju histološke analize tkivni preseci su bojeni hematoksilin-eozinom (H&E). Naime, ispitivani uzorci slezine i kostne srži prvo su deparafinirani u ksilolu, a zatim hidratisani u seriji alkohola opadajuće koncentracije (100%, 96% i

70%). Nakon ovako sprovedene procedure preseci su bojeni hematoksilinom po Mayer-u, prosvetljivani u 2% rastvoru eozina, dehidratirani, ponovo prosvetljivani i analizirani pod svetlosnim mikroskopom.

### 3.3.5.2. Imunohistohemijska analiza

Za detekciju određenih antigena u tkivu slezine korišćena su specifična monoklonska i poliklonska anti-mišja antitela (**Tabela 2**). Vizuelizacija kompleksa antigen-antitelo vršena je primenom visokosenzitivne i specifične imunohistohemijske metode, tzv. obeležene streptavidin-biotin (*Labeled Streptavidin-Biotin* – LSAB+) metode i 3,3'-diamino-benzidin tetrahidro-hlorida (DAKO, Danska) kao supstrat-hromogena, uz korišćenje komercijalnog kita (*Novocastra Peroxidase Detection System kit*, Leica Biosystems, Nemačka).

Postupak imunohistohemijskog bojenja trostepenom LSAB+ tehnikom započet je demaskiranjem antigena koje je sprovedeno u 0,01 M rastvoru citratnog pufera pH 6 (*Target Retrieval Solution*, DAKO, Danska) u mikrotalasnoj pećnici (700 W), u trajanju od 21 min. Posle demaskiranja antigena, blokirana je aktivnost endogene peroksidaze sa 0,3% vodenim rastvorom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u toku 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je usledila inkubacija tkivnih preseka sa odgovarajućim primarnim antitelom u vlažnoj komori, na sobnoj temperaturi u toku jednog sata. Zatim su preseci inkubirani sa biotiniziranim antikoziom ili antizečjim imunoglobulinima 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga vršena je inkubacija sa streptavidinskim konjugatom na peroksidazu rena 30 min, a kompleks antigen-antitelo je vizuelizovan primenom rastvora supstrat-hromogena, u trajanju od 5-10 minuta na sobnoj temperaturi. Na kraju su tkivni preseci kontrastirani Mayer-ovim hematoksilinom (Merck, Nemačka) i uklapani u vodeni medijum. Za rastvaranje svih primarnih antitela korišćen je komercijalni rastvarač (*Dako antibody diluent*, DAKO, Danska), a za ispiranje preparata u toku procedure imunohistohemijskog bojenja 0,1 M PBS pH 7,4.

**Tabela 2.** Pregled primarnih antitela korišćenih u imunohistohemijskim ispitivanjima

<b>Antitelo (At)</b>	<b>Razblaženje At</b>	<b>Kataloški broj</b>	<b>Proizvođač</b>
anti-mišji Ter119	1:400	550565	BD Pharmingen, SAD
anti-humani c-kit	1:400	A4502	Dako, Danska
anti-mišji EPOR	1:100	sc-5624	Santa Cruz, SAD
anti-mišji GR	1:400	sc-1004	Santa Cruz, SAD
anti-mišji BMP4	1:100	VMA1049	AbCys, Francuska
anti-h/m* MIF	1:600	PA5-27343	Thermo Scientific, SAD

\*h/m – humani/mišji

### 3.3.5.3. Morfometrijska analiza

Na histološkim preparatima, obojenim H&E, izvršena je stereološka analiza, dok je brojnost ciljnih ćelija po mm<sup>2</sup> površine određivana na tkivnim presecima obojenim imunohistohemijskom metodom.

Za stereološku analizu slezine korišćen je višenamenski testni sistem M-42 (Weibel, 1979), pomoću kojega je određena je volumenska gustina pojedinačnih komponenti koje sačinjavaju tkivo slezine. Volumenska gustina pokazuje koji deo sveukupnog prostora zauzima posmatrana komponenta. Na ovaj način su analizirane sledeće sastavne komponente tkiva slezine: crvena pulpa, bela pulpa, marginalni sinusi sa marginalnom zonom, vezivno tkivo i zona ispod kapsule. Vrednost volumenske gustine za određenu komponentu tkiva (Vvf) izračunava se kada se broj pogodaka koji padaju na ispitivanu komponentu (Pf) podeli sa brojem svih testnih tačaka unutar testnog polja (Pt).

$$Vvf = Pf/Pt$$

Pored navedenog, određen je broj folikula po tkivnom preseku, kao i broj folikula po mm<sup>2</sup> površine tkiva.

Morfometrijska analiza tkivnih preseka obojenih imunohistohemijskom metodom je izvršena korišćenjem istraživačkog mikroskopa Olympus AX70 (Olympus, Nemačka) i softvera analysis Pro 3.1 (*Soft Imaging system GmbH*, Nemačka). Kvantitativna analiza ekspresije određenog antigena u crvenoj pulpi slezine podrazumevala je određivanje broja ćelija koje ekspimiraju ispitivani protein. Vrednosti su dobijene skorovanjem imunoreaktivnih ćelija primenom uveličanja objektiva x 40 na 5 polja po tkivnom preseku i izražene su kao broj imunoreaktivnih ćelija po 1 mm<sup>2</sup> površine crvene pulpe.

### **3.3.6. Western blot analiza**

#### **3.3.6.1. Izolacija proteina**

Ukupni ćelijski proteini slezine izolovani su postupkom homogenizacije tkiva u ohlađenom puferu za liziranje ćelija (50 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM natrijum-hlorid; 1% Triton x-100; 1% natrijum-deoksiholat; 0.1 % natrijum-dodecil sulfat; 2 mM EDTA; 50 mM natrijum fluorid), koristeći odnos - 100 mg tkiva na 1 ml pufera. Neporedno pre početka homogenizacije, navedenom puferu su dodati inhibitori proteaza (10 µl/ml, Pierce Thermo Fisher Scientific, SAD) i natrijum-ortovanadat (5 µl/ml). Tako dobijeni ćelijski lizati su inkubirani 25 min na +4°C, a zatim centrifugirani na 15000 g i temperaturi +4°C, u trajanju od 20 min.

Postupak za izolaciju proteina iz ćelija kostne srži obuhvatio je izdvajanje citoplazmatske i nukleusne frakcije proteina. Izolovanoj suspenziji ćelija kostne srži dodat je odgovarajući pufer za liziranje (10 mM hidroksietil piperazin-etansulfonska kiselina – HEPES, pH 7,9; 1,5 mM magnezijum-hlorid; 10mM kalijum-hlorid; 0,5 mM ditionitrol; 20 mM natrijum-fluorid) u zapremini 5 puta većoj od zapremine ćelijskog taloga dobijenog centrifugiranjem suspenzije ćelija u PBS-u. Nakon 25 minuta inkubacije na ledu, lizat ćelija je centrifugiran na 420 g u trajanju 15 min na temperaturi +4°C. Dobijenom talogu je dodat pufer za liziranje u zapremini dva puta većoj od zapremine početnog ćelijskog taloga. Intenzivnim mešanjem ćelijskog lizata i centrifugiranjem na +4°C u trajanju od 15 min na

10000 g, izdvojeni su citoplazmatski proteini i dobijen je talog ćelijskih nukleusa. Nukleusni proteini su zatim izolovani liziranjem ćelijskih jedara u puferu za ekstrakciju nukleusnih proteina (20 mM HEPES pH 7,9; 1,5 mM magnezijum-hlorid; 0,2 mM EDTA, 420 mM natrijum-hlorid; 25% glicerol; 0,5 mM ditiotreititol; 20 mM natrijum-fluorid), dodatog u zapremini koja je iznosila 2/3 početnog ćelijskog taloga. Ovako dobijena smeša je inkubirana 40 min na +4°C, a zatim na istoj temperaturi centrifugirana 20 min na 15000 g, nakon čega su izdvojeni nukleusni proteini. Upotrebom komercijalnog BCA testa (Pierce, Rockford, SAD) određena je koncentracija proteina u svakom uzorku, a zatim su uzorci čuvani na -70°C do analize.

### **3.3.6.2. Elektroforeza i transfer**

Nakon dodavanja redukcionog pufera za uzorke (0,125 M Tris, pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 0,2 M DTT, 0,02% bromfenol plavo) uzorci proteina ćelijskih lizata su kuvani u ključaloj vodi 3 minuta. Ovako pripremljeni uzorci nanošeni su na akrilamidni gel debljine 1 mm i razdvajani SDS-PAGE elektroforezom, pri konstantnoj jačini struje od 20 mA. Nakon toga, razdvojeni proteini su elektrotransferom prenošeni na nitroceluloznu membranu (Applichem, SAD).

### **3.3.6.3. Imunoblot i detekcija proteina**

Nespecifično vezivanje proteina blokirano je inkubacijom membrane sa 5% BSA u 0,1% Tween-20 u TBS-u (TTBS) tokom 1 h. Membrana je zatim inkubirana sa primarnim antitelom (**Tabela 3**) na rotacionoj mešalici, 2 h na sobnoj temperaturi, ili preko noći na +4°C. Posle ispiranja, usledila je inkubacija membrane sa sekundarnim antitelom, konjugovanim sa HRP (engl. horseradish peroxidase), tokom 1 h i 30 min na sobnoj temperaturi. Za podešavanje odgovarajućeg razblaženja primarnih antitela korišćen je 1% BSA u TTBS-u, a membrane su između navedenih koraka ispirane u rastvoru TTBS.

Proteini, obeleženi antitelima, vizuelizovani su na autoradiografskom filmu (Amersham Pharmacia Biotech, Švedska) nakon inkubacije membrane sa sistemom reagenasa za pojačanu hemiluminiscencu (ECL, engl. enhanced chemiluminescence reagent system, Applichem). Intenzitet proteinskih traka

kvantifikovan je denzitometrijski, primenom programa ImageJ (National Institute for Health, SAD).

**Tabela 3.** Pregled primarnih antitela korišćenih u *Western Blot* analizi

Antitelo (At)	Razblaženje At	Kataloški broj	Proizvođač
anti-mišji EPOR	1:2000	sc-5624	Santa Cruz, SAD
anti-mišji GR	1:1000	sc-1004	Santa Cruz, SAD
anti-h/m* MIF	1:3000	PA5-27343	Thermo Scientific, SAD
anti-h/m nNOS	1:100	sc-5302	Santa Cruz, SAD
anti-h/m eNOS	1:500	sc-654	Santa Cruz, SAD
anti-h/m NF-κB p65	1:600	PA1-14288	Thermo Scientific, SAD
anti-h/m Tubulin	1:8000	T6074	Sigma-Aldrich, SAD
anti-h/m Actin	1:500	sc-1616	Santa Cruz, SAD
anti-h/m Histon	1:200	sc-10808	Santa Cruz, SAD

\*h/m – humani/mišji

### 3.3.7. Analiza ekspresije gena

#### 3.3.7.1. Izolacija RNK i reakcija reverzne transkripcije

Ukupna RNK je izolovana iz 30 mg homogenizovanog tkiva slezine korišćenjem komercijalnog kita (*RNeasy Mini kit*, Qiagen, Velika Britanija), nakon čega je usledilo uklanjanje rezidualne genomske DNK iz uzoraka izolovane RNK upotrebom enzima DNase I (Thermo Scientific). Reakcija reverzne transkripcije izvedena je prema uputstvima proizvođača kompleta za reverznu transkripciju - *Maxima First Strand cDNA Synthesis kit* (Thermo Scientific). Ukratko, 2,5 µg RNK, 6

μl osnovne reakcione smeše i voda bez nukleaza do ukupne zapremine od 20 μl, inkubirani su prvo 10 min na 25°C, zatim 15 min na 50°C, da bi, na kraju, reakcija bila prekinuta inkubacijom dobijene smeše na 85°C, u trajanju od 5 min. Navedena reakcija je izvedena u termobloku aparata *Mastercycler personal* (Eppendorf, Nemačka).

### 3.3.7.2. Reakcija lančanog umnožavanja sa detekcijom produkata u realnom vremenu

Umnožavanje i detekcija ciljnih fragmenata cDNK izvršeni su reakcijom lančanog umnožavanja sa detekcijom produkata u realnom vremenu (qRT-PCR, engl. quantitative real time polymerase chain reaction), uz korišćenje odgovarajućih prajmera (**Tabela 4**) i komercijalne smeše (*Maxima SYBR Green/ROX qPCR master mix*, Thermo Scientific). Ova metoda omogućava kvantifikaciju PCR produkta u toku svakog PCR ciklusa, tj. u realnom vremenu.

**Tabela 4.** Pregled prajmera korišćenih u kvantitativnoj RT-PCR metodi

Gen	Sekvenca (5'-3')	Veličina PCR produkta
BMPR-Ia	F: GGGTGTATGAAGTATGAAGGCTCTGAT R: GCACAAATTGGTCCGACAACATTCTA	96 bp
BMPR-II	F: GACAGAAGTTGGAAACCATCCCACAT R: GTGACCTCACTGCCAGGCTATT	116 bp
BMP4	F: AGGGATCTTTACCGGCTCCA R: TCCAGATGTTCTTCGTGATGG	134 bp
GAPDH	F: GCACAGTCAAGGCCGAGAA R: GCCTTCTCCATGGTGGTGAA	151 bp

F – *forward* prajmer; R – *reverse* prajmer; bp - bazni par

U qRT-PCR se meri fluorescentni signal koji se emituje u toku PCR reakcije i čiji je intenzitet direktno proporcionalan količini PCR produkta u datom ciklusu. U početnim ciklusima intenzitet fluorescencije ne prelazi bazalni nivo. Ciklus u kome je fluorescentni signal uzorka značajno viši od bazalnog signala, naziva se *threshold cycle* – Ct. Vrednost Ct je obrnuto proporcionalna količini ciljne sekvence u uzorku. Tako, što je veći početni broj kopija ciljne sekvence, Ct je niži, i obrnuto.



Amplifikacija cDNK i detekcija produkata je izvedena u termobloku aparata Mastercycler ep realplex (Eppendorf), po sledećem qRT-PCR programu:

8 min na temperaturi od 95°C

40 ciklusa: 30 s na temperaturi od 95°C

30 s na temperaturi od 60°C

30 s na temperaturi od 72°C

Nakon završenog procesa ampifikacije, analizirana je kriva topljenja produkata. Ekspresija ispitivanih gena je određena primenom komparativne  $\Delta\Delta C_t$  metode, a izražena je u odnosu na ekspresiju GAPDH (engl. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) kao kontrolnog gena.

### **3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Statistička analiza urađena je primenom jednofaktorske i dvofaktorske analize varijanse (ANOVA). U slučaju statističke značajnosti, dobijene primenom jednofaktorske ANOVA, za procenu značajnosti međugrupnih razlika upotrebljeni su odgovarajući *post hoc* testovi, dok je za statističku značajnost, utvrđenu dvofaktorskom ANOVA, primenjeno međugrupno poređenje sa korekcijom po Bonferroni-u. Statistička obrada podataka, dobijenih qRT-PCR metodom, izvedena je korišćenjem programa REST (engl. relative expression software tool) (Pfaffl i sar., 2002). Utvrđeni su sledeći nivoi statističke značajnosti:  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  i  $p < 0,001$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. EFEKTI HRONIČNOG PSIHOLOŠKOG STRESA NA ERITROCITOPOEZU

#### 4.1.1. Uticaj hroničnog stresa na hematološke parametare i status gvožđa

U cilju ispitivanja efekata psihološkog stresa na proces eritrocitopoeze miševi, starosti 6-8 nedelja, podvrgnuti su psihološkom stresu u trajanju od 7 ili 14 dana, nakon čega su žrtvovani. U perifernoj krvi analizirani su hematološki parametri i status gvožđa (**Tabela 5**).

**Tabela 5.** Hematološki parametri i status gvožđa

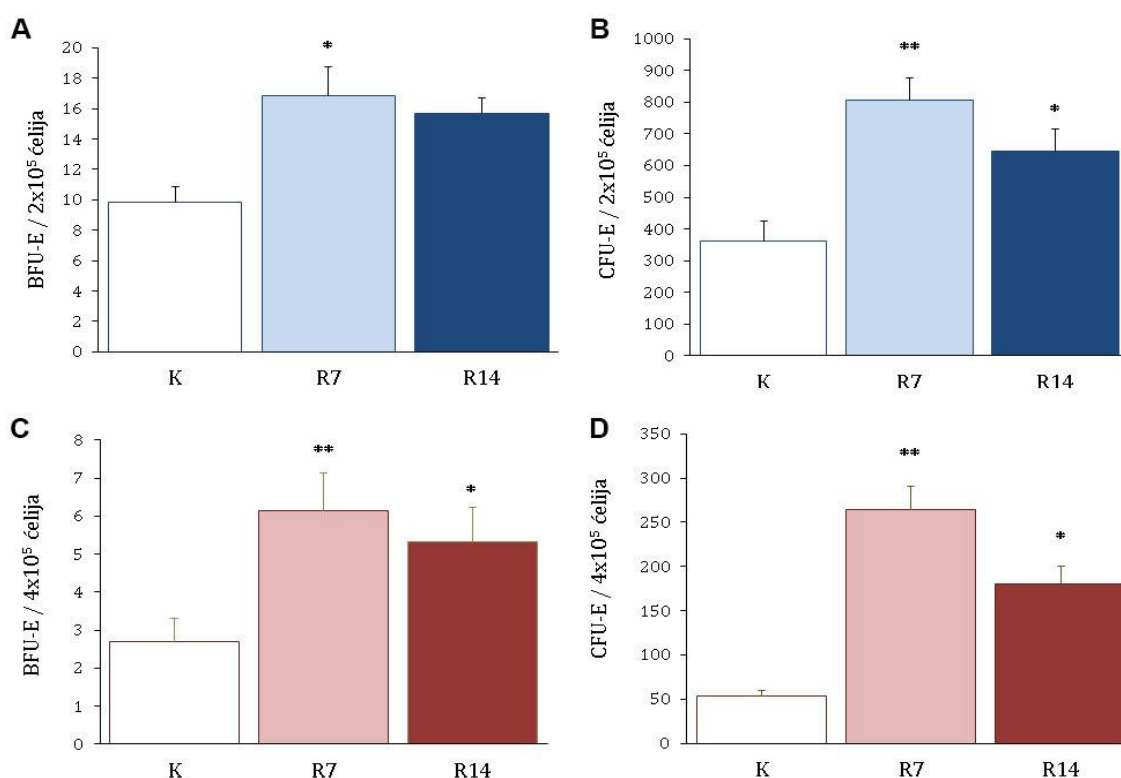
	Kontrole	R7	R14
Eritrociti (x10 <sup>12</sup> /l)	5,87 ± 0,3	5,98 ± 0,4	5,49 ± 0,2
Leukociti (x10 <sup>9</sup> /l)	7,49 ± 0,4	6,56 ± 1,2	5,64 ± 0,9
Trombociti (x10 <sup>12</sup> /l)	1,59 ± 0,1	1,64 ± 0,1	1,43 ± 0,1
Hb (g/l)	150,00 ± 6,1	100,94 ± 4,2***	100,55 ± 7,1***
Hct (%)	52,91 ± 0,6	50,75 ± 1,2	52,20 ± 0,8
MCV (fl)	86,83 ± 4,4	88,26 ± 5,4	90,00 ± 5,7
MCH (pg)	26,88 ± 0,4	19,98 ± 0,7***	18,97 ± 0,3***
MCHC (g/l)	309,72 ± 5,2	226,70 ± 9,6***	210,57 ± 6,8***
RDW (%)	11,36 ± 0,1	13,86 ± 0,3**	14,20 ± 0,3**
Gvožđe (μmol/l)	49,60 ± 0,9	12,96 ± 2,7***	33,06 ± 2,1**
TIBC (μmol/l)	61,12 ± 0,6	24,16 ± 2,4***	48,12 ± 5,3
TS (%)	81,08 ± 1,8	52,84 ± 9,1*	67,90 ± 4,34

*Hb – hemoglobin; Hct – hematokrit; TIBC – ukupni kapacitet za vezivanje gvožđa; TS – saturacija transferina; R7- životinje stresirane 7 dana; R14 - životinje stresirane 14 dana; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.*

Iako nisu uočene razlike u broju eritrocita između kontrolnih i stresiranih životinja, hronična izloženost psihološkom stresoru dovela je do značajnog smanjenja koncentracija gvožđa i hemoglobina u cirkulaciji ( $p < 0,001$ ). Pored toga, kod hronično stresiranih životinja utvrđene su i smanjene vrednosti eritrocitnih indeksa (MCH, MCHC,  $p < 0,001$ ), a kod miševa stresiranih 7 dana detektovano je i statistički značajno smanjenje ukupnog kapaciteta za vezivanje gvožđa ( $p < 0,01$ ).

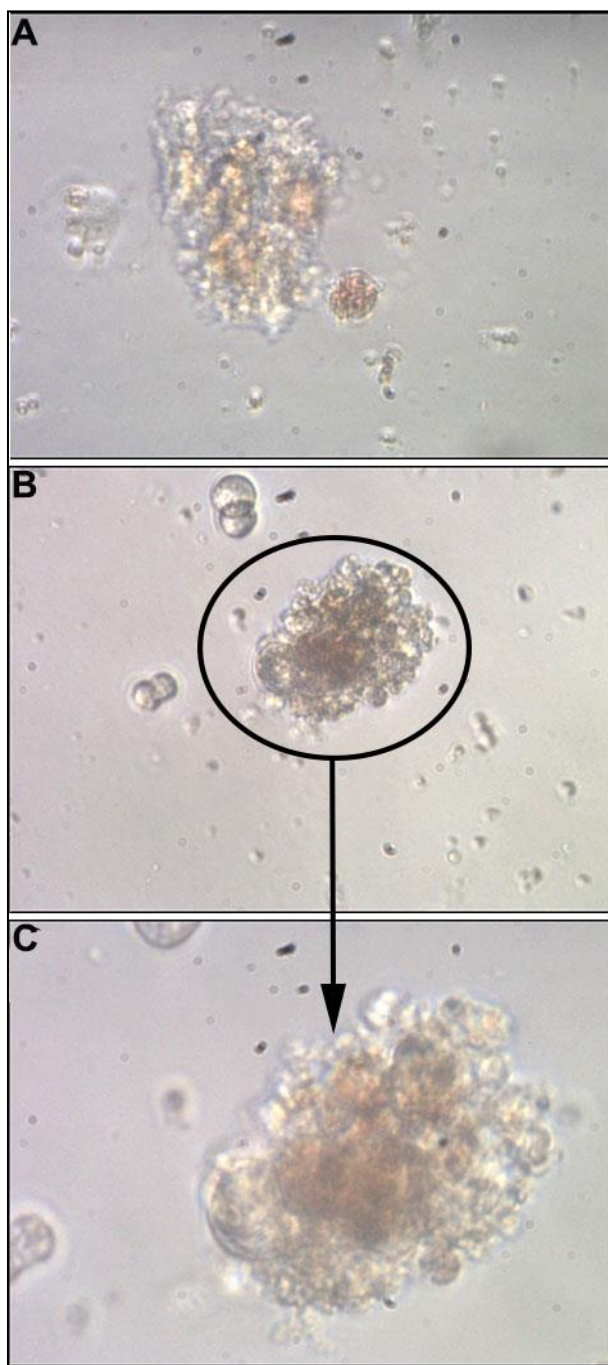
#### 4.1.2. Hronični stres stimuliše rast BFU-E i CFU-E ćelija u kostnoj srži i slezini miša

U okviru ispitivanja uticaja hroničnog psihološkog stresa na eritrocitopoezu, prvo su praćeni efekti hroničnog delovanja psihološkog stresora na rast i diferencijaciju opredeljenih matičnih ćelija za eritrocitopoezu. Rezultati prikazani na **Slici 9** pokazuju statistički značajno povećanje broja BFU-E i CFU-E ćelija u kostnoj srži (**Slika 9A, B**) i slezini (**Slika 9C, D**) stresiranih miševa u odnosu na kontrolne životinje.



**Slika 9.** Broj BFU-E i CFU-E ćelija u kostnoj srži (A, B) i slezini (C, D) netretiranih i hronično stresiranih miševa. K- kontrolne životinje; R7, R14 - životinje stresirane 7, odnosno 14 dana; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Pored promena u broju BFU-E progenitora u slezini hronično stresiranih miševa, pokazali smo da te ćelije imaju karakteristike tzv. „stress” BFU-E’ progenitora. Naime, za razliku od ostalih BFU-E progenitora, čiji je rast uslovljen prisustvom različitih faktora rasta, kolonije „stress” BFU-E ćelija smo detektovali u medijumu koji sadrži samo eritropoetin (**Slika 10**).



**Slika 10.** Kolonije „stres” BFU-E ćelija formirane nakon inkubacije splenocita hronično stresiranih miševa u medijumu M3334. Uveličanje objektiva x20 (A, B), x40 (C).

#### 4.1.3. Dejstvo hroničnog stresa na različite subpopulacije Ter119-pozitivnih ćelija u kostnoj srži i slezini miša

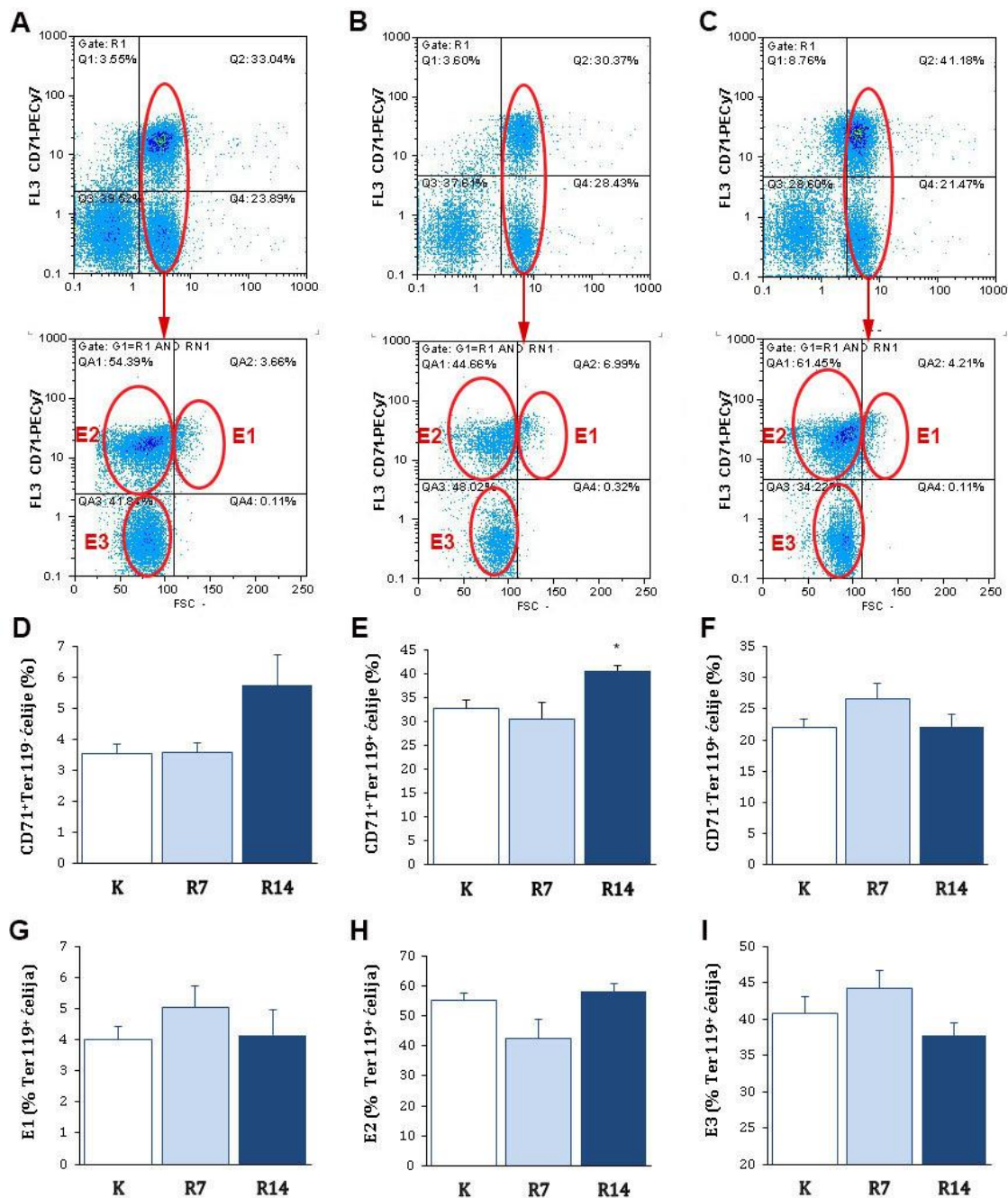
Budući da su prethodni rezultati pokazali izraženo povećanje broja ranih i kasnih opredeljenih matičnih ćelija za eritrocitopoezu u toku hroničnog stresa, u sledećem eksperimentu smo ispitivali dejstvo stresa na zrelije forme ćelija eritroidne loze – Ter119-pozitivne ćelije.

Metodom protočne citometrije, uz upotrebu markera CD71 i Ter119, analiziran je uticaj hroničnog psihološkog stresa na različite populacije eritroidnih ćelija u kostnoj srži. Na osnovu ekspresije navedenih markera izdiferencirane su tri osnovne populacije eritroidnih ćelija u različitim stadijumima zrelosti, koje su počev od nezreljih ka zrelijim oblicima označene kao: CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>-</sup>, CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> i CD71<sup>-</sup>Ter119<sup>+</sup> ćelije. Daljom analizom su ukupne Ter119-pozitivne ćelije razvrstane u subpopulacije (E1, E2 i E3) na osnovu njihove veličine i stepena ekspresije transferinskog receptora - CD71 (**Slika 11A, B, C**). Statistička obrada podataka je pokazala da 14 dana kontinuirane primene psihološkog stresora dovodi do značajnog povećanja broja CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> ćelija ( $p < 0,05$ ) u kostnoj srži, (**Slika 11D, E**), dok broj najzrelijih ćelija (CD71<sup>-</sup>Ter119<sup>+</sup>) ostaje nepromenjen u odnosu na kontrole (**Slika 11F**). Pored toga, hronični psihološki stres nije uticao ni na procentualnu zastupljenost različitih subpopulacija ukupnih Ter119-pozitivnih ćelija u kostnoj srži (**Slika 11G, H, I**).

U skladu sa podacima dobijenim metodom protočne citometrije, kvalitativna analiza preseka kostne srži, obojenih H&E, pokazala je prisustvo većeg broja eritroblastnih ostrvaca kod stresiranih životinja u poređenju sa kontrolama. Takođe, može se uočiti da je povećanje broja eritroblastnih ostrvaca u kostnoj srži stresiranih miševa izraženije nakon 14 dana stresa (**Slika 12**).

Uporedo sa praćenjem efekata psihološkog stresa na eritroidne ćelije u kostnoj srži, na identičan način je ispitivano i dejstvo stresa na različite populacije ovih ćelija u slezini miša (**Slika 13A, B, C**). Rezultati su pokazali značajno povećan broj CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>-</sup> i CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> ćelija ( $p < 0,01$ ) u slezini hronično stresiranih životinja, dok je izraženo povećanje broja CD71<sup>-</sup>Ter119<sup>+</sup> ćelija ( $p < 0,001$ ) uočeno tek nakon 14 dana stresa (**Slika 13D, E, F**). Takođe, hronični stres je uzrokovao značajne promene u procentualnoj zastupljenosti različitih subpopulacija Ter119-

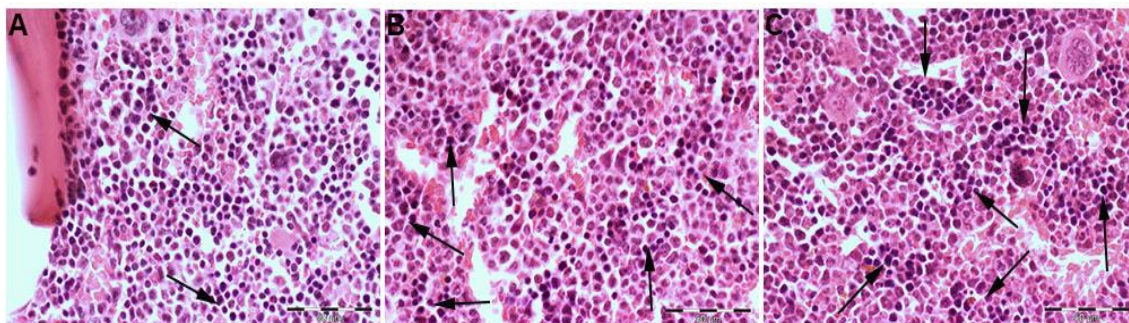
pozitivnih ćelija u slezini. Naime, nakon 7 i 14 dana svakodnevne primene stresora povećano je učešće nezreljih formi Ter119-pozitivnih ćelija ( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ) u



**Slika 11.** Efekti hroničnog psihološkog stresa na različite populacije i subpopulacije Ter119-pozitivnih ćelija u kostnoj srži. Analiza ukupnih Ter119-pozitivnih ćelija u kostnoj srži kontrolnih miševa (A) i miševa stresiranih 7 (B), odnosno 14 dana (C). Zastupljenost CD71+Ter119- (D), CD71+Ter119+ (E) i CD71-Ter119+ ćelija (F) u kostnoj srži kontrolnih i hronično stresiranih miševa. Procentualno učešće različitih subpopulacija Ter119-pozitivnih ćelija u kostnoj srži netretiranih i stresiranih miševa (G-I). K- kontrolne životinje; R7, R14 - životinje stresirane 7, odnosno 14 dana; \* $p<0,05$ .



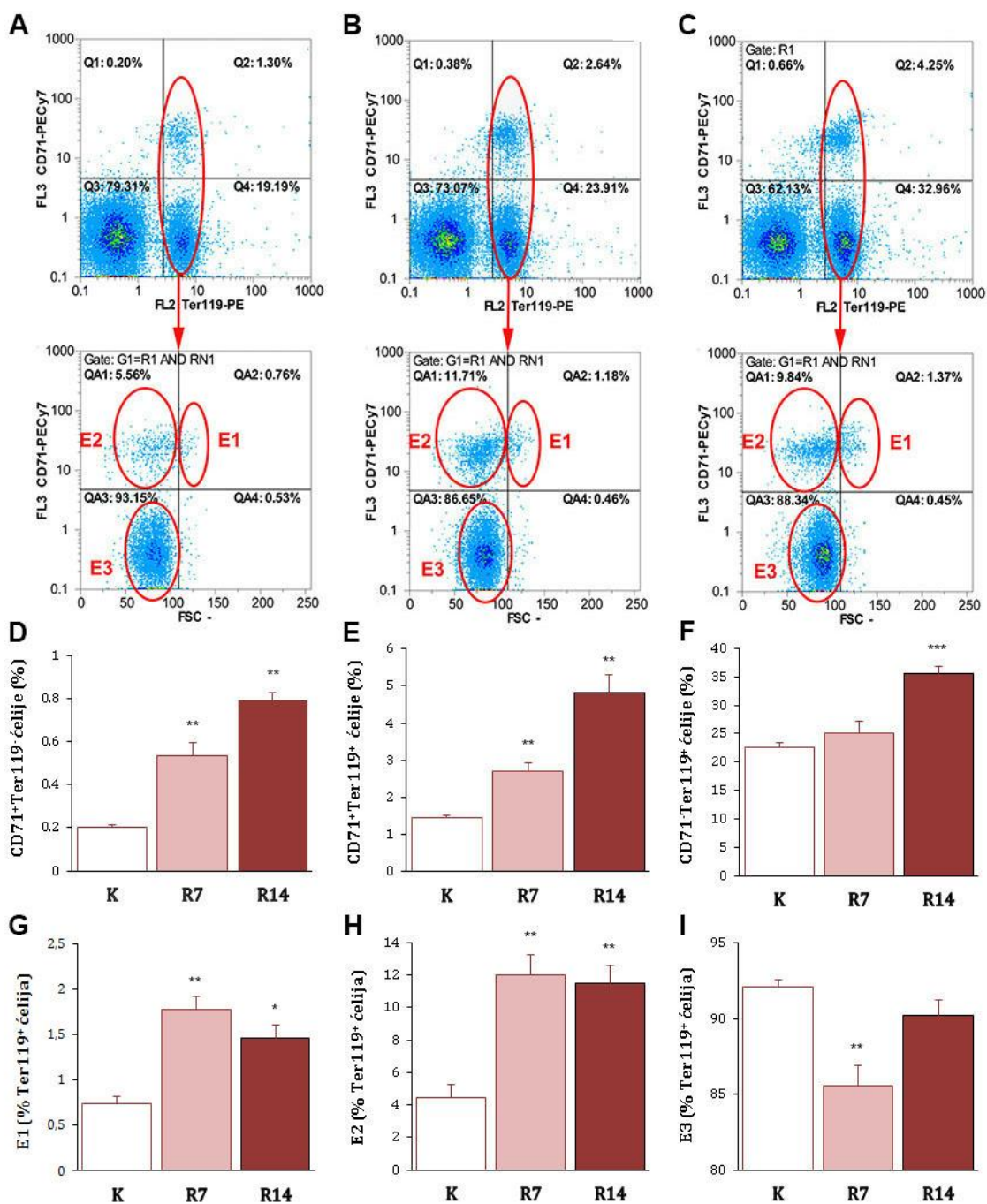
slezini stresiranih miševa (**Slika 13G, H**) dok je procenat zrelih eritrocita bio statistički značajno smanjen u slezini miševa stresiranih 7 dana (**Slika 13I**).



**Slika 12.** Eritroblastna ostrva u kostnoj srži kontrolnih miševa (A) i miševa stresiranih 7 (B), odnosno 14 dana (C). H&E, uveličanje objektiva x40.

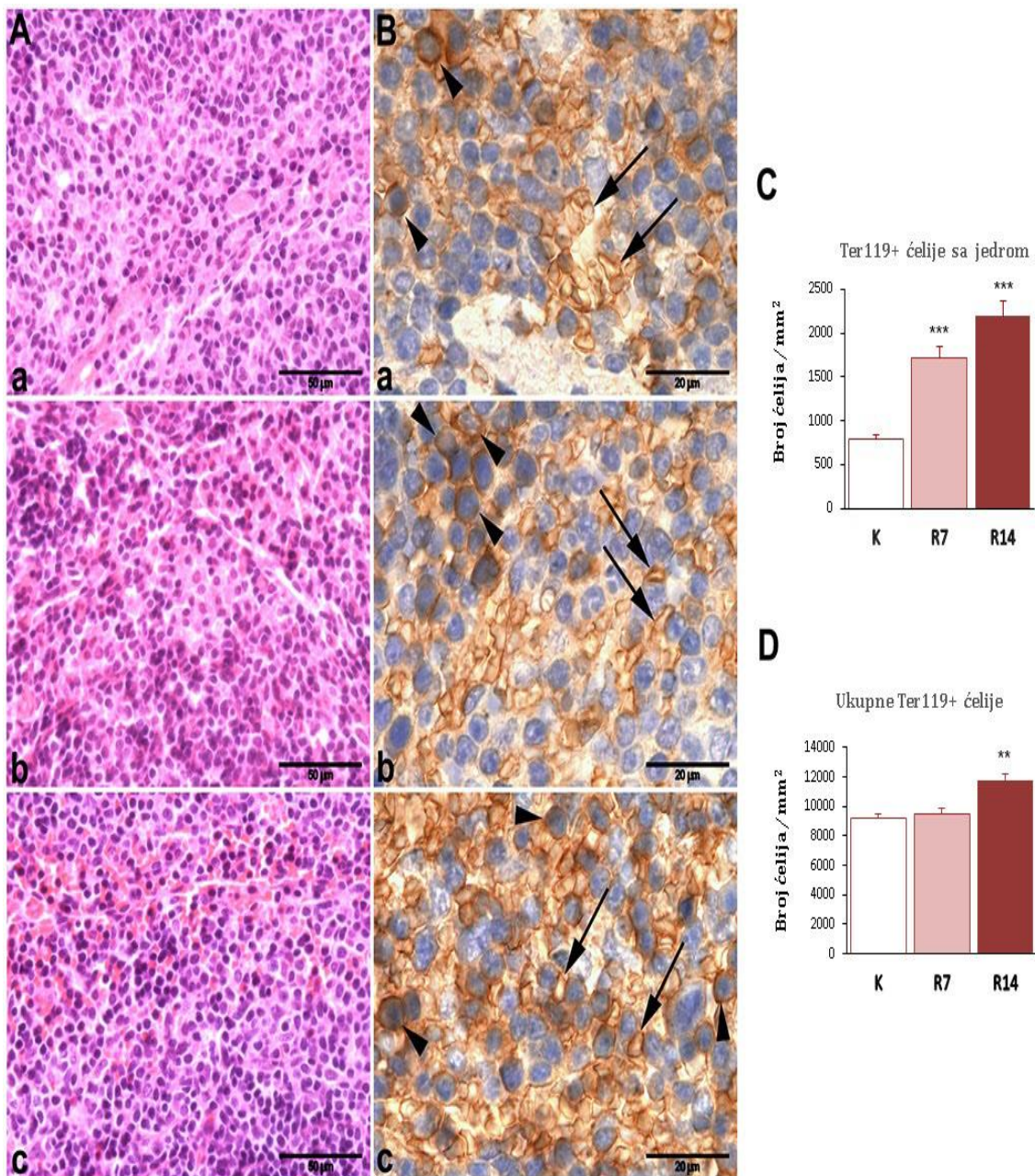
Pored protočne citometrije, za detekciju Ter119-pozitivnih ćelija u slezini koristili smo i imunohistohemijsku metodu. Morfometrijska analiza Ter119-pozitivnih ćelija u slezini podrazumevala je određivanje njihovog broja po 1 mm<sup>2</sup> crvene pulpe. S obzirom da se antigen Ter119 eksprimira na ćelijama eritroidne loze počev od proeritroblasta do zrelog eritrocita, ukupne Ter119-imunoreaktivne ćelije smo na osnovu prisustva/odsustva nukleusa razvrstali na eritroblaste (Ter119-pozitivne ćelije sa nukleusom) i zrele eritrocite (Ter119-pozitivne ćelije bez nukleusa) (**Slika 14B**). Statistička analiza dobijenih podataka je potvrdila markantno povećanje broja eritroblasta ( $p < 0,001$ ) u slezini miševa stresiranih 7 i 14 dana (**Slika 14Bb, c, 14C**) dok se broj ukupnih Ter119-imunoreaktivnih ćelija u slezini značajno povećao ( $p < 0,01$ ) tek nakon 14 dana stresa (**Slika 14Bc, 14D**).

U skladu sa prethodnim rezultatima, histološka analiza preseka slezine, obojenih H&E, pokazala je očuvanu strukturu i povećanu celularnost crvene pulpe kod stresiranih životinja (**Slika 14Ab, c**). Na histološkim preparatima urađena je stereološka analiza koja je obuhvatila određivanje volumenske gustine pojedinačnih komponenti tkiva slezine, kao i definisanje broja folikula u slezini ispitivanih miševa. Rezultati kvantitativne analize su ukazali na trend povećanja volumenske gustine crvene pulpe kod životinja izloženih hroničnom stresu, uz istovremeno smanjenje broja folikula i volumenske gustine bele pulpe u slezini ovih životinja. Međutim, navedene razlike u strukturi slezine kontrolnih i stresiranih miševa nisu dostigle statističku značajnost (**Tabela 6**).



**Slika 13.** Efekti hroničnog psihološkog stresa na različite populacije i subpopulacije Ter119-pozitivnih ćelija u slezini. Analiza ukupnih Ter119-pozitivnih ćelija u slezini kontrolnih miševa (A) i miševa stresiranih 7 (B), odnosno 14 dana (C). Zastupljenost CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> (D), CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> (E) i CD71<sup>-</sup>Ter119<sup>+</sup> ćelija (F) u slezini kontrolnih i hronično stresiranih miševa. Procentualno učešće različitih subpopulacija Ter119-pozitivnih ćelija u slezini netretiranih i stresiranih miševa (G-I). K- kontrolne životinje; R7, R14 - životinje stresirane 7, odnosno 14 dana; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .





**Slika 14.** Promene u crvenoj pulpi i broju Ter119-imunoreaktivnih ćelija u slezini uzrokovane hroničnim stresom. Crvena pulpa (A) i Ter119-imunoreaktivne ćelije (B) u slezini kontrolnih miševa (a), i miševa stresiranih 7 (b) ili 14 dana (c). Kratke strelice pokazuju Ter119-imunoreaktivne ćelije sa jedrom dok duge strelice označavaju Ter119-pozitivne ćelije bez jedra. Broj Ter119-imunoreaktivnih ćelija sa jedrom (C) i broj ukupnih Ter119-pozitivnih ćelija (D) po jedinici površine crvene pulpe kontrolnih i hronično stresiranih životinja. K- kontrolne životinje; R7, R14 - životinje stresirane 7, odnosno 14 dana; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . H&E, uveličanje objektiva x40; IHH, x100

**Tabela 6.** Volumenske gustine sastavnih komponenti slezine i broj folikula u slezini

<b>Vv</b>	<b>Kontrole</b>	<b>R7</b>	<b>R14</b>
Crvena pulpa	0,49 ± 0,034	0,52 ± 0,049	0,53 ± 0,039
Folikuli sa PALS	0,30 ± 0,019	0,29 ± 0,032	0,26 ± 0,026
MS + MZ	0,06 ± 0,017	0,06 ± 0,007	0,08 ± 0,021
Kapsula + trabekule	0,04 ± 0,004	0,04 ± 0,005	0,05 ± 0,005
Zona ispod kapsule	0,11 ± 0,012	0,09 ± 0,012	0,10 ± 0,011
Broj folikula po preseku	45,2 ± 4,71	40,6 ± 2,61	44,9 ± 7,78
Broj folikula po 1mm <sup>2</sup>	4,26 ± 0,46	3,67 ± 0,26	3,58 ± 0,39

*Vv* – volumenska gustina; *MS* – marginalni sinus; *MZ* – marginalna zona. *R7*- životinje stresirane 7 dana; *R14* - životinje stresirane 14 dana.

#### **4.2. MEDIJATORI DEJSTVA HRONIČNOG STRESA NA EKSTRAMEDULARNU ERITROCITOPOEZU**

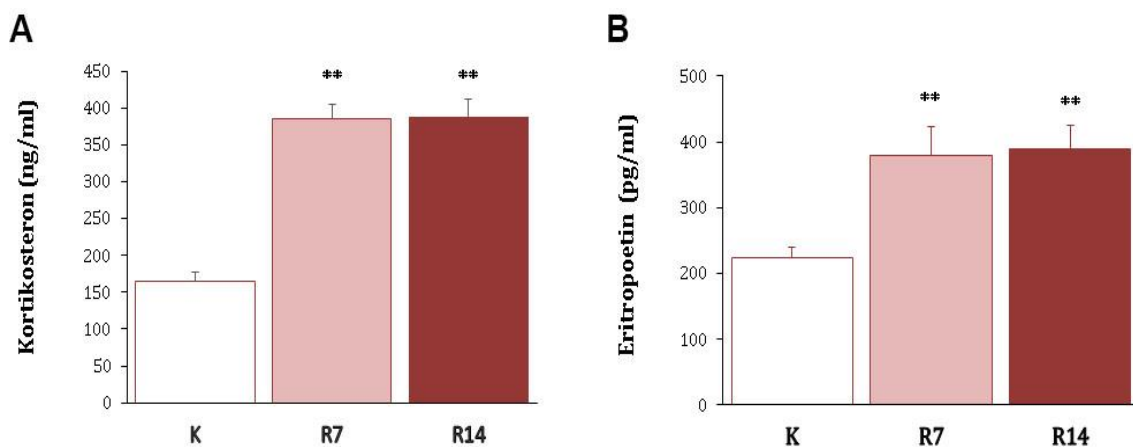
S obzirom da su dobijeni rezultati ukazali na činjenicu da hronični psihološki stres dovodi do stimulacije procesa eritrocitopoeze prevashodno u slezini, dalja istraživanja su bila usmerena na identifikaciju potencijalnih medijatora u dejstvu stresa na ekstramedularnu eritrocitopoezu.

##### **4.2.1. Hronični stres povećava nivo kortikosterona i eritropoetina u cirkulaciji, a smanjuje ekspresiju GR i EpoR u slezini miša**

U cilju ispitivanja potencijalnih medijatora stimulišućeg dejstva hroničnog stresa na proces formiranja eritrocita u slezini, pošli smo od pretpostavke da u ovom procesu učestvuju glukokortikoidi, kao glavni medijatori stresa, i eritropoetin, kao osnovni regulator eritrocitopoeze.

Budući da hronični psihološki stres aktivira osovinu hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda, u cirkulaciji ispitivanih miševa prvo smo odredili nivo kortikosterona kao najpouzdanijeg markera stresa. Koncentracija kortikosterona

je bila značajno veća u plazmi hronično stresiranih miševa ( $p < 0,01$ ) u odnosu na vrednost ovog hormona izmerenu kod kontrolnih životinja (**Slika 15A**).

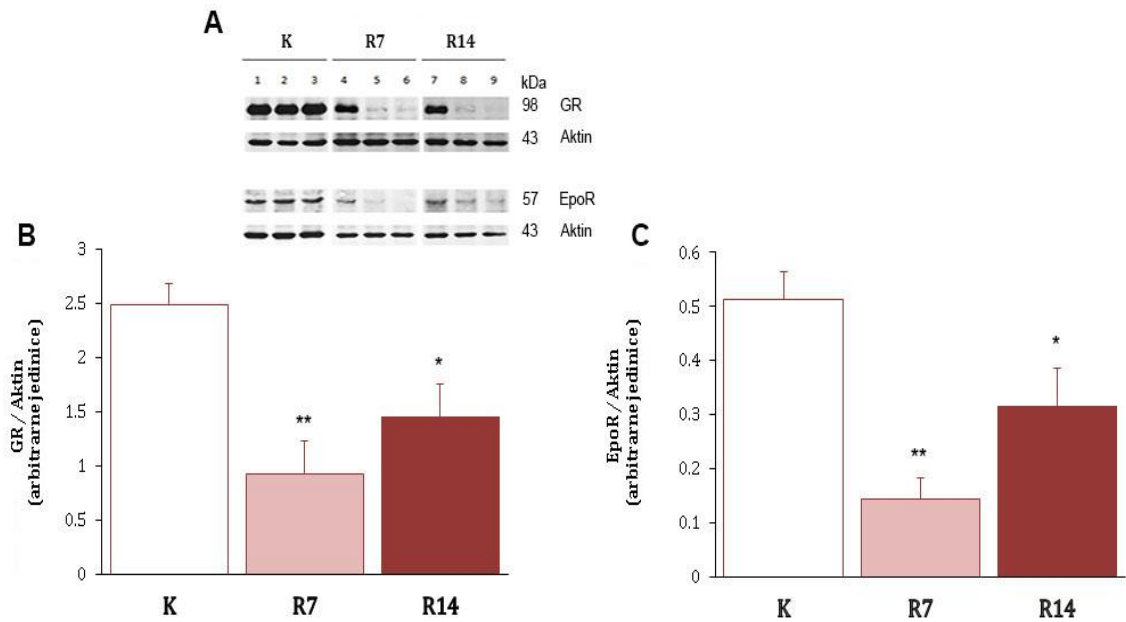


**Slika 15.** Koncentracije kortikosterona (A) i eritropoetina (B) u plazmi kontrolnih i stresiranih miševa. K- kontrolne životinje; R7, R14 - životinje stresirane 7, odnosno 14 dana; \*\* $p < 0,01$ .

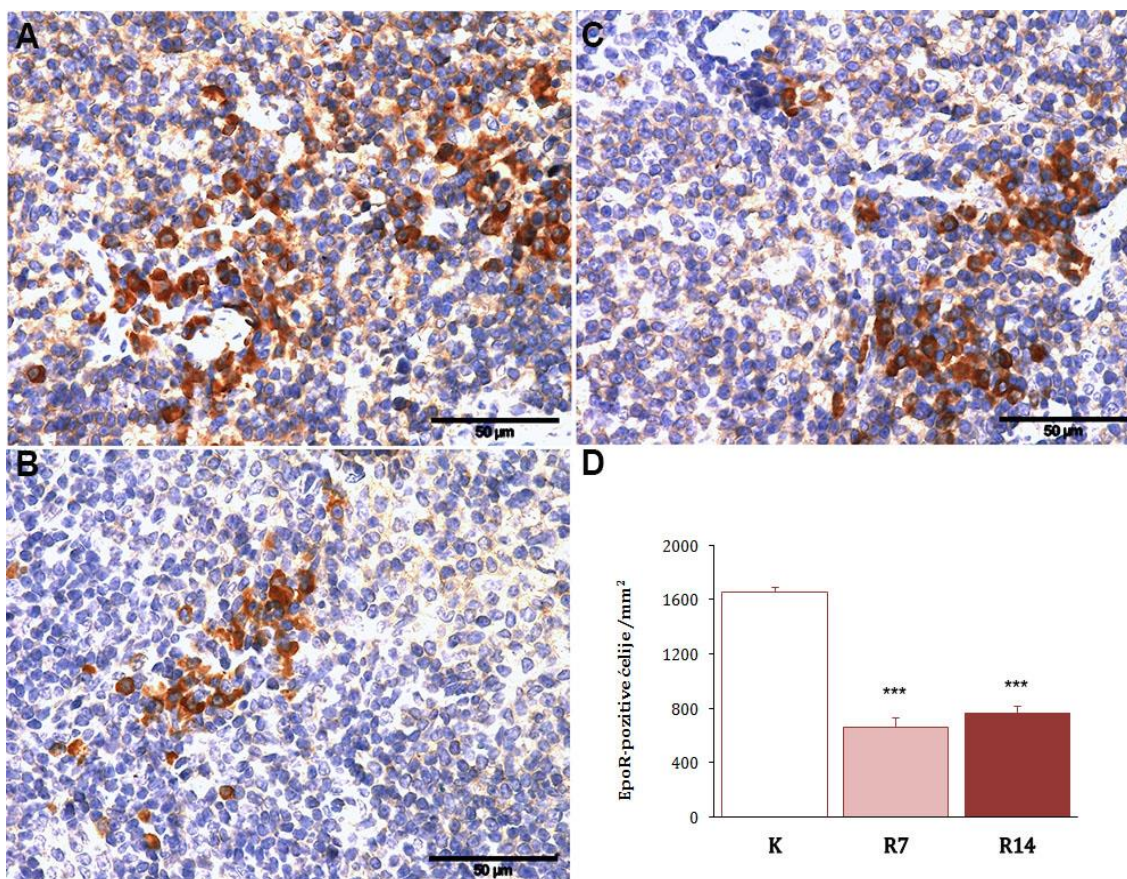
Takođe je ispitivano da li hronični psihološki stress utiče na koncentraciju eritropoetina u cirkulaciji. Poređenjem nivoa eritropoetina u plazmi kontrolnih i hronično stresiranih miševa, ustanovljeno je značajno povećanje koncentracije ovog hormona u cirkulaciji ( $p < 0,01$ ) nakon 7 i 14 dana stresa (**Slika 15B**).

Pored toga, praćeni su efekti hroničnog stresa na ekspresiju GR i EpoR u slezini (**Slika 16A**). Korišćenjem tehnike *Western blot*, uz upotrebu specifičnih antitela, u uzorcima slezine ispitivanih životinja detektovani su proteini molekulske mase od 98 kDa (GR) i 57 kDa (EpoR). Zatim je postupkom denzitometrije određen stepen ekspresije ovih receptora u ukupnom ćelijskom lizatu kontrolnih i stresiranih životinja. Rezultati statističke obrade su ukazali na značajno smanjenje ekspresije oba receptora u slezini miševa stresiranih 7 ( $p < 0,01$ ) ili 14 ( $p < 0,05$ ) dana (**Slika 16B, C**). Takođe, analizom ekspresije ovih receptora u svakom pojedinačnom uzorku slezine, zapaženo je da je veći stepen smanjenja ekspresije GR praćen većim stepenom smanjenja ekspresije EpoR, i obrnuto (**Slika 16A**). Dodatnu potvrdu redukovane ekspresije GR i EpoR u slezini tokom hroničnog stresa obezbedio je nalaz značajno smanjenog broja GR- i EpoR- imunoreaktivnih ćelija ( $p < 0,001$ ) u crvenoj pulpi stresiranih miševa (**Slike 17, 18**).

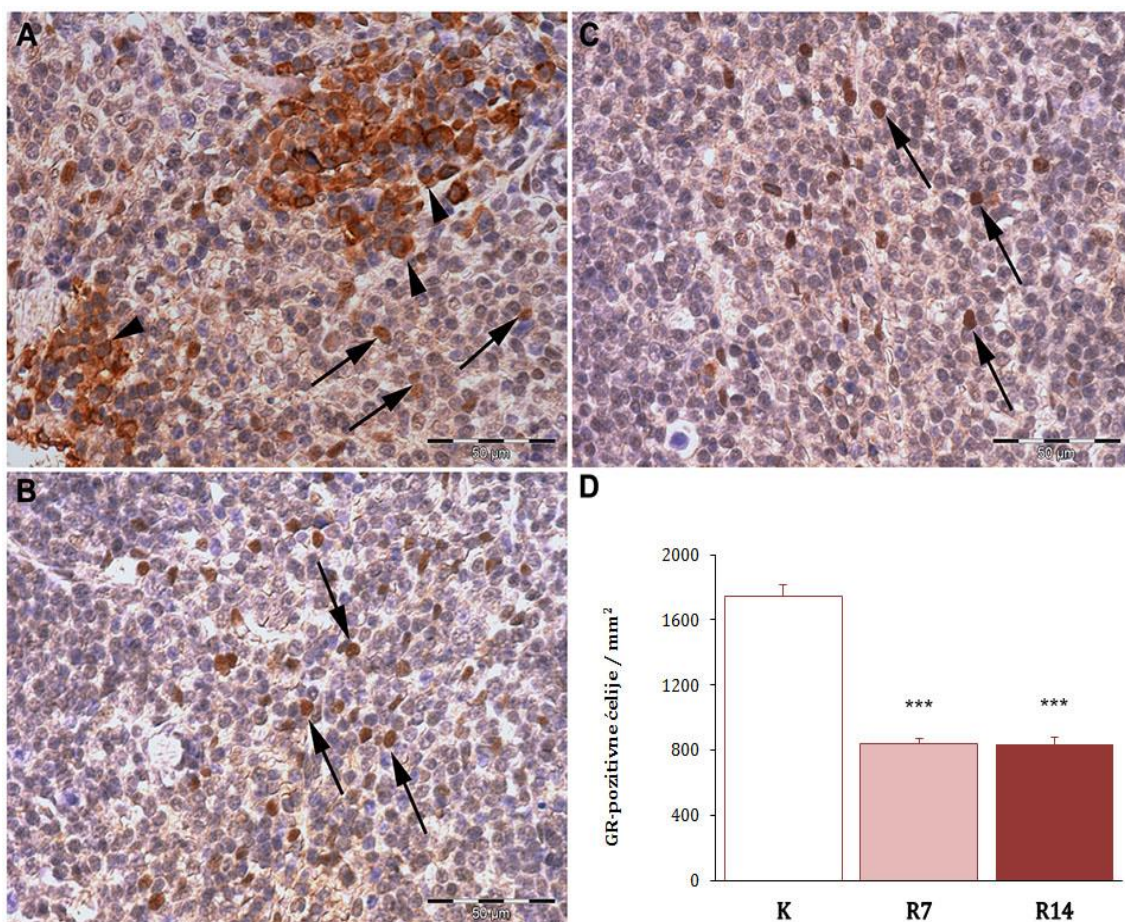




**Slika 16.** Ekspresija GR i EpoR u slezini kontrolnih i stresiranih miševa. A) Denzitometrijska analiza imunoreaktivnih traka (B, C). K- kontrolne životinje; R7, R14 - životinje stresirane 7, odnosno 14 dana; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .



**Slika 17.** EpoR-imunoreaktivne ćelije u crvenoj pulpi slezine kontrolnih miševa (A) i miševa stresiranih 7 (B) ili 14 dana (C). Broj EpoR-imunoreaktivnih ćelija po jedinici površine crvene pulpe u kontrolnih i stresiranih životinja (D). K- kontrolne, R7, R14 - stresirane životinje; \*\*\* $p < 0,001$ . IHH, uveličanje objektiva x40.



**Slika 18.** GR-imunoreaktivne ćelije u crvenoj pulpi slezine kontrolnih miševa (A) i miševa stresiranih 7 (B) ili 14 dana (C). Kratke strelice označavaju imunoreaktivnost na GR u citoplazmi dok duge strelice pokazuju GR-imunoreaktivnost u nukleusu. Broj GR-imunoreaktivnih ćelija po jedinici površine crvene pulpe u kontrolnih i stresiranih životinja (D). K- kontrolne, R7, R14 - stresirane životinje; \*\*\* $p < 0,001$ . IHH, uveličanje objektiva x40.

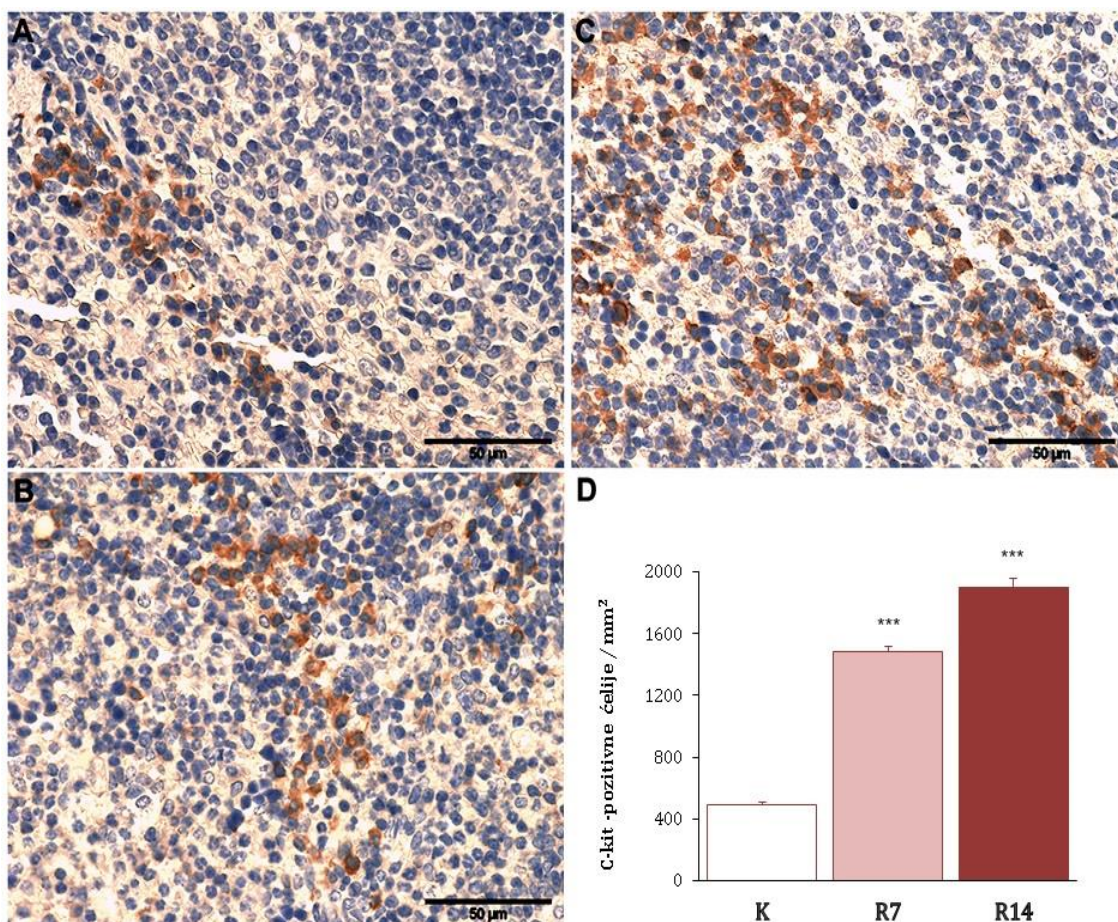
#### 4.2.2. Povećana ekspresija c-Kit receptora u slezini miša tokom hroničnog stresa

Opšte je poznato da *stem cell factor* ima značajnu ulogu u regulaciji hematopoeze, kako u bazalnim uslovima, tako i u brojnim stanjima povećanih potreba organizma za eritrocitopoezom. Naime, vezujući se za c-Kit receptor, *stem cell factor* stimuliše rast i proliferaciju opredeljenih matičnih ćelija za eritroidnu lozu.

S obzirom da je visok stepen ekspresije c-Kit receptora karakterističan za nezrele ćelije eritroidne loze, koristeći imunohistohemiju ispitali smo ekspresiju ovog receptora u crvenoj pulpi slezine kod kontrolnih i stresiranih miševa (Slika 19A; B, C). Poređenjem broja c-Kit-imunoreaktivnih ćelija u slezini netretiranih i



stresiranih životinja, utvrđeno je da hronični stres dovodi do izraženog povećanja ekspresije ovog receptora u crvenoj pulpi ( $p < 0,001$ ) (**Slika 19D**).



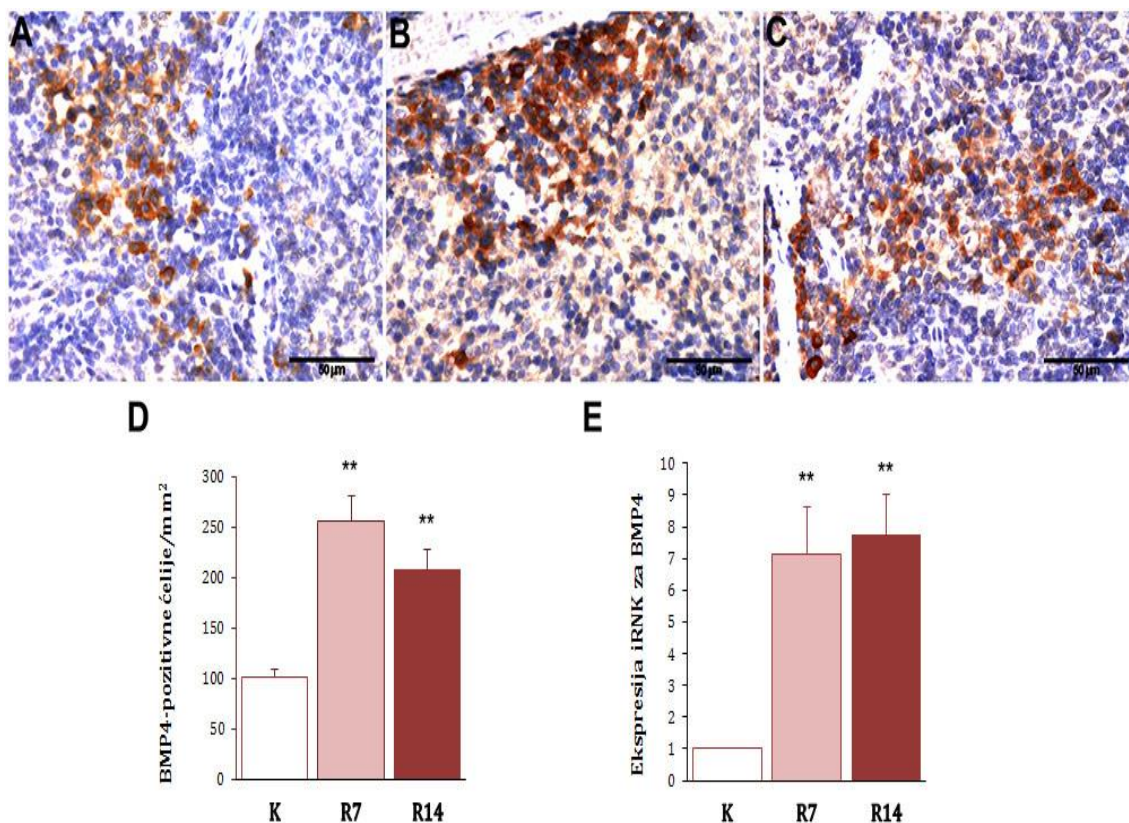
**Slika 19.** C-Kit-imunoreaktivne ćelije u crvenoj pulpi slezine kontrolnih miševa (A) i miševa stresiranih 7 (B) ili 14 dana (C). Razlike u broju c-Kit-imunoreaktivnih ćelija između kontrolnih i stresiranih životinja. K- kontrolne životinje; R7, R14 - životinje stresirane 7, odnosno 14 dana; \*\*\* $p < 0,001$ . IHH, uveličanje objektiva x40.

#### 4.2.3. Signalni molekul BMP4 učestvuje u aktivaciji ekstramedularne eritrocitopoeze indukovane hroničnim stresom

Imajući u vidu ključnu ulogu molekula BMP4 u regulaciji stimulisane eritrocitopoeze uzrokovane anemijom, u daljem istraživanju smo pošli od pretpostavke da bi isti signalni molekul mogao biti uključen i u kontrolu procesa eritrocitopoeze indukovane hroničnim stresom.

U cilju ispitivanja uloge BMP4 u eritrocitopoezi tokom hroničnog psihološkog stresa, prvo je praćena ekspresija ovog molekula u slezini na genskom i proteinskom nivou. Metodom qRT-PCR kvantifikovana je ekspresija gena *BMP4* u

slezini ispitivanih životinja i rezultati su pokazali višestruko povećanje nivoa infromacione RNK (iRNK) kod stresiranih miševa u poređenju sa kontrolama ( $p<0,01$ ) (Slika 20E).

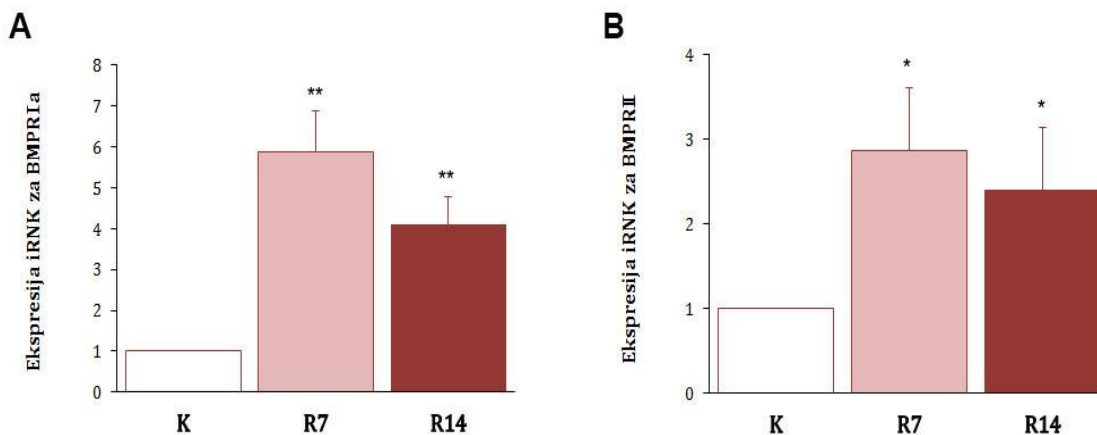


**Slika 20.** Ekspresija BMP4 u slezini tokom hroničnog stresa. BMP4-imunoreaktivne ćelije u crvenoj pulpi slezine kontrolnih miševa (A) i miševa stresiranih 7 (B) ili 14 dana (C). Razlike u broju BMP4-pozitivnih ćelija (D) i ekspresiji iRNK za BMP4 u slezini ispitivanih životinja (E). Relativna ekspresija iRNK za BMP4 je kvantifikovana u odnosu na ekspresiju iRNK za GAPDH. K- kontrolne životinje; R7, R14 - životinje stresirane 7, odnosno 14 dana; \*\* $p<0,01$ . IHH, uveličanje objektiva  $\times 40$ .

Takođe, imunohistohemijском tehnikom detektovano je prisustvo proteina BMP4 u ćelijama crvene pulpe slezine kontrolnih i stresiranih miševa (Slika 20A, B, C), a kvantitativna analiza je ukazala na značajno povećan broj BMP4-imunoreaktivnih ćelija ( $p<0,01$ ) u crvenoj pulpi miševa stresiranih 7 ili 14 dana (Slika 20D).

Kako su razlike u zastupljenosti BMP4 u slezini kontrolnih i tretiranih životinja potvrdile hipotezu o ulozi ovog molekula u ispitivanom procesu, sledeći zadatak se odnosio na kvantifikaciju ekspresije gena za njegove receptore –

BMPRIa i BMPRII. Analiza ekspresije ovih gena je pokazala značajno povećanje nivoa iRNK za BMPRIa ( $p < 0,01$ ) i BMPRII ( $p < 0,05$ ) u slezini miševa nakon 7 i 14 dana izlaganja stresu (**Slika 21**).



**Slika 21.** Ekspresija iRNK za BMPRIa i BMPRII u slezini tokom hroničnog stresa. Relativna ekspresija iRNK za receptore je kvantifikovana u odnosu na ekspresiju iRNK za GAPDH. K- kontrolne životinje; R7, R14 - životinje stresirane 7, odnosno 14 dana; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

#### 4.3. ULOGA GR U DEJSTVU HRONIČNOG STRESA NA RAST BFU-E I CFU-E ČELIJA U SLEZINI

Da bi se definisala uloga GR u eritrocitopoezi u toku hroničnog stresa, pre svakodnevne primene stresora receptori su blokirani sa RU486. Nakon toga su praćeni efekti blokade GR na nivo kortikosterona u cirkulaciji, broj BFU-E i CFU-E ćelija u slezini, kao i na relativnu masu ovog organa.

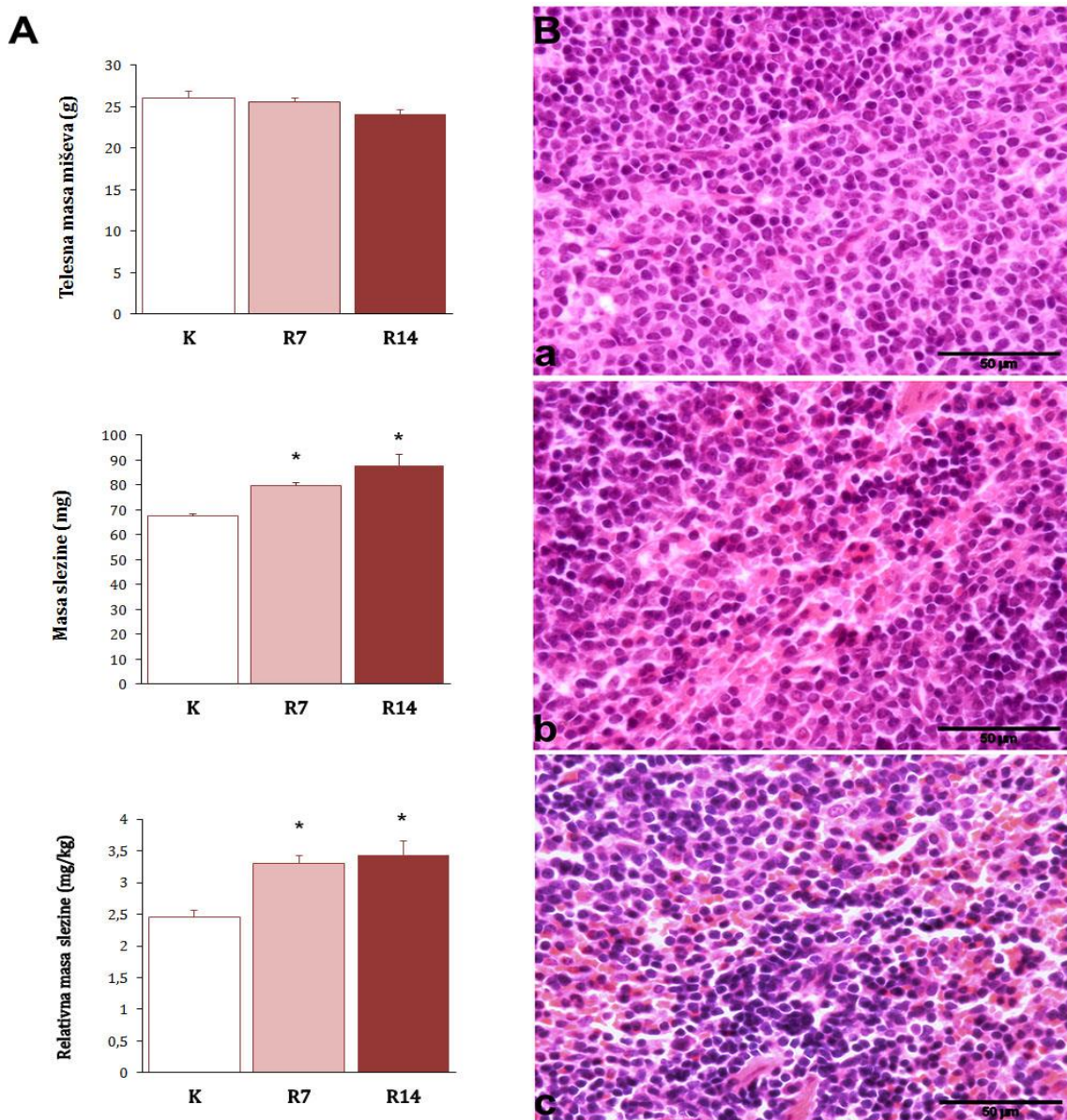
Naši rezultati su pokazali da hronični stres u trajanju od 7 ili 14 dana povećava celularnost crvene pulpe i relativnu masu slezine ( $p < 0,05$ ) (**Slika 22**). Blokada GR je dovela do blagog smanjenja relativne mase ovog organa kod stresiranih životinja (**Slika 23**) koje nije dostiglo statističku značajnost ( $p > 0,05$ ).

U ovom eksperimentu potvrđene su povećane vrednosti kortikosterona u plazmi stresiranih miševa, a primena mifepristona u dozi od 50 mg/kg pre svakodnevnog izlaganja stresu nije dovela do značajne promene u koncentraciji ovog hormona ( $p > 0,05$ ) u cirkulaciji ispitivanih životinja. Takođe, uočeno je da hronična primena mifepristona kod nestresiranih životinja povećava nivo



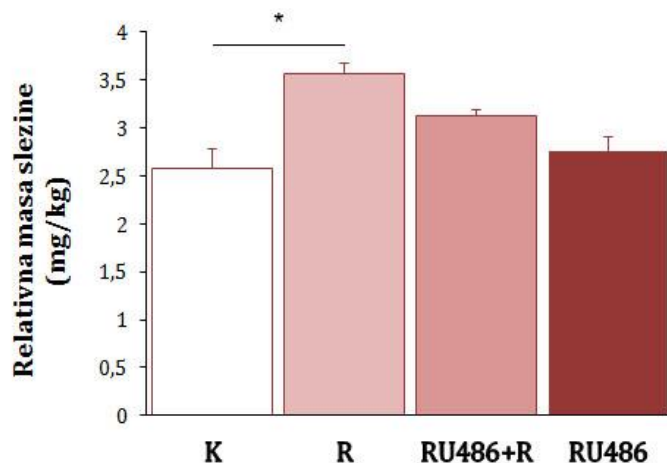
kortikosterona u cirkulaciji, ali dobijeno povećanje nije statistički značajno (Slika 24).

Pored toga, na isti način je ispitivana i uloga GR u dejstvu hroničnog stresa na rast i diferencijaciju opredeljenih matičnih ćelija za eritroidnu lozu u slezini. Rezultati su potvrdili da hronični stres u trajanju od 7 dana povećava broj BFU-E ćelija ( $p < 0,05$ ), a blokada GR pre svakodnevne primene stresora ne utiče na broj

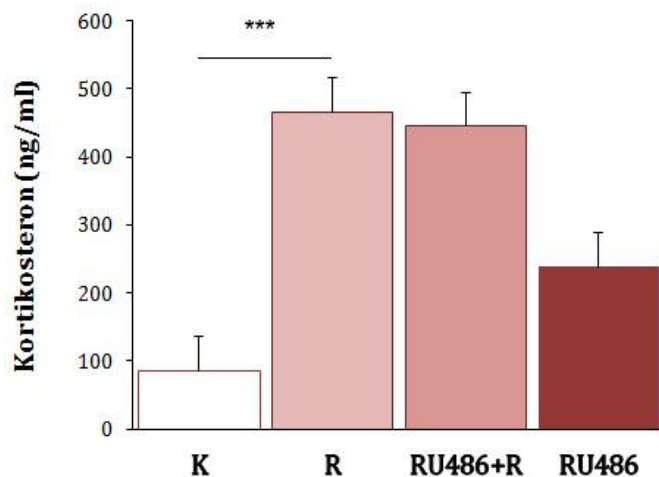


**Slika 22.** Efekti hroničnog psihološkog stresa na relativnu masu slezine i celularnost crvene pulpe. Telesna masa miševa i razlike u relativnoj masi slezine između kontrolnih i stresiranih životinja (A). Crvena pulpa kontrolnih miševa (Ba) i miševa stresiranih 7 (Bb), odnosno 14 dana (Bc). K- kontrolne životinje; R7, R14 - životinje stresirane 7, odnosno 14 dana; \* $p < 0,05$ . H&E, uveličanje objektiva x40.

ovih progenitorskih ćelija u slezini stresiranih životinja. Međutim, hronična primena mifepristona je uzrokovala povećanje broja BFU-E ćelija u slezini nestresiranih miševa (**Slika 25**).

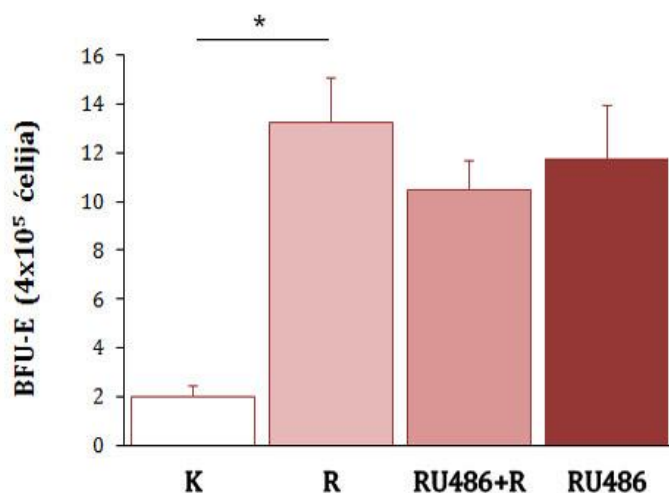


**Slika 23.** Efekti stresa i blokade GR na relativnu masu slezine. K – kontrolne životinje, R- životinje stresirane 7 dana uzastopno, RU486+R – životinje kojima su blokirani GR pre svakodnevne primene stresora, RU486 – nestresirani miševi sa svakodnevnom blokadom GR u trajanju 7 dana, \* $p < 0,05$ .

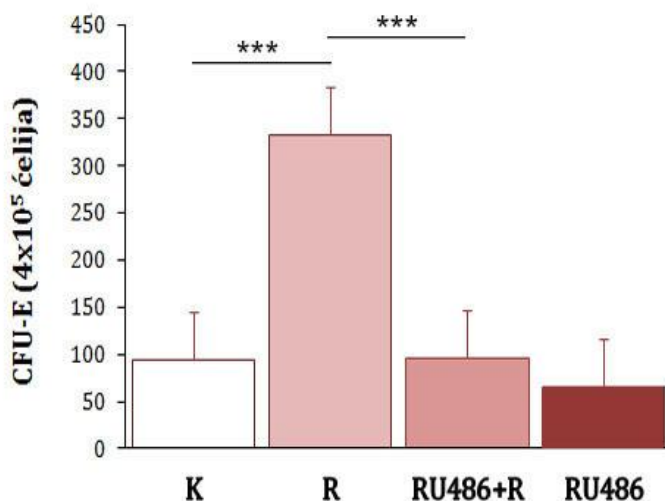


**Slika 24.** Efekti stresa i blokade GR na nivo kortikosterona u plazmi. K – kontrolne životinje, R- životinje stresirane 7 dana uzastopno, RU486+R – životinje kojima su blokirani GR pre svakodnevne primene stresora, RU486 – nestresirani miševi sa svakodnevnom blokadom GR u trajanju 7 dana, \*\*\* $p < 0,001$ .

Izloženost hroničnom stresu je takođe dovela do markantnog povećanja broja kasnih opredeljenih matičnih ćelija za eritroidnu lozu u slezini ( $p < 0,001$ ), a hronična blokada GR je u potpunosti sprečila stimulišući efekat hroničnog stresa na CFU-E ćelije (**Slika 26**).



**Slika 25.** Efekti stresa i blokade GR na BFU-E ćelije u slezini. K – kontrolne životinje, R – životinje stresirane 7 dana uzastopno, RU486+R – životinje kojima su blokirani GR pre svakodnevnih primena stresora, RU486 – nestresirani miševi sa svakodnevnom blokadom GR u trajanju od 7 dana,  $*p < 0,05$ .



**Slika 26.** Efekti stresa i blokade GR na CFU-E ćelije u slezini. K – kontrolne životinje, R – životinje stresirane 7 dana uzastopno, RU486+R – životinje kojima su blokirani GR pre svakodnevnih primena stresora, RU486 – nestresirani miševi sa svakodnevnom blokadom GR u trajanju od 7 dana,  $***p < 0,001$ .

#### **4.4. ULOGA MIF U DEJSTVU HRONIČNOG STRESA NA ERITROCITOPOEZU U KOSTNOJ SRŽI I SLEZINI**

Sledeći zadatak se odnosio na ispitivanje inhibitornih mehanizama koji bi sprečili prekomernu ekspanziju nezrelih ćelija eritroidne loze u hroničnom stresu, a čija bi neadekvatna aktivacija mogla dovesti do eritroleukemijske transformacije ovih ćelija.

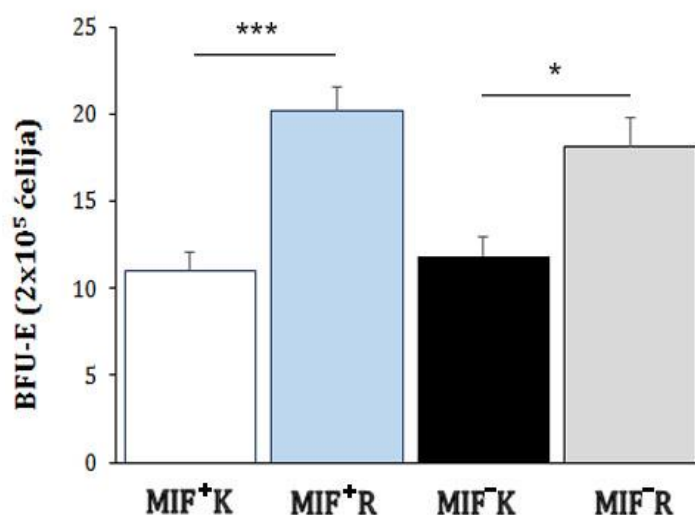
S obzirom da rezultati najnovijih istraživanja ukazuju na veoma značajnu ulogu makrofaga u regulaciji eritrocitopoeze, kako u fiziološkim uslovima, tako i u patološkim stanjima povećane produkcije eritrocita, u daljim istraživanjima smo pošli od pretpostavke da bi se poremećaj u funkciji makrofaga mogao odraziti na eritrocitopoezu u hroničnom stresu. Budući da kretanje makrofaga kroz ciljno tkivo predstavlja neophodan preduslov za ostvarivanje njihove funkcije, narednim eksperimentalnim pristupom je ispitivana uloga MIF u dejstvu hroničnog stresa na eritrocitopoezu u kostnoj srži i slezini miša.

##### **4.4.1. MIF ne učestvuje u regulaciji eritrocitopoeze indukovane hroničnim stresom u kostnoj srži**

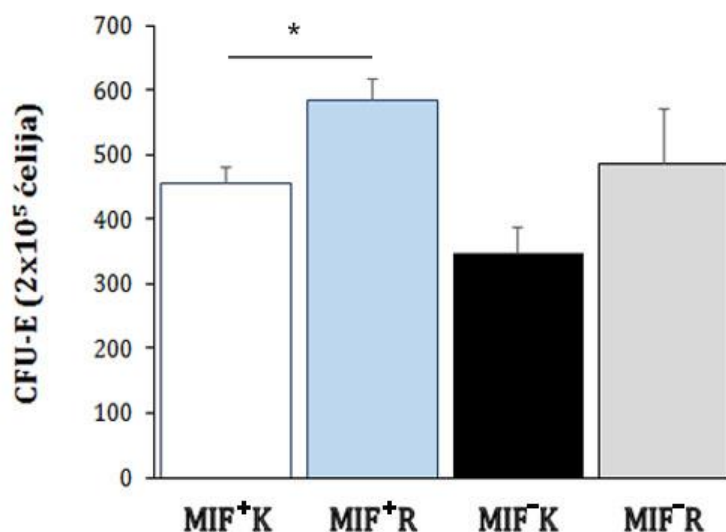
Da bi se ispitala uloga MIF u regulaciji eritrocitopoeze tokom hroničnog stresa, paralelno je praćen efekat psihološkog stresa na eritrocitopoezu kod *wild-type* и MIF *knockout* miševa soja C57/Bl6. Na ovom soju miševa smo takođe potvrdili da hronični psihološki stres u trajanju od 7 dana stimuliše eritrocitopoezu povećavajući broj BFU-E i CFU-E progenitora u kostnoj srži. Sličan nalaz je dobijen i u kostnoj srži MIF *knockout* miševa, a rezultati dvofaktorske ANOVA su pokazali da MIF ne utiče na broj opredeljenih matičnih ćelija za eritroidnu lozu u kostnoj srži ispitivanih životinja ( $p > 0,05$ ) (**Slike 27 i 28**).

Dalja istraživanja obuhvatila su citofluorometrijsku analizu eritroidnih prekursora u uslovima hroničnog psihološkog stresa. Na osnovu ekspresije markera CD71 i Ter119, sve prekursorske ćelije eritroidne loze su podeljene na tri osnovne populacije i praćeni su efekti hroničnog stresa na njihovu zastupljenost u kostnoj srži *wild-type* i MIF *knockout* miševa (**Slika 29**). Delovanje stresa u trajanju od 14 dana je značajno povećalo broj nezrelih CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> prekursora u kostnoj srži i kod *wild-type* i kod MIF *knockout* miševa ( $p < 0,05$ ), ali nije uticalo na broj

zrelijih - CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> ćelija (**Slika 29E i F**). Takođe, hronični stres nije doveo do promena u procentualnoj zastupljenosti različitih subpopulacija Ter119-pozitivnih ćelija u kostnoj srži *wild-type* miševa, a kod MIF *knockout* miševa je detektovano povećano učešće nezrelijih ćelija nakon 14 dana stresa (**Slika 30**).

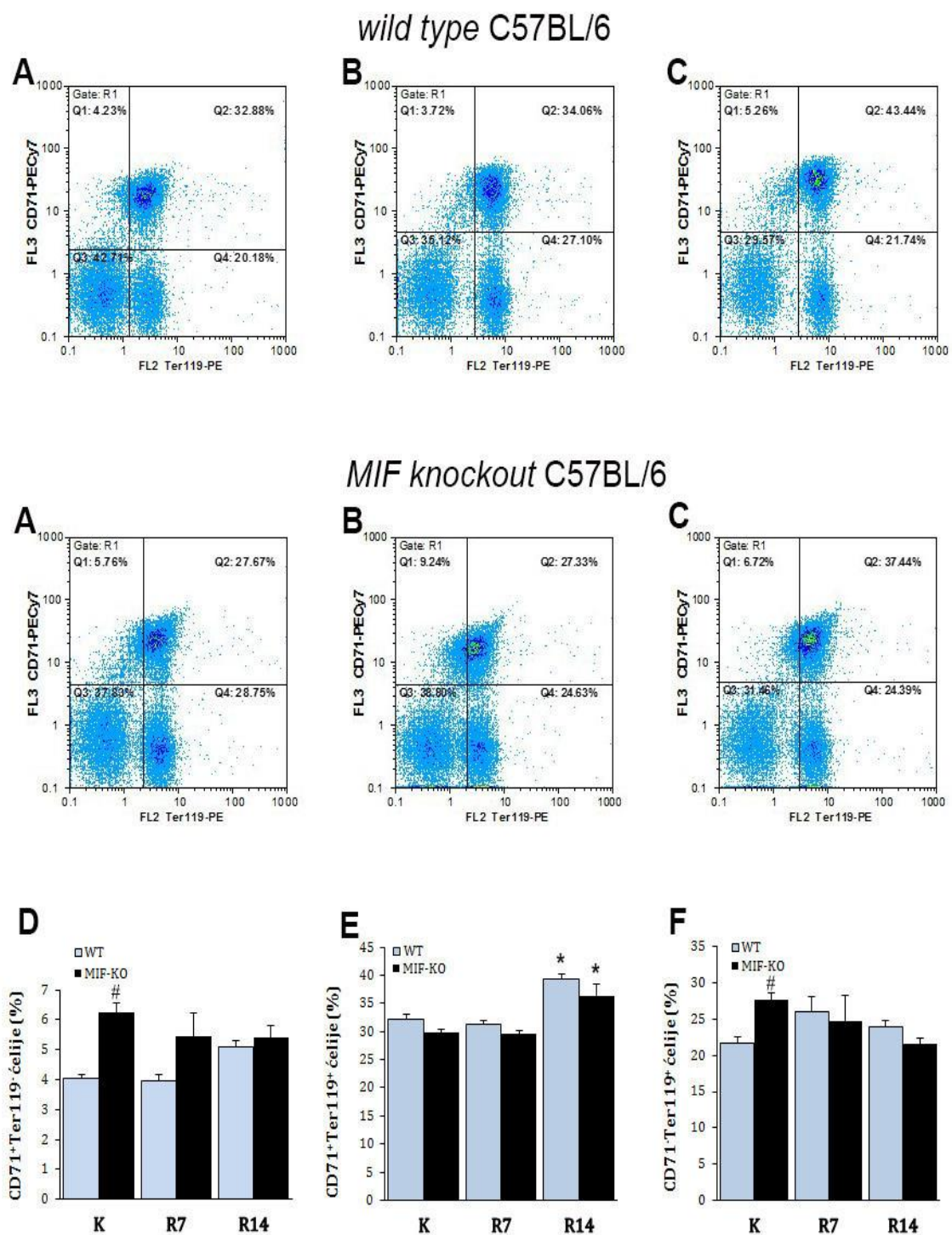


**Slika 27.** Efekti stresa i MIF na BFU-E ćelije u kostnoj srži. MIF<sup>+</sup>K - *wild-type* kontrolni miševi, MIF<sup>+</sup>R- *wild-type* miševi stresirani 7 dana uzastopno, MIF<sup>-</sup>K - MIF *knockout* kontrolni miševi, MIF<sup>-</sup>R - MIF *knockout* miševi stresirani 7 dana uzastopno. \**p*<0,05, \*\*\**p*<0,001.

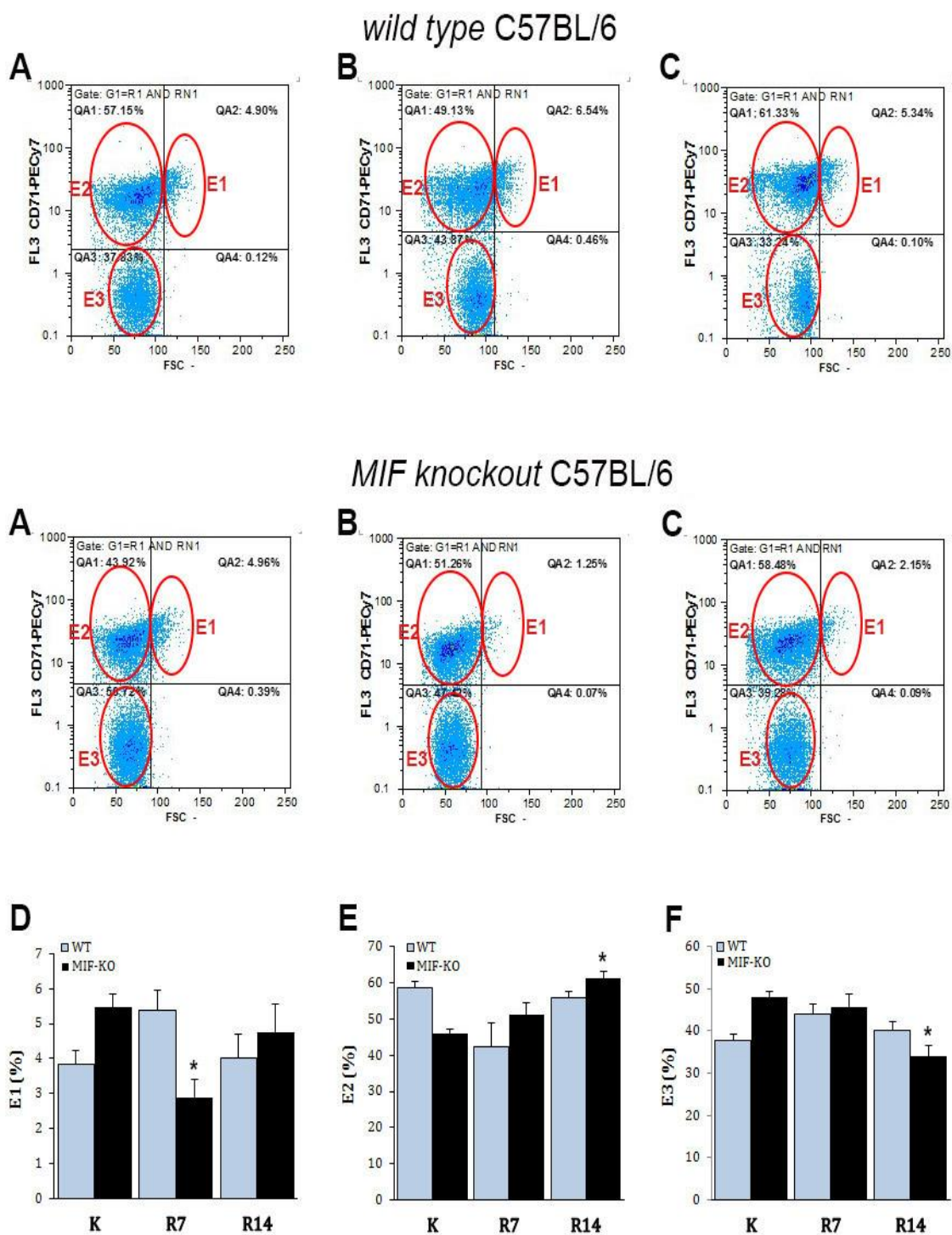


**Slika 28.** Efekti stresa i MIF na CFU-E ćelije u kostnoj srži. MIF<sup>+</sup>K - *wild-type* kontrolni miševi, MIF<sup>+</sup>R- *wild-type* miševi stresirani 7 dana uzastopno, MIF<sup>-</sup>K - MIF *knockout* kontrolni miševi, MIF<sup>-</sup>R - MIF *knockout* miševi stresirani 7 dana uzastopno. \**p*<0,05.





**Slika 29.** Efekti hroničnog psihološkog stresa na različite populacije eritroidnih prekursora u kostnoj srži *MIF*<sup>+/+</sup> i *MIF*<sup>-/-</sup> miševa. Citofluorometrijska analiza prekursorskih ćelija za eritroidnu lozu u kostnoj srži kontrolnih miševa (**A**) i miševa stresiranih 7 (**B**), odnosno 14 dana (**C**). Procenat CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>-</sup> (**D**), CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> (**E**) i CD71<sup>-</sup>Ter119<sup>+</sup> ćelija (**F**) u kostnoj srži kontrolnih i hronično stresiranih miševa. WT – wild type, MIF-KO – MIF knockout miševi; K- kontrolni miševi; R7, R14 - miševi stresirani 7, odnosno 14 dana; \**p*<0,05 u odnosu na odgovarajuće kontrole; #*p*<0,05 u odnosu na istu grupu wild-type miševa.



**Slika 30.** Efekti hroničnog psihološkog stresa na različite subpopulacije *Ter119*-pozitivnih ćelija u kostnoj srži *MIF*<sup>+/+</sup> i *MIF*<sup>-/-</sup> miševa. Citofluorometrijska analiza ukupnih *Ter119*-pozitivnih ćelija u kostnoj srži kontrolnih miševa (A) i miševa stresiranih 7 (B), odnosno 14 dana (C). Procentualno učešće različitih subpopulacija *Ter119*-pozitivnih ćelija u kostnoj srži netretiranih i stresiranih miševa (D-F). WT – wild type, MIF-KO – MIF knockout miševi; K- kontrolni miševi; R7, R14 - miševi stresirani 7, odnosno 14 dana; \**p*<0,05 u odnosu na odgovarajuće kontrole.

#### 4.4.2. MIF je negativan regulator ekstramedularne eritropoeze indukovane hroničnim stresom

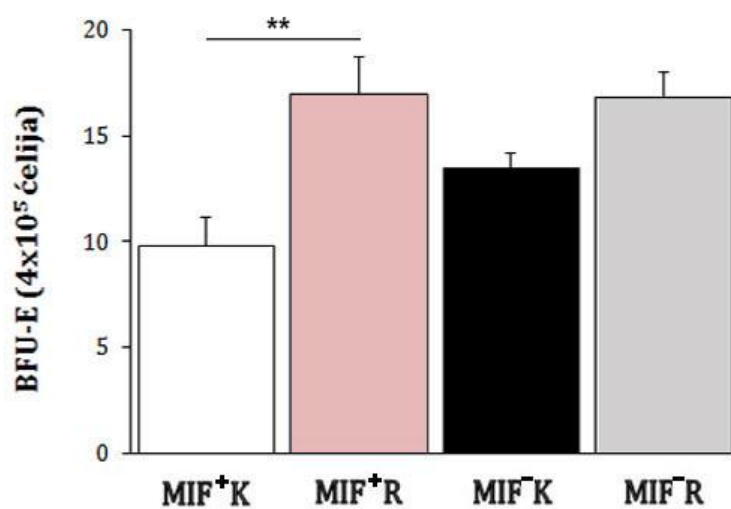
Uporedo sa analizom uticaja MIF na eritrocitopoezu u kostnoj srži tokom hroničnog stresa, pod istim uslovima ispitivana je i potencijalna uloga ovog citokina u regulaciji ekstramedularne eritrocitopoeze.

U bazalnim uslovima nisu uočene razlike u broju opredeljenih matičnih ćelija za eritroidnu lozu u slezini MIF<sup>+/+</sup> i MIF<sup>-/-</sup> miševa (**Slike 31 i 32**). Hronični stres u trajanju od 7 dana je stimulisao ekstramedularnu eritrocitopoezu, istovremeno povećavajući broj BFU i CFU-E ćelija u slezini ( $p < 0,01$ ), a delecija gena za MIF rezultirala je dodatnim povećanjem broja CFU-E ćelija u odgovoru na stres ( $p < 0,05$ ) (**Slika 32**).

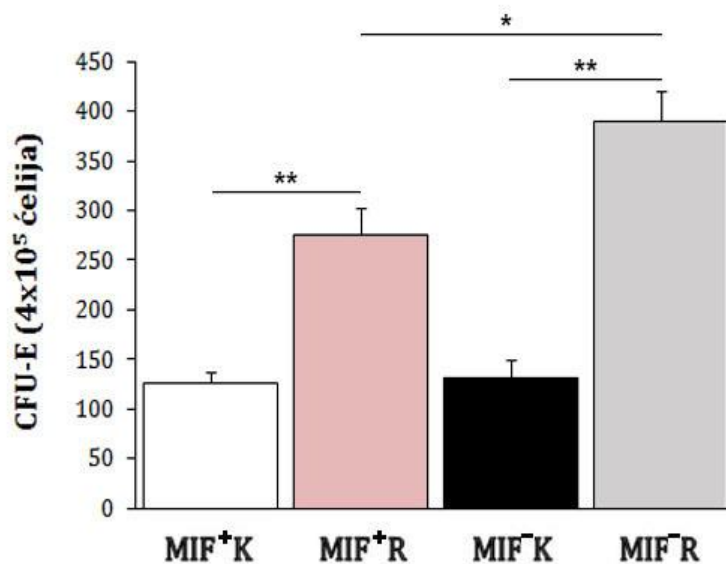
Nakon toga, citofluorometrijskom analizom je ustanovljeno da delecija gena za MIF u bazalnim uslovima povećava broj zrelijih CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> ćelija u slezini ( $p < 0,001$ ) (**Slika 33F**). Nasuprot tome, u uslovima hroničnog stresa u trajanju od 14 dana, nedostatak ovog gena je doveo do značajnog povećanja broja nezrelih CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> prekursora ( $p < 0,01$ ) uz istovremeno smanjenje broja zrelijih CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> ćelija ( $p < 0,001$ ) kod MIF<sup>-/-</sup> miševa (**Slika 33E i F**). U skladu sa tim, rezultati dvofaktorske ANOVA su pokazali statistički značajan uticaj MIF na broj CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> ( $p < 0,01$ ) i CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> ćelija ( $p < 0,001$ ) u slezini tokom hroničnog stresa. Dalja analiza različitih subpopulacija ukupnih Ter119-pozitivnih ćelija u slezini MIF<sup>+/+</sup> i MIF<sup>-/-</sup> miševa je potvrdila prethodni nalaz (**Slika 34**). Naime, hronični stres u trajanju od 14 dana doveo je do markantnijih promena u međusobnom odnosu različitih subpopulacija Ter119-pozitivnih ćelija kod MIF<sup>-/-</sup> miševa. Ove promene su podrazumevale veću zastupljenost nezrelijih formi Ter119-pozitivnih ćelija (**Slika 34D, E**) ( $p < 0,01$ ) i posledično smanjenje broja zrelih eritrocita ( $p < 0,01$ ) u slezini MIF *knockout* miševa (**Slika 34F**).

U cilju dodatne potvrde prethodnih rezultata koji su pokazali značajnu ulogu MIF u ekstramedularnoj eritrocitopoezi tokom hroničnog stresa, pratili smo ekspresiju ovog citokina u slezini kontrolnih i stresiranih životinja. Imunohistohemijskom metodom smo detektovali prisustvo MIF u crvenoj pulpi (**Slika 35**), a rezultati *Western blot* analize su pokazali statistički značajno povećanje ekspresije ovog proteina u slezini nakon 7 i 14 dana stresa (**Slika 36**).

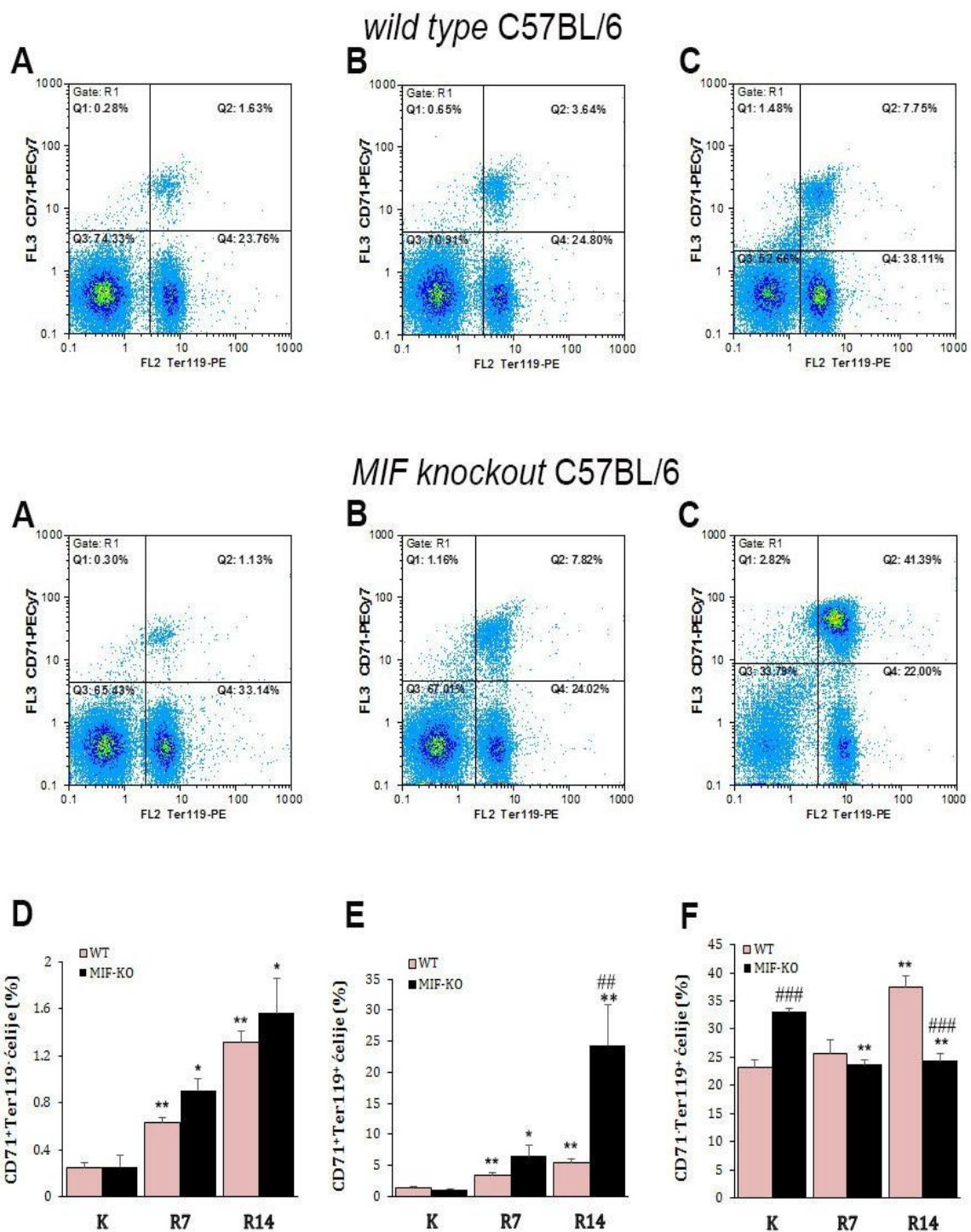




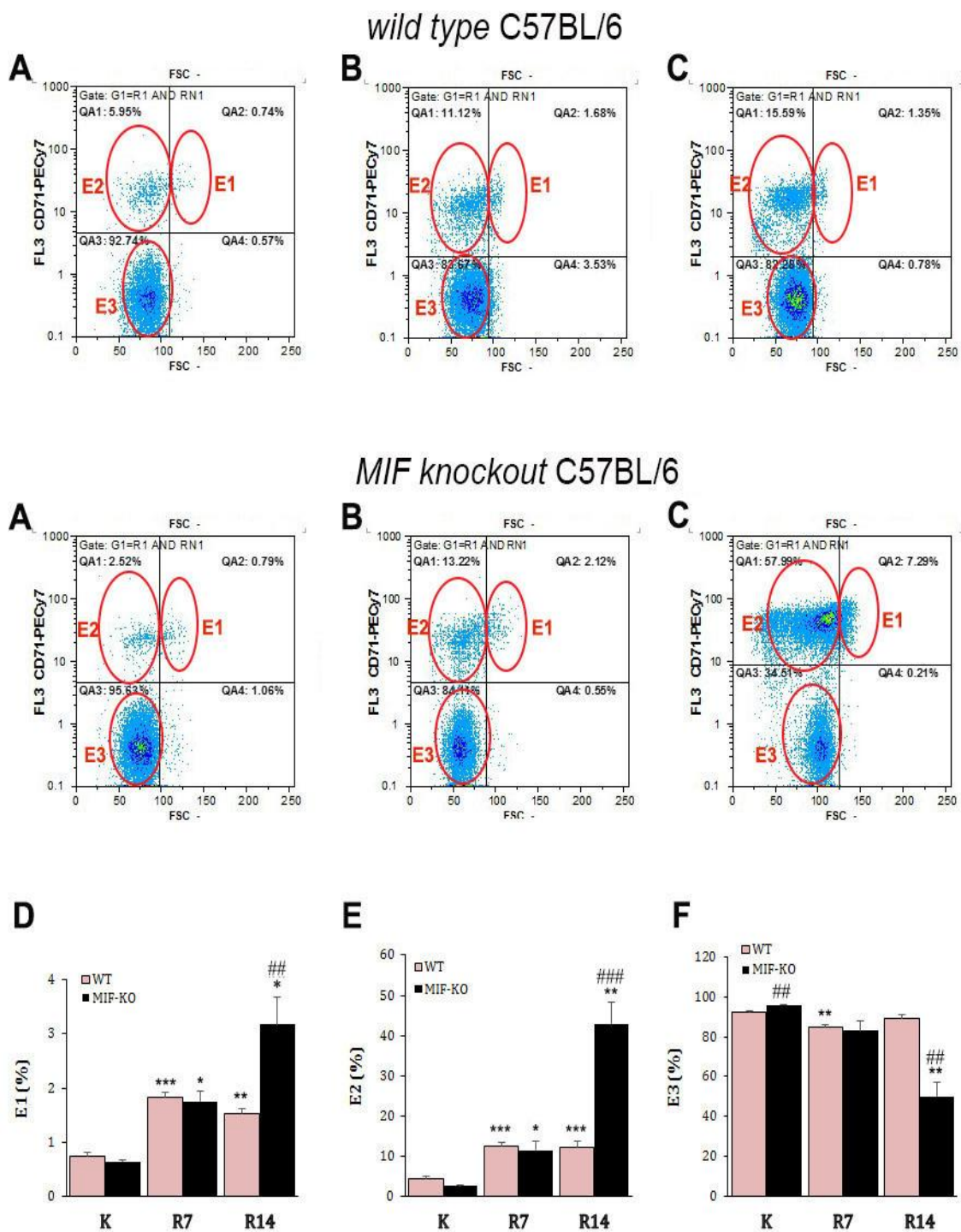
**Slika 31.** Efekti stresa i MIF na BFU-E ćelije u slezini. MIF<sup>+</sup>K – wild-type kontrolni miševi, MIF<sup>+</sup>R- wild-type miševi stresirani 7 dana uzastopno, MIF<sup>-</sup>K - MIF knockout kontrolni miševi, MIF<sup>-</sup>R - MIF knockout miševi stresirani 7 dana uzastopno. \*\*p<0, 01.



**Slika 32.** Efekti stresa i MIF na CFU-E ćelije u slezini. MIF<sup>+</sup>K – wild-type kontrolni miševi, MIF<sup>+</sup>R- wild-type miševi stresirani 7 dana uzastopno, MIF<sup>-</sup>K - MIF knockout kontrolni miševi, MIF<sup>-</sup>R - MIF knockout miševi stresirani 7 dana uzastopno. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

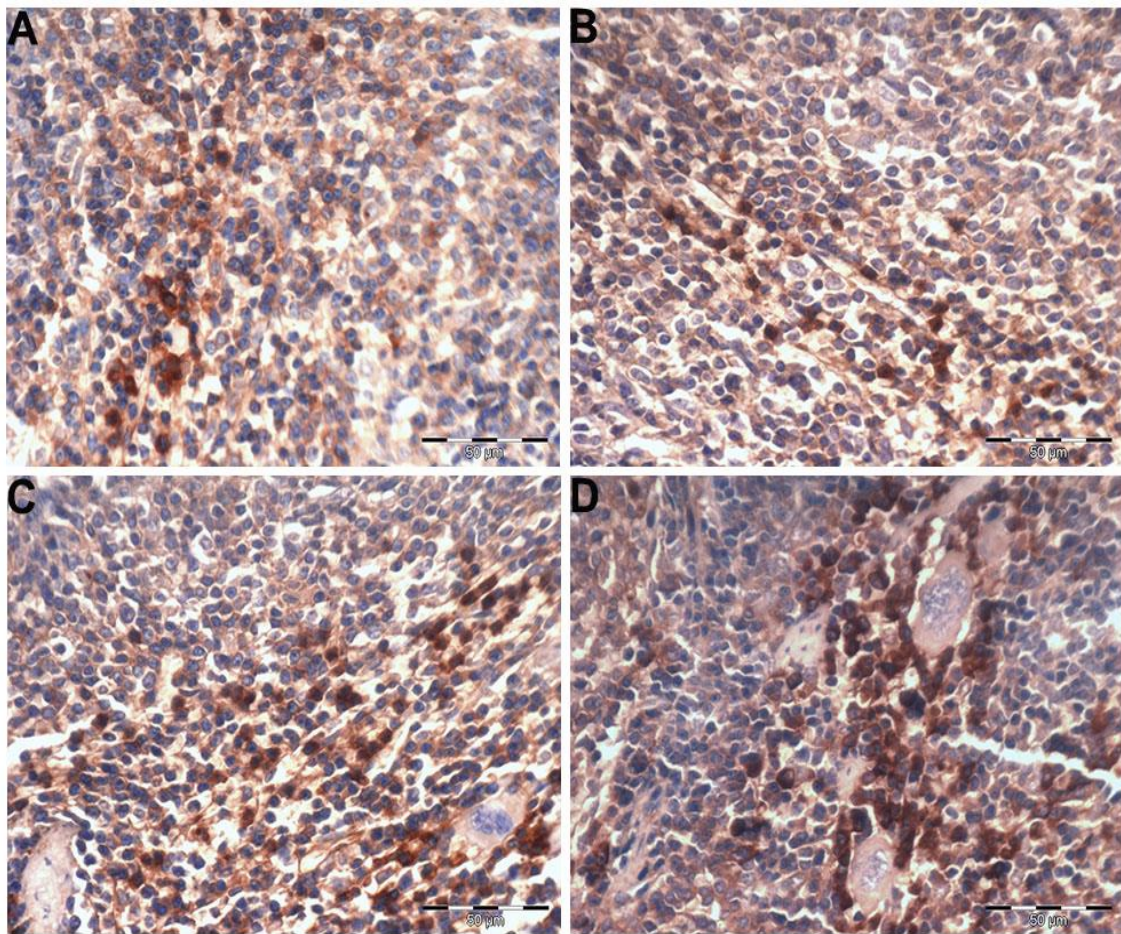


**Slika 33.** Efekti hroničnog psihološkog stresa na različite populacije eritroidnih prekursora u slezini *MIF*<sup>+/+</sup> i *MIF*<sup>-/-</sup> miševa. Citofluorometrijska analiza prekursorskih ćelija za eritroidnu lozu u slezini kontrolnih miševa (A) i miševa stresiranih 7 (B), odnosno 14 dana (C). Procenat CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>-</sup> (D), CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> (E) i CD71<sup>-</sup>Ter119<sup>+</sup> ćelija (F) u slezini kontrolnih i hronično stresiranih miševa. WT – wild type, MIF-KO – MIF knockout miševi; K- kontrolni miševi; R7, R14 - miševi stresirani 7, odnosno 14 dana; \**p*<0,05, \*\**p*<0,01 u odnosu na odgovarajuće kontrole; ##*p*<0,01, ###*p*<0,001 u odnosu na istu grupu wild-type miševa.

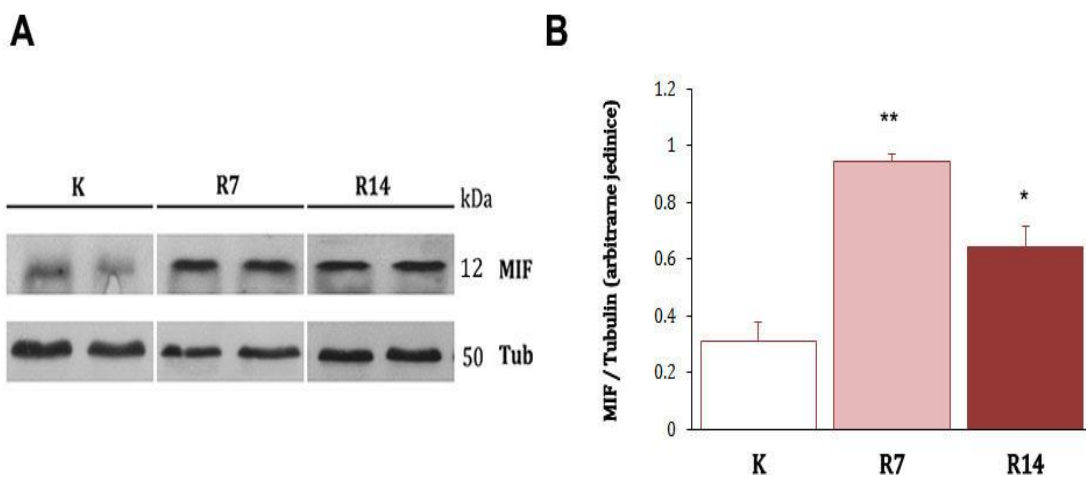


**Slika 34.** Efekti hroničnog psihološkog stresa na različite subpopulacije Ter119-pozitivnih ćelija u slezini MIF<sup>+/+</sup> i MIF<sup>-/-</sup> miševa. Citofluorometrijska analiza ukupnih Ter119-pozitivnih ćelija u slezini kontrolnih miševa (A) i miševa stresiranih 7 (B), odnosno 14 dana (C). Procentualno učešće različitih subpopulacija Ter119-pozitivnih ćelija u slezini netretiranih i stresiranih miševa (D-F). WT – wild type, MIF-KO – MIF knockout miševi; K- kontrolni miševi; R7, R14 - miševi stresirani 7, odnosno 14 dana; \**p*<0,05, \*\**p*<0,01, \*\*\**p*<0,001 u odnosu na odgovarajuće kontrole; ##*p*<0,01, ###*p*<0,001 u odnosu na istu grupu wild-type miševa.





**Slika 35.** MIF-imunoreaktivne ćelije u crvenoj pulpi slezine kontrolnih miševa (A, B) i miševa stresiranih 7 (C) ili 14 dana (D). IHH, uveličanje objektiva x40.



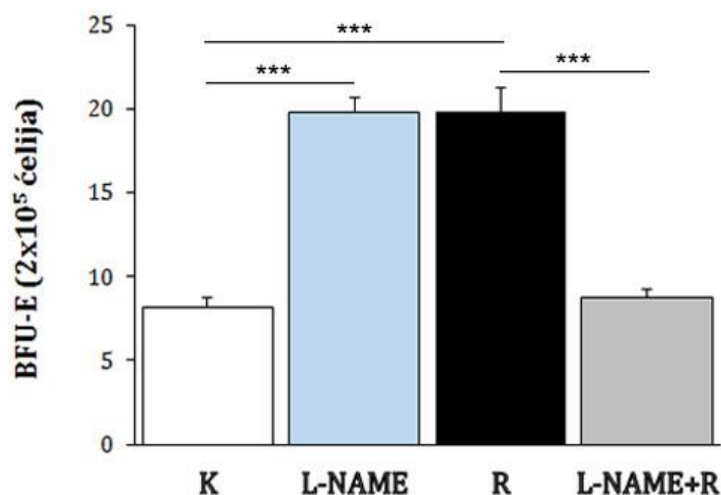
**Slika 36.** Ekspresija MIF u slezini kontrolnih i stresiranih miševa (A). Densitometrijska analiza imunoreaktivnih traka (B). K- kontrolne životinje; R7, R14 - životinje stresirane 7, odnosno 14 dana; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

#### 4.5. ULOGA NO U DEJSTVU HRONIČNOG STRESA NA RAST BFU-E I CFU-E ČELIJA U KOSTNOJ SRŽI

Da bismo ispitali potencijalnu ulogu NO u dejstvu hroničnog stresa na eritrocitopoezu u kostnoj srži, blokirali smo endogenu produkciju ovog signalnog molekula 30 minuta pre svakodnevne primene stresora i nakon toga pratili efekte na rast opredeljenih matičnih ćelija za eritroidnu lozu. Pored toga, analizirana je ekspresija eNOS i nNOS u kostnoj srži kontrolnih i stresiranih životinja. S obzirom na značajnu ulogu transkripcionog faktora NFκB u regulaciji ekspresije enzima NOS, na posredan način smo ispitali i stepen aktivacije ovog transkripcionog faktora u našem eksperimentalnom modelu.

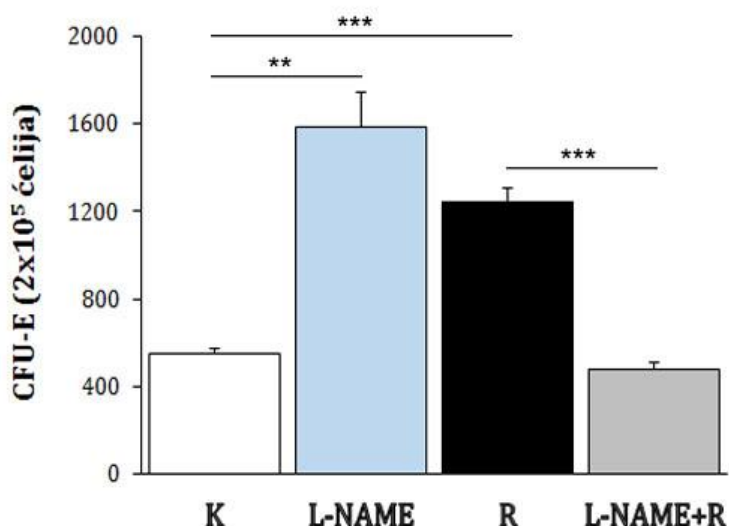
##### 4.5.1. Blokada sinteze NO sprečava efekat hroničnog stresa na rast BFU-E i CFU-E ćelija u kostnoj srži

Primenom L-NAME, neselektivnog inhibitora NOS, ispitivana je uloga NO u dejstvu hroničnog stresa na rast progenitorskih ćelija eritroidne loze. Svakodnevna blokada sinteze ovog signalnog molekula u trajanju od 7 dana rezultirala je povećanjem broja BFU-E i CFU-E ćelija u kostnoj srži nestresiranih miševa, pokazujući inhibitoryni uticaj NO na rast ovih ćelija u bazalnim uslovima (**Slike 37 i 38**).



**Slika 37.** Efekti stresa i L-NAME na BFU-E ćelije u kostnoj srži. K – kontrolne životinje, R – životinje stresirane 7 dana uzastopno, L-NAME+R – životinje kojima je blokirana endogena produkcija NO pre svakodnevne primene stresora, L-NAME – nestresirani miševi sa svakodnevnom blokadom produkcije NO u trajanju od 7 dana, \*\*\* $p < 0,001$ .

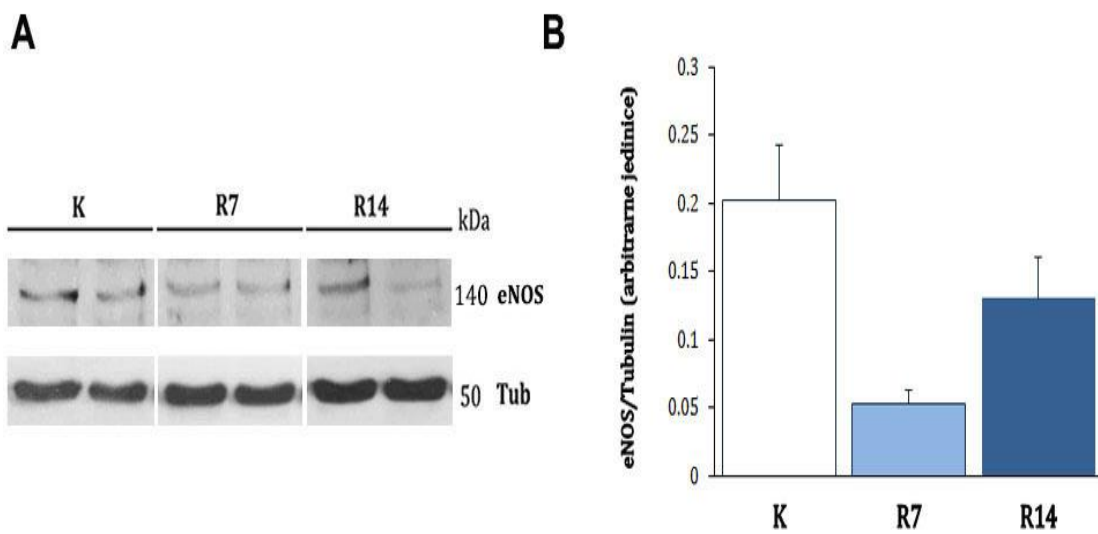
Broj opredeljenih matičnih ćelija za eritroidnu lozu se značajno povećao nakon 7 dana stresa ( $p < 0,001$ ), a blokada endogene produkcije NO pre svakodnevne primene psihološkog stresora je u potpunosti prevenirala stimulišući efekat hroničnog stresa ( $p < 0,001$ ) na BFU-E i CFU-E ćelije u kostnoj srži (**Slike 37 i 38**).



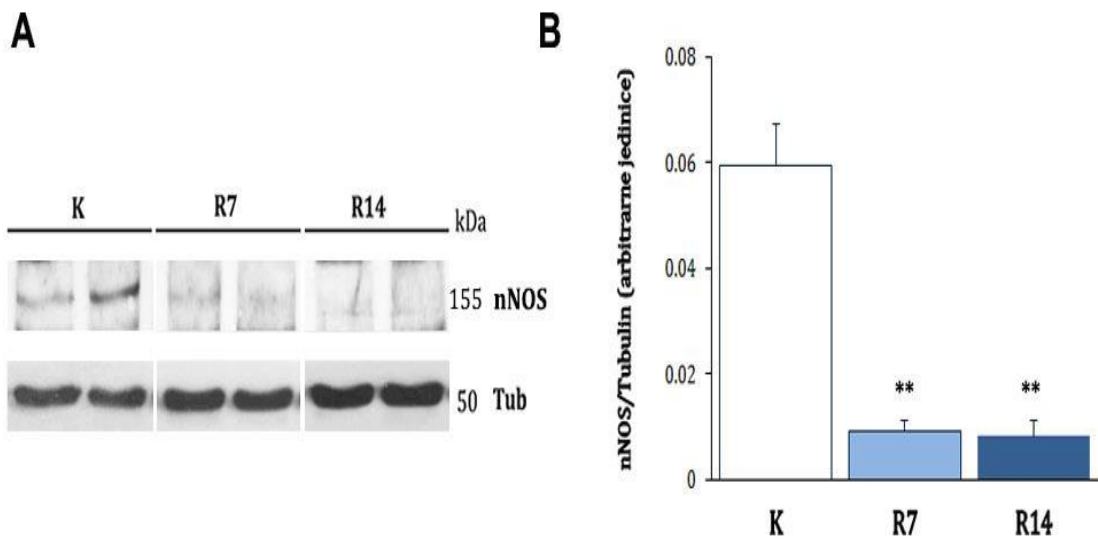
**Slika 38.** Efekti stresa i L-NAME na CFU-E ćelije u kostnoj srži. K – kontrolne životinje, R – životinje stresirane 7 dana uzastopno, L-NAME+R – životinje kojima je blokirana endogena produkcija NO pre svakodnevne primene stresora, L-NAME – nestresirani miševi sa svakodnevnom blokadom produkcije NO u trajanju od 7 dana, \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.5.2. Uticaj hroničnog stresa na ekspresiju eNOS i nNOS u kostnoj srži

Primenom *Western blot* tehnike analizirana je ekspresija enzima eNOS i nNOS u kostnoj srži ispitivanih miševa. Nakon inkubacije sa odgovarajućim antitelima, u proteinskim ekstraktima citoplazmatske frakcije ćelija kostne srži detektovane su specifične imunoreaktivne trake u domenu molekulskih masa od 140 kDa koja odgovara eNOS i 155 kDa koja označava nNOS (**Slike 39A i 40A**). Densitometrijska analiza imunoreaktivnih traka je pokazala izražen trend smanjenja ekspresije eNOS (**Slika 39B**) i statistički značajno smanjenje ( $p < 0,01$ ) ekspresije nNOS (**Slika 40B**) u ćelijama kostne srži stresiranih miševa u poređenju sa ekspresijom ovih enzima u istim ćelijama kontrolnih životinja.



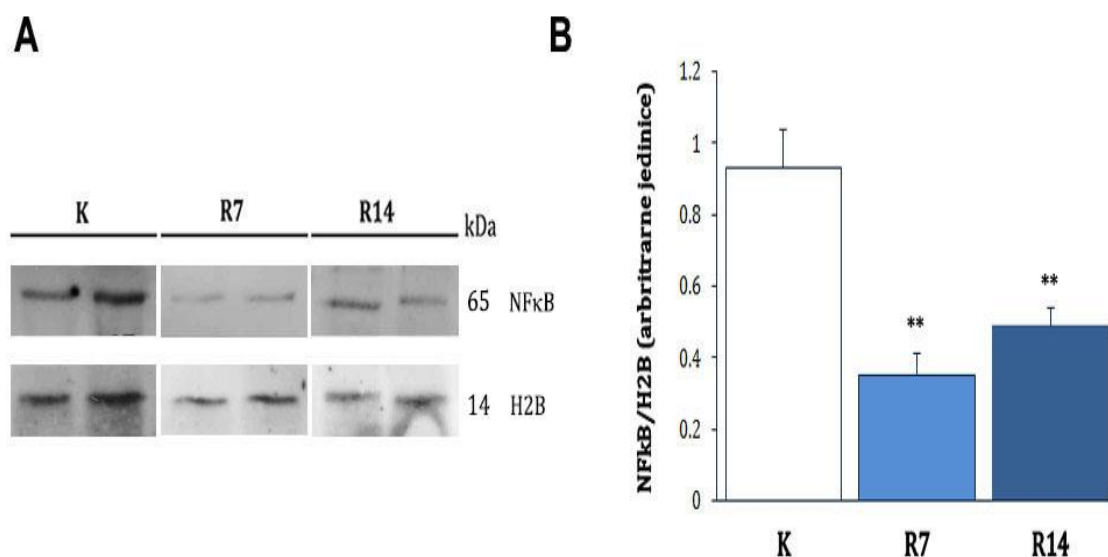
**Slika 39.** Ekspresija eNOS u kostnoj srži kontrolnih i stresiranih miševa (A). Densitometrijska analiza imunoreaktivnih traka (B). K- kontrolne životinje; R7, R14 - životinje stresirane 7, odnosno 14 dana



**Slika 40.** Ekspresija nNOS u kostnoj srži kontrolnih i stresiranih miševa (A). Densitometrijska analiza imunoreaktivnih traka (B). K- kontrolne životinje; R7, R14 - životinje stresirane 7, odnosno 14 dana; \*\* $p < 0,01$ .

### 4.5.3. Dejstvo hroničnog stresa na aktivaciju transkripcionog faktora NFκB u ćelijama kostne srži

Stepen aktivacije transkripcionog faktora NFκB smo ispitivali na posredan način - analizom ekspresije njegove subjedinice p65 u nukleusnoj frakciji ćelija kostne srži. U proteinskim ekstraktima jedarne frakcije kostne srži detektovana je specifična imunoreaktivna traka od 65 kDa (**Slika 41A**), a denzitometrijska analiza je pokazala da hronični stres u trajanju od 7 ili 14 dana značajno smanjuje ekspresiju ove subjedinice transkripcionog faktora NFκB ( $p < 0,01$ ) u jedrima ćelija kostne srži (**Slika 41B**).



**Slika 41.** Ekspresija NFκB u kostnoj srži kontrolnih i stresiranih miševa (A). Denzitometrijska analiza imunoreaktivnih traka (B). K- kontrolne životinje; R7, R14 - životinje stresirane 7, odnosno 14 dana; \*\* $p < 0,01$ .



## 5. DISKUSIJA

### 5.1. UTICAJ HRONIČNOG PSIHOLOŠKOG STRESA NA ERITROCITOPOEZU

Stres je sastavni deo svakodnevnog života. Izaganje organizma stresnim činiocima okoline dovodi do brojnih fizioloških, psiholoških i bihevioralnih promena koje sačinjavaju reakciju organizma na stres. Rezultati ekperimentalnih i kliničkih istraživanja ukazuju na kompleksnost stresne reakcije čiji mehanizmi zavise od različitih faktora, uključujući i prirodu stresora (Desborough, 2000; Rotllant i sar., 2013). Tako, za razliku od fizičkih stresora koji dovode do predominantne aktivacije simpatičko-adrenomedularnog sistema, psihološki stresori utiču prvenstveno na aktivnost HPA osovine (Goldstein i McEwen, 2002). Do određene granice, koja je individualna, stres može imati i pozitivan uticaj, jer doprinosi prilagođavanju organizma zahtevima sredine. Međutim, produženo i ponavljano izlaganje stresorima povećava rizik od pojave različitih patoloških procesa u organizmu koji mogu nastati usled neadekvatne aktivacije adaptivnih mehanizama u stresu (de Kloet i sar., 2005; Cohen i sar., 2007).

Nasuprot teoriji tzv. opšteg adaptacionog sindroma, prema kojoj različiti stresori aktiviraju potpuno identične - nespecifične mehanizme adaptacije na stres, rezultati novijih istraživanja pokazuju da svaki stresor pokreće jedinstven obrazac fizioloških promena u organizmu (Goldstein i Kopin, 2007). Do sada su uspostavljeni mnogobrojni eksperimentalni modeli za izučavanje mehanizama uključenih u odgovor organizma na stres, a među njima najširu primenu ima model *restraint* stresa, odnosno stresa izazvanog delimičnom imobilizacijom životinje. S obzirom na naglašenu psihičku komponentu, delimična imobilizacija se svrstava u grupu psiholoških stresora (Buynitsky i Mostofsky, 2009), koji uporedo sa aktivacijom neuroendokrinog sistema pokreću i čitav niz različitih fizioloških interakcija u organizmu. Tako je pokazano da stres izazavan delimičnom imobilizacijom moduliše aktivnost gastrointestinalnog, respiratornog, neuroendokrinog, imunskog i hematopoetskog sistema (Engler i sar., 2005; Frick i sar., 2009; Zheng i sar., 2009; Cruz i sar., 2011; Novozhilov i sar., 2013). U skladu sa tim, u našim istraživanjima koristili smo *restraint* stres kao eksperimentalni model

za ispitivanje uticaja hroničnog psihološkog stresa na eritrocitopoezu i za rasvetljavanje mehanizama koji se nalaze u osnovi tog procesa.

Eritrocitopoeza podrazumeva kontinuiran proces nastanka zrelih eritrocita iz pluripotentnih neopredeljenih matičnih ćelija hematopoeze. Tokom ovog procesa, koordinisanim delovanjem različitih citokina i faktora rasta iz pluripotentnih matičnih ćelija nastaju progenitorske (opredeljene matične ćelije), a zatim prekursorske ćelije crvene krvne loze (Orkin i Zon, 2008). Sazrevanje prekursorskih ćelija se karakteriše sintezom hemoglobina, kondenzacijom jedra i smanjenjem dijametra ćelije, nakon čega u stadijumu acidofilnog eritroblasta ćelija gubi jedro formirajući retikulocit. Daljim sazrevanjem retikulocita u cirkulaciji nastaje zreo eritrocit. Budući da zreli eritrociti imaju ograničen životni vek, stare ćelije se uklanjaju fagocitozom i kontinuirano zamenjuju novostvorenim ćelijama crvene krvne loze. Stoga je hematopoetski sistem organizovan tako da obezbeđuje optimalnu produkciju eritrocita u skladu sa fiziološkim zahtevima organizma. Naime, poznato je da se u bazalnim uslovima proces diferencijacije i sazrevanja eritrocita odvija predominantno u kostnoj srži (Tsiftoglou i sar., 2009). Međutim, u uslovima povećanih potreba organizma za eritrocitima, postojeća fleksibilnost hematopoetskog sistema omogućava da se proces eritrocitopoeze aktivira i u slezini (Paulson i sar., 2011).

Imajući u vidu prethodno navedene činjenice i saznanje da psihološki stres utiče na pojavu određenih hematoloških poremećaja (Gramotnev i Gramotnev, 2011), želeli smo da ispitamo da li hronična izloženost psihološkom stresoru dovodi do promena u broju ćelija crvene krvne loze u perifernoj krvi, kostnoj srži i slezini. Naši rezultati su pokazali da ponavljani *restraint* stres u trajanju od 7 ili 14 dana ne utiče na broj eritrocita u perifernoj krvi. Nasuprot hroničnom dejstvu *restraint* stresa, akutno izlaganje ovom stresoru dovodi do mobilizacije eritrocita iz njihovih depoa u kostnoj srži i slezini, uzrokujući značajno povećanje broja crvenih krvnih ćelija u cirkulaciji (Novozhilov i sar., 2013). Međutim, budući da povećanje broja eritrocita usporava protok krvi i predstavlja rizik od nastanka intravaskularne koagulacije, u stanjima eritrocitoze dolazi do aktivacije kompenzatornih mehanizama koji spečavaju nagomilavanje ovih ćelija u perifernoj krvi (Testa, 2004; Lang i sar., 2012). Stoga, neizmenjen broj eritrocita u cirkulaciji

hronično stresiranih životinja najverovatnije predstavlja kumulativan efekat aktivacije navedenih kompenzatornih mehanizama i iscrpljenja depoa zrelih eritrocita koji nastaje usled svakodnevnog izlaganja organizma stresoru.

Iako nisu uočene razlike u broju eritrocita između kontrolnih i stresiranih životinja, dobijeni rezultati su pokazali da hronična izloženost psihološkom stresoru dovodi do markantnog smanjenja nivoa hemoglobina u cirkulaciji. Ovaj nalaz je u saglasnosti sa rezultatima Wei i sar. (2008) koji su ukazali na značajno smanjenje koncentracije gvoždja i hemoglobina u cirkulaciji hronično stresiranih pacova. S obzirom da sinteza hemoglobina zavisi od raspoložive količine gvožđa u organizmu, u daljim istraživanjima smo upoređivali status gvožđa kod kontrolnih i stresiranih životinja. U plazmi stresiranih životinja detektovana je značajno smanjena koncentracija gvožđa koja može biti odraz redukovane apsorpcije ovog nutritijenta u hroničnom stresu. Naime, Chen i sar. (2009) su utvrdili da hronični psihološki stres dovodi do nakupljanja gvožđa u epitelnim ćelijama tankog creva i na taj način smanjuje njegovu apsorpciju u gastrointestinalnom traktu. Izmenjena apsorpcija nutritijenata pokazana je i u drugim eksperimentalnim modelima hroničnog stresa (Boudry i sar., 2007; Teng i sar., 2008), što potvrđuje hipotezu da je hronični stres osnovni etiološki faktor smanjene apsorpcije gvožđa i posledične redukcije hemoglobina u cirkulaciji stresiranih životinja. Pored toga, smanjene vrednosti eritrocitnih indeksa i redukovani procenat zasićenja transferina, dobijeni u našem eksperimentalnom modelu, ukazuju na pojavu anemije koja je uzrokovana hroničnim delovanjem psihološkog stresora.

Da bismo ispitali efekte psihološkog stresa i nastale redukcije hemoglobina u perifernoj krvi na proces eritrocitopoeze, analizirali smo broj eritroidnih progenitora u kostnoj srži kontrolnih i hronično stresiranih životinja. Naši rezultati, dobijeni nakon 7 i 14 dana svakodnevne primene stresora, pokazali su da hronično delovanje psihološkog stresora povećava broj BFU-E i CFU-E ćelija u kostnoj srži miša. Ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima Sherstoboev i Minakova (2005) koji su, ispitujući dejstvo hroničnog imobilizacionog stresa na hematopoezu u kostnoj srži, ustanovili da hronični stres utiče na proliferaciju i diferencijaciju progenitorskih ćelija hematopoeze. Naime, ovi autori su utvrdili da intenzivan stres u trajanju od 5 dana dovodi do izraženog povećanja eritropoetske aktivnosti

u serumu ispitivanih miševa i značajno povećava broj CFU-E progenitora u kostnoj srži ovih životinja.

U skladu sa nalazom povećanog broja eritroidnih progenitora u stresu, Voorhees i sar. (2013) su nakon tri nedelje svakodnevnog *restraint* stresa detektovali statistički značajno povećanje broja eritroblasta u kostnoj srži eksperimentalnih životinja, ukazujući na stimulatívni uticaj hroničnog stresa na diferencijaciju nezrelih ćelija crvene krvne loze. Koristeći isti model psihološkog stresa i metodu protočne citometrije, u našim istraživanjima smo pokazali povećan procenat eritroidnih prekursora (CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> ćelija) u kostnoj srži miševa stresiranih 14 dana. Budući da dvostruko-pozitivne CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> ćelije predstavljaju heterogenu populaciju eritroblasta koji se na histološkim preparatima kostne srži mogu detektovati u okviru eritroblastnih ostrva, u cilju potvrde prethodno dobijenih rezultata analizirali smo tkivne preseke kostne srži kontrolnih i hronično stresiranih miševa. Histološka analiza tkivnih preseka kostne srži je ukazala na povećan broj eritroblastnih ostrva kod stresiranih životinja, naročito izražen nakon 14 dana stresa što u potpunosti odgovara nalazu protočne citometrije. Saglasno našim rezultatima, Sherstoboev i Minakova (2005) su pokazali da hronični imobilizacioni stres dovodi do blagog, ali statistički značajnog povećanja broja eritroblastnih ostrva u kostnoj srži.

Za razliku od kostne srži, koja predstavlja primarno mesto sazrevanja eritroidnih progenitora u bazalnim uslovima, u uslovima povećanih potreba organizma za eritrocitima dolazi do aktivacije ekstramedularne eritrocitopoeze (Lenox i sar., 2009; Paulson i sar., 2011). Poznato je da slezina ima značajnu ulogu u procesu sazrevanja hematopoetskih ćelija u različitim fiziološkim i patološkim stanjima (Kim, 2010; O'Neill, 2012). Naime, slezina odraslog organizma sadrži ograničen pul pluripotentnih matičnih ćelija hematopoeze koje imaju sposobnost samoobnove i diferencijacije u zrele ćelije svih krvnih loza, uključujući eritrocite (Dor i sar., 2006; Morita i sar., 2011). Pod uticajem brojnih regulatornih faktora, u određenim uslovima dolazi do aktivacije mehanizma samoobnove eritroidnih progenitora u slezini (Hattangadi i sar., 2011) čime se obezbeđuje adekvatna produkcija eritrocita u procesu SE tj. u svim fiziološkim i patološkim stanjima koja zahtevaju ubrzano stvaranje crvenih krvnih ćelija. U prilog tome idu i rezultati

ranijih istraživanja (Hara i Ogawa, 1976) koji su pokazali da u stanju anemije slezina postaje primarno mesto za odvijanje procesa eritrocitopoeze. Takođe, eritrocitopoeza je regulisana signalima koji potiču iz mikrosredine u okviru koje se celokupan proces odvija, a slezina predstavlja optimalnu mikrosredinu za sazrevanje eritrocita u uslovima narušene homeostaze (Yanai i sar., 1989; Hattangadi i sar., 2011).

Uzimajući u obzir značajnu ulogu slezine u SE, kao i činjenicu da izloženost psihološkom stresoru narušava homeostazu organizma, u daljem istraživanju smo želeli da ispitamo kako hronični psihološki stres utiče na proces sazrevanja eritrocita u slezini. Nekoliko studija je pokazalo da psihološki stres dovodi do promena u strukturi i funkciji slezine (Li i sar., 2005; Hernandez i sar., 2013). Tako su Yin i sar. (2006), koristeći eksperimentalni model *restraint* stresa, utvrdili da hronični stres moduliše ekspresiju gena u slezini i uzrokuje promene u histološkoj građi ovog organa. U skladu sa tim, naši rezultati su pokazali da hronična izloženost psihološkom stresoru povećava relativnu masu slezine i celularnost crvene pulpe. Budući da se telesna masa hronično stresiranih miševa nije značajno razlikovala u odnosu na masu kontrolnih životinja, zapažena promena u relativnoj masi slezine predstavlja odraz povećanja apsolutne mase ovog organa u našem modelu *restraint* stresa. Saglasno nalazu neizmenjene telesne mase hronično stresiranih miševa u našim istraživanjima, Joëls i sar. (2007) su i istakli da model hroničnog *restraint* stresa najčešće ne dovodi do redukcije u telesnoj masi ispitivanih životinja. Nasuprot tome, Voorhees i sar. (2013) su, ispitujući dejstvo psihološkog stresa na odraslim ženkama miševa C57BL/6J soja, pokazali da 28 dana svakodnevene primene *restraint* stresa u trajanju od 6 h dovodi do značajnog gubitka u telesnoj masi ovih životinja. Razlike u efektima hroničnog stresa na telesnu masu ispitivanih miševa, prisutne između rezultata naših istraživanja i navedene studije, mogu se objasniti različitim intenzitetom i trajanjem stresa, kao i činjenicom da su Voorhees i sar. eksperimente izvodili na ženkama koje su znatno osetljivije na dejstvo psihološkog stresora (Buynitsky i Mostofsky, 2009; Verma i sar., 2011). S obzirom da je hronično dejstvo psihološkog stresa u našem eksperimentalnom modelu uvećalo masu slezine i povećalo broj ćelija u crvenoj pulpi ispitivanih miševa, pretpostavili smo da se kod stresiranih životinja aktivirao

proces ekstramedularne SE. Ovu pretpostavku je potvrdio nalaz značajno povećanog broja eritroidnih progenitora u slezini koji je zapažen i nakon 7 i nakon 14 dana stresa. Uz povećan broj BFU-E ćelija, utvrdili smo da ove ćelije imaju svojstva tzv. „stres” BFU-E progenitora – specijalizovane populacije ćelija koja je karakteristična za proces SE. Pored povećanog broja progenitorskih ćelija, naši rezultati su pokazali da se tokom hroničnog stresa značajno povećava i broj prekursorskih ćelija crvene krvne loze u slezini što je u saglasnosti sa hipotezom da povećana celularnost crvene pulpe predstavlja odraz stimulisane ekstramedularne eritrocitopoeze u stresu. Na osnovu podataka dobijenih protočnom citometrijom i imunohistohemijom, uočili smo da se nakon 7 dana stresa, uprkos markantnom povećanju eritroidnih progenitora i prekursora, ne menja broj ukupnih Ter119-pozitivnih ćelija u slezini, ukazujući na izvestan zastoj u terminalnom sazrevanju eritrocita. Interesantno je istaći da su Engler i sar. (2004) primenom druge vrste psihološkog stresora ustanovili da hronični stres dovodi do povećanja broja CD11b-pozitivnih ćelija u slezini. Nalaz ovih autora navodi na pretpostavku da bi porast u broju CD11b-pozitivnih ćelija takođe mogao da doprinese povećanoj celularnosti crvene pulpe u slezini hronično stresiranih životinja. Međutim, novija istraživanja pokazuju da *restraint* stres povećava broj CD11b-pozitivnih leukocita u perifernoj krvi, ali ne i u slezini (Stiner-Jones i sar., 2012), potvrđujući činjenicu da odgovor leukocita na stres umnogome zavisi od vrste stresora (Bowers i sar., 2008). Takođe, na preparatima obojenim H&E, jedra eritroidnih prekursora su usled visokog sadržaja heterohromatina izrazito tamne boje, pa se po ovoj specifičnosti eritroidni prekursori relativno lako mogu razlikovati od mijeloidnih prekursora i ostalih ćelija koje se mogu naći u crvenoj pulpi slezine (Suttie, 2006). U prilog aktivaciji ekstramedularne eritrocitopoeze u psihološkom stresu govori i najnovija studija Hernandez i sar. (2013) kojom je utvrđeno da hronični *restraint* stres utiče na strukturu slezine tako što dovodi do ekspanzije crvene, a obliteracije bele pulpe. Saglasno sa tim, podaci morfometrijske analize u okviru naših istraživanja pokazuju trend povećanja volumenske gustine crvene pulpe u slezini stresiranih miševa.

Sveopšte uzevši, rezultati ovog dela naših istraživanja jasno pokazuju da hronični psihološki stres redukuje koncentraciju gvožđa i hemoglobina u krvi i

dovodi do stimulacije eritrocitopoeze u kostnoj srži i slezini miša. Izraženiji efekat hroničnog stresa na ekstramedularnu eritrocitopoezu se može objasniti činjenicom da slezina preuzima vodeću ulogu u sazrevanju eritrocita tokom različitih fizioloških i patoloških stanja koja narušavaju homeostazu organizma i zahtevaju povećanu produkciju crvenih krvnih ćelija. U prilog tome govore i rezultati najnovijih istraživanja koji pokazuju da povećani zahtevi organizma za eritrocitopoezom podstiču migraciju određenog broja eritroidnih progenitora iz kostne srži u slezinu gde se u uslovima specifične mikrosredine vrši njihova kontinuirana samoobnova i diferencijacija ka zrelim eritrocitima (Paulson i sar., 2011).

## **5.2. REGULACIJA ERITROCITOPOEZE U USLOVIMA HRONIČNOG STRESA**

Optimalna eritrocitopoeza je od vitalnog značaja za organizam. Starenjem eritrociti gube elastičnost i sposobnost vezivanja kiseonika, zbog čega se stari eritrociti razgrađuju i kontinuirano zamenjuju novostvorenim ćelijama crvene krvne loze. U organizmu čoveka eritrociti u proseku žive oko 120 dana, a svako skraćenje životnog veka ovih ćelija upućuje na ubrzano propadanje ili hemolizu eritrocita. U trenutku kada kostna srž više nije u mogućnosti da nadoknadi oko 5% eritrocitne mase na dan, dužina životnog veka eritrocita se smanjuje na 20 dana i aktiviraju se kompenzatorni mehanizmi koji omogućavaju povećanu produkciju ćelija crvene krvne loze (Labar i sar., 2007). Proces eritrocitopoeze je dovoljno fleksibilan da u uslovima smanjene produkcije eritrocita ili povećanih zahteva organizma za eritrocitopoezom može da obezbedi stvaranje desetostruko većeg broja crvenih krvnih ćelija nego u bazalnim uslovima. Ovako izražena fleksibilnost hematopoetskog sistema se ostvaruje zahvaljujući aktivaciji procesa SE.

Efikasnost procesa SE zavisi od koordinisanog delovanja različitih regulatornih faktora mikrosredine koja okružuje pluripotentne i opredeljene matične ćelije za eritrocitnu lozu (Chow i sar., 2013; Migliaccio, 2013). Naime, poznato je da ćelije mikrosredine stvaraju veliki broj hemijskih medijatora kao što su citokini i faktori rasta. Neki od ovih regulatornih faktora povećavaju mitotsku aktivnost HSC i/ili eritroidnih progenitorskih ćelija, dok drugi stimulišu

diferencijaciju ovih ćelija ka zrelim eritrocitima. Pored produkcije solubilnih medijatora, ćelije mikrosredine ostvaruju direktnu komunikaciju sa opredeljenim matičnim ćelijama, a ova međućelijska adhezija utiče na procese samoobnavljanja i diferencijacije eritroidnih progenitora. U skladu sa tim, rezultati mnogobrojnih istraživanja ukazuju na slezinu kao specifičnu mikrosredinu koja sadrži signale neophodne za ekspanziju pula BFU-E progenitora i aktivaciju procesa SE što u određenim uslovima može biti od vitalnog značaja za organizam (Perry i sar., 2009; O'Neill, 2012).

U većini dosadašnjih studija proces SE je ispitivan na mišjim modelima anemije (Lenox i sar., 2005; Dumitriu i sar., 2010), dok su podaci o regulaciji eritrocitopoeze tokom hroničnog psihološkog stresa veoma oskudni i odnose se isključivo na rast progenitorskih ćelija u kostnoj srži (Sherstoboev i Minakova, 2005). Međutim, naši rezultati su pokazali da, pored ekspanzije eritroidnih progenitora u kostnoj srži, hronični psihološki stres markantno povećava broj kako progenitorskih, tako i prekursorskih ćelija crvene krvne loze u slezini čime se obezbeđuje kontinuitet u sazrevanju ovih ćelija tokom hroničnog stresa. Dobijeni nalaz je u saglasnosti sa podatkom da psihološki stres dovodi do mobilizacije HSC i eritroidnih progenitora iz kostne srži (Lapid i sar., 2012), koji pod određenim uslovima migriraju u slezinu gde se u okviru procesa SE dovršava ubrzano sazrevanje crvenih krvnih ćelija (Paulson i sar., 2011). Uzimajući u obzir prethodno dobijene rezultate i navedene činjenice, najveći deo istraživanja posvetili smo ispitivanju mehanizma regulacije procesa ekstramedularne SE u eksperimentalnom modelu hroničnog psihološkog stresa.

Kako je hronično delovanje psihološkog stresora u trajanju od 7 ili 14 dana dovelo do značajnog povećanja nivoa glukokortikoidnih hormona u cirkulaciji, interesovalo nas je da li i u kojoj meri ovi hormoni posreduju u efektima hroničnog stresa na ekstramedularnu eritrocitopoezu. Naime, poznato je da glukokortikoidni hormoni imaju ulogu ključnih medijatora u dejstvu stresa na čitav niz različitih fizioloških procesa u organizmu (McEwen, 2000). U pogledu eritrocitopoeze, glukokortikoidi stimulišu proliferaciju nezrelih ćelija eritrocitne loze i podstiču formiranje kolonija eritroidnih progenitora u *in vitro* uslovima (Udupa i sar., 1986). Saglasno sa tim, pokazano je da terapija glukokortikoidnim hormonima



pospešuje proces eritrocitopoeze kod pacijenata obolelih od određenih oblika anemije (Liang i sar., 1994) i da je policitemija jedna od kliničkih manifestacija Cushing-ovog sindroma (Gursoy i sar., 2006). Premda mehanizmi delovanja glukokortikoidnih hormona na proces SE nisu u potpunosti razjašnjeni, smatra se da su evolutivno konzervirani i da sačinjavaju deo adaptivnog odgovora organizma na stres (Hattangadi i sar., 2011).

Ćelijski odgovor na stres je posredovan aktivacijom GR, tako da se ovaj receptor nalazi u skoro svim ćelijama organizma, uključujući i nezrele ćelije crvene krvne loze (Necela i Cidlowski, 2004; Stellacci i sar., 2009). U skladu sa tim, rezultati brojnih istraživanja ukazuju na značajnu ulogu ovog receptora u regulaciji procesa SE (Chute i sar., 2010). Tako su Bauer i sar. (1999), ispitivanjem genetski modifikovanih miševa  $GR^{dim/dim}$  kod kojih je onemogućena dimerizacija GR receptora, ustanovili da je adekvatna aktivacija ovog receptora neophodan preduslov za povećanu produkciju eritrocita u stanju anemije. Ovi autori su, analizirajući eritrocitopoezu  $GR^{dim/dim}$  miševa, utvrdili da kod genetski modifikovanih miševa ne dolazi do povećanja broja CFU-E ćelija u odgovoru na eksperimentalno indukovanu anemiju.

S obzirom da blokada GR mifepristonom sprečava mehanizam transaktivacije ovih receptora, čineći ih funkcionalno neaktivnim, u našim istraživanjima smo koristili navedeni blokator kako bismo ispitali ulogu GR u ekstramedularnoj eritrocitopoezi tokom hroničnog stresa. U skladu sa činjenicom da je mifepriston potpuni antagonist GR u eritroidnim ćelijama (Wessely i sar., 1997), blokada ovih receptora u našem eksperimentalnom modelu je prevenirala stimulišući efekat hroničnog stresa na proliferaciju CFU-E ćelija u slezini. Naši rezultati su u saglasnosti sa najnovijim istraživanjima Voorhees i sar. (2013) koji su utvrdili da mifepriston sprečava stresom-indukovan odgovor eritroidnih progenitora u kostnoj srži. Međutim, nasuprot efektu na CFU-E ćelije, blokada GR nije uticala na povećan broj BFU-E progenitora u našem modelu hroničnog stresa. Takođe, pokazali smo da se svakodnevnom primenom mifepristona značajno povećao broj BFU-E ćelija u slezini nestresiranih miševa, dok je broj CFU-E progenitora ostao nepromenjen. Dobijeni rezultati bi se mogli objasniti različitim mehanizmima koji regulišu rast i diferencijaciju eritroidnih progenitora. Naime,

poznato je da rast i proliferacija BFU-E ćelija zavise od kooperativnog delovanja brojnih regulatornih faktora kao što su: glukokortikoidi, SCF i eritropoetin (Lodish i sar., 2010). Dokazano je da glukokortikoidni hormoni stimulišu proliferaciju BFU-E ćelija tokom SE i na taj način obezbeđuju povećanu produkciju eritrocita u stanju anemije (Zhang i sar., 2013). Studija Flygare i sar. (2011) je potvrdila značaj sinergičkog dejstva glukokortikoida i drugih regulatornih faktora u ekspanziji BFU-E progenitora, pokazujući da aktivacija transkripcionog faktora HIF1 alfa može da pojača ili u potpunosti da zameni efekat glukokortikoida na proces samoobnove ovih ćelija. Saglasno sa tim, povećan broj BFU-E ćelija u slezini miševa tretiranih samo mifepristonom može biti rezultat kompenzatornih mehanizama koji se aktiviraju u cilju adekvatne samoobnove ovih progenitora tokom hronične blokade GR. U prilog ovoj hipotezi govore i rezultati Bauer i sar. (1999) koji su pokazali da  $GR^{dim/dim}$  miševi imaju potpuno očuvanu eritrocitopoezu u bazalnim uslovima.

Pored kompleksnih mehanizama koji regulišu bazalnu produkciju eritrocita, tokom SE se aktiviraju i mehanizmi kontinuirane samoobnove eritroidnih progenitora čime se značajno povećava broj nezrelih ćelija eritrocitne loze u slezini (Millot i sar., 2010). S obzirom da veliki broj regulatornih faktora deluje direktno na BFU-E ćelije (Perry i sar., 2007; Lodish i sar., 2010), ekspanzija ovih progenitora u slezini tokom hroničnog *restraint* stresa najverovatnije predstavlja rezultat njihovog sinergičkog delovanja. Stoga, i pored značajne uloge koju glukokortikoidi imaju u samoobnovi BFU-E ćelija, blokada GR nije dovela do smanjenja broja ovih progenitora u našem eksperimentalnom modelu hroničnog stresa.

Za razliku od regulacije proliferacije BFU-E ćelija, rast CFU-E progenitora je regulisan prevashodno dejstvom eritropoetina (Richmond i sar., 2005). Vezujući se za EpoR, eritropoetin stimuliše proliferaciju i preživljavanje ovih ćelija (Hattangadi i sar., 2011). Procesi samoobnove i ubrzane ekspanzije eritroidnih progenitora u SE zahtevaju istovremenu aktivaciju EpoR i GR, kao i njihovu međusobnu interakciju (Bauer i sar., 1999; Kolbus i sar., 2003; Menon i sar., 2006). U skladu sa tim, nalaz smanjenje ekspresije oba receptora u slezini, uz istovremeno povećanje koncentracija glukokortikoida i eritropoetina u cirkulaciji stresiranih životinja, ukazuje na nishodnu regulaciju GR i EpoR, odnosno na njihovu aktivaciju u hroničnom psihološkom stresu. Pored toga, analizirajući stepen ekspresije ovih

receptora u pojedinačnim uzorcima slezine stresiranih životinja, uočili smo da je veći stepen smanjenja ekspresije GR praćen većim stepenom smanjenja ekspresije EpoR, i obrnuto. S obzirom da su Stellacci i sar. (2009) dokazali direktno vezivanje GR za EpoR na membrani eritroidnih ćelija u *in vitro* uslovima, naši rezultati mogu da ukažu na fizičku interakciju između ovih receptora tokom hroničnog stresa, što bi ujedno predstavljalo i prvu potvrdu njihove direktne interakcije u *in vivo* uslovima.

Nishodnu regulaciju GR i EpoR u hroničnom psihološkom stresu potvrdili smo i imunohistohemijskom analizom koja je pokazala značajno smanjenje broja GR- i EpoR-imunoreaktivnih ćelija u crvenoj pulpi stresiranih životinja. Eksperimentalno je dokazano da hronični psihološki stres smanjuje senzitivnost ćelija bele pulpe na dejstvo kortikosterona (Engler i sar., 2008; Cohen i sar. 2012), tako da, analogno tome, nalaz redukovane ekspresije GR u crvenoj pulpi hronično stresiranih miševa može označavati pojavu rezistencije eritroidnih ćelija na dejstvo glukokortikoidnih hormona. Takođe, postoji mogućnost da BFU-E i CFU-E ćelije vremenom razviju različit stepen rezistencije na dejstvo glukokortikoida u hroničnom stresu čime bi se mogle objasniti razlike u odgovoru ovih ćelija na blokadu GR tokom hroničnog izlaganja psihološkom stresoru. Navedena zapažanja pružaju osnovu za dalja istraživanja koja bi obuhvatila detaljnu analizu izmenjenog odgovora eritroidnih progenitora na dejstvo glukokortikoidnih hormona u hroničnom stresu.

Poznato je da u procesu ekspanzije eritroidnih progenitora, pored GR i EpoR, učestvuje i c-Kit. Na istovremenu aktivaciju sva tri receptora, odnosno na sinergičke efekte glukokortikoida, eritropoetina i SCF u SE ukazuju i rezultati naših istraživanja koji su pokazali da uprkos ključnoj ulozi GR u ekspanziji CFU-E ćelija tokom hroničnog stresa, blokada ovog receptora nije dovela do značajne redukcije u masi slezine stresiranih životinja. Ispitujući mehanizme regulacije SE u uslovima anemije, Perry i sar. (2007), su ustanovili da „stres” BFU-E ćelije na svojoj površini ekspimiraju c-Kit receptor. U skladu sa tim, povećan broj c-Kit-imunoreaktivnih ćelija u crvenoj pulpi hronično stresiranih miševa može da predstavlja odraz povećane proliferacije „stres” BFU-E progenitora u našem eksperimentu.

Treba istaći da je uloga c-Kit receptora u regulaciji procesa SE dokazana pre svega zahvaljujući eksperimentima izvedenim na genetski modifikovanim miševima. Tako je zapaženo da se miševi sa mutacijom gena koji kodira sintezu c-Kit receptora veoma sporo oporavljaju od eksperimentalno indukovane anemije (Agosti i sar., 2009). Zastoj u oporavku od anemije uočen je i kod splenektomisanih miševa što potvrđuje značajnu ulogu slezine u procesu SE (Lenox i sar., 2005). Naime, ustanovljeno je da kapacitet samoobnove eritroidnih progenitora u kostnoj srži splenektomisanih životinja nije dovoljan da kompenzuje smanjen broj eritrocita i obezbedi brz oporavak ovih miševa. Saglasno sa tim, Millot i sar. (2010) su, korišćenjem eksperimentalnog modela hronične anemije, utvrdili da povećan nivo eritropoeina u cirkulaciji ispitivanih životinja ne utiče na obim eritrocitopoeze u kostnoj srži, već dovodi do aktivacije procesa SE u slezini. Stimulisana ekstramedularna eritrocitopeza u uslovima povećane koncentracije eritropoetina u našem istraživanju predstavlja dodatnu potvrdu navedenih rezultata. Iako uloga slezine u procesu SE kod čoveka još uvek nije razjašnjena, rezultati kliničkih istraživanja ističu značaj ovog hematopoetskog organa u uslovima narušene homeostaze organizma (Stewart i McKenzie, 2002), kao i u određenim patološkim stanjima koja se karakterišu ograničenom i/ili izmenjenom eritrocitopoezom u kostnoj srži (Kim, 2010).

Specifičnost slezine se ogleda pre svega u činjenici da njeno tkivo sačinjava jedinstvenu mikrosredinu koja obezbeđuje signale neophodne za nastanak i ubrzanu ekspanziju „stres” BFU-E progenitora. U skladu sa tim, Paulson i sar. (2011) su pokazali da se BFU-E progenitori lokalizovani u slezini po svojim fenotipskim i funkcionalnim karakteristikama jasno razlikuju od istoimenih ćelija u kostnoj srži, i zaključili da uočene razlike predstavljaju odraz specifičnosti mikrosredina iz kojih ovi progenitori potiču. Sumirajući rezultate dosadašnjih istraživanja, grupa ovih američkih autora je predstavila model aktivacije SE u stanju anemije koji podrazumeva: 1) aktivaciju specifičnih signala koji omogućavaju kontinuiranu samoobnovu eritroidnih progenitora u slezini i 2) migraciju BFU-E progenitora iz kostne srži u slezinu gde „klasične” BFU-E ćelije pod uticajem aktiviranih signala menjaju svoja morfološka i funkcionalna svojstva, poprimajući karakteristike „stres” BFU-E ćelija. Kako u stanju anemije dolazi do

kompletne mobilizacije pula „stres” BFU-E ćelija u slezini, Perry i sar. (2007) su, ispitujući mehanizme obnove ovih ćelija, ustanovili da je signalni put *Hedgehog* odgovoran za transformaciju „klasičnih” u „stres” BFU-E progenitore, i to odmah nakon njihovog ulaska u slezinu. Takođe, pokazali su da aktivacija ovog signalnog puta povećava ekspresiju molekula BMP4 koji je neophodan za kontinuiranu samoobnovu „stres” BFU-E ćelija i posledičnu aktivaciju SE u slezini.

Budući da je BMP4 identifikovan kao signalni molekul neophodan za aktivaciju SE u stanju anemije, želeli smo da ispitamo da li je ovaj molekul uključen i u regulaciju procesa ekstramedularne eritrocitopoeze indukovane hroničnim *restraint* stresom. U tom cilju, prvo smo upoređivali ekspresiju BMP4 u slezini kontrolnih i stresiranih životinja. Imunohistohemijskom metodom smo pokazali prisustvo određenog broja BMP4-pozitivnih ćelija u crvenoj pulpi kontrolnih miševa, što odgovara rezultatima Alarmo i sar. (2013) koji su dokazali proteinsku ekspresiju ovog molekula u slezini zdravih osoba. Međutim, hronično delovanje psihološkog stresora dovelo je do markantnog povećanja broja BMP4-imunoreaktivnih ćelija u crvenoj pulpi i povećanja ekspresije iRNK za BMP4 u slezini stresiranih životinja. Nalaz BMP4-imunoreaktivnih ćelija u slezini kontrolnih životinja je u saglasnosti sa ulogom ovog proteina u održavanju tkivne homeostaze, odnosno sa njegovom konstitutivnom ekspresijom u brojnim fetalnim i adultnim tkivima, uključujući crvenu pulpu slezine (Hogan, 1996; Alarmo i sar., 2013). Izraženo povećanje ekspresije BMP4 u crvenoj pulpi hronično stresiranih životinja ukazuje prvi put na značaj ovog signalnog molekula u regulaciji procesa SE koji je indukovano hroničnim delovanjem psihološkog stresora.

Kako aktivacija signalnog puta započinje vezivanjem molekula BMP4 za odgovarajuće receptore (Shi i Massague, 2003), sledeće što smo ispitivali je da li hronični psihološki stres utiče na ekspresiju BMPR u slezini. Poznato je da se BMP4 prvo vezuje za BMPR tipa I, koji ima visok afinitet vezivanja za BMP4, nakon čega dolazi do privlačenja BMPR tipa II i posledičnog formiranja heteromernog kompleksa ligand / receptor tipa I / receptor tipa II (Sieber i sar., 2009). Naši rezultati su pokazali višestruko povećanje ekspresije iRNK za BMPRIa i BMPRII u slezini stresiranih životinja, što uz nalaz povećane genske i proteinske ekspresije

BMP4 jasno ukazuje na aktivaciju BMP4/BMPR signalnog puta u slezini tokom hroničnog psihološkog stresa.

Eksperimentalno je dokazano da aktivacija BMP4/BMPR signalnog puta povećava produkciju hepcidina, osnovnog fiziološkog regulatora metabolizma gvožđa u organizmu (Ganz, 2003; Wang i sar., 2005). Nakon sinteze u jetri, hepcidin se izlučuje u cirkulaciju, a zatim vezuje za protein feroportin lokalizovan na enterocitima i ćelijama retikuloendotelnog sistema sprečavajući oslobađanje gvožđa iz ovih ćelija (Kemna i sar., 2008). Zhao i sar. (2008) su pokazali da hronični psihološki stres mehanizmom povećane produkcije hepcidina smanjuje apsorpciju gvožđa u duodenumu i onemogućava njegovo oslobađanje iz intracelularnih depoa u jetri i slezini. Na osnovu navedenih saznanja, možemo pretpostaviti da aktivacija BMP4/BMPR signalnog puta u našem eksperimentalnom modelu istim mehanizmom sprečava oslobađanje gvožđa iz ćelija retikuloendotelnog sistema slezine što dodatno smanjuje njegovu koncentraciju u cirkulaciji stresiranih životinja i na taj način dovodi do permanentne aktivacije procesa SE u hroničnom stresu. Naime, poznato je da smanjena koncentracija gvožđa u cirkulaciji stimuliše ekspanziju nezrelih ćelija eritrocitne loze koje se kontinuirano samoobnavljaju i najvećim delom ne dovršavaju proces sazrevanja (Li i Ginzburg, 2010). Slično tome, maligno izmenjene hematopoetske ćelije stiču potencijal kontinuirane proliferacije i stoga često ne ulaze u fazu terminalne diferencijacije (von Lindern i sar., 2001).

Uzimajući u obzir prethodno navedene činjenice, permanentna aktivacija procesa SE i odložena terminalna diferencijacija eritroidnih ćelija u slezini, zapažene u našim istraživanjima, označavaju potencijalne faktore rizika za malignu transformaciju nezrelih ćelija eritrocitne loze u hroničnom psihološkom stresu. U prilog ovoj hipotezi idu i rezultati Shaked i sar. (2005) koji su pokazali da slezina predstavlja specifičnu mikrosredinu koja ubrzava ekspanziju eritroleukemijskih ćelija. Činjenica da se ekstramedularna hematopoeza i akutna leukemijska transformacija ćelija kod pacijenata sa mijeloproliferativnim neoplazmama odvijaju najčešće u slezini (Prakash i sar., 2012) dodatno potvrđuje značaj njene mikrosredine u stvaranju uslova koji favorizuju malignu transformaciju nezrelih krvnih ćelija.

S obzirom na kontinuiranu aktivaciju SE i potencijalni rizik od leukemijske transformacije nezrelih ćelija eritrocitne loze (Subramanian i sar., 2008), pretpostavili smo da se u toku hroničnog stresa aktiviraju određeni inhibitorni mehanizmi kako bi sprečili prekomernu ekspanziju ovih ćelija. Prethodno smo pokazali da hronični psihološki stres dovodi do značajnog povećanja broja eritroidnih progenitora u kostnoj srži i markantnog povećanja broja eritroidnih progenitora i prekursora u slezini, tako da smo u nastavku istraživanja bili usmereni na identifikaciju molekula koji bi ograničili ekspanziju navedenih ćelija tokom hroničnog stresa. Imajući u vidu da psihološki stres povećava produkciju NO u različitim tkivima (Eskiocak i sar., 2006; Gądek-Michalska i sar., 2012), i da ovaj signalni molekul inhibitorno deluje na eritrocitopoezu (Čokić i Schechter, 2008), želeli smo da ispitamo da li hronični psihološki stres mehanizmom povećane produkcije NO sprečava prekomernu ekspanziju eritroidnih progenitora u kostnoj srži.

Naši rezultati su pokazali da svakodnevna primena L-NAME u trajanju od 7 dana značajno povećava broj BFU-E i CFU-E ćelija u kostnoj srži nestresiranih miševa, sugerišući da endogena produkcija NO inhibira rast ovih ćelija u bazalnim uslovima. Dobijeni nalaz je u saglasnosti sa rezultatima Shami i Weinberg (1996) koji su, ispitujući uticaj NO na mijeloidne i eritroidne progenitore izolovane iz kostne srži čoveka, ustanovili da ovaj signalni molekul inhibira formiranje CFU-E kolonija u *in vitro* uslovima. Međutim, nasuprot očekivanjima, utvrdili smo da blokada endogene produkcije NO pre svakodnevne primene psihološkog stresora u potpunosti prevenira stimulišući efekat hroničnog stresa na BFU-E i CFU-E ćelije. Uzimajući u obzir rezultate Joung i sar. (2012) koji su pokazali da pretretman sa L-NAME sprečava porast glukokortikoidnih hormona u *restraint* stresu i činjenicu da ovi hormoni predstavljaju ključne medijatore u dejstvu hroničnog *restraint* stresa na eritroidne progenitore u kostnoj srži (Voorhees i sar., 2013), izostanak odgovora eritroidnih progenitora kod miševa kojima je L-NAME aplikovan pre svakodnevnog izlaganja *restraint* stresu, može biti rezultat neizmenjene koncentracije glukokortikoida u cirkulaciji ovih životinja. Takođe, za razliku od nestresiranih životinja kod kojih je hronična primena L-NAME povećala broj BFU-E i CFU-E ćelija u kostnoj srži, svakodnevna inhibicija sinteze NOS tokom hroničnog

stresa nije izmenila broj ovih ćelija u odnosu na njihov broj u kostnoj srži kontrolnih životinja. Ovakav nalaz bi se mogao objasniti činjenicom da bioraspoloživost NO nije uslovljena samo njegovom sintezom *de novo*, već da zavisi i od stepena konverzije njegovih metabolita. Naime, pokazano je da se u uslovima hipoksije i narušene homeostaze organizma aktivira alternativna produkcija NO koja podrazumeva stvaranje ovog signalnog molekula iz njegovih metabolita – nitrita i nitrata (Lundberg i Weitzberg, 2010). U skladu sa tim, neizmenjen broj eritroidnih progenitora u kostnoj srži navedene grupe miševa može biti odraz alternativne produkcije NO u hroničnom stresu uzrokovane svakodnevnom primenom L-NAME.

Bitno je istaći da su Lim i sar. (2007) dokazali direktan uticaj glukokortikoida na produkciju NO u makrofagima. Kako makrofagi ulaze u sastav eritroblastnog ostrva i u značajnoj meri doprinose ukupnoj produkciji NO u kostnoj srži, interesovalo nas je da li i na koji način povećana koncentracija glukokortikoida u hroničnom stresu utiče na lokalnu produkciju NO u našem eksperimentalnom modelu. *Western blot* analizom smo utvrdili statistički značajno smanjenje ekspresije nNOS u kostnoj srži miševa stresiranih 7 i 14 dana, što ukazuje da povećana koncentracija glukokortikoida tokom hroničnog stresa smanjuje produkciju NO u ćelijama kostne srži. Slično tome, u kostnoj srži stresiranih životinja uočili smo i trend smanjenja ekspresije eNOS, ali detektovano smanjenje, verovatno zbog velikih individualnih razlika, nije dostiglo statističku značajnost. Smanjena produkcija NO u ćelijama kostne srži tokom hroničnog stresa je u saglasnosti sa *in vitro* studijom Lim i sar. (2007) kojom je ustanovljeno da niske koncentracije glukokortikoida stimulišu dok visoke suprimiraju lokalnu produkciju NO. S obzirom da NO deluje inhibitorno na rast eritroidnih progenitora, smanjena produkcija ovog molekula može biti jedan od mehanizama kojim glukokortikoidi povećavaju broj BFU-E i CFU-E ćelija u hroničnom stresu. Takođe, podaci dobijeni *Western blot* analizom ukazuju na značajnu ulogu nNOS u ispitivanom procesu što odgovara rezultatima Krasnov i sar. (2008), koji su analizirajući uticaj pojedinačnih izoformi NOS na produkciju NO i parakrinu regulaciju hematopoeze u kostnoj srži, pokazali da nNOS ima najznačajniju ulogu u regulaciji hematopoeze u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Pored toga, eksperimentalno je



dokazano da aktivacija transkripcionog faktora NF $\kappa$ B utiče na ekspresiju nNOS u različitim tipovima ćelija (Li i sar., 2007; Nakata i sar., 2007; Carbone i sar., 2008). U skladu sa tim, smanjena ekspresija NF $\kappa$ B u nukleusnoj frakciji ćelija kostne srži stresiranih životinja ukazuje na smanjenu aktivnost ovog transkripcionog faktora, odnosno njegovu ulogu u regulaciji ekspresije nNOS i posledičnom smanjenju produkcije NO u kostnoj srži tokom hroničnog psihološkog stresa.

Imajući u vidu činjenicu da hronično delovanje psihološkog stresora dovodi do povećanja koncentracije MIF u cirkulaciji (Edwards i sar., 2010), i da podaci dobijeni istraživanjem *in vitro* pokazuju inhibitorno dejstvo ovog citokina na rast eritroidnih progenitora (McDevitt i sar., 2006), u nastavku istraživanja cilj nam je bio da ispitamo da li hronični psihološki stres mehanizmom povećane produkcije MIF ograničava ekspanziju nezrelih eritroidnih ćelija u kostnoj srži i slezini miša. Tako, istovremenim praćenjem efekata psihološkog stresa na eritrocitopoezu kod *wild-type* i MIF *knockout* miševa, ustanovili smo da MIF ne utiče na broj opredeljenih matičnih ćelija za eritrocitnu lozu u kostnoj srži. Slično tome, citofluorometrijska analiza ćelija kostne srži nije pokazala značajnije razlike u odgovoru eritroidnih prekursora MIF<sup>+/+</sup> i MIF<sup>-/-</sup> miševa na hronično delovanje psihološkog stresora. Na osnovu navedenih rezultata, zaključili smo da MIF tokom hroničnog stresa ne učestvuje u regulaciji eritrocitopoeze u kostnoj srži. Međutim, poređenjem različitih populacija Ter119-pozitivnih ćelija u kostnoj srži kontrolnih *wild-type* i MIF *knockout* miševa, uočili smo značajno povećan procenat najzrelijih formi Ter119-pozitivnih ćelija - CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> ćelija u kostnoj srži kontrolnih MIF<sup>-/-</sup> miševa. Identičan nalaz povećanog broja najzrelijih formi CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> ćelija zapažen je i u slezini kontrolnih MIF<sup>-/-</sup> miševa, što ukazuje da MIF do izvesne mere inhibira terminalnu diferencijaciju Ter119-pozitivnih ćelija u bazalnim uslovima.

Za razliku od kostne srži, delecija gena za MIF je rezultirala dodatnim povećanjem broja CFU-E progenitora u slezini stresiranih miševa, sugerišući da MIF utiče na ekstrapomedularnu eritrocitopoezu u hroničnom stresu. U skladu sa tim, nalaz dobijen protočnom citometrijom pokazuje da nedostatak ovog gena značajno povećava broj nezrelih CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> prekursora u slezini miševa stresiranih 14 dana, potvrđujući inhibitorni uticaj MIF na ekstrapomedularnu

eritrocitopoezu indukovanu hroničnim stresom. Pored toga, imunohistohemijskom metodom je detektovano prisustvo MIF u crvenoj pulpi slezine, a saglasno njegovoj ulozi u ekstramedularnoj eritrocitopoezi tokom hroničnog stresa, *Western blot* analiza je pokazala značajno povećanje ekspresije ovog proteina u slezini stresiranih miševa. S obzirom da glukokortikoidi indukuju sintezu i oslobađanje MIF (Fingerle-Rowson i sar., 2003), pretpostavljamo da povećana ekspresija MIF u stresu predstavlja direktnu posledicu porasta nivoa glukokortikoidnih hormona u cirkulaciji stresiranih životinja. U prilog povećane produkcije MIF tokom hroničnog psihološkog stresa govore i rezultati Lu i sar. (2013), koji su ustanovili povećanu ekspresiju ovog proteina u zidu aorte hronično stresiranih zečeva.

Kako su literaturni podaci o uticaju MIF na eritrocitopoezu veoma oskudni i dobijeni prevashodno istraživanjem u *in vitro* uslovima, rezultati naših istraživanja prvi put ističu ulogu ovog citokina u sazrevanju eritrocita *in vivo*, pokazujući da je MIF negativan regulator ekstramedularne eritrocitopoeze u hroničnom stresu.

Sumarno, naši rezultati pokazuju da hronični psihološki stres povećava broj eritroidnih progenitora u kostnoj srži i dovodi do permanentne aktivacije procesa SE u slezini. Permanentna aktivacija SE i ubrzana ekspanzija eritroidnih ćelija predstavljaju potencijalne faktore rizika za malignu transformaciju nezrelih ćelija eritrocitne loze u hroničnom stresu. U skladu sa tim, prvi put smo pokazali da MIF sprečava prekomernu ekspanziju nezrelih ćelija eritrocitne loze u slezini delujući kao negativni regulator SE tokom hroničnog psihološkog stresa. Rezultati, prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji, doprinose opštem sagledavanju fiziološkog odgovora organizma na stres i pružaju polaznu osnovu za dalja istraživanja regulatornih mehanizama čija bi neadekvatna aktivacija mogla rezultirati klonalnim rastom i malignom transformacijom nezrelih ćelija crvene krvne loze u hroničnom stresu.

## 6. ZAKLJUČCI

Izražen porast u broju nezrelih ćelija eritrocitne loze kod stresiranih životinja ukazuje da hronični psihološki stres stimuliše eritrocitopoezu u kostnoj srži i aktivira ekstramedularnu eritrocitopoezu u slezini miša.

Povećana ekspresija c-Kit receptora i prisustvo tzv. „stres” BFU ćelija u slezini hronično stresiranih životinja sugerišu da ekstramedularna eritrocitopoeza u našem eksperimentu odgovara SE opisanoj u eksperimentalnom modelu akutne anemije.

Povećana genska i proteinska ekspresija BMP4, uz povećanu ekspresiju receptora BMPRIa i BMPRII, u slezini nakon 7 ili 14 dana izlaganja stresoru, ukazuje na ulogu BMP4 signalnog puta u regulaciji ekstramedularne eritrocitopoeze u toku hroničnog psihološkog stresa.

Smanjena ekspresija GR i EpoR u slezini, uz istovremeno povećanje koncentracije glukokortikoida i eritropoetina u cirkulaciji, nakon hroničnog delovanja psihološkog stresora, upućuje na aktivaciju oba receptora u toku SE.

Blokada GR, inhibicija aktivnosti NOS i nedostatak gena za MIF značajno utiču na proces eritrocitopoeze kod hronično stresiranih miševa što jasno ukazuje na ulogu GR, NO i MIF u regulaciji eritrocitopoeze tokom hroničnog stresa.

Primena blokade GR sprečava efekat stresa na ekspanziju CFU-E ćelija u slezini, pa se može zaključiti da hronični psihološki stres deluje na kasne eritroidne progenitore putem GR.

Inhibicija aktivnosti enzima NOS u potpunosti prevenira dejstvo hroničnog stresa na eritroidne progenitore u kostnoj srži što pokazuje da azot monoksid reguliše proces eritrocitopoeze u kostnoj srži u uslovima hroničnog stresa.

Kako je efekat hroničnog psihološkog stresa na eritrocitopoezu značajno veći u slezini miševa kojima nedostaje gen za MIF, može se zaključiti da je MIF negativan regulator ekstramedularne eritrocitopoeze u našem eksperimentalnom modelu.

Naši rezultati prvi put ukazuju na mehanizme regulacije procesa eritrocitopoeze u toku hroničnog psihološkog stresa, čija bi neadekvatna aktivacija mogla dovesti do leukemijske transformacije nezrelih ćelija crvene krvne loze. Dobijeni rezultati takođe otvaraju mogućnosti za dalja istraživanja na molekularnom nivou koja bi doprinela boljem razumevanju uloge hroničnog psihološkog stresa kao kofaktora u patogenezi hematoloških maligniteta.

## 7. LITERATURA

Aeberli D, Leech M, Morand EF. Macrophage migration inhibitory factor and glucocorticoid sensitivity. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45:937-943.

Aeberli D, Yang Y, Mansell A, Santos L, Leech M, Morand EF. Endogenous macrophage migration inhibitory factor modulates glucocorticoid sensitivity in macrophages via effects on MAP kinase phosphatase-1 and p38 MAP kinase. *FEBS Lett* 2006; 580:974-981.

Agosti V, Karur V, Sathyanarayana P, Besmer P, Wojchowski DM. A KIT juxtamembrane PY567 -directed pathway provides nonredundant signals for erythroid progenitor cell development and stress erythropoiesis. *Exp Hematol* 2009; 37:159-171.

Alarmo EL, Huhtala H, Korhonen T, Pylkkänen L, Holli K, Kuukasjärvi T, Parkkila S, Kallioniemi A. Bone morphogenetic protein 4 expression in multiple normal and tumor tissues reveals its importance beyond development. *Mod Pathol* 2013; 26:10-21.

Alexander JK, Cox GM, Tian JB, Zha AM, Wei P, Kigerl KA, Reddy MK, Dagia NM, Sielecki T, Zhu MX, Satoskar AR, McTigue DM, Whitacre CC, Popovich PG. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is essential for inflammatory and neuropathic pain and enhances pain in response to stress. *Exp Neurol* 2012; 236:351-362.

Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Lambrechts D, Fish RJ, Tjwa M, Plaisance S, Sugamele R, DeMol M, Martinez-Soria E, Maxwell PH, Lemke G, Goff SP, Matsushima GK, Earp HS, Chanson M, Collen D, Izui S, Schapira M, Conway EM, Carmeliet P. Role of Gas6 in erythropoiesis and anemia in mice. *J Clin Invest* 2008; 118:583-596.

Antoni MH, Lutgendorf SK, Cole SW, Dhabhar FS, Sephton SE, McDonald PG, Stefanek M, Sood AK. The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:240-248.

Armario A, Montero JL, Balasch J. Sensitivity of corticosterone and some metabolic variables to graded levels of low intensity stresses in adult male rats. *Physiol Behav* 1986; 37:559-561.

Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, Gemsa D, Donnelly T, Bucala R. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:7849-7854.

Barbieri A, Palma G, Rosati A, Giudice A, Falco A, Petrillo A, Petrillo M, Bimonte S, Di Benedetto M, Esposito G, Stiuso P, Abbruzzese A, Caraglia M, Arra C. Role of

endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in chronic stress-promoted tumour growth. *J Cell Mol Med* 2012; 16:920-926.

Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 1998; 94:557-572.

Baron MH, Isern J, Fraser ST. The embryonic origins of erythropoiesis in mammals. *Blood*. 2012; 119:4828-4837.

Bauer A, Tronche F, Wessely O, Kellendonk C, Reichardt HM, Steinlein P, Schütz G, Beug H. The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes Dev* 1999; 13:2996-3002.

Bierhaus A, Humpert PM, Nawroth PP. NF-kappaB as a molecular link between psychosocial stress and organ dysfunction. *Pediatr Nephrol* 2004; 19:1189-1191.

Bierhaus A, Wolf J, Andrassy M, Rohleder N, Humpert PM, Petrov D, Ferstl R, von Eynatten M, Wendt T, Rudofsky G, Joswig M, Morcos M, Schwaninger M, McEwen B, Kirschbaum C, Nawroth PP. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:1920-1925.

Bloom J, Al-Abed Y. MIF. Mood Improving/Inhibiting Factor? *J Neuroinflammation* 2014; 11:11.

Bornstein SR, Engeland WC, Ehrhart-Bornstein M, Herman JP. Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19:175-180.

Boudry G, Cheeseman CI, Perdue MH. Psychological stress impairs Na<sup>+</sup>-dependent glucose absorption and increases GLUT2 expression in the rat jejunal brush-border membrane. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292:R862-R867.

Bowers SL, Bilbo SD, Dhabhar FS, Nelson RJ. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. *Brain Behav Immun* 2008; 22:105-113.

Bozzini CE, Alippi RM, Barceló AC, Conti MI, Bozzini C, Lezon CE, Olivera MI. The biology of stress erythropoiesis and erythropoietin production. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 718:83-92.

Bresnick EH, Lee HY, Fujiwara T, Johnson KD, Keles S. GATA switches as developmental drivers. *J Biol Chem* 2010; 285:31087-31093.

Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 1997; 90:1345-1364.

Budeč M, Đorđević-Dikić A, Balint-Perić Lj. Acute effect of ethanol on ACTH secretion: relationship to phases of oestrus cycle. *Eur J Endocrinol* 1994; 130:206.

Budeč M, Marković D, Djikić D, Mitrović O, Drndarević N, Koko V, Todorović V. Blockade of nitric oxide synthesis modulates rat immunoglobulin A. *Neuroimmunomodulation* 2009; 16:155-161.

Bugajski J, Gadek-Michalska A, Bugajski A J. Nitric oxide and prostaglandin systems in the stimulation of hypothalamic-pituitary/adrenal axis by neurotransmitters and neurohormones. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55:679-703.

Buynitsky T, Mostofsky DI. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev* 2009; 33:1089-1098.

Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 1995; 377:68-71.

Calandra T, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor: a counter-regulator of glucocorticoid action and critical mediator of septic shock. *J Inflamm* 1996; 47:39-51.

Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:791-800.

Carbone DL, Moreno JA, Tjalkens RB. Nuclear factor kappa-B mediates selective induction of neuronal nitric oxide synthase in astrocytes during low-level inflammatory stimulation with MPTP. *Brain Res* 2008; 1217:1-9.

Chasis JA, Mohandas N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood* 2008; 112:470-478.

Chen K, Liu J, Heck S, Chasis JA, An X, Mohandas N. Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:17413-17418.

Chen J, Shen H, Chen C, Wang W, Yu S, Zhao M, Li M. The effect of psychological stress on iron absorption in rats. *BMC Gastroenterol* 2009; 9:83.

Chénais B, Molle I, Jeannesson P. Inhibitory effect of nitric oxide on chemically induced differentiation of human leukemic K562 cells. *Biochem Pharmacol* 1999; 58:773-778.

Chow A, Huggins M, Ahmed J, Hashimoto D, Lucas D, Kunisaki Y, Pinho S, Leboeuf M, Noizat C, van Rooijen N, Tanaka M, Zhao ZJ, Bergman A, Merad M, Frenette PS. CD169<sup>+</sup> macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress. *Nat Med* 2013; 19:429-436.

Chute JP, Ross JR, McDonnell DP. Minireview: Nuclear receptors, hematopoiesis, and stem cells. *Mol Endocrinol* 2010; 24:1-10.

Cohen S, Janicki-Deverts D, Doyle WJ, Miller GE, Frank E, Rabin BS, Turner RB. Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:5995-5999.

Cohen S, Janicki-Deverts D, Miller G. Psychological stress and disease. *JAMA* 2007; 298:1685-1687.

Cole RJ, Regan T. Haemopoietic progenitor cells in prenatal congenitally anaemic 'flexed-tailed' (f/f) mice. *Br J Haematol* 1976; 33:387-394.

Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* 2001; 1:1397-1406.

Conrad CD. Chronic stress-induced hippocampal vulnerability: the glucocorticoid vulnerability hypothesis. *Rev Neurosci* 2008; 19:395-411.

Cortese-Krott MM, Kelm M. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: Key to a new erythrocrine function? *Redox Biol* 2014; 2:251-258.

Cruz FC, Marin MT, Leão RM, Planeta CS. Behavioral and neuroendocrine effects of the exposure to chronic restraint or variable stress in early adolescent rats. *Int J Dev Neurosci* 2012; 30:19-23.

Custodis F, Gertz K, Balkaya M, Prinz V, Mathar I, Stamm C, Kronenberg G, Kazakov A, Freichel M, Böhm M, Endres M, Laufs U. Heart rate contributes to the vascular effects of chronic mental stress: effects on endothelial function and ischemic brain injury in mice. *Stroke* 2011; 42:1742-1749.

Čokić VP, Schechter AN. Effects of nitric oxide on red blood cell development and phenotype. *Curr Top Dev Biol* 2008; 82:169-215.

Ćirić O. Hipotalamo-hipofizo-adrenalna osovina: Morfologija, funkcija i biohemija. U: *Neuroendokrinoimunologija*. Ćirić O, Budeč M, Leposavić O (ured.). Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 2000, str. 273-301.

Dai CH, Krantz SB, Zsebo KM. Human burst-forming units-erythroid need direct interaction with stem cell factor for further development. *Blood* 1991; 78:2493-2497.

Daun JM, Cannon JG. Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic I $\kappa$ B $\alpha$ . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 279:R1043-R1049.

de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6:463-475.



- Desborough JP. The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth* 2000; 85:109-117.
- DeSimone J, Biel M, Heller P. Maintenance of fetal hemoglobin (HbF) elevations in the baboon by prolonged erythropoietic stress. *Blood* 1982; 60:519-523.
- Dinan TG, Scott LV. Anatomy of melancholia: focus on hypothalamic-pituitary-adrenal axis overactivity and the role of vasopressin. *J Anat* 2005; 207:259-264.
- Dor FJ, Ramirez ML, Parmar K, Altman EL, Huang CA, Down JD, Cooper DK. Primitive hematopoietic cell populations reside in the spleen: studies in the pig, baboon, and human. *Exp Hematol* 2006; 34:1573-1582.
- Dzierzak E, Philipsen S. Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3:e011601.
- Dumitriu B, Bhattaram P, Dy P, Huang Y, Quayum N, Jensen J, Lefebvre V. Sox6 is necessary for efficient erythropoiesis in adult mice under physiological and anemia-induced stress conditions. *PLoS One* 2010; 5:e12088.
- Đikić D, Budeč M, Vranješ Đurić S, Koko V, Vignjević S, Mitrović O. Blokada sinteze azot-monoksida stimuliše aktivnost korteksa nadbubrežne žlezde. *Med Čas (Krag)* 2013; 47:7-11.
- Dorđević D. Stres i adaptacija. *Med Data Rev* 2011; 3:77-83.
- Dorđević J, Cvijić G, Davidović V. Different activation of ACTH and corticosterone release in response to various stressors in rats. *Physiol Res* 2003; 52:67-72.
- Echeverry MB, Guimarães FS, Del Bel EA. Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. *Neuroscience* 2004; 125:981-993.
- Edwards KM, Bosch JA, Engeland CG, Cacioppo JT, Marucha PT. Elevated macrophage migration inhibitory factor (MIF) is associated with depressive symptoms, blunted cortisol reactivity to acute stress, and lowered morning cortisol. *Brain Behav Immun* 2010; 24:1202-1208.
- Engler H, Bailey MT, Engler A, Sheridan JF. Effects of repeated social stress on leukocyte distribution in bone marrow, peripheral blood and spleen. *J Neuroimmunol* 2004; 148:106-115.
- Engler H, Bailey MT, Engler A, Stiner-Jones LM, Quan N, Sheridan JF. Interleukin-1 receptor type 1-deficient mice fail to develop social stress-associated glucocorticoid resistance in the spleen. *Psychoneuroendocrinology* 2008; 33:108-117.

Engler A, Roy S, Sen CK, Padgett DA, Sheridan JF. Restraint stress alters lung gene expression in an experimental influenza A viral infection. *J Neuroimmunol* 2005; 162:103-111.

Erkut ZA, Pool C, Swaab DF. Glucocorticoids suppress corticotropin-releasing hormone and vasopressin expression in human hypothalamic neurons. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:2066-2073.

Eskiocak S, Gozen AS, Taskiran A, Kilic AS, Eskiocak M, Gulen S. Effect of psychological stress on the L-arginine-nitric oxide pathway and semen quality. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39:581-588.

Feng Z, Liu L, Zhang C, Zheng T, Wang J, Lin M, Zhao Y, Wang X, Levine AJ, Hu W. Chronic restraint stress attenuates p53 function and promotes tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109:7013-7018.

Flaster H, Bernhagen J, Calandra T, Bucala R. The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity. *Mol Endocrinol* 2007; 21:1267-1280.

Flygare J, Rayon Estrada V, Shin C, Gupta S, Lodish HF. HIF1alpha synergizes with glucocorticoids to promote BFU-E progenitor self-renewal. *Blood* 2011; 117:3435-3444.

Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest* 2007; 117:850-858.

Frick LR, Arcos ML, Rapanelli M, Zappia MP, Brocco M, Mongini C, Genaro AM, Cremaschi GA. Chronic restraint stress impairs T-cell immunity and promotes tumor progression in mice. *Stress* 2009; 12:134-143.

Fingerle-Rowson G, Koch P, Bikoff R, Lin X, Metz CN, Dhabhar FS, Meinhardt A, Bucala R. Regulation of macrophage migration inhibitory factor expression by glucocorticoids *in vivo*. *Am J Pathol* 2003; 162:47-56.

Gądek-Michalska A, Tadeusz J, Rachwalska P, Spyrka J, Bugajski J. Effect of repeated restraint on homotypic stress-induced nitric oxide synthases expression in brain structures regulating HPA axis. *Pharmacol Rep* 2012; 64:1381-1390.

Ganguli G, Back J, Sengupta S, Wasylyk B. The p53 tumour suppressor inhibits glucocorticoid-induced proliferation of erythroid progenitors. *EMBO Rep* 2002; 3:569-574.

Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 2003; 102:783-788.

Gilliver SC, Emmerson E, Bernhagen J, Hardman MJ. MIF: a key player in cutaneous biology and wound healing. *Exp Dermatol* 2011; 20:1-6.

Golde DW, Bersch N, Cline MJ. Potentiation of erythropoiesis in vitro by dexamethasone. *J Clin Invest* 1976; 57:57-62.

Goldstein DS, Kopin IJ. Evolution of concepts of stress. *Stress* 2007; 10:109-120.

Goldstein DS, McEwen B. Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress* 2002; 5:55-58.

Goyal S, Gupta G, Thomas B, Bhat KM, Bhat GS. Stress and periodontal disease: The link and logic! *Ind Psychiatry J* 2013; 22:4-11.

Gramotnev DK, Gramotnev G. Psychological stress and psychosomatic treatment: major impact on serious blood disorders? *Neuroimmunomodulation* 2011; 18:171-183.

Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood* 1999; 94:87-96.

Gulati K, Ray A, Masood A, Vijayan VK. Involvement of nitric oxide (NO) in the regulation of stress susceptibility and adaptation in rats. *Indian J Exp Biol* 2006; 44:809-815.

Gummow BM, Scheys JO, Cancelli VR, Hammer GD. Reciprocal regulation of a glucocorticoid receptor-steroidogenic factor-1 transcription complex on the Dax-1 promoter by glucocorticoids and adrenocorticotrophic hormone in the adrenal cortex. *Mol Endocrinol* 2006; 20:2711-2723.

Gursoy A, Dogruk Unal A, Ayturk S, Karakus S, Nur Izol A, Bascil Tutuncu N, Guvener Demirag N. Polycythemia as the first manifestation of Cushing's disease. *J Endocrinol Invest* 2006; 29:742-744.

Gutiérrez L, Lindeboom F, Langeveld A, Grosveld F, Philipsen S, Whyatt D. Homotypic signalling regulates Gata1 activity in the erythroblastic island. *Development* 2004; 131:3183-3193.

Hanspal M, Hanspal JS. The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: a 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. *Blood* 1994; 84:3494-3504.

Hara H, Ogawa M. Erythropoietic precursors in mice with phenylhydrazine-induced anemia. *Am J Hematol* 1976; 1:453-458.

Hattangadi SM, Wong P, Zhang L, Flygare J, Lodish HF. From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood* 2011; 118:6258-6268.

Hegde S, Lenox LE, Lariviere A, Porayette P, Perry JM, Yon M, Paulson RF. An intronic sequence mutated in flexed-tail mice regulates splicing of Smad5. *Mamm Genome* 2007; 18:852-860.

Helms C, Kim-Shapiro DB. Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling. *Free Radic Biol Med* 2013; 61:464-472.

Hernandez ME, Martinez-Mota L, Salinas C, Marquez-Velasco R, Hernandez-Chan NG, Morales-Montor J, Pérez-Tapia M, Streber ML, Granados-Camacho I, Becerril E, Javier BH, Pavón L. Chronic stress induces structural alterations in splenic lymphoid tissue that are associated with changes in corticosterone levels in wistar-kyoto rats. *Biomed Res Int* 2013; 2013:868742.

Hillhouse EW, Randeve H, Ladds G, Grammatopoulos D. Corticotropin-releasing hormone receptors. *Biochem Soc Trans* 2002; 30:428-432.

Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996; 10:1580-1594.

Isern J, Fraser ST, He Z, Baron MH. The fetal liver is a niche for maturation of primitive erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:6662-6667.

Itoi K, Jiang YQ, Iwasaki Y, Watson SJ. Regulatory mechanisms of corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 2004; 16:348-355.

Jasnić N, Đorđević J, Đurašević S, Lakić I, Vujović P, Spasojević N, Cvijić G. Specific regulation of ACTH secretion under the influence of low and high ambient temperature — The role of catecholamines and vasopressin. *J Thermal Biol* 2012; 37: 469-474.

Jensen FB. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: a comparative perspective. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1787:841-848.

Joëls M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10:459-466.

Joëls M, Karst H, Krugers HJ, Lucassen PJ. Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Front Neuroendocrinol* 2007; 28:72-96.

Joëls M, Kloet ER. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol* 1994; 43:1-36.

Joung HY, Jung EY, Kim K, Lee MS, Her S, Shim I. The differential role of NOS inhibitors on stress-induced anxiety and neuroendocrine alterations in the rat. *Behav Brain Res* 2012; 235:176-181.

Junqueira LC, Carneiro J. *Osnovi histologije : tekst i atlas*, 11th ed. Beograd, Data status, 2005.

Kahn MJ, Maley JH, Lasker GF, Kadowitz PJ. Updated role of nitric oxide in disorders of erythrocyte function. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2013; 1:83-87.

Kant GJ, Eggleston T, Landman-Roberts L, Kenion CC, Driver GC, Meyerhoff JL. Habituation to repeated stress is stressor specific. *Pharmacol Biochem Behav* 1985; 22:631-634.

Kapur R, Zhang L. A novel mechanism of cooperation between c-Kit and erythropoietin receptor. Stem cell factor induces the expression of Stat5 and erythropoietin receptor, resulting in efficient proliferation and survival by erythropoietin. *J Biol Chem* 2001; 276:1099-1106.

Kasama T, Ohtsuka K, Sato M, Takahashi R, Wakabayashi K, Kobayashi K. Macrophage migration inhibitory factor: A multifunctional cytokine in rheumatic diseases. *Arthritis* 2010; 2010:106202.

Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411:273-89.

Kemna EH, Tjalsma H, Willems HL, Swinkels DW. Heparin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica* 2008; 93:90-97.

Kim CH. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *J Blood Med* 2010; 1:13-19.

Kingsley PD, Malik J, Fantauzzo KA, Palis J. Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. *Blood* 2004; 104:19-25.

Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Ozüyan B, Schnürch HG, Gödecke A, Weber AA, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rösen P, Kelm M. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 2006; 107:2943-2951.

Kolbus A, Blázquez-Domingo M, Carotta S, Bakker W, Luedemann S, von Lindern M, Steinlein P, Beug H. Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the expansion of erythroid progenitors: molecular analysis by expression profiling. *Blood* 2003; 102:3136-3146.

Koo JW, Russo SJ, Ferguson D, Nestler EJ, Duman RS. Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:2669-2674.

Krasnov P, Michurina T, Packer MA, Stasiv Y, Nakaya N, Moore KA, Drazan KE, Enikolopov G. Neuronal nitric oxide synthase contributes to the regulation of hematopoiesis. *Mol Med* 2008; 14:141-149.

Krstić A, Santibanez JF, Okić I, Mojsilović S, Kocić J, Jovčić G, Milenković P, Bugarski D. Combined effect of IL-17 and blockade of nitric oxide biosynthesis on haematopoiesis in mice. *Acta Physiol (Oxf)* 2010; 199:31-41.

Küçükkaya B, Oztürk G, Yalçintepe L. Nitric oxide levels during erythroid differentiation in K562 cell line. *Indian J Biochem Biophys* 2006; 43:251-253.

Kudielka BM, Kirschbaum C. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol Psychol* 2005; 69:113-132.

Kunicka JE, Talle MA, Denhardt GH, Brown M, Prince LA, Goldstein G. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of production of multiple lymphokines by in vivo administration of dexamethasone. *Cell Immunol* 1993; 149:39-49.

Kyrou I, Tsigos C. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9:787-793.

Labar B, Hauptman E (ured.). *Hematologija*. Školska knjiga, Zagreb, 2007, str. 102-157.

Lang E, Qadri SM, Lang F. Killing me softly - suicidal erythrocyte death. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44:1236-1243.

Lapid, K., Glait-Santar C, Gur-Cohen S, Canaani J, Kollet O, Lapidot T. Egress and mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells: a dynamic multi-facet process. In: *StemBook*, Cambridge, 2012, (<http://www.stembook.org/node/762>).

Leech M, Metz C, Hall P, Hutchinson P, Gianis K, Smith M, Weedon H, Holdsworth SR, Bucala R, Morand EF. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1601-1618.

Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, Delohery T, Chen Y, Mitchell RA, Bucala R. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* 2003; 197:1467-1476.

Lenox LE, Perry JM, Paulson RF. BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia. *Blood* 2005; 105:2741-2748.

Lenox LE, Shi L, Hegde S, Paulson RF. Extramedullary erythropoiesis in the adult liver requires BMP-4/Smad5-dependent signaling. *Exp Hematol* 2009; 37:549-558.

Li H, Ginzburg YZ. Crosstalk between iron metabolism and erythropoiesis. *Adv Hematol* 2010; 2010:605435.

Li Q, Liang Z, Nakadai A, Kawada T. Effect of electric foot shock and psychological stress on activities of murine splenic natural killer and lymphokine-activated killer cells, cytotoxic T lymphocytes, natural killer receptors and mRNA transcripts for granzymes and perforin. *Stress* 2005; 8:107-116.

Li Y, Zhao Y, Li G, Wang J, Li T, Li W, Lu J. Regulation of neuronal nitric oxide synthase exon 1f gene expression by nuclear factor-kappaB acetylation in human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 2007; 101:1194.

Liang R, Chan TK, Todd D. Childhood acute lymphoblastic leukaemia and aplastic anaemia. *Leuk Lymphoma* 1994; 13:411-415.

Lim HY, Müller N, Herold MJ, van den Brandt J, Reichardt HM. Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration. *Immunology* 2007; 122:47-53.

Ling KW, Ottersbach K, van Hamburg JP, Oziemlak A, Tsai FY, Orkin SH, Ploemacher R, Hendriks RW, Dzierzak E. GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells *J Exp Med* 2004; 200:871-882.

Llamas-Covarrubias MA, Valle Y, Bucala R, Navarro-Hernández RE, Palafox-Sánchez CA, Padilla-Gutiérrez JR, Parra-Rojas I, Bernard-Medina AG, Reyes-Castillo Z, Muñoz-Valle JF. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): genetic evidence for participation in early onset and early stage rheumatoid arthritis. *Cytokine* 2013; 61:759-765.

Lodish H, Flygare J, Chou S. From stem cell to erythroblast: regulation of red cell production at multiple levels by multiple hormones. *IUBMB Life* 2010; 62:492-496.

Lopez-Figueroa MO, Day HEW, Akil H, Watson SJ. Nitric oxide in the stress axis. *Histol Histopathol* 1998; 13:1243-1252.

Lu XT, Liu YF, Zhao L, Li WJ, Yang RX, Yan FF, Zhao YX, Jiang F. Chronic psychological stress induces vascular inflammation in rabbits. *Stress* 2013; 16:87-98.

Luck L, Zeng L, Hiti AL, Weinberg KI, Malik P. Human CD34(+) and CD34(+)CD38(-) hematopoietic progenitors in sickle cell disease differ

phenotypically and functionally from normal and suggest distinct subpopulations that generate F cells. *Exp Hematol* 2004; 32:483–493.

Lundberg JO, Weitzberg E. NO-synthase independent NO generation in mammals. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396:39–45.

Maciejewski JP, Selleri C, Sato T, Cho HJ, Keefer LK, Nathan CF, Young NS. Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro. Contribution to inhibitory action of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 1995; 96:1085–1092.

Madrigal JL, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Castrillo A, Boscá L, Leza JC. Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor kappaB-mediated mechanisms. *J Neurochem* 2001; 76:532-538.

Mancuso C, Navarra P, Preziosi P. Roles of nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neurochem* 2010; 113:563-575.

Mao YF, Zhang YL, Yu QH, Jiang YH, Wang XW, Yao Y, Huang JL. Chronic restraint stress aggravated arthritic joint swell of rats through regulating nitric oxide production. *Nitric Oxide* 2012; 27:137-142.

Martí O, Armario A. Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int J Dev Neurosci* 1998; 16:241-260.

Martin TR. MIF mediation of sepsis. *Nat Med* 2000; 6:140-141.

Mayer E. The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut* 2000; 47: 861–869.

McDevitt MA, Xie J, Shanmugasundaram G, Griffith J, Liu A, McDonald C, Thuma P, Gordeuk VR, Metz CN, Mitchell R, Keefer J, David J, Leng L, Bucala R. A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia. *J Exp Med* 2006; 203:1185-1196.

McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res* 2000; 886:172-189.

McEwen BS, Wingfield JC. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav* 2003; 43:2-15.

Menon MP, Karur V, Bogacheva O, Bogachev O, Cuetara B, Wojchowski DM. Signals for stress erythropoiesis are integrated via an erythropoietin receptor-phosphotyrosine-343-Stat5 axis. *J Clin Invest* 2006; 116:683-694.



Merali Z, Hayley S, Kent P, McIntosh J, Bédard T, Anisman H. Impact of repeated stressor exposure on the release of corticotropin-releasing hormone, arginine-vasopressin and bombesin-like peptides at the anterior pituitary. *Behav Brain Res* 2009; 198:105-112.

Michurina T, Krasnov P, Balazs A, Nakaya N, Vasilieva T, Kuzin B, Khrushchov N, Mulligan RC, Enikolopov G. Nitric oxide is a regulator of hematopoietic stem cell activity. *Mol Ther* 2004; 10:241-248.

Migliaccio AR. A niche for every cell, for every function. *Haematologica* 2013; 98:1660-1663.

Millot S, Andrieu V, Letteron P, Lyoumi S, Hurtado-Nedelec M, Karim Z, Thibaudeau O, Bennada S, Charrier JL, Lasocki S, Beaumont C. Erythropoietin stimulates spleen BMP4-dependent stress erythropoiesis and partially corrects anemia in a mouse model of generalized inflammation. *Blood* 2010; 116:6072-6081.

Morand EF, Bucala R, Leech M. Macrophage migration inhibitory factor: an emerging therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48:291-299.

Morita Y, Iseki A, Okamura S, Suzuki S, Nakauchi H, Ema H. Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen. *Exp Hematol* 2011; 39:351-359.

Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Yamashita T, Tanimoto A, Tasaki H, Ozumi K, Sabanai K, Morishita T, Suda O, Hirano H, Sasaguri Y, Nakashima Y, Yanagihara N. Statin treatment upregulates vascular neuronal nitric oxide synthase through Akt/NF-kappaB pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:92-98.

Necela BM, Cidlowski JA. Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1:239-246.

Novozhilov AV, Tavrovskaya TV, Ivanov VA, Morozov VI. Hematological parameters and redox balance of rat blood in the dynamics of immobilization. *Bull Exp Biol Med* 2013; 155:447-450.

O'Connor TM, O'Halloran DJ, Shanahan F. The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *QJM* 2000; 93:323-333.

O'Neill. Nches for extramedullary hematopoiesis in the spleen. *Niche* 2012; 1:12-16.

Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 2008; 132:631-644.

Pacák K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 2001;22:502-548.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87:315-424.

Parohova J, Vrankova S, Barta A, Kovacsova M, Bartko D, Pechanova O. The cross-talk of nuclear factor kappaB and nitric oxide in the brain. *Act Nerv Super Rediviva* 2009; 51:123–126.

Patchev VK, Patchev AV. Experimental models of stress. *Dialogues Clin Neurosci* 2006; 8:417-432.

Paulson RF, Shi L, Wu DC. Stress erythropoiesis: new signals and new stress progenitor cells. *Curr Opin Hematol* 2011; 18:139-145.

Peng YL, Liu YN, Liu L, Wang X, Jiang CL, Wang YX. Inducible nitric oxide synthase is involved in the modulation of depressive behaviors induced by unpredictable chronic mild stress. *J Neuroinflammation* 2012; 9:75.

Perry JM, Harandi OF, Paulson RF. BMP4, SCF, and hypoxia cooperatively regulate the expansion of murine stress erythroid progenitors. *Blood* 2007; 109:4494-4502.

Perry JM, Harandi OF, Porayette P, Hegde S, Kannan AK, Paulson RF. Maintenance of the BMP4-dependent stress erythropoiesis pathway in the murine spleen requires hedgehog signaling. *Blood* 2009; 113:911–918.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:e36.

Prakash S, Hoffman R, Barouk S, Wang YL, Knowles DM, Orazi A. Splenic extramedullary hematopoietic proliferation in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms: heterogeneous morphology and cytological composition. *Mod Pathol* 2012; 25:815-827.

Rettori V, Fernandez-Solari J, Mohn C, Zorrilla Zubilete MA, de la Cal C, Prestifilippo JP, De Laurentiis A. Nitric oxide at the crossroad of immunoneuroendocrine interactions. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1153:35-47.

Rhodes MM, Kopsombut P, Bondurant MC, Price JO, Koury MJ. Adherence to macrophages in erythroblastic islands enhances erythroblast proliferation and increases erythrocyte production by a different mechanism than erythropoietin. *Blood* 2008; 111:1700-1708.

Richmond TD, Chohan M, Barber DL. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol* 2005; 15:146-155.

Rivier C. Role of gaseous neurotransmitters in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Ann NY Acad Sci* 2001;933:254-264.

Rivier C. Role of nitric oxide in regulating the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to endotoxemia. *Ann NY Acad Sci* 2003; 992: 72-85.

Rotllant D, Pastor-Ciurana J, Armario A. Stress-induced brain histone H3 phosphorylation: contribution of the intensity of stressors and length of exposure. *J Neurochem* 2013; 125:599-609.

Santos L, Hall P, Metz C, Bucala R, Morand EF. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids. *Clin Exp Immunol* 2001; 123:309-314.

Sapolsky SM., Romero LM, Munck AV. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating, permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocrine Rev* 2000;21: 55-89.

Savaskan NE, Fingerle-Rowson G, Buchfelder M, Eyüpoglu IY. Brain miffed by macrophage migration inhibitory factor. *Int J Cell Biol* 2012; 2012:139573.

Shackelford TJ, Claret FX. JAB1/CSN5: a new player in cell cycle control and cancer. *Cell Div* 2010; 5:26.

Shaked Y, Cervi D, Neuman M, Chen L, Klement G, Michaud CR, Haeri M, Pak BJ, Kerbel RS, Ben-David Y. The splenic microenvironment is a source of proangiogenesis/inflammatory mediators accelerating the expansion of murine erythroleukemic cells. *Blood* 2005; 105:4500-4507.

Shami PJ, Weinberg JB. Differential effects of nitric oxide on erythroid and myeloid colony growth from CD34+ human bone marrow cells. *Blood* 1996; 87:977-982.

Sherstoboev EY, Minakova MY. Hemopoietic precursors: mechanisms of regulation under conditions of chronic stress. *Bull Exp Biol Med* 2005; 140:616-620.

Shi X, Leng L, Wang T, Wang W, Du X, Li J, McDonald C, Chen Z, Murphy JW, Lolis E, Noble P, Knudson W, Bucala R. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* 2006; 25:595-606.

Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113:685-700.

Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; 20:343-355.

Socolovsky M. Molecular insights into stress erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 2007; 14:215-224.

Soni S, Bala S, Hanspal M. Requirement for erythroblast-macrophage protein (Emp) in definitive erythropoiesis. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 41:141-147.

Stiner-Jones L, Reader B, Minnillo J, Sheridan J. Restraint stress alters innate immunity. *Brain Behav Immun* 2012; 26:S41-S42.

Stellacci E, Di Noia A, Di Baldassarre A, Migliaccio G, Battistini A, Migliaccio AR. Interaction between the glucocorticoid and erythropoietin receptors in human erythroid cells. *Exp Hematol* 2009; 37:559-572.

Stephens A, Kivimäki M. Stress and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 2012; 9:360-370.

Stewart IB, McKenzie DC. The human spleen during physiological stress. *Sports Med* 2002; 32:361-369.

Stopka T, Zivny JH, Stopkova P, Prchal JF, Prchal JT. Human hematopoietic progenitors express erythropoietin. *Blood* 1998; 91:3766-3772.

Subramanian A, Hegde S, Porayette P, Yon M, Hankey P, Paulson RF. Friend virus utilizes the BMP4-dependent stress erythropoiesis pathway to induce erythroleukemia. *J Virol* 2008; 82:382-393.

Suttie AW. Histopathology of the spleen. *Toxicol Pathol* 2006; 34:466-503.

Syed RS, Reid SW, Li C, Cheetham JC, Aoki KH, Liu B, Zhan H, Osslund TD, Chirino AJ, Zhang J, Finer-Moore J, Elliott S, Sitney K, Katz BA, Matthews DJ, Wendoloski JJ, Egrie J, Stroud RM. Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature* 1998; 395:511-516.

Szabo S, Tache Y, Somogyi A. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: a retrospective 75 years after his landmark brief "letter" to the editor of nature. *Stress* 2012; 15:472-478.

Teng WF, Sun WM, Shi LF, Hou DD, Liu H. Effects of restraint stress on iron, zinc, calcium, and magnesium whole blood levels in mice. *Biol Trace Elem Res* 2008; 121:243-248.

Testa U. Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia* 2004; 18:1176-1199.

Thippeswamy T, McKay JS, Quinn JP, Morris R. Nitric oxide, a biological double-faced janus-is this good or bad. *Histol Histopathol* 2006; 21:445-458.

Tsiftoglou AS, Vizirianakis IS, Strouboulis J. Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs. *IUBMB Life* 2009; 61:800-830.

Tsuchiya T, Kishimoto J, Koyama J, Ozawa T. Modulatory effect of L-NAME, a specific nitric oxide synthase (NOS) inhibitor, on stress-induced changes in plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone levels in rats: physiological significance of stress-induced NOS activation in hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Res* 1997; 776:68-74.

Udupa KB, Crabtree HM, Lipschitz DA. *In vitro* culture of proerythroblasts: characterization of proliferative response to erythropoietin and steroids. *Br J Haematol* 1986; 2:705-714.

Verma R, Balhara YP, Gupta CS. Gender differences in stress response: Role of developmental and biological determinants. *Ind Psychiatry J* 2011; 20:4-10.

Vojta A, Zoldoš V. Adaptation or malignant transformation: the two faces of epigenetically mediated response to stress. *Biomed Res Int* 2013; 2013:954060.

von Lindern M, Deiner EM, Dolznig H, Parren-Van Amelsvoort M, Hayman MJ, Mullner EW, Beug H. Leukemic transformation of normal murine erythroid progenitors: v- and c-ErbB act through signaling pathways activated by the EpoR and c-Kit in stress erythropoiesis. *Oncogene* 2001; 20:3651-3664.

von Lindern M, Zauner W, Mellitzer G, Steinlein P, Fritsch G, Huber K, Löwenberg B, Beug H. The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. *Blood* 1999; 94:550-559.

Voorhees JL, Powell ND, Moldovan L, Mo X, Eubank TD, Marsh CB. Chronic restraint stress upregulates erythropoiesis through glucocorticoid stimulation. *PLoS One* 2013; 8:e77935.

Walrafen P, Verdier F, Kadri Z, Chrétien S, Lacombe C, Mayeux P. Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood* 2005; 105:600-608.

Wang RH, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zerfas P, Cooperman S, Eckhaus M, Rouault T, Mishra L, Deng CX. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab* 2005; 2:399-409.

Wang Z, Vogel O, Kuhn G, Gassmann M, Vogel J. Decreased stability of erythroblastic islands in integrin  $\beta$  3-deficient mice. *Physiol Rep* 2013; 1:e00018.

Wei C, Zhou J, Huang X, Li M. Effects of psychological stress on serum iron and erythropoiesis. *Int J Hematol* 2008; 88:52-56.

Weibel ER. Stereological methods. Practical methods for biological morphometry. Academic Press, London-New York-Toronto-Sidney-San Francisco, 1979.

Wessely O, Deiner EM, Beug H, von Lindern M. The glucocorticoid receptor is a key regulator of the decision between self-renewal and differentiation in erythroid progenitors. *EMBO J* 1997; 16:267–280.

Whitnall MH, Smyth D, Gainer H. Vasopressin coexists in half of the corticotropin-releasing factor axons present in the external zone of the median eminence in normal rats. *Neuroendocrinology* 1987; 45:420-424.

Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 1995; 83:59-67.

Yanai N, Matsuya Y, Obinata M. Spleen stromal cell lines selectively support erythroid colony formation. *Blood* 1989; 74:2391-2397.

Yin D, Zhang Y, Stuart C, Miao J, Zhang Y, Li C, Zeng X, Hanley G, Moorman J, Yao Z, Woodruff M. Chronic restraint stress modulates expression of genes in murine spleen. *J Neuroimmunol* 2006; 177:11-17.

Yokoyama T, Etoh T, Kitagawa H, Tsukahara S, Kannan Y. Migration of erythroblastic islands toward the sinusoid as erythroid maturation proceeds in rat bone marrow. *J Vet Med Sci* 2003; 65:449-452.

Zhang L, Prak L, Rayon-Estrada V, Thiru P, Flygare J, Lim B, Lodish HF. ZFP36L2 is required for self-renewal of early burst-forming unit erythroid progenitors. *Nature* 2013; 499:92-96.

Zhao M, Chen J, Wang W, Wang L, Ma L, Shen H, Li M. Psychological stress induces hypoferrremia through the IL-6-hepcidin axis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373:90-93.

Zheng J, Dobner A, Babygirija R, Ludwig K, Takahashi T. Effects of repeated restraint stress on gastric motility in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 296:R1358-R1365.

## Biografija

Sanja Vignjević je rođena 18. juna 1976. godine u Indiji, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju prirodno-matematičkog smera. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 28. juna 2004. godine. Pripravnički staž je obavila u okviru Kliničkog centra Srbije i u julu 2005. godine položila stručni ispit. Školske 2006/2007. godine upisala je specijalističke akademske studije – smer endokrinologija na Medicinskom fakultetu u Beogradu i 14. juna 2010. godine odbranila završni akademski specijalistički rad pod nazivom: „Grelina u humanom pankreasu u prenatalnom i ranom postnatalnom periodu i sekrecija drugih hormona iz istih ćelija“. Na istom fakultetu je šk. 2008/2009. godine upisala akademske doktorske studije iz Molekularne medicine. Decembra 2011. godine započela je specijalizaciju iz Laboratorijske medicine na Katedri za kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Zaposlena je u Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu od 26. decembra 2005. godine. U toku dosadašnjeg naučnoistraživačkog rada bila je angažovana na jednom projektu finansiranom od strane Evropske Komisije u okviru programa FP6 (Sixth Framework Programme – FP6, Priority 1: Life Science, Genomic and Biotechnology for Health, Specific Support Action, Area: Network of Excellence, HISERBS NO 0267357) i na tri projekta koje je finansiralo/finansira Ministarstvo za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Autor je ili koautor 44 publikacije koje obuhvataju: 15 radova, pretežno objavljenih u vrhunskim i vodećim naučnim časopisima međunarodnog značaja, 1 rad u časopisu nacionalnog značaja, 16 saopštenja na međunarodnim skupovima i 12 na skupovima nacionalnog značaja. Član je *European Hematology Association*, Društva fiziologa Srbije i Srpskog lekarskog društva.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Сања Вигњевић

број индекса 08-DS-MM-16

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ЋЕЛИЈСКИ И МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗМИ РЕГУЛАЦИЈЕ ЕРИТРОЦИТОПОЕЗЕ  
У УСЛОВИМА ХРОНИЧНОГ СТРЕСА

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

Потпис докторанда

У Београду, 25.8.2014.

Сања Вигњевић



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Сања Вигњевић

Број индекса 08-DS-MM-16

Студијски програм Молекуларна медицина

Наслов рада ЋЕЛИЈСКИ И МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗМИ РЕГУЛАЦИЈЕ  
ЕРИТРОЦИТОПОЕЗЕ У УСЛОВИМА ХРОНИЧНОГ СТРЕСА

Ментор Проф. др Мирјана Готић

Коментор Др Мирела Будеч, научни саветник

Потписани/а Сања Вигњевић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 25.8.2014.

Сања Вигњевић

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

ЋЕЛИЈСКИ И МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗМИ РЕГУЛАЦИЈЕ ЕРИТРОЦИТОПОЕЗЕ  
У УСЛОВИМА ХРОНИЧНОГ СТРЕСА

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 25.8.2014.

Силвија Поповић

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

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.