

RESEARCH ARTICLE OPEN ACCESS

Image Analysis Platform for Comprehensive Quantification of Extracellular Vesicle Morphology

Alexander Spark¹ | Nan Jiang² | Benjamin Purnell² | Mihajlo Radmilovic² | Andras Saftics² | Eugenia Romano² | Tijana Jovanovic-Talisman²  | Alexandre Kitching¹

¹Nanometrix Ltd, Oxford, UK | ²Department of Cancer Biology and Molecular Medicine, Beckman Research Institute, City of Hope Comprehensive Cancer Center, Duarte, California, USA

Correspondence: Tijana Jovanovic-Talisman (ttalisman@coh.org) | Alexandre Kitching (alexandre.kitching@nanometrix.bio)

Received: 23 January 2026 | **Revised:** 13 February 2026 | **Accepted:** 16 February 2026

Keywords: Extracellular vesicles (EVs) | Single Extracellular Vesicle Analysis | Single Extracellular Vesicle Nanoscopy (SEVEN) | Single Molecule Localization Microscopy (SMLM) | Transmission electron microscopy (TEM)

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are membrane-encapsulated nanoparticles with key roles in cell biology and growing importance in biomedicine. However, EVs are challenging to characterize because they are highly heterogeneous. Single EV analysis methods are valuable tools for addressing this challenge. Here, we developed single EV analysis pipeline for assessment of transmission electron microscopy (TEM) and single molecule localization microscopy (SMLM) images. Our analysis of morphology and localization/density patterns from these imaging techniques identified two primary EV classes which we termed dense and complex. Compared to dense EVs, complex EVs were larger, less circular, and more elongated. For recombinant and cell culture-derived EVs, analysis revealed overall good agreement between TEM and SMLM data. Using SMLM, we further compared plasma EVs enriched in common markers, tetraspanins CD9, CD63, and CD81, with the total EV population. While both groups showed similar size and shape properties, tetraspanin-enriched EVs were on average slightly larger and exhibited a higher fraction of complex EVs. Our findings underscore the morphological diversity of EVs; highlight the benefits of multimodal imaging; and demonstrate quantitative performance of the data analysis pipeline. Our comprehensive analysis of EV morphology may ultimately help clarify EV biogenesis and advance their potential in biomedicine.

1 | Introduction

In the 1980s, extracellular vesicles (EVs) were first postulated to be a cellular modality for shedding specific types of membrane components, like the transferrin receptor [1]. In the late 1990s, these membrane-bound nanoparticles became implicated in intercellular communication [2]. EVs appeared to encapsulate biological data (in the form of proteins, lipids, nucleic acids, glycans, and metabolites [3, 4]) and translocate this information from their cells of origin to recipient cells. Further studies have clarified

some aspects of EV-mediated intercellular communication. For example, EVs that originate from cancer cells can travel long distances, be taken up by organ-specific cells, and can contribute to the formation of the pre-metastatic niche [5]. Yet, recent data suggests that some EVs may not act as long-range messengers and travel only short distances before the uptake, reflecting the diversity of the process [6]. While the prevailing thought is that EVs are involved in both physiological and pathological processes through intercellular communication [7–11], additional roles, including maintaining cellular homeostasis via disposal of

Abbreviations: EV, Extracellular vesicle; KDE, kernel density estimation; NTA, nanoparticle tracking analysis; PBS, phosphate buffered saline; SEC, size exclusion chromatography; SEVEN, single extracellular vesicle nanoscopy; SMLM, single molecule localization microscopy; SRRF, super resolution radial fluctuations; TEM, transmission electron microscopy.

Alexander Spark, Nan Jiang, and Benjamin Purnell contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2026 The Author(s). *Proteomics* published by Wiley-VCH GmbH.

Statement of significance of the study

Extracellular vesicles (EVs) have significant roles in biology and biomedicine. However, their inherent heterogeneity in size, shape, and molecular composition presents a major challenge for their characterization. To help address this challenge, we advanced a robust image analysis pipeline. We used this pipeline to analyze transmission electron microscopy and single molecule localization microscopy images, and we comprehensively quantified morphology of single EVs. By classifying EVs into distinct morphological subtypes, dense and complex, we reveal consistent trends across recombinant, cell line-derived, and plasma EVs. Importantly, we demonstrate strong agreement between imaging modalities. Our approach enables high-resolution analysis of individual EVs and offers insights into their structural diversity. This work advances the methodological toolkit for EV research and lays the foundation for improved characterization of EVs in biology and biomedicine.

unwanted cargoes degraded by other cells [12], have been recently proposed. Thus, while the field has evolved significantly since 1980s, we are still elucidating many aspects of EV functions.

In addition to their important functional roles, EVs have been investigated as biomarker candidates, therapeutic modalities, and delivery vectors [11, 13–19]. In particular, the following four properties indicate potential of EVs in biomedicine: 1) EV cargo is protected from degradation; 2) EVs are abundant in circulation, biocompatible, and have low immunogenicity; 3) EVs can cross biological barriers; 4) EVs can be engineered to carry bioactive cargo. While EVs are currently being assessed in a number of clinical trials, they have not yet fully emerged as either a therapy or a diagnostic biomarker.

One significant challenge in EV research has been to robustly isolate EVs. EVs typically comprise a mixture of different sized nanoparticles ranging from 30 nm to 10 microns. Isolation of EVs is challenging because cell cultures and biofluids contain a complex mixture of nanoparticles, protein aggregates, and nonvesicular components with similar size, charge, and density ranges [19–21]. Further, while many vesicles contain tetraspanins such as CD9, CD63, and CD81 [22, 23], a universal EV marker remains elusive. While this challenge confines a “perfect” EV isolation method, new separation technologies are emerging [19]. Additionally, updated guidelines in the field [17] have enabled robust data reporting.

Another significant challenge in EV research is to robustly quantify biophysical and biochemical parameters of EVs. Further, given the heterogeneity of the typical biological sample (EVs come from many different types of cells), little is known about rare vesicle populations—tissue or disease specific—that may have significant biological roles [19]. Single EV analysis methods can address some aspects of these challenges.

Biochemical methods, such as Raman spectroscopy, can define biomolecular EV markers. Biophysical methods, such as atomic force microscopy, cryo-electron microscopy, and transmission

electron microscopy (TEM), can provide size and shape of EVs. Nanoparticle tracking analysis (NTA) and tunable resistive pulse sensing can provide concentration, charge, and size of EVs—however, there are limitations to these two approaches due to relatively low sensitivity [17, 19, 24]. While a few single EV analysis methods provide a multiparametric characterization (they can define both biophysical and biochemical properties), each technique has its own advantages and challenges. For example, fluorescent-NTA measures concentration, presence of protein markers, size, and charge, but it has limited resolution [19]. Nano-flow cytometry and single-particle interferometric reflectance imaging assess concentration, presence of protein markers, and size. However, they have somewhat limited detection sensitivity (approximately 50 nm in size and typically 5–10 fluorescent molecules for specific cargo detection) [23, 25–30]. Immuno-electron microscopy provides morphology, size, and presence of protein markers, but it has low throughput and high cost [19]. While super-resolution microscopy methods such as single molecule localization microscopy (SMLM) have moderate throughput and typically require specialized microscopes, they can otherwise robustly assess EV concentration, molecular cargo content, size, and shape. Each of these different single EV analysis methods has distinct advantages and challenges; however, they are often complementary and can be combined to provide a more comprehensive description of the sample.

Here we focused on advancing data analysis to rigorously define the morphology of single EVs—size, shape, and structural characteristics. Morphology can provide important insight on EV biological function and origin. For example, it can indicate the amount of molecular cargo EVs can carry (more cargo can be sorted into larger EVs [31]). Moreover, information on morphology may have potential in emerging biomedical applications of EVs. Specific EV subpopulations with distinct, irregular shapes are present in diseases such as cancer [32–34], while consistent morphology can be a hallmark of quality control in therapeutic applications. We developed a data analysis strategy for the comprehensive quantification of EV morphology based on TEM and SMLM images.

2 | Materials and Methods

2.1 | Cell Line EVs

Recombinant standard EVs (rEVs) were purchased from Millipore Sigma, Cat# SAE0193-IVL; Burlington, MA, USA; their characterization was reported before [35]. For EVs derived from conditioned cell culture media (SH-SY5Y, BT-474, BT-474^R, SK-BR-3, JIMT-1), cell culturing and EV isolation using size exclusion chromatography (SEC) were reported before [34]. MISEV guidelines [17] were used to characterize isolated EVs and these results were reported previously [34]. In particular, using dot blots, in previous work we have shown expression of membrane EV markers (tetraspanins CD9, CD63, CD81 [TSPAN]), luminal EV marker (syntenin), and negligible expression of cytochrome C (typically not associated with EVs). These dot blots have also shown that EVs from HER2-positive cell lines (BT-474, BT-474^R, SK-BR-3, JIMT-1) had appreciable expression of HER2 while EVs from HER2-negative cell line (SH-SY5Y) had negligible expression of HER2. Further, we characterized concentration and

size of EVs using NTA and have shown their intact morphology using TEM [34].

2.2 | Plasma EVs

Here, we used pooled human plasma (Innovative Research, IPLAWBK2E50ML); plasma processing has been previously described [34]. As before [34], we applied an additional centrifugation step (2500 x g for 15 min) before the experiments to reduce platelet contamination [36]. EVs were isolated using iZON 70 nm original SEC column in phosphate buffered saline (PBS); first five fractions containing EVs were combined and used in downstream experiments. For EV characterization according to MISEV guidelines [17], dot blots and NTA experiments were performed as described before [33]; for ApoE dot blot staining, we used Biologend mouse monoclonal antibody (Cat# 852802; cross-reacts with Apo E2, Apo E3, and Apo E4) diluted 1:1000.

Detailed protocols for TEM and SEVEN sample preparation were reported before [33, 34] and briefly outlined below. SMLM localization maps obtained using SEVEN and TEM images from EVs reported in two previous publications [33, 34] were used here for data analysis.

2.3 | TEM

4 μ L of undiluted EV sample (rEVs or SEC isolated EVs from SH-SY5Y, BT-474, and BT474^R cultured cells) was applied to glow discharged, carbon-coated 200 mesh electron microscopy grids. After 5 min incubation, the excess sample solution was removed, and the grid was washed three times in DI water, for 30 s each time. Then the grid was stained with 1% (w/v) uranyl acetate by incubating 10 s for three times. FEI Tecnai 12 transmission electron microscope (Thermo Fisher Scientific) at an acceleration voltage of 120 kV using LaB6 filament and Gatan 2 k \times 2 k CCD camera (Gatan; Pleasanton, CA, USA) was used for TEM imaging [33, 34].

2.4 | Single Extracellular Vesicle Nanoscopy (SEVEN) for Cell Line EVs and rEVs

Following antibodies were used for capture and staining of EVs: anti-CD9 (BioLegend, Cat# 312102), anti-CD63 (Novus Biologicals, Cat# NBP2-42225), and anti-CD81 (BioLegend, Cat# 349502).

Clean coverslips coated with MCP4 polymer were functionalized with antibodies against TSPANs. After blocking coverslips with Block-On blocking solution (Lucidant Polymers, Cat# 2X-BLK1) and phosphate buffer saline with 0.025% Tween 20 (0.025% PBS-T) supplemented with 2% (w/v) bovine serum albumin (BSA), EVs (in 0.025% PBS-T buffer) were incubated onto these coverslips overnight. Coverslips were washed with 0.025% PBS-T, then blocked with 0.025% PBS-T supplemented with 2% BSA. EVs were stained with anti-TSPAN antibodies labeled with Alexa Fluor 647 (AF647) in 0.025% PBS-T supplemented with 2% (w/v) BSA. After washing, EVs were fixed with 4% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde, quenched with 10 mM glycine, and imaged on

Nikon N-STORM microscope using 640 nm laser; localizations were extracted using the NIS-Elements software (Nikon) [33, 34].

2.5 | SMLM for Plasma EVs

25-mm diameter #1.5H glass coverslips (Thermo Fischer Scientific, Cat# NC9560650; Waltham, MA, USA) were cleaned as previously described [37]. UV/ozone treatment was conducted on the Novascan PSD-UV for 15 min according to manufacturer protocol.

- TSPAN-enriched EVs: We incubated 150 μ L of 0.025% PBS-T (buffer control) or unlabeled EVs in 0.025% PBS-T on clean, and UV/ozone treated coverslips for 1 h. After washing, a mixture of anti-TSPAN antibodies labeled with AF647 was applied to coverslips to stain EVs (detailed protocol was described before [33]). Samples were fixed with 4% paraformaldehyde, quenched with 10 mM glycine, and immediately imaged.
- All EVs: We labeled SEC isolated EVs with CF568-maleimide (protocol described before [33]). As a control for any possible dye aggregation/unspecific labeling, we separately incubated buffer only (no EVs) with CF568-maleimide using the same steps performed for EV labeling. Subsequently, we incubated 150 μ L of CF568 labeled EVs or buffer dye control (both diluted 1:4 in 0.025% PBS-T) on cleaned and UV/ozone treated coverslips for 1 h. Samples were washed, fixed with 4% paraformaldehyde, quenched with 10 mM glycine and immediately imaged.

To assess presence of detergent insoluble aggregates, CF568 labeled EVs were treated with 1% Triton X-100 for 30 min. Protocol detailed above was performed, and surfaces were imaged using super resolution radial fluctuations (SRRF) microscopy as described before [38].

To assess double-labelled EVs, 150 μ L of CF568 labeled EVs (diluted 1:4 in 0.025% PBS-T) were incubated on cleaned and UV/ozone treated coverslips for 1 h. EVs were subsequently stained with anti-TSPAN antibodies labeled with AF647 as described before [33]. Samples were washed, fixed with 4% paraformaldehyde, quenched with 10 mM glycine, and immediately imaged using SRRF as described before [38].

All super-resolution microscopy imaging was performed on N-STORM microscope (Nikon) as described before for SMLM [33] and SRRF [38]. For SMLM, localizations were extracted using the NIS-Elements software (Nikon) [33]; for SRRF, data were processed using ImageJ [38].

2.6 | Image Analysis

SMLM image data were analyzed with the Nanometrix SMLM software (v2.4.1.3, <https://www.nanometrix.bio>). Localization tables exported from NIS-Elements were imported, inspected for drift and other potential acquisition artifacts, and batch processed using the automated Single-channel Analysis Pipeline. Particle identification was performed using DBSCAN clustering. Clusters

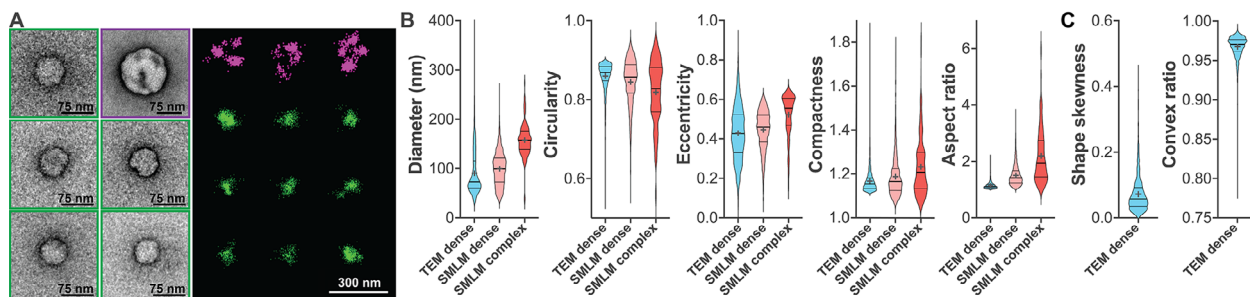


FIGURE 1 | Morphology of rEVs from TEM and SMLM images. A. TEM (left) and SMLM (right) image grids for rEVs showing dense EVs (green) and complex EVs (magenta). B. For detected dense EVs (TEM and SMLM) and complex EVs (SMLM), distribution of size, circularity, eccentricity, compactness, and aspect ratio is shown. C. For detected dense EVs (TEM), distribution of shape skewness and convex ratio is shown. Thick horizontal lines represent medians, and thin horizontal lines represent quartiles; crosses represent means. Descriptive statistics are shown in **Table S2**; statistical considerations are shown in **Table S3**.

with an effective diameter < 30 nm or fewer than 20 localizations were discarded. Remaining vesicles were classified by the Nanometrix convolutional-neural-network model NMTX-s1 (trained on >1 million EVs) into dense or complex morphological groups based on protein distribution patterns on EV surfaces.

TEM images were processed in the Nanometrix Image Analysis software (v1.4.1.1, <https://www.nanometrix.bio>). Batches of TIFFs (4k × 4k) were automatically segmented by the Nanometrix UNet-based model NMTX-a1, which was trained on >2 000 TEM and other biological images of nanoparticles (EVs, **adeno-associated viral vectors**, lipid nanoparticles, liposomes, etc.) and artefacts. Objects < 30 nm were removed, and the remaining vesicles were sorted into dense, complex, or other classes. Following filters were applied: relative contrast greater or equal to 0.04, mean intensity between 55 and 155, compactness greater or equal to 1.115, and convex ratio less or equal to 1.

For every vesicle in both datasets, the Nanometrix Software Suite computed (among others) projected diameter, circularity, compactness, aspect ratio, eccentricity, convex ratio, and 2D shape skewness using the equations listed in Supplementary Table S1. These metrics, extracted with identical parameter settings for all samples, provide quantitative descriptions of size, outline complexity, shape, and distribution across modalities. Raw data, batch summaries, and plots were exported from the Nanometrix Software Suite.

2.7 | Statistical Analysis

Mean, median, standard error of the mean (SEM), and coefficient of variation (CV) values were determined using GraphPad Prism (version 10.3.0; GraphPad; San Diego, CA, USA). Mann-Whitney test was used to determine p-values; this nonparametric test assesses stochastic differences between two independent groups [39]. Significances are indicated as follows: ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Graphs were generated in GraphPad Prism and finalized in Adobe Illustrator 2025 (version 29.8.2; Adobe; San Jose, CA, USA).

3 | Results

We have previously characterized recombinant EV reference material (rEVs) by TEM (negative staining of whole mount EVs)

and Single Extracellular Vesicle Nanoscopy (SEVEN). SEVEN platform encompassed SMLM imaging of tetraspanin CD9, CD63, CD81 (TSPAN)-enriched EVs [34]; TSPANs are abundant EV markers present on most EVs [23]. Here we applied optimized data analysis pipeline to these TEM images and SMLM localization maps; the goal was to provide a comprehensive description of individual EV morphology.

Evaluation of both TEM and SMLM data indicated the presence of two types of EVs: dense and complex. Dense EVs were defined as highly circular vesicles that displayed a compact, uniformly populated localization cloud in SMLM and a homogeneous electron-dense lumen in negatively stained TEM images. These particles correspond to the typical small EVs reported in the literature and formed the dominant fraction of the rEV population. Complex EVs showed a discontinuous distribution of localizations in SMLM, consistent with nonuniform surface-protein topology, and appeared in TEM with irregular luminal contrast or multi-lobed outlines. Image grids of rEVs acquired with both techniques are shown in Figure 1A; dense EVs are indicated by green color and complex EVs are indicated by magenta color. Both SMLM and TEM detected a low fraction (under 5%) of complex EVs (Figure S1A and Table S2A).

Given that EVs with distinct morphology can have important functional roles and biomedical applications, for both SMLM and TEM images, we evaluated size and comprehensive set of shape properties: circularity, eccentricity, compactness, and aspect ratio. Circularity indicates how close a vesicle shape approaches a circle; eccentricity indicates elongation of vesicles; compactness quantifies how efficiently a shape occupies a space; aspect ratio indicates the relationship between the width and height of a shape. For pixel-based TEM images, we also calculated convex ratio (ratio of the area of the smallest convex shape that can completely enclose the figure and the area of the figure itself) and shape skewness (measure of the asymmetry of a shape). We did not include these two properties for SMLM since the point cloud (localization maps) obtained with this technique can have varying conformations with more points clustering on the exterior or toward interior, leading to uneven sampling and variation in metrics.

Our TEM and SMLM data (Figure 1B and Table S2B) show that complex rEVs (compared to dense) have significantly larger size,

lower circularity, and increased elongation, compactness, and aspect ratio; for TEM data, they also had significantly decreased convex ratio, and increased shape skewness. Descriptive statistics and statistical significances are shown in Tables S2B, S3, respectively; kernel density estimation (KDE) graph for TEM is shown in Figure S1B. Additionally, for dense EVs that were abundantly detected with both techniques, the values for size, eccentricity, circularity, and compactness showed an excellent agreement between the two techniques (average values were within 10%). Of note, compared to EVs detected with SMLM, those detected with TEM had slightly lower average size (90 vs. 99 nm), higher size heterogeneity (CV of 50 vs. 34%), and lower average aspect ratios (1.132 vs. 1.508). This could be in part attributed to detection of TSPAN-enriched EVs with SMLM versus all EVs in TEM, or possibly issues related to dehydration of some EVs in TEM. As expected, for TEM images, most dense EVs had shape skewness close to value of zero and convex ratio close to value of 1, indicating their shape is close to a circle, Figure 1C.

We next analyzed morphology of EVs from different cultured cell lines. We have previously reported isolation, characterization, and imaging of EVs from following five cultured cell lines: 1) SH-SY5Y (neuroblastoma), 2) BT-474 (breast cancer, luminal B molecular subtype, trastuzumab-sensitive), 3) BT-474^R (breast cancer, luminal B molecular subtype, trastuzumab-resistant), 4) SK-BR-3 (breast cancer, HER2 overexpressing molecular subtype, trastuzumab-sensitive), and 5) JIMT-1 (breast cancer, HER2 overexpressing molecular subtype, trastuzumab-resistant) [34]. We applied our optimized analysis pipeline to previously obtained TEM images and SMLM localization maps of these cell culture EVs (ref. [34]). In particular, here we performed analysis of TEM and SMLM images of EVs from SH-SY5Y, BT-474, and BT-474^R cultured cell lines (we had reasonable number of acquired TEM images) and analysis of SMLM images of EVs from SK-BR-3 and JIMT-1 cultured cell lines.

Since SMLM provided excellent EV sampling, we first determined the fraction of complex EVs enriched in TSPANs derived from SH-SY5Y, BT-474, and BT-474^R cells, Figure 2A and Table S4. Like with rEVs, this fraction was low for all cell lines, with trastuzumab-resistant cell line BT-474^R having the highest fraction of complex EVs at ~5%. Image grids with dense and complex EVs detected with SMLM are shown in Figure S2A–C. Similar to rEV data, complex EVs (vs dense EVs) from three cell lines detected with SMLM had larger size, lower circularity, and increased elongation, compactness, and aspect ratio, Figure 2B. Trends for morphological properties of dense EVs obtained from SMLM localization maps agreed well with published data [34]: SH-SY5Y dense EVs were on average the largest and most circular while BT-474^R dense EVs were on average the smallest, least circular, and most elongated (Figure 2B, top and Tables S5, S6). Additionally, here we determined dense EVs from BT-474^R cells had the highest average values for compactness and aspect ratio Figure 2B, bottom and Tables S5, S6).

We also evaluated the distribution of size and shape properties for EVs from cultured cell lines based on TEM images (Figure 2B,C and Tables S5, S6). Image grids for EVs detected with TEM are shown in Figure S2D–F. In addition to dense and complex classes, in TEM images from SH-SY5Y and BT-474 cell line EVs, we

detected a third class, labelled ‘other’. They consisted of highly circular objects with very small sizes (typically ranging 20–50 nm in diameter). Since particles with these features were absent in corresponding SMLM images (lacked TSPAN signal), they may represent small EVs without TSPANs, other nanoparticles, or residual contaminants. Due to the limited TEM sampling of complex EVs, we report only properties of dense EVs. Dense EVs from SH-SY5Y and BT-474 cells had on average very similar size values for TEM compared to SMLM (103 vs. 102 nm, respectively, for SH-SY5Y and 87 nm for BT-474). Dense EVs from BT-474^R cells had on average slightly higher size values for TEM compared to SMLM (90 vs. 82 nm, respectively). The observed differences between SMLM and TEM data can be in part attributed to EVs that do not contain TSPANs, presence of other nanoparticles, and limited sampling of EVs using TEM.

Next, we compared SMLM data for dense and complex EVs from HER2 overexpressing cell lines SK-BR-3 and JIMT1. Image grids for dense and complex EVs detected with SMLM are shown in Figure S3A,B. Compared to the trastuzumab-sensitive cell line SK-BR-3, trastuzumab-resistant cell line JIMT-1 had higher fraction of complex EVs (5.8 vs. 6.5 %, Figure S3C and Table S4). As before [34], compared to SK-BR-3 EVs, JIMT-1 EVs were on average larger and more circular; this trend was clear for both dense and complex EVs, Figure S3D. Compared to SK-BR-3 EVs, JIMT-1 EVs (both dense and complex) had on average decreased values for compactness and aspect ratio. Descriptive statistics and statistical significances are shown in Tables S7, S8, respectively.

EV biogenesis is highly complex and diverse. Additionally, not all EVs are enriched in TSPANs. One example comes from recent data indicating the existence of LC3B-enriched EVs that often carry no TSPAN molecules [40]. Thus, we wanted to assess TSPAN-positive and “total” EV populations. Toward this, we first isolated healthy human pooled plasma EVs using SEC (EV characterization is shown in Figure S4). We compared either total detected EVs (detection of EV surface with CF568 dye) or TSPAN-enriched EVs (detection of EV surface TSPANs with fluorescently labeled antibodies).

Since attachment of EVs onto glass has been shown to work effectively [41], to assess all EVs, we did not include affinity enrichment step used for SEVEN, and instead used unfunctionalized coverslips. We first used coverslips coated with poly-L-lysine (positively charged). However, we detected high background signal with CF568 dye control (Figure S5A). Next, we tested UV/ozone treated glass coverslips. This strategy removes organic compounds, making surfaces more hydrophilic [42], and thus facilitates enhanced adhesion of biological entities. UV/ozone treated surfaces showed minimal background with CF568 dye control (Figure S5B) and Alex Fluor 647 labeled α TSPAN antibodies control (Figure S5C). At the same time, UV/ozone treated surfaces showed well defined EV signal when EVs were labeled with CF568 dye (Figure S5D) or α TSPAN antibodies complexed with Alex Fluor 647 (Figure S5E). Thus, we used UV/ozone treated surfaces for our experiments.

Image grids for TSPAN-enriched and all EVs (dense and complex) detected with SMLM are shown in Figure 3A,B. Since we used two different labeling approaches that may affect EV adhesion, we did not quantitatively compare detected EV numbers. However,

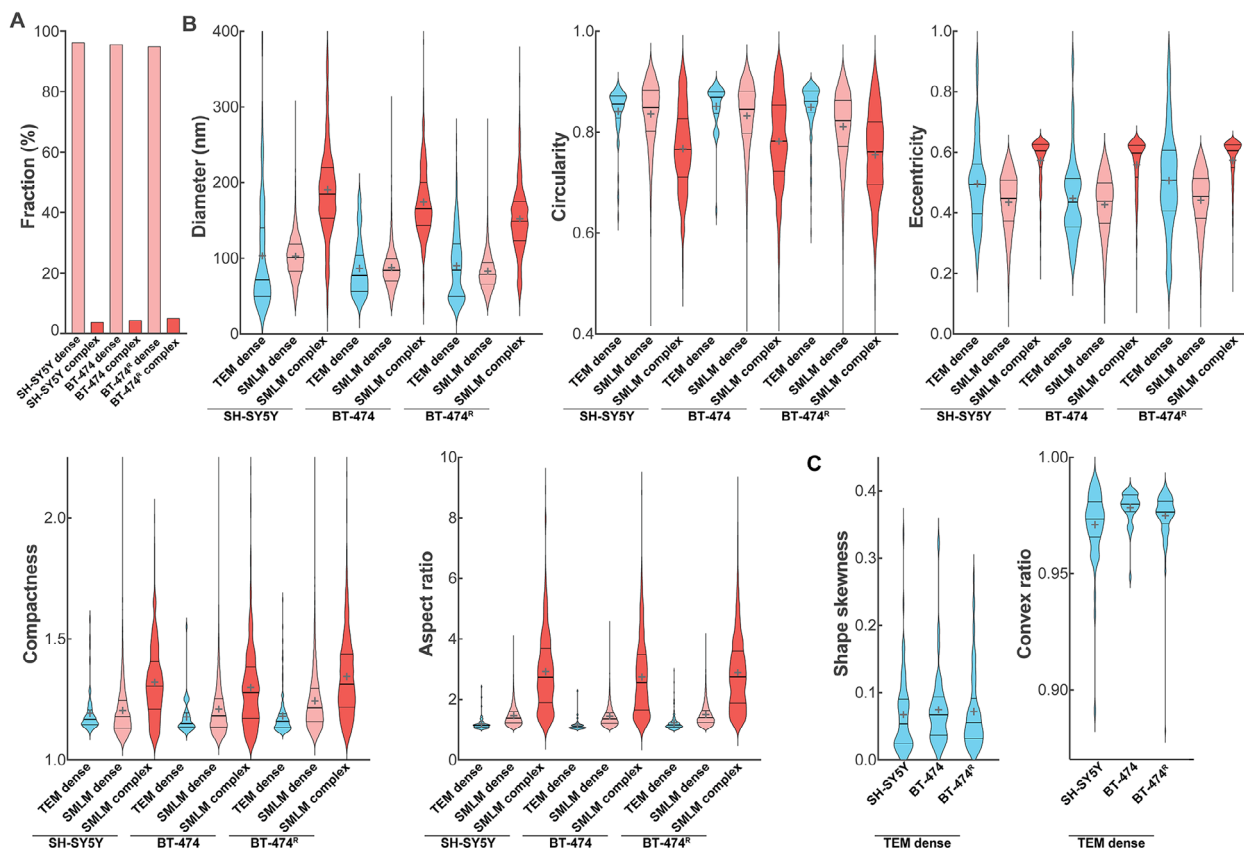


FIGURE 2 | Morphology of EVs from SH-SY5Y, BT-474, BT-474^R cultured cell lines. A. Fraction of dense and complex EVs from SMLM images. B. For detected dense EVs (TEM and SMLM) and complex EVs (SMLM), distribution of size, circularity, eccentricity, compactness, and aspect ratio is shown. C. For detected dense EVs (TEM), distribution of shape skewness and convex ratio is shown. Thick horizontal lines represent medians, and thin horizontal lines represent quartiles; crosses represent means. Descriptive statistics are shown in **Table S5**; statistical considerations are shown in **Table S6**.

more EVs were detected with CF568 labeling approach. This was confirmed with SRRF imaging of EVs (Figure S5F) [38]. While SRRF resolution is ~ 70 nm, this approach allowed fast assessment of individual EVs (particularly helpful during optimization/evaluation steps). We also used Triton X-100 treatment to confirm that CF568 detected structure are not largely protein aggregates. According to SEVEN-universal protocol analysis [38], Triton X-100 treatment (compared to native protocol without Triton X-100) led to detection of $\sim 10\%$ of EVs (images in Figure S5G). Finally, we performed SMLM measurements. TSPAN-positive EVs had higher fraction of complex EVs, Figure 3C. Further, our data suggests that overall distribution and average values were similar between the two groups, Figure 3D. Total EVs (compared to TSPAN-enriched) showed slightly lower average size for both dense (81 vs. 89 nm) and complex (207 vs. 215 nm) EVs; interestingly heterogeneities for both groups (as indicated by CV) were similar. Total EVs (compared to TSPAN-enriched) had slightly lower elongation, but overall, their shape appeared similar, especially for dense EVs. Descriptive statistics and statistical significances are shown in Tables S9, S10, respectively.

4 | Discussion

Here we present a new TEM and SMLM image analysis strategy for comprehensive determination of EV morphology. We show

excellent agreement between results obtained with the two single EV imaging techniques and indicate strengths for each approach.

EVs detected in TEM and SMLM images can be robustly divided into dense and complex populations with consistent trends between the two groups; some TEM images also displayed “other” very small particles (often below the size of classical EVs). While we obtained good agreement between TEM and SMLM data in five morphological properties (size, eccentricity, circularity, compactness, and aspect ratio) convex ratio and shape skewness were calculated only for TEM because of the inherent differences between the techniques (pixel-based vs. point-cloud based). Additionally, we evaluated total EV population (TEM and SMLM) and tetraspanin-enriched population (SMLM). While the total plasma derived EV population had slightly lower size and fewer complex EVs, our data suggests that both total and TSPAN-enriched plasma EV populations had very similar EV morphologies.

When analyzing the data, it is important to consider images acquired with appropriate experimental protocols. Proper sample preparation, protocol optimizations/standardizations, and controls are critical. While conventional TEM technology cannot preserve the native, hydrated state of EVs like in Cryo-TEM [43], it is fast, easy to perform, and can provide important biophysical details of EVs. However, it is important to ensure EV integrity and

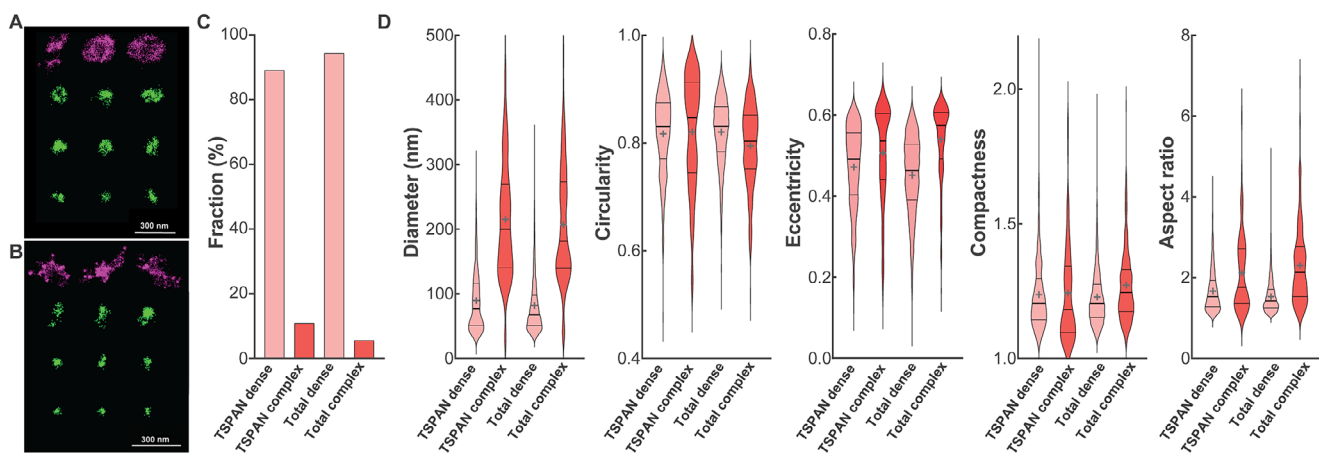


FIGURE 3 | Morphology of total and TSPAN-enriched plasma EVs detected with SMLM. SMLM image grids for TSPAN-enriched EVs (A) and total EVs (B). Dense EVs are in green and complex EVs are in magenta. C. Fraction of dense and complex EVs from plasma EVs. D. For detected dense and complex EVs from SMLM images, distribution of size, circularity, eccentricity, compactness, and aspect ratio is shown. Thick horizontal lines represent medians, and thin horizontal lines represent quartiles; crosses represent means. Descriptive statistics are shown in **Table S9**; statistical significances between dense and complex EVs are shown in **Table S10**.

prevent artifacts (e.g., from drying) that could misrepresent their native morphology [24]. The canonical fixation/embedding TEM workflows for detailed ultrastructure typically include fixation (with paraformaldehyde/glutaraldehyde), heavy metal staining, and graded ethanol dehydration. Fixation and dehydration protocols preserve internal morphology but can introduce crosslinking and chemical modifications that can alter surface appearance. Alternatively, whole mount staining can be used since this protocol also preserves vesicles in a near-native state. We used an established whole mount negative staining protocol that involves sample adhesion to grids (without fixation), brief deionized-water washes (to reduce salt crystal formation), and staining with uranyl acetate; it involves fewer steps and milder chemistry, reducing the risk of artifacts that can arise from solvent exchanges or strong fixatives. While it is important to note that the cup-shape of EVs will appear as the result of dehydration in the whole mount negative staining, with and without sample fixation [24, 44], recent study suggests protocols without fixation yield comparable numbers of EVs with less pronounced cup shape [45]. However, possible issues introduced by sample dehydration should always be considered when images are quantified and absolute values for parameters should be interpreted carefully.

Since it is challenging to discriminate EVs from non-EV particles [24], good sample purity is important. SMLM can be significantly less sensitive to such impurities when combined with affinity isolation and/or detection as in the SEVEN platform. Such protocols can focus on isolation/detection of EVs enriched in either EV markers (e.g., tetraspanins) or user-defined markers present on EVs (e.g., those associated with specific EV subpopulations). However, it is important to ensure that the surface of the EV is well covered with labels and specific affinity reagents with good binding capacity are used for detection. To accomplish this, we used a mixture of three validated antibodies against abundant tetraspanins (CD9, CD63, CD81) labeled with the same fluorescent dye, Alexa Fluor 647, or covalent labeling of EV surface with CF568 dye. Another important aspect for SMLM protocol is attachment of EVs to coverslips. Affinity attachment works well for selection of EV subpopulations (e.g., TSPAN-

enriched EVs). For attachment of all EVs (epitope independent), we used UV/ozone treated glass coverslips. However, this adhesion strategy could be missing EVs that do not attach well to clean glass (e.g., due to charge, hydrophilicity). Lipoproteins and albumin typically have more negative charge compared to EVs [46] and UV/ozone treated surfaces have hydroxyl groups [47] which can deprotonate in pH neutral aqueous environments (for short periods of time). However, we did detect small amount of lipoprotein markers (ApoA and ApoE) in our EVs isolated with SEC. While these could be part of the EV corona [48], we cannot exclude that small amount of lipoprotein particles such as very low density lipoproteins (30-80 nm), chylomicron remnants (30-80 nm), and chylomicrons (75-1200 nm) may be attached to coverslips as their size range falls within detected EV size range.

In conclusion, a comprehensive description of EV morphology and cross validation between techniques can provide the field with new tools for EV classification. This may be particularly important in machine learning applications where information on additional EV parameters can help better define desired EV populations.

Acknowledgements

We thank I. Talisman for manuscript editing. Research reported in this publication included work performed in the Analytical Cytometry Core supported by the National Cancer Institute of the National Institutes of Health under award number P30CA033572. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health. This work was supported by National Institutes of Health grant UG3/UH3 TR002878, Circle 1500, Board of Governors of the City of Hope, Concern Foundation, and Diabetes Prevention Risk Omics Metabolism and Therapy of Diabetes (PROMT) Interdisciplinary Training Program T32 DK131943 (BP).

Conflicts of Interest

Part of methodology used in this work is the subject of a provisional patent application. Patent holders may be entitled to certain compensation

through their institutions' respective intellectual property policies in the event such intellectual property is licensed. Alexandre Kitching and Alexander Spark are cofounders of Nanometrix Ltd.

Associated Data

The data presented in this study is available in this article and supplementary material.

References

1. R. M. Johnstone, M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr, and C. Turbide, "Vesicle Formation during Reticulocyte Maturation. Association of Plasma Membrane Activities with Released Vesicles (exosomes)," *Journal of Biological Chemistry* 262 (1987): 9412–9420.
2. G. Raposo, H. W. Nijman, W. Stoorvogel, et al., "B Lymphocytes Secrete Antigen-presenting Vesicles," *The Journal of Experimental Medicine* 183 (1996): 1161–1172.
3. J. Ratajczak, M. Wysoczynski, F. Hayek, A. Janowska-Wieczorek, and M. Z. Ratajczak, "Membrane-derived Microvesicles: Important and Underappreciated Mediators of Cell-to-cell Communication," *Leukemia* 20 (2006): 1487–1495.
4. M. Colombo, G. Raposo, and C. Théry, "Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles," *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30 (2014): 255–289.
5. A. Hoshino, B. Costa-Silva, T.-L. Shen, et al., "Tumour Exosome Integrins Determine Organotropic Metastasis," *Nature* 527 (2015): 329–335.
6. F. Colombo, K. Nimkar, E. G. Norton, F. Lovat, and E. Cocucci, "Exploring the Spatial Limits of Extracellular Vesicles-Mediated Intercellular Communication," *Journal of Extracellular Vesicles* 14 (2025): 70169.
7. A. G. Yates, R. C. Pink, U. Erdbrügger, et al., "In Sickness and in Health: the Functional Role of Extracellular Vesicles in Physiology and Pathology in Vivo: Part II: Pathology: Part II: Pathology," *Journal of Extracellular Vesicles* 11 (2022): 12190.
8. J. G. Spiers, N. Vassileff, and A. F. Hill, "Neuroinflammatory Modulation of Extracellular Vesicle Biogenesis and Cargo Loading," *Neuromolecular Medicine* 24 (2022): 385–391.
9. D. M. Pegtel and S. J. Gould, "Exosomes," *Annual Review of Biochemistry* 88 (2019): 487–514.
10. E. I. Buzas, "The Roles of Extracellular Vesicles in the Immune System," *Nature Reviews Immunology* 23 (2023): 236–250.
11. R. Kalluri and V. S. LeBleu, "The Biology, Function, and Biomedical Applications of Exosomes," *Science* 367 (2020): eaau6977.
12. J. M. Ngo, J. K. Williams, C. Zhang, et al., "Extracellular Vesicles and Cellular Homeostasis," *Annual Review of Biochemistry* 94 (2025): 587–609.
13. J. Rädler, D. Gupta, A. Zickler, and S. E. Andaloussi, "Exploiting the Biogenesis of Extracellular Vesicles for Bioengineering and Therapeutic Cargo Loading," *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 31 (2023): 1231–1250.
14. O. P. B. Wiklander, M. Brennan, J. Lötvall, X. O. Breakfield, and S. E. Andaloussi, "Advances in Therapeutic Applications of Extracellular Vesicles," *Science Translational Medicine* 11 (2019): eaav8521.
15. K. Cheng and R. Kalluri, "Guidelines for Clinical Translation and Commercialization of Extracellular Vesicles and Exosomes Based Therapeutics," 100029.
16. D. M. Stranford, L. M. Simons, K. E. Berman, et al., "Genetically Encoding Multiple Functionalities into Extracellular Vesicles for the Targeted Delivery of Biologics to T Cells," *Nature Biomedical Engineering* (2023).
17. J. A. Welsh, D. C. I. Goberdhan, L. O'Driscoll, et al., "Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles (MISEV2023): From Basic to Advanced Approaches," *Journal of Extracellular Vesicles* 13 (2024): 12404.
18. Y. Zhu, H. Zhang, N. Chen, et al., "Diagnostic Value of Various Liquid Biopsy Methods for Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis," *Medicine* 99 (2020): 18581.
19. A. Hendrix, L. Lippens, C. Pinheiro, et al., "Extracellular Vesicle Analysis," *Nature Reviews Methods Primers* 3 (2023): 56.
20. D. Brambilla, L. Sola, A. M. Ferretti, et al., "EV Separation: Release of Intact Extracellular Vesicles Immunocaptured on Magnetic Particles," *Analytical Chemistry* 93 (2021): 5476–5483.
21. F. Coccozza, E. Grisard, L. Martin-Jaular, M. Mathieu, and C. Théry, "SnapShot: Extracellular Vesicles," *Cell* 182, no. 262-262 (2020): 261.
22. J. M. Escola, M. J. Kleijmeer, W. Stoorvogel, et al., "Selective Enrichment of Tetraspan Proteins on the Internal Vesicles of Multivesicular Endosomes and on Exosomes Secreted by human B-lymphocytes," *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998): 20121–20127.
23. N. Zarovni, D. Mladenović, D. Brambilla, F. Panico, and M. Chiari, "Stoichiometric Constraints for Detection of EV-borne Biomarkers in Blood," *Journal of Extracellular Vesicles* 14 (2025): 70034.
24. L. Pascucci and G. Scattini, "Imaging Extracellular Vesicles by Transmission Electron Microscopy: Coping with Technical Hurdles and Morphological Interpretation," *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1865 (2021): 129648.
25. G. C. T. Brittain, Y. Q. Chen, E. Martinez, et al., "A Novel Semiconductor-Based Flow Cytometer with Enhanced Light-Scatter Sensitivity for the Analysis of Biological Nanoparticles," *Scientific Reports* 9 (2019): 16039.
26. G. Vergauwen, B. Dhondt, J. Van Deun, et al., "Confounding Factors of Ultrafiltration and Protein Analysis in Extracellular Vesicle Research," *Scientific Reports* 7 (2017): 2704.
27. F. Momen-Heravi, L. Balaj, S. Alian, et al., "Alternative Methods for Characterization of Extracellular Vesicles," *Frontiers in Physiology* 3 (2012): 354.
28. Q. Zhang, J. N. Higginbotham, D. K. Jeppesen, et al., "Transfer of Functional Cargo in Exomeres," *Cell Reports* (2019).
29. H. Zhang, D. Freitas, H. S. Kim, et al., "Identification of Distinct Nanoparticles and Subsets of Extracellular Vesicles by Asymmetric Flow Field-flow Fractionation," *Nature Cell Biology* 20 (2018): 332–343.
30. D. Mladenović, J. Brealey, B. Peacock, K. Koort, and N. Zarovni, "Quantitative Fluorescent Nanoparticle Tracking Analysis and Nanoflow Cytometry Enable Advanced Characterization of Single Extracellular Vesicles," *Journal of Extracellular Biology* 4 (2025): 70031.
31. M. Herzog, I. Verdenik, B. Kobal, and K. Cerne, "Size Distribution of Extracellular Vesicles in Pretreatment Ascites and Plasma Is Correlated with Primary Treatment Outcome in Advanced High-grade Serous Carcinoma," *Scientific Reports* 15 (2025): 4500.
32. S. Ryuzaki, T. Yasui, M. Tsutsui, et al., "Rapid Discrimination of Extracellular Vesicles by Shape Distribution Analysis," *Analytical Chemistry* 93 (2021): 7037–7044.
33. A. Saftics, S. Abuelreich, E. Romano, et al., "Single Extracellular Vesicle Nanoscopy," *Journal of Extracellular Vesicles* 12 (2023): 12346.
34. N. Jiang, A. Saftics, E. Romano, et al., "Multiparametric Profiling of HER2-enriched Extracellular Vesicles in Breast Cancer Using Single Extracellular Vesicle Nanoscopy," *Journal of Nanobiotechnology* 22 (2024): 589.
35. E. Geurickx, J. Tulkens, B. Dhondt, et al., "The Generation and Use of Recombinant Extracellular Vesicles as Biological Reference Material," *Nature Communications* 10 (2019): 3288.
36. H. H. Cheng, H. S. Yi, Y. Kim, et al., "Plasma Processing Conditions Substantially Influence Circulating microRNA Biomarker Levels," *PLoS ONE* 8 (2013): 64795.

37. O. Golfetto, D. L. Wakefield, E. E. Cacao, et al., "A Platform To Enhance Quantitative Single Molecule Localization Microscopy," *Journal of the American Chemical Society* 140 (2018): 12785–12797.
38. A. Saftics, B. Purnell, B. Beres, et al., "Single Extracellular Vesicle Nanoscopy-Universal Protocol (SEVEN-UP): Accessible Imaging Platform for Quantitative Characterization of Single Extracellular Vesicles," *Analytical Chemistry* (2025).
39. A. Hart, "Mann-Whitney Test Is Not Just a Test of Medians: Differences in Spread Can be Important," *Bmj* 323 (2001): 391–393.
40. T. Visnovitz, D. Lenzinger, A. Koncz, P. M. Vizi, et al., (eLife Sciences Publications, 2024).
41. B. C. Pachane, B. Carlson, S. E. Queen, H. S. Selistre-de-Araujo, and K. W. Witwer, "Exploring the Adhesion Properties of Extracellular Vesicles for Functional Assays," *Journal of Extracellular Biology* 4 (2025): 70042.
42. R. M. Kohli, *Developments in Surface Contamination and Cleaning: Applications of Cleaning Techniques. Developments in Surface Contamination and Cleaning: Applications of Cleaning Techniques* (Elsevier, 2019), 2019.
43. P. Cizmar and Y. Yuana, "Detection and Characterization of Extracellular Vesicles by Transmission and Cryo-Transmission Electron Microscopy," *Methods in Molecular Biology* 1660 (2017): 221–232.
44. M. K. Jung and J. Y. Mun, "Sample Preparation and Imaging of Exosomes by Transmission Electron Microscopy," *Journal of Visualized Experiments: JoVE* (2018).
45. L. G. Rikkert, R. Nieuwland, L. Terstappen, and F. A. W. Coumans, "Quality of Extracellular Vesicle Images by Transmission Electron Microscopy Is Operator and Protocol Dependent," *Journal of Extracellular Vesicles* 8 (2019): 1555419.
46. W. Back, M. Bang, J.-H. Jung, et al., "Charge-Based Isolation of Extracellular Vesicles from Human Plasma," *ACS Omega* 9 (2024): 17832–17838.
47. A. M. Schrader, J. I. Monroe, R. Sheil, et al., "Surface Chemical Heterogeneity Modulates Silica Surface Hydration," *PNAS* 115 (2018): 2890–2895.
48. E. Tóth, L. Turiák, T. Visnovitz, et al., "Formation of a Protein Corona on the Surface of Extracellular Vesicles in Blood Plasma," *Journal of Extracellular Vesicles* 10 (2021): 12140.

Supporting Information

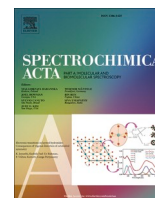
Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section.

Supporting File: pmic70113-sup-0001-SuppMat.docx.



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.journals.elsevier.com/spectrochimica-acta-part-a-molecular-and-biomolecular-spectroscopy

Light on abnormal red blood cell subpopulations: Label-free optics-based approach for studying *in vitro* rigidified blood cells

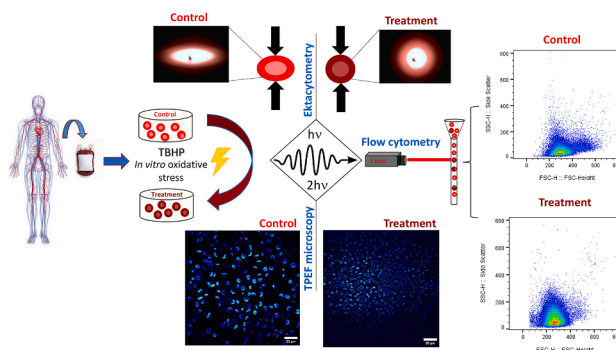
Mihajlo D. Radmilović^a, Vesna Lj. Ilić^b, Dušan D. Vučetić^{c,d}, Drenka I. Trivanović^b,
Mihailo D. Rabasović^a, Aleksandar J. Krmpot^a, Ivana T. Drvenica^{b,*}

^a Institute of Physics Belgrade, University of Belgrade, Belgrade, Serbia^b Institute for Medical Research, National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade, Belgrade, Serbia^c Institute for Transfusiology and Haemobiology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia^d Faculty of Medicine, Military Medical Academy, University of Defence, Belgrade, Serbia

HIGHLIGHTS

- Label-free optics-based approach for studying abnormal RBCs was established.
- Ektacytometry was supplemented by flow cytometry, phase-contrast, and TPEF microscopy.
- Fluorescence peak area effectively revealed oxidized RBC subpopulations.
- TPEF microscopy disclosed spatial location of fluorescence intensity near RBC membrane.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:

Red blood cells
Deformability
Oxidation
Ektacytometry
Flow cytometry
Two-photon excitation fluorescence microscopy

ABSTRACT

RBCs deformability plays a crucial role in maintaining proper blood flow and oxygen delivery throughout the body. Conventional ektacytometry fails to differentiate between variations in deformability of RBC subpopulations as the averaging measurement process obscures these differences. In this study, we introduced an approach that integrates label-free optics-based techniques (flow cytometry, phase-contrast, and two-photon excitation fluorescent microscopy) with ektacytometry to evaluate subpopulations that exhibit decreased RBCs deformability upon an *in vitro* oxidation using 0.5 mM TBHP, as a low-level oxidative agent.

We found that flow cytometry can easily detect rigidified and oxidized subpopulations based on FSC/SSC light distribution, as well as RBCs fluorescence intensity and peak area likely originating from hemoglobin photo and/or degradation products. Two-photon excitation fluorescence microscopy proved altered morphology and spatial location of fluorescence intensity signal near the membrane of oxidized RBCs, when compared to control RBCs, indicating a link with the reduced deformability. The proposed label-free optics-based methodology, which combines established techniques with more sophisticated microscopy, emerges as a promising tool for detecting mechano-biological changes in different RBC subpopulations induced by oxidative stress. The findings suggest

* Corresponding author.

E-mail address: ivana.drvenica@imi.bg.ac.rs (I.T. Drvenica).<https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.125420>

Received 8 May 2024; Received in revised form 17 October 2024; Accepted 7 November 2024

Available online 10 November 2024

1386-1425/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

potential applications in clinical practice for monitoring pathological conditions influenced by physical or environmental stress and as a quality control measure for stored RBCs.

1. Introduction

Red blood cells (RBCs), during their 120-day life in circulation, play several essential roles [1,2]. Their primary function is transporting oxygen from the lungs to all the body's tissues, thanks to the major intracellular protein-hemoglobin. Nevertheless, ensuring efficient oxygen delivery to tissues [3,4] is also enabled by RBCs membrane deformability, a crucial physiological property that allows RBCs to navigate through the intricate microcirculatory system. The excellent elastic properties of RBCs and resistible integrity during billions of passages through microcapillaries are provided by the specific discoid biconcave shape and proteins and lipids composition and organization in RBCs [5,6]. Besides inevitable RBCs physical trauma due to shear stress during squeezing to narrow capillaries, the proteins and lipid bilayers within RBCs undergo chemical alterations throughout their entire lifespan, by oxidation, metabolic depletion, loss of ions gradients, or cellular aging [7,8]. Therefore, the deformability of the RBCs membrane becomes an important biophysical parameter to be monitored, as well as one of the many that can reflect oxidative stress levels and even hemoglobin degradation [9]. Impaired deformability has been associated with various pathological conditions, including cardiovascular diseases, diabetes, and certain hematological disorders [10,11].

Ektacytometry, a laser diffraction technique, has been the method of the first choice for evaluating the deformability of RBCs in both research and clinical settings [12]. However, ektacytometry measures average deformability in populations of RBCs and does not provide information on the deformability of individual cells. Several studies revealed that some optics-based methods like optical tweezers or newly designed microfluidic devices could supplement and provide a more sensitive assessment of the progressive impairment of RBCs deformability than ektacytometry [12–14]. On the other hand, it is crucial to monitor RBCs with impaired deformability on an individual level since a recent study has demonstrated that the presence of a fraction of rigid RBCs in blood flow can disrupt the adhesion of leukocytes to the vascular wall, which in turn affects the immune response [15]. However, measurement deformability of RBCs should be accompanied with the information's directly associated with it, such as hemoglobin location within RBCs [16] and its photophysical properties [17]. Based on our latest study on the formation of fluorescent photoproducts from hemoglobin after light interaction and its application for labeling and tracking single human RBCs [17], we were motivated to explore the use of optics-based techniques in combination with ektacytometry to better distinguish between populations of healthy persons' untreated RBCs and those *in vitro* oxidized and rigidified by TBHP (Tert – Butyl – hydroperoxide). Prior studies have demonstrated that exposure to 1 mM TBHP results in the oxidation of fatty acids of membrane phospholipids and hemoglobin [18,19]. This oxidation leads to the transformation of iron ions into higher oxidized states, culminating in methemoglobin formation [20]. Using label-free optics-based methods: ektacytometry, flow cytometry, phase contrast, and Two-photon Excitation Fluorescence (TPEF) microscopy we aimed to expand knowledge on possibilities toward effective monitoring of rigid and/or oxidized RBC subpopulations, since we show that oxidation of RBCs lead to increased rigidification.

The samples of an equal population of RBCs and RBCs oxidized/rigidified by 0.5 mM TBHP (slight oxidation) showed elongation indices in the physiological range, i.e., the effect of the oxidation treatments was annulled when measuring deformability of the sample by ektacytometry. On the other hand, it was possible to differentiate between the oxidized / rigidified subpopulation presences of RBCs based on the difference in FSC (Forward scatter) light distribution by using flow cytometry. Light scattering by human RBCs involves a combination of

Rayleigh and Mie scattering mechanisms influenced by their unique shape, refractive index, and interactions with surrounding fluid. This phenomenon is crucial for understanding various physiological processes and developing potentially new diagnostic tools [21,22]. Flow cytometry offers in-depth insights into the optical properties of RBCs by measuring their laser light scattering. This technique elucidates the relationships between RBCs morphology and scattering characteristics, particularly through FSC and side scatter (SSC) light measurements [23]. It is well known that flow cytometry is mainly used for measuring fluorescence intensity [24]; however, measuring fluorescence intensity from samples that are not labeled with specific fluorescent dye is not a standard task in the flow cytometry community. Fluorescence of human RBCs, measured by flow cytometry, was obtained on the samples that were treated with H₂O₂ [25], and based on this research, we introduce a novel approach to utilizing flow cytometry that goes beyond its typical use for labeling and sorting cells with fluorescent dyes. Instead, we showed that it is possible to analyze abnormalities in non-labeled TBHP-oxidized/rigidified RBCs by detecting their autofluorescence properties. Specifically, we demonstrated that fluorescence intensity and fluorescence peak area, often overlooked parameters in flow cytometry of non-labeled cells, can be used to assess these abnormalities. The fluorescence peak area is derived from the total fluorescence intensity over time as the particle passes through the laser. This area is calculated by integrating the fluorescence signal over the duration of the signal, which often corresponds to how long the particle is illuminated by the laser [26,27]. In our study, we have been shown that fluorescence peak area can be used to determine aggregation in oxidized RBCs, probably due to its increased fluorescence upon oxidation with 0.5 mM TBHP. This correlation between fluorescence characteristics and RBCs aggregation underscores the potential for advanced imaging techniques in this area. Moreover, our findings suggest that a proposed label-free optics-based integrated approach, which combines techniques such as ektacytometry, flow cytometry, phase-contrast microscopy, single-photon excitation microscopy with, to some extent, more sophisticated TPEF microscopy, is a highly promising methodology for detecting changes in the mechanobiology of different subpopulations of RBCs induced by oxidation.

2. Material and methods

2.1. Blood samples

Venous blood from three healthy blood donors was collected at the Institute for Transfusiology and Hemobiology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia, by the blood draw protocol, which included informed consent of the participants, approved by the Institutional Ethical Review Board (No 9/2021). The blood was drawn using vacutainer tubes (10 mL plastic vacutainer (BD Vacutainer® EDTA Tubes) with BD Hemogard™ lavender closure, containing 18 mg K₂EDTA). The peripheral blood RBCs parameters (hematocrit, hemoglobin concentration, RBCs concentration and volume distribution width), were in the reference range for healthy people (Supplementary material Table S1).

2.2. RBCs isolation and *in vitro* oxidation/rigidification

For the RBCs isolation, a centrifugation procedure was employed, wherein 10 mL of whole blood underwent centrifugation at 1811 × g for a duration of 20 min at 4 °C, utilizing the Megafuge 1.0R Heraeus centrifuge (Langensfeld, Germany). The ensuing supernatant, containing leucocytes and blood plasma, was cautiously aspirated and subsequently discarded. The precipitated RBCs were then reconstituted

in an isotonic saline solution (0.9 % NaCl, specifically Natrii chloridi infundibile 9 g/L, Hemofarm, Serbia) at a volumetric ratio of 1:4, and this suspension was homogenized through a twisting motion applied to the test tube. The residual plasma proteins were separated from the RBCs suspension via 10 min centrifugation at $1257 \times g$, at 4°C . These procedures were iterated three times. Ultimately, the packed RBCs were revived by resuspending them in an isotonic phosphate-buffered saline solution (denoted as PBS; comprising 0.8 % saline buffered with 10 mM sodium phosphate and maintaining a pH range of 7.2–7.4) at the same volumetric ratio of 1:4. According to the protocol by Gutierrez et al (2018) [15], the isolated RBCs were treated at 2 % Hct (hematocrit) in PBS with 0.75 or 0.5 mM Tert-butyl hydroperoxide (TBHP, Sigma Aldrich, USA) for 30 min, to induce oxidative damages on cellular membranes and consequent rigidification. The oxidized rigid cells were then washed with PBS and then used separately or reconstituted with healthy RBCs in a volume ratio of 1:1. In order to confirm the oxidation, RBCs were lysed with distilled water, and the absorbance of resulting hemolysate was measured using Ultrospec 3300 pro spectrophotometer (AmershamBioscience, Uppsala, Sweden). Additionally, lipid peroxidation (i.e., thiobarbituric acid reactive species; TBARS) levels in treated RBCs were analyzed according to the method described in Brujić et al. (2021) [28].

2.3. Ektactometry

Ektactometry, also known as laser diffraction ektactometry, utilizes laser light scattering patterns produced by RBCs subjected to controlled shear stress, allowing quantitative deformability assessment. By measuring the changes in the diffraction patterns, ektactometry provides valuable information about the mechanical properties of RBCs, such as elongation index (EI), deformability index (DI), and other parameters related to cell membrane viscoelasticity [29].

In this study, the RheoSCAN-AnD300 ektactometer (RheoMeditech Inc, Korea) was used for the RBCs deformability measurement [29]. Specifically, 6 μl of packed RBCs was carefully suspended in the tube containing polyvinylpyrrolidone (PVP, MW 360,000) in PBS (overall viscosity, 30 mPa/s) solution provided by the producer (test kit RSD-K02). A 500 μl volume of the RBCs suspension in PVP was transferred to the designated chamber of the microchannel measurement cuvette for exposure to standardized inputs of increasing shear stress. The microchannel width was 200 μm . Cell deformation was expressed as an EI using Equation (1), originating from the resulting ellipsoid laser diffraction pattern, where the major and minor axes of the elongated RBCs are represented by A and B, respectively. The calculated values for the elongation index were plotted versus shear stress (Pa) to obtain the deformability curve [15].

$$EI = \frac{A - B}{A + B} \quad (1)$$

2.4. Flow cytometry

For the flow cytometric measurements of non-labeled normal or 0.5 mM TBHP treated RBCs, the protocol by Drvenica et al. (2021) [23] was used on BD FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lake NJ, USA, [30]). A laser operating on 488 nm was used for the excitation. This protocol was based on determining FSC and SSC parameters of the RBCs, after the short time incubation in a series of solutions with decreasing molarity (155 mM, 139 mM, 124 mM, 93 mM) [23]. As an added value of flow cytometric analysis, we investigated the fluorescence peak area and fluorescence intensity of untreated RBCs, TBHP-treated RBCs and of a mixture of untreated and 0.5 mM TBHP-treated RBCs using spectral channel which corresponds to the following excitation and emission wavelengths: $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} = 525 (40) \text{ nm}$. The fluorescence peak area was used as an indirect measure of fluorescent particles size [27]. Flow cytometer measure fluorescence

intensity which can be represented as a pulse, characterized as the detector's signal output during a fluorescent particle's passage through the laser beam. The signal intensity rises as the cell traverses the laser beam and returns to baseline upon exiting the beam. The fluorescence intensity signal was detected by the PMT (Photomultiplier Tube) which is an integral part of the flow cytometer. PMT measures the current generated from photo-electrons in time. In the next processing stage, the signal is discretized and classified by some parameter such as fluorescence peak area. The fluorescence peak area was calculated by integrating the fluorescence signal over time, which often corresponds to how long the laser illuminates the particle. [26,27]. We assumed that the fluorescence peak area is directly proportional to the fluorescence intensity of the particle/cell size that passes through the laser beam and the time that particle/cells spent in it (Supplementary Material Fig. S1). The data were analyzed using Flow J software (v10.8.1) and Graph Pad Prism 7. At least 100,000 events were recorded per sample.

2.5. Phase contrast microscopy

The morphology and aggregation of RBCs were obtained by an Olympus CKX 41 inverted phase-contrast microscope (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Germany) using Quick PHOTO Camera 2.3 software (PROMICRA, Prague, Czech Republic). Images were analyzed using Fiji (an open – source platform for biological-image analysis).

2.6. Two-photon excitation fluorescence (TPEF) microscopy

Prior literature has detailed the experimental arrangement and the home-constructed TPEF microscope [31]. We harnessed a Ti:Sapphire laser (Coherent, Mira 900-F), driven by a frequency-doubled Nd:YVO4 laser (Coherent, Verdi V10), to produce ultrashort laser pulses at a 76 MHz repetition rate and a 160 fs pulse duration. Galvo-scanning mirrors (Cambridge Technology) were employed for raster scanning. Two different microscope objectives were utilized for this research: EC Plan-NEOFLUAR $40\times /1.3 \text{ N.A. oil}$ (Carl Zeiss) for RBCs imaging and Plan-Apochromat $20\times /0.8 \text{ N.A. air}$ (Carl Zeiss) for hemoglobin TPEF emission spectra measurement. We expanded the laser beam to match the objective lens's back aperture. A short-pass dichroic mirror was applied to reflect the laser beam toward the objective lens and transmit the signal to both the 15.1-megapixel digital single-lens reflex (DSLR) camera (Canon, EOS 50D) and the Photomultiplier Tube (PMT) (RCA, PF1006). The DSLR camera served the purpose of capturing bright-field images. We removed the camera's infrared filter to enable the observation of the laser beam's back reflection from the cover glass, aiding in system alignment and facilitating the axial positioning of the RBCs, for measuring TPEF emission spectra. Band-pass filters (VIS and/or 450 nm short pass) were positioned in front of the PMT to gather hemoglobin photoproduct fluorescence [17]. A 700 nm long-pass filter was used to eliminate parasitic laser lines shorter than 700 nm. A short-pass 700 nm filter was installed in front of the PMT detector to further eliminate back-scattered laser light. The RBCs and RBCs ghost imaging were carried out using 730 nm ultrashort laser pulses. This wavelength was selected based on the optical setup and the characteristics of the hemoglobin molecule, with further information provided in our earlier investigations [17,32]. Microscopic slides were prepared for RBCs imaging, 10 μl of packed RBCs underwent dilution in isotonic saline solution (0.9 % NaCl, Hemofarm, Serbia) at a 1:30 vol ratio. A 3 μl portion of the diluted whole blood sample was applied to a microscope slide, overlaid with a No. 1.5 coverslip, and sealed.

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis of the results was carried out using Graph PadPrism 9 software. According to Drvenica et al. (2021) [23], kurtosis and skewness of FSC distribution were determined for the 400–1000 quantity range with an aim to exclude cell debris and large aggregates,

rarely formed during samples preparation.

The results are expressed as mean \pm standard deviation. The statistical significance of differences between the groups was determined with a two-tailed paired *t*-test since the comparison was made between the same donor (control and TBHP treatment). Differences with *p* values of < 0.05 were considered significant.

3. Results and Discussion

3.1. Measuring RBCs deformability

The impact of TBHP on the integrity of the RBCs membrane was discernible by its response to mechanical stress, as determined by ektacytometry and shown in Fig. 1. Consequently, oxidative crosslinking transpires between methemoglobin and spectrin, resulting in a reduction in membrane flexibility [18,20]. These findings were proven decades ago in the case of hydrogen peroxide treatment of RBCs, where increased rigidity, along with morphological and surface changes in the RBCs, are shown to be mainly a cause of oxidation of heme-protein and in its cross-linking to skeletal proteins, i.e., spectrin and actin [33,34], and in addition, to the cytoplasmic component of Band 3. In this study, we aim to simulate mild oxidative stress in a controllable manner, so we investigated how the influence of a lower concentration of TBHP as a stable oxidant, specifically 0.5 mM TBHP (Fig. 1), manifests in terms of membrane elasticity within the packed RBCs population. This concentration of 0.5 mM TBHP induced an evident decrease in the EI compared to the control. After treating RBCs with 0.5 mM TBHP, it was found that the hemolysate absorbance spectra indicated the presence of methemoglobin (as seen in Supplementary Material Fig. S2a). Moreover, there was a higher level of lipid peroxides in the treated RBCs compared to the control RBCs (as seen in Supplementary Material Fig. S2b), confirming that oxidation had indeed occurred. A more pronounced oxidative impact (Fig. 1) associated with 0.75 mM TBHP led to a reduction in EI (at the beginning of the measurement, small values of shear stress were negligible [35,36]) and ultimately guided the cells toward irreversible lysis, as confirmed by the osmotic fragility test (Supplementary material Fig. S3). It is worth noting that the mixture of control RBCs and those treated with 0.5 mM TBHP (Fig. 1) re-established the EI curve within a range similar to that observed for control RBCs, which is also scenario with mixture of 0.75 mM and control (Fig. 1). This observation underscores one of the limitations of ektacytometry – the calculation of the EI curve as an average across the entire RBCs population, so it does not provide data on altered deformability of individual RBCs or affected subpopulation [37], such as RBCs altered by oxidation in this study.

3.2. Flow cytometry analysis based on FSC (forward scatter) and SSC (side scatter) light distribution

For all samples of RBCs, encompassing both control and those

subjected to treatment with 0.5 mM TBHP, flow cytometry analyses were conducted, examining the forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) dot plots, cell counts in the FSC/SSC channels, and auto-fluorescence intensity signals. Alterations in the distribution of light in the FSC and SSC channels were assessed by comparing changes in statistical parameters of the distribution, including skewness and kurtosis.

Incubation of RBCs in isotonic solutions resulted in a multimodal FSC distribution, as outlined in the supplementary information, with two partially overlapping peaks (Supplementary material Fig. S4). The emergence of a multimodal FSC signal distribution was primarily attributed to the random spatial orientation of RBCs within the flow channel and their deformation under hydrodynamic forces [23,21,38].

In the case of RBCs suspended and swelled (i.e., spherized) in a 93 mM phosphate buffer saline (PBS), FSC exhibited a unimodal distribution (Fig. 2), consistent with previous findings [23]. To attenuate the influence of RBCs orientation within the flow channel and individual variations between donors on the FSC and SSC signals [23], both control and treatment samples were subjected to swelling through incubation in a 93 mM hypotonic PBS solution and a distinct relationship between the intensities of forward and scattered light were observed in treated and control samples (Fig. 2a, 2b). Based on the FSC histogram presented in Fig. 2c, it is evident that the oxidized and rigidified RBCs by 0.5 mM TBHP exhibited a slight decrease in size. This decrease in size can be attributed to an increase in the area-to-volume ratio, which is already established to be associated with a reduction in cell deformability [39,40]. The histogram of SSC values obtained from oxidized and rigidified RBCs treated with 0.5 mM TBHP and control RBCs showed a more pronounced difference when compared to the FSC signal (Fig. 2d). The possible reasons for this could be the treatment – triggered changes in the shape and associated intracellular modifications, such as refractive index scattering at the right angle depends on the cell shape and internal properties of the scattering cells [41].

The consequences of RBCs oxidation are multifaceted and can be quantified using the flow cytometry technique across a larger cell population. Our observations indicated that a higher percentage of light was scattered forward in control samples compared to those treated with 0.5 mM TBHP, possibly due to alterations in the hydrodynamic forces acting on RBCs within the flow channel. As evidenced by ektacytometry, the mechanical properties of RBCs differed, with RBCs treated with 0.5 mM TBHP displaying as rigid, i.e., with reduced deformability. Although a direct comparison between ektacytometry and flow cytometry results is challenging, it is highly conceivable that changes in behavior in microfluidics techniques between rigid and deformable cells exist [42]. Based on that, it is realistic to speculate that the altered biomechanical properties of RBCs could induce alterations in FSC light intensity as the results of Gienger et al. (2019) [21] already gave a proof of principle that rheological properties of RBCs can be derived from flow cytometric measurements, however using the custom-made flow cytometric set-up. The use of commercially available flow cytometers for that purpose still

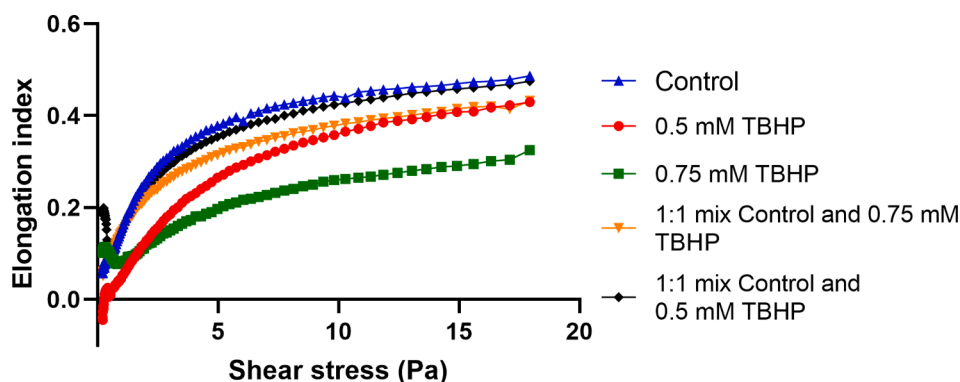


Fig. 1. Change of elongation indices, obtained by ektacytometry, with healthy donor RBCs treatment with 0.5 mM and 0.75 mM TBHP.

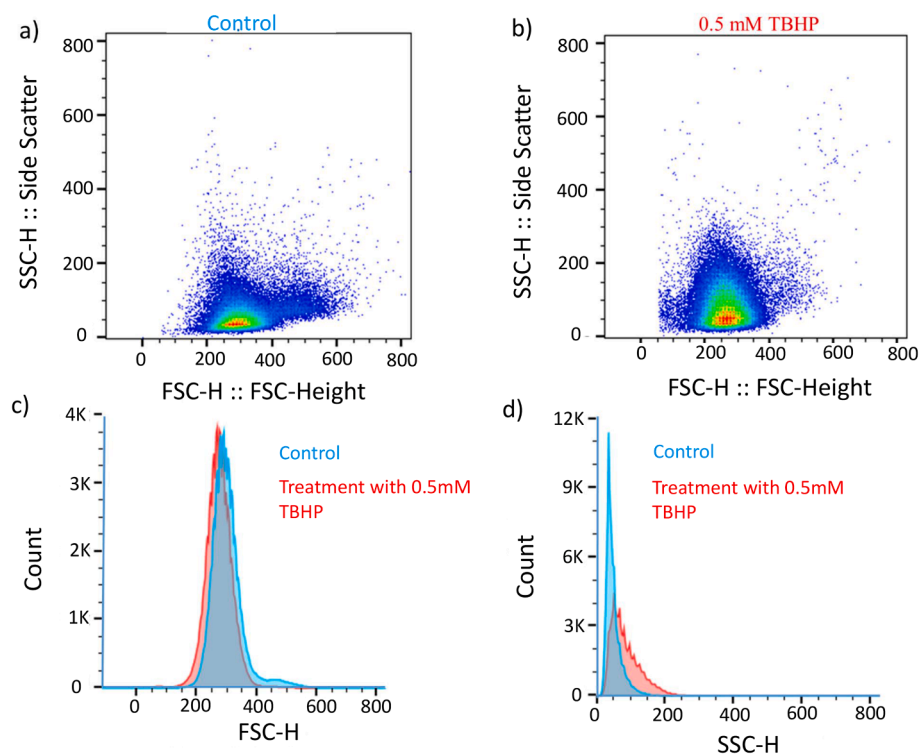


Fig. 2. Representative flow cytometry data of oxidized / rigidified and control RBCs swelled by incubation in 93 mM sodium phosphate buffer: a) SSC/FSC dot plot of control, untreated RBCs, b) SSC/FSC dot plot of RBCs treated with 0.5 mM TBHP, c) Overlapped FSC/Cell count histograms of control and RBCs treated with 0.5 mM TBHP, d) Overlapped SSC/Cell count histograms of control and RBCs treated with 0.5 mM TBHP.

requires the development of a more realistic shape model of elastic properties of RBCs made of several parameters and new mathematical approaches like surrogate modeling or tools of large-scale data analysis [21].

Based on the obtained FSC and SSC distributions in 93 mM hypotonic PBS, we perform an analysis of two statistical parameters related to RBCs sphericity, skewness, and kurtosis. Kurtosis exhibits greater sensitivity to oxidation compared to skewness in the analysis of FSC distribution. It is well-established that hypoosmotic incubation of RBCs leads to decreased kurtosis [23] as RBCs sphericity becomes

predominant [43]. Our investigation revealed that oxidative conditions also exerted an influence on kurtosis, with a lesser impact on skewness of the FSC distribution (Fig. 3a, 3b).

One potential reason for the reduced kurtosis in the FSC distribution may be the induced oxidation of hemoglobin and the subsequent relocation of oxidized hemoglobin to the cell membrane [20]. The kurtosis parameter increases with the fourth degree of difference between the mean and specific measurements [44–46] and is more sensitive to deviations from the mean than skewness. Accordingly, kurtosis could serve as a valuable parameter for assessing the effects of oxidation on FSC and

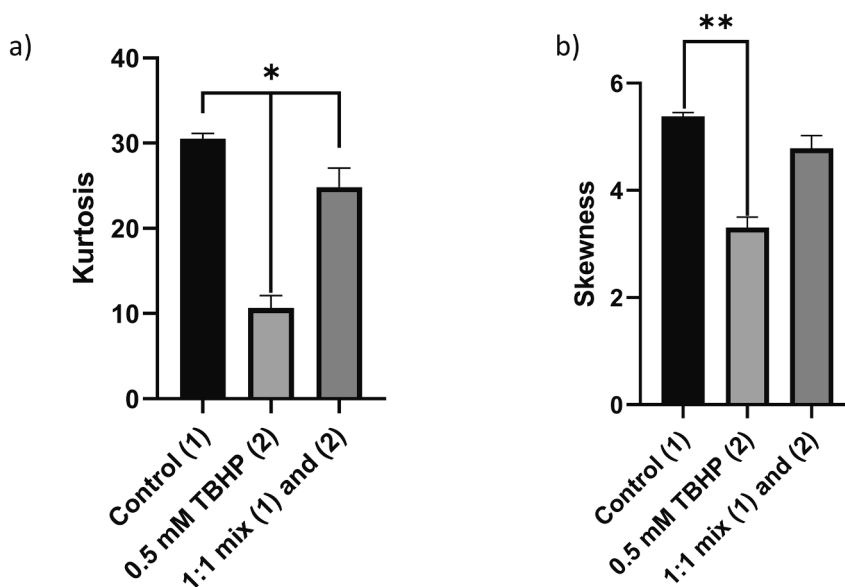


Fig. 3. Statistical parameters of FSC light distribution averaged on three different healthy blood donors: a) Kurtosis and b) Skewness of FSC light distribution of control (1), 0.5 mM treated RBCs (2) and 1:1 mix of control and 0.5 mM TBHP treated RBC ((1) and (2)).

SSC distributions.

3.3. (Auto) fluorescence properties of oxidized / rigidified RBCs measured by flow cytometry

RBCs exposed to an oxidized agent can be characterized by measuring fluorescence emission intensity by one- and TPEF microscopies [17,25,47]. The study by Yakimov et al. (2019) [48] revealed that RBCs fluorescence can also be detected when using flow cytometry, where low, but clearly detectable signal in all available spectral channels in their set-up was observed. In this study, we demonstrated that RBCs oxidation by 0.5 mM TBHP induced an increase in fluorescence emission in all three treated samples from healthy donors (Fig. 4a, 4b, 4c), in the spectral channel which corresponds to the following excitation and emission wavelengths: $\text{ex} = 488 \text{ nm} / \text{em} = 525 (40) \text{ nm}$. The detected autofluorescence in the control group as well, probably comes from RBCs dominant endogenous fluorophores [48–50]. The detected signal possibly came from hemoglobin degradation products, present intrinsically in low concentration in control donor RBCs. The intensified formation of heme fluorescent products can be induced by oxidation [47], laser irradiation [17,45] or in some pathophysiological states such as atherosclerotic plaques [51]. We have also demonstrated analogous findings using epifluorescence microscopy, revealing that the control group exhibits very low autofluorescence intensity, while RBCs treated with 0.5 mM TBHP show an increased fluorescence intensity (Supplementary Fig. S5).

It is underestimated that fluorescence pulse width (FIW2) can provide size information on the fluorescence-emitting particle [27], since the signals originating from individual and clustered cells are separated. In our study, fluorescence peak area was a parameter that was different between the control and TBHP treated RBCs (Fig. 5). In the TBHP treated RBCs we observed several peaks, formed as a consequence of increased fluorescence intensity and possibly the formation of RBCs clusters. However, the clustering level could vary between the samples, and autofluorescence not caused by oxidation, could affect the measurements. We observed that peaks were present in all TBHP treated RBC samples, but also in one control RBCs sample (Fig. 5b), indicating the advance of flow cytometry to detect interindividual differences in oxidative status of healthy donors. More importantly, the existence of fluorescence peaks with different areas in the population of 0.5 mM TBHP oxidized RBCs indicated that oxidation induces the appearance of RBC clusters with increased fluorescence intensity. Indirectly we have been shown clustering in TBHP treated RBCs, by using phase contrast microscopy (see Supplement Material Figs. S6, S7, S8, S9). In such a way, flow cytometric analysis allowed a clear distinction between control, untreated RBCs, oxidized RBCs, and sample containing an equal portion of oxidized and normal RBCs (Fig. 5).

3.4. Phase contrast microscopy of RBCs

Phase contrast microscopy was employed to indirectly assess the extent of aggregation in the treated RBCs and elucidate their morphological characteristics. The control RBCs sample demonstrated a homogeneous cell distribution (Fig. 6a). It becomes apparent that the RBCs sample treated with 0.5 mM TBHP exhibited aggregation, as illustrated in Fig. 6b.

Notably, areas devoid of cellular entities exhibited a considerable increase in size within the treated sample, as demonstrated in Supplementary Fig. S9. This expansion in pixel area devoid of cells can be attributed to the augmented aggregation of RBCs observed in the treated sample. Furthermore, the influence of a 0.5 mM TBHP treatment on RBCs aggregation was corroborated by complementary techniques, such as flow cytometry.

3.5. TPEF microscopy of RBCs

TPEF imaging was applied on control RBCs (Fig. 7a), the RBCs treated with 0.5 mM TBHP, and a mixture of TBHP-treated and control RBCs (Fig. 7b and 7c). The TPEF images depicted deviations from the native morphology in the 0.5 mM TBHP-treated RBCs, indicating the TPEF footprint of *in vitro* induced oxidation. We want to emphasize that the TPEF signal observed in the RBCs membrane in 0.5 mM treated RBCs was not uniform across all RBCs in the sample. Individual variability in the TPEF signal spatial distribution among treated RBCs suggests varying degrees of tolerance to oxidation within the pool of RBCs. Notably, TPEF microscopy revealed potential interactions between oxidized hemoglobin and RBCs membrane components, as evidenced by the fluorescence signal confined to the RBCs membranes (Fig. 7b). This result follows our and other previous studies on femtosecond laser interaction with hemoglobin molecules extracellularly or within RBCs [17,52], as well as documented discrepancies in SSC histograms between control and oxidized RBCs, reflecting internal properties of the cell such as refractive index change. Overall, this can provide a possible differentiation between oxidized and control RBCs in the mixed suspension (Fig. 7c, where the green arrow points to control RBCs and the red arrow points to the 0.5 mM treated RBCs). However, TPEF imaging of oxidized RBCs should be more explored since the inter-individual differences between RBCs of a single donor can affect the distribution of TPEF within RBCs.

Previous reports showed that the membrane-attached hemoglobin is one of the determining factors of RBCs deformability, i.e., when an RBCs contains more membrane-attached hemoglobin molecules, its ability to deform worsens [16]. In this study, we demonstrated that it is more likely that membrane-attached hemoglobin photoproduct and/or degradation/oxidation is responsible for the TPEF signal (Fig. 7) since it was especially pronounced in the sample of RBCs rigidified with 0.5 mM TBHP, with already confirmed lower deformability (Fig. 1). In this way,

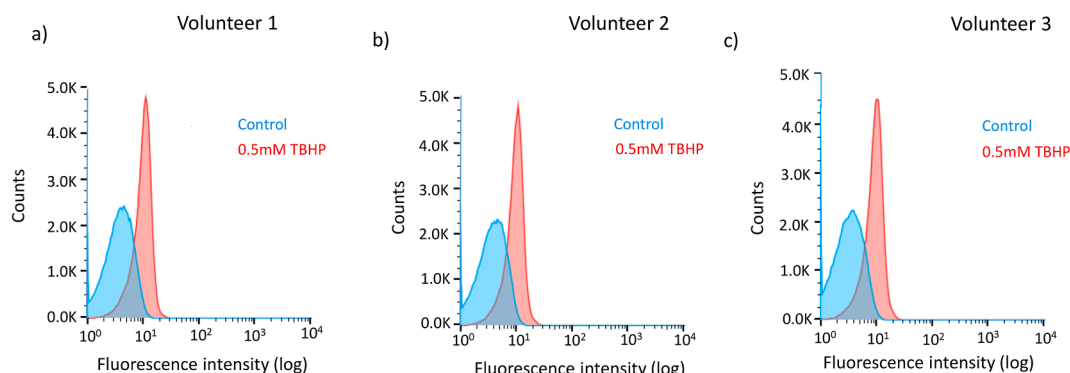


Fig. 4. Autofluorescence intensity of 0.5 mM TBHP treated and control, untreated RBCs of three healthy donors.

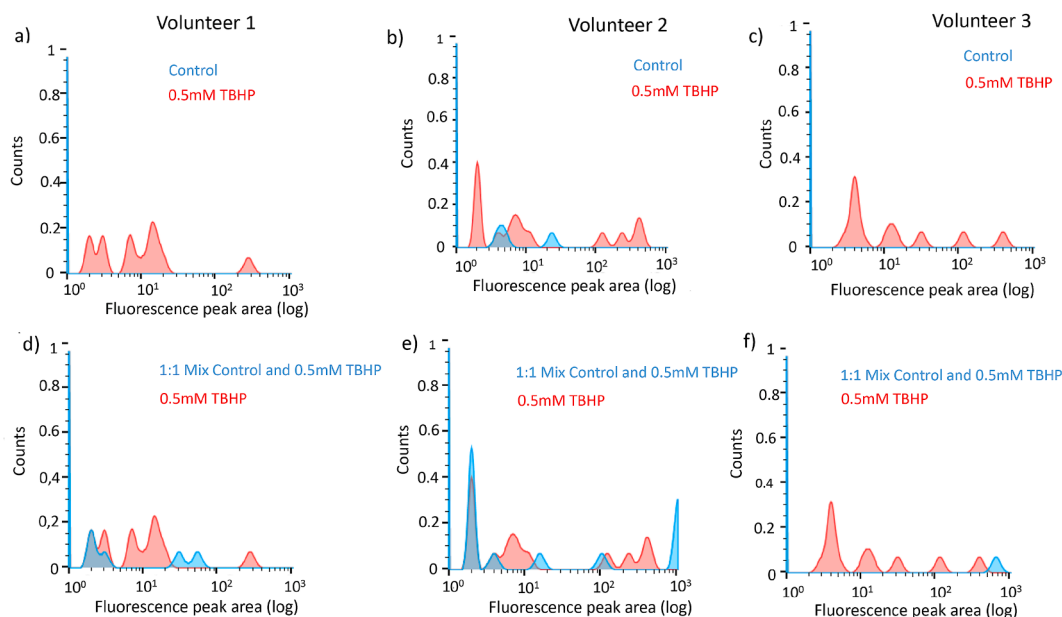


Fig. 5. Fluorescence peak area of oxidized RBCs. a), b), and c) Fluorescence peak area from control, untreated, and 0.5 mM TBHP treated RBCs of three healthy donors. Peaks were not observed in control RBCs samples of donors 1 and 3. d), e) and f) 1:1 mix of control and 0.5 mM TBHP treated RBCs of the same three healthy donors.

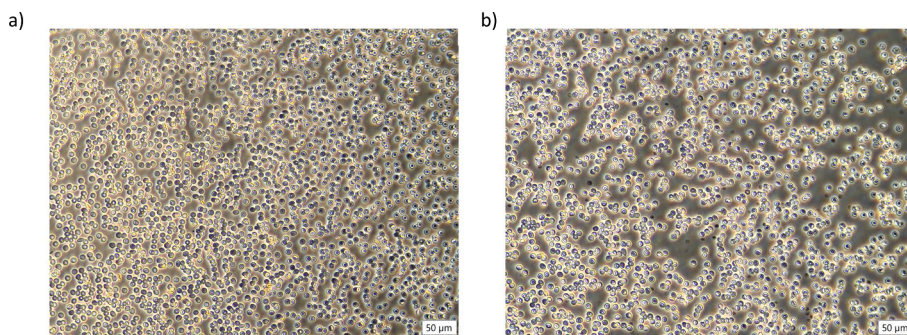


Fig. 6. Phase contrast microscopy of a) control RBCs and b) RBCs treated with 0.5 mM TBHP.

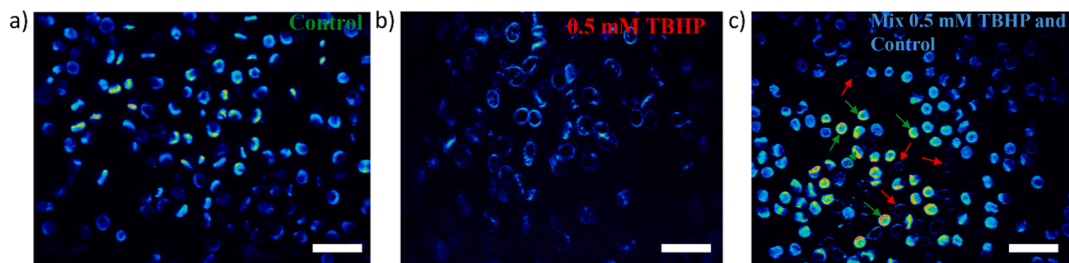


Fig. 7. TPEF imaging of a) Control, healthy donor's untreated RBCs; b) 0.5 mM TBHP treated RBCs of the same donor, c) Mixture of Control (green arrow) 0.5 mM treated RBCs (red arrow). Scale bar 20 μm .

based on the obtained results with a sample containing two subpopulations equally represented, normal and less deformable oxidized RBCs, we demonstrated that the presented TPEF microscopy set-up can indirectly serve as a technique for monitoring the quality of stored RBCs for transfusion purposes, as already proposed by Saytashev and co-workers (2016) [53].

4. Conclusion

In conventional ektacytometry, differences in RBC subpopulations

deformability are often obscured due to the averaging measurement process. To address this limitation, this study introduces an approach that integrates label-free optics-based techniques such as flow cytometry, phase-contrast, and two-photon excitation fluorescent microscopy with ektacytometry. The aim was to evaluate subpopulations that exhibit decreased RBCs deformability upon an *in vitro* oxidation using 0.5 mM TBHP as a low-level oxidative agent.

The study found that flow cytometry can easily detect rigidified subpopulations based on FSC/SSC light distribution, RBCs fluorescence intensity, and peak area. The latter are most likely originating from

hemoglobin photo and/or degradation products, as we demonstrated in our recent study [17] Phase-contrast microscopy confirmed clustering in rigidified RBCs that was demonstrated by flow cytometry. Moreover, single-photon excitation microscopy confirmed increased fluorescence intensity in 0.5 mM oxidized RBCs population.

Additionally, two-photon excitation fluorescence microscopy proved altered morphology and spatial location of fluorescence intensity signal near the membrane of oxidized RBCs compared to control RBCs, indicating a link with the reduced deformability.

The proposed label-free optics-based methodology approach, which combines established techniques (ektacytometry and flow cytometry) with more sophisticated microscopy (two-photon excitation fluorescence microscopy), emerges as a promising tool for detecting mechanobiological changes in different RBC subpopulations induced by oxidative stress. The findings suggest potential applications in clinical practice for monitoring pathological conditions influenced by physical or environmental stress and as a quality control measure for stored RBCs. Overall, our study contributes to understanding the effects of oxidative stress on RBCs biomechanics, morphology, and fluorescence properties.

Ethics approval

The collection of venous blood from healthy blood donors at the Institute for Transfusiology and Hemobiology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia was approved by the Institutional Ethical Review Board (No 9/2021).

7. Consent for publication

All authors of the manuscript agree to its submission and publication.

Funding

This work was supported by the Science Fund of the Republic of Serbia [program PROMIS, project HEMMAGINERO, grant number 6066079]. The authors acknowledge funding provided by the Institute of Physics Belgrade and the Institute for Medical Research University of Belgrade, National Institute of the Republic of Serbia through a grant by the Ministry of Science Technological Development and Innovation of the Republic of Serbia (contract No. 451-03-66/2024-03/200015). The authors also acknowledge funding provided by the Project Advanced Biophysical Methods for Soil Targeted Fungi-Based Biocontrol Agents -BioPhysFUN [Grant number 4545] from the Green program of cooperation between science and industry, Science Fund of the Republic of Serbia.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.125420>.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- [1] M.J. McAteer, L.J. Dumont, J. Cancelas, N. Rugg, R. Vassallo, P. Whitley, S. Graminske, K. Friedman, Multi-institutional randomized control study of haemolysis in stored red cell units prepared manually or by an automated system, *Vox Sang.* 99 (1) (2010) 34–43, <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2010.01313.x>.
- [2] Anderson, H. L., Brodsky, I. E., & Mangalmurti, N. S. (2018). The Evolving Erythrocyte: Red Blood Cells as Modulators of Innate Immunity. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 201(5), 1343–1351. doi: 10.4049/jimmunol.1800565.
- [3] S. Chien, Physiological and pathophysiological significance of hemorheology, in: *Clinical Hemorheology: Applications in Cardiovascular and Hematological Disease, Diabetes, Surgery and Gynecology*, Springer, Netherlands, Dordrecht, 1987, pp. 125–164.
- [4] L. Kuck, J.N. Peart, M.J. Simmonds, Active modulation of human erythrocyte mechanics, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 319 (2) (2020) C250–C257, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00210.2020>.
- [5] V. Pretini, M.H. Koenen, L. Kaestner, M.H.A.M. Fens, R.M. Schifffers, M. Bartels, R. Van Wijk, Red Blood Cells: Chasing Interactions, *Front. Physiol.* 10 (2019) 945, <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00945>.
- [6] J.C. Kuo, M.J. Paszek, Glycocalyx curving the membrane: forces emerging from the cell exterior, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 37 (2021) 257–283, <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-120219-054401>.
- [7] G. Bartosz, Erythrocyte aging: physical and chemical membrane changes, *Gerontology* 37 (1–3) (1991) 33–67, <https://doi.org/10.1159/000213251>.
- [8] A. Catan, C. Turpin, N. Diotel, J. Patche, A. Guerin-Dubourg, X. Debussche, E. Bourdon, N. Ah-You, N. Le Moulllec, M. Besnard, R. Veerapen, P. Rondeau, O. Meilhac, Aging and glycation promote erythrocyte phagocytosis by human endothelial cells: Potential impact in atherothrombosis under diabetic conditions, *Atherosclerosis* 291 (2019) 87–98, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.10.015>.
- [9] V.M. Barodka, E. Nagababu, J.G. Mohanty, D. Nyhan, D.E. Berkowitz, J.M. Rifkind, J.J. Strouse, New insights provided by a comparison of impaired deformability with erythrocyte oxidative stress for sickle cell disease, *Blood Cell Mol. Dis.* 52 (4) (2014) 230–235, <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.10.004>.
- [10] R. Huisjes, A. Makhro, E. Llaudet-Planas, L. Hertz, P. Petkova-Kirova, L. P. Verhagen, S. Pignatelli, M.A.E. Rab, R.M. Schifffers, E. Seiler, W.W. van Solinge, J.V. Corrons, L. Kaestner, M. Mañú-Pereira, A. Bogdanova, R. van Wijk, Density, heterogeneity and deformability of red cells as markers of clinical severity in hereditary spherocytosis, *Haematologica* 105 (2) (2020) 338–347, <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.188151>.
- [11] M. Leo, D.I.F. Giacinto, M. Nardini, A. Mazzini, C. Rossi, E. Porceddu, M. Papi, A. Grieco, D.E.M. Spirito, G. Ciasca, Erythrocyte viscoelastic recovery after liver transplantation in a cirrhotic patient affected by spur cell anaemia, *J. Microsc.* 280 (3) (2020) 287–296, <https://doi.org/10.1111/jmi.12958>.
- [12] N.Z. Piet, J. Stutz, N. Yilmaz, H. Xia, T. Yoshida, S.S. Shevkopyas, Microfluidic capillary networks are more sensitive than ektacytometry to the decline of red blood cell deformability induced by storage, *Sci. Rep.* 11 (1) (2021) 604, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79710-3>.
- [13] I. Doh, W.C. Lee, Y.H. Cho, A.P. Pisano, F.A. Kuypers, Deformation measurement of individual cells in large populations using a single-cell microchamber array chip, *Appl. Phys. Lett.* 100 (17) (2012) 173702–173702, <https://doi.org/10.1063/1.4704923>.
- [14] Y.J. Kang, S. Serhrouchni, A. Makhro, A. Bogdanova, S.S. Lee, Simple assessment of red blood cell deformability using blood pressure in capillary channels for effective detection of subpopulations in red blood cells, *ACS Omega* 7 (43) (2022) 38576–38588, <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04027>.
- [15] M. Gutierrez, M.B. Fish, A.W. Golinski, O. Eniola-Adefeso, Presence of rigid red blood cells in blood flow interferes with the vascular wall adhesion of leukocytes, *Langmuir* 34 (6) (2018) 2363–2372, <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b03890>.
- [16] X.Q. Mi, J.Y. Chen, L.W. Zhou, Effect of low power laser irradiation on disconnecting the membrane-attached hemoglobin from erythrocyte membrane, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 83 (2) (2006) 146–150, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.12.018>.
- [17] M.D. Radmilović, I.T. Drvenica, M.D. Rabasović, V.L. Ilić, D. Pavlović, S. Oasa, V. Vukojević, M. Perić, S.N. Nikolić, A.J. Krmpot, Interactions of ultrashort laser pulses with hemoglobin: Photophysical aspects and potential applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 244 (2023) 125312, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125312>.
- [18] M.J. Chen, M.P. Sorette, D.T. Chiu, M.R. Clark, Prehemolytic effects of hydrogen peroxide and t-butylhydroperoxide on selected red cell properties, *BBA* 1066 (2) (1991) 193–200, [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(91\)90186-c](https://doi.org/10.1016/0005-2736(91)90186-c).
- [19] J.G. Mohanty, E. Nagababu, J.M. Rifkind, Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging, *Front. Physiol.* 5 (2014) 84, <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00084>.
- [20] T. Maruyama, M. Hieda, S. Mawatari, T. Fujino, Rheological Abnormalities in Human Erythrocytes Subjected to Oxidative Inflammation, *Front. Physiol.* 13 (2022) 837926, <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.837926>.
- [21] J. Gienger, H. Gross, V. Ost, M. Bär, J. Neukammer, Assessment of deformation of human red blood cells in flow cytometry: measurement and simulation of bimodal forward scatter distributions, *Biomed. Opt. Express* 10 (9) (2019) 4531–4550, <https://doi.org/10.1364/BOE.10.004531>.
- [22] D.H. Tycko, M.H. Metz, E.A. Epstein, A. Grinbaum, Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration, *Appl. Opt.* 24 (9) (1985) 1355–1365, <https://doi.org/10.1364/AO.24.001355>.
- [23] I. Drvenica, S. Mojsilović, A. Stanić, D. Marković, M. Kovačić, I. Maslovarić, I. Rapajić, D. Vučetić, V. Ilić, The effects of incubation media on the assessment of the shape of human erythrocytes by flow cytometry: a contribution to mathematical data interpretation to enable wider application of the method,

- European Biophysics Journal: EBJ 50 (6) (2021) 829–846, <https://doi.org/10.1007/s00249-021-01527-3>.
- [24] Steinkamp, J. A. (1984). Flow cytometry. Review of scientific instruments, 55(9), 1375–1400. doi: 10.1063/1.1137948.
- [25] E. Nagababu, F.J. Chrest, J.M. Rifkind, Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1620 (1–3) (2003) 211–217, [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00537-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00537-8).
- [26] R. Fedr, Z. Kahounová, J. Remšík, M. Reiterová, T. Kalina, K. Souček, Variability of fluorescence intensity distribution measured by flow cytometry is influenced by cell size and cell cycle progression, *Sci. Rep.* 13 (1) (2023) 4889, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31990-1>.
- [27] K. Kang, S.B. Lee, J.H. Yoo, C.W. Nho, Flow cytometric fluorescence pulse width analysis of etoposide-induced nuclear enlargement in HCT116 cells, *Biotechnol. Lett.* 32 (8) (2010) 1045–1052, <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0277-x>.
- [28] M. Brujić, J. Grujić-Milanović, Z. Miloradović, D.j. Jovović, L. Živković, N. Mihailović-Stanojević, D. Karanović, B. Spremo-Potparević, DNA, protein and lipid oxidative damage in tissues of spontaneously hypertensive versus normotensive rats, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 141 (2021) 106088, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2021.106088>.
- [29] S. Shin, Y. Ku, M.S. Park, J.S. Suh, Slit-flow ektacytometry: laser diffraction in a slit rheometer, *Cytometry B Clin. Cytom.* 65 (1) (2005) 6–13, <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20048>.
- [30] https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketing-documents/BD_FACSCalibur_instructions.pdf.
- [31] M.D. Rabasović, D.V. Pantelić, B.M. Jelenković, S.B. Čurčić, M.S. Rabasović, M. D. Vrbica, V.M. Lazovic, B.P. Čurčić, A.J. Krmpot, Nonlinear microscopy of chitin and chitinous structures: a case study of two cave-dwelling insects, *J. Biomed. Opt.* 20 (1) (2015) 016010, <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.1.016010>.
- [32] K. Bukara, S. Jovanic, I.T. Drvenica, A. Stancic, V. Ilic, M.D. Rabasovic, D. Pantelic, B. Jelenkovic, B. Bugarski, A.J. Krmpot, Mapping of hemoglobin in erythrocytes and erythrocyte ghosts using two photon excitation fluorescence microscopy, *J. Biomed. Opt.* 22 (2) (2017) 26003, <https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.2.026003>.
- [33] L.M. Snyder, N.L. Fortier, J. Trainor, J. Jacobs, L. Leb, B. Lubin, D. Chiu, S. Shohet, N. Mohandas, Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking, *J. Clin. Invest.* 76 (5) (1985) 1971–1977, <https://doi.org/10.1172/JCI112196>.
- [34] N. Shaklai, B. Frayman, N. Fortier, M. Snyder, Crosslinking of isolated cytoskeletal proteins with hemoglobin: a possible damage inflicted to the red cell membrane, *BBA* 915 (3) (1987) 406–414, [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(87\)90027-6](https://doi.org/10.1016/0167-4838(87)90027-6).
- [35] P.J. Bronkhorst, E. Nijhof, J.J. Sixma, Parametrization of the deformation curve as a tool for standardization and interpretation of ektacytometric measurements, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 15 (1995) 803–816, <https://doi.org/10.3233/CH-1995-15602>.
- [36] O.K. Baskurt, M.R. Hardeman, M. Uyuklu, P. Ulker, M. Cengiz, N. Nemeth, S. Shin, T. Alexy, H.J. Meiselman, Parameterization of red blood cell elongation index–shear stress curves obtained by ektacytometry, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 69 (7) (2009) 777–788, <https://doi.org/10.3109/00365510903266069>.
- [37] J. Kim, H. Lee, S. Shin, Advances in the measurement of red blood cell deformability: a brief review, *J. Cell. Biotechnol.* 1 (1) (2015) 63–79, <https://doi.org/10.3233/JCB-15007>.
- [38] Gibaud, E. (2015) Numerical simulation of red blood cells flowing in a blood analyzer. Hematology. PhD thesis, Université Montpellier, 2015. English. NNT: 2015MONT5135.
- [39] R.E. Waugh, M. Narla, C.W. Jackson, T.J. Mueller, T. Suzuki, G.L. Dale, Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age, *Blood* 79 (5) (1992) 1351–1358.
- [40] M.J. McVey, W.M. Kuebler, A. Orbach, D. Arbell, O. Zelig, G. Barshtein, S. Yedgar, Reduced deformability of stored red blood cells is associated with generation of extracellular vesicles, *Transfus. Apher. Sci.* 59 (5) (2020) 102851, <https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.102851>.
- [41] B.G. de Grooth, L.W. Terstappen, G.J. Puppels, J. Greve, Light-scattering polarization measurements as a new parameter in flow cytometry, *Cytometry* 8 (6) (1987) 539–544, <https://doi.org/10.1002/cyto.990080602>.
- [42] E. Henry, S.H. Holm, Z. Zhang, J.P. Beech, J.O. Tegenfeldt, D.A. Fedosov, G. Gompfer, Sorting cells by their dynamical properties, *Sci. Rep.* 6 (2016) 34375, <https://doi.org/10.1038/srep34375>.
- [43] C. Ahlgrim, T. Pottgiesser, T. Sander, Y.O. Schumacher, M.W. Baumstark, Flow cytometric assessment of erythrocyte shape through analysis of FSC histograms: use of kurtosis and implications for longitudinal evaluation, *PLoS One* 8 (3) (2013) e59862.
- [44] B.W. Silverman Density Estimation for Statistics and Data Analysis 1986 Chapman and Hall New York 10.1201/9781315140919.
- [45] J.W. Tukey, *Exploratory Data Analysis*, Addison-Wesley, Reading, MA, 1977.
- [46] B.H. Erickson, T.A. Nosanchuk, *Understanding Data*, Second Edition, Open University Press, Buckingham, 1992.
- [47] E. Nagababu, S. Ramasamy, J.M. Rifkind, Y. Jia, A.I. Alayash, Site-specific cross-linking of human and bovine hemoglobins differentially alters oxygen binding and redox side reactions producing rhombic heme and heme degradation, *Biochemistry* 41 (23) (2002) 7407–7415, <https://doi.org/10.1021/bi0121048>.
- [48] B.P. Yakimov, M.A. Gogleva, A.N. Semenov, S.A. Rodionov, M.V. Novoselova, A. V. Gayer, A.V. Kovalev, A.I. Bernakevich, V.V. Fadeev, A.G. Armaganov, V. P. Drachev, D.A. Gorin, M.E. Darvin, V.I. Shcheslavskiy, G.S. Budylin, A. V. Priezhev, E.A. Shirshin, Label-free characterization of white blood cells using fluorescence lifetime imaging and flow-cytometry: molecular heterogeneity and erythrophagocytosis, *Biomedical Optics Express* 10 (8) (2019) 4220–4236, <https://doi.org/10.1364/BOE.10.004220>.
- [49] M. Monici, Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications, *Biotechnol. Annu. Rev.* 11 (2005) 227–256, [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11007-2](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11007-2).
- [50] W. Zheng, D. Li, Y. Zeng, Y. Luo, J.Y. Qu, Two-photon excited hemoglobin fluorescence, *Biomed. Opt. Express* 2 (1) (2011) 71–79, <https://doi.org/10.1364/BOE.2.000071>.
- [51] N.M. Htun, Y.C. Chen, B. Lim, T. Schiller, G.J. Maghazal, A.L. Huang, K.D. Elgass, J. Rivera, H.G. Schneider, B.R. Wood, R. Stocker, K. Peter, Near-infrared autofluorescence induced by intraplaque hemorrhage and heme degradation as marker for high-risk atherosclerotic plaques, *Nat. Commun.* 8 (1) (2017) 75, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00138-x>.
- [52] R. Zhu, T. Avsievich, X. Su, A. Bykov, A. Popov, I. Meglinski, Hemorheological alterations of red blood cells induced by 450-nm and 520-nm laser radiation, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 230 (2022) 112438, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112438>.
- [53] I. Saytashev, R. Glenn, G.A. Murashova, S. Osseiran, D. Spence, C.L. Evans, M. Dantus, Multiphoton excited hemoglobin fluorescence and third harmonic generation for non-invasive microscopy of stored blood, *Biomed. Opt. Express* 7 (9) (2016) 3449–3460, <https://doi.org/10.1364/BOE.7.003449>.



Elongation index derivative as a potential hemorheological parameter in a diffraction analysis of diabetes mellitus patients' erythrocytes

Mihajlo D. Radmilović¹ · Vesna Lj. Ilić² · Drenka Trivanović² · Ana Petakov³ · Katarina Lalić^{3,4} · Mihailo D. Rabasović¹ · Aleksandar J. Krmpot¹ · Ivana T. Drvenica²

Received: 29 December 2023 / Accepted: 15 April 2024 / Published online: 19 June 2024

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2024

Abstract

Comparative analysis of erythrocyte deformability in individuals with Diabetes Mellitus (DM) and healthy individuals (Control) was represented, focusing on the Elongation index (EI) calculation based on diffraction images. While no statistically significant differences in EI values were observed between the groups, we determined specific points along the deformability curve and revealed the first derivative of deformability curve (dEI / dSS) as a potential metric for quantifying erythrocyte response to deformation, where SS represents shear stress in Pa (Pascal). Statistically significant differences in dEI / dSS at the half maximum value of the deformability curve were identified, suggesting a slower erythrocyte response to shear stress in DM patients. Scatter plot analysis demonstrated a linear declining trend in dEI / dSS index with an increase in shear stress, indicating decaying erythrocyte responsiveness to higher shear stress values, particularly pronounced in DM patients. Although pilot, this study suggests that dEI / dSS can provide valuable insights into the hemorheological aspects of DM pathology and contribute to a comprehensive understanding of erythrocyte mechanobiological behavior in response to varying shear stress levels. Correlations between the proposed measure of RBC mechanical properties and established clinical markers of DM and its complications (serum cholesterol, creatinine, and urea level) are obtained to get preliminary insight into dEI / dSS application for better diagnosis and/or patient management.

Keywords Erythrocyte deformability · Diabetes mellitus · Ektacytometry · Laser diffraction

1 Introduction

Erythrocyte deformability plays a pivotal role in blood flow through the small capillaries (Mokken et al. 1992). Understanding how erythrocytes behave when they are exposed to increased pressures is an important biophysical aspect of microcirculation (Maeda et al.

Extended author information available on the last page of the article

1996; Kobayashi et al. 2022; Pretorius et al. 2018). Erythrocytes that have reduced deformability by obstructing capillary blood flow may induce the metabolic stress of the tissues (Cho et al. 2014). Diseases such as Diabetes mellitus (DM) (especially type 2) are sensitive to the change in deformability of erythrocyte membrane (Shin et al. 2007; Sokolova et al. 2017; Babu et al. 2021). Studies which include a large number of individuals across the globe estimated that world prevalence of DM will increase 7.7%, affecting 439 million adults by 2030 (Shaw et al. 2010). In the year 2015, it was approximated that there existed 415 million individuals (with an uncertainty range of 340 to 536 million) aged between 20 and 79 who had diabetes (Ogurtsova et al. 2017). Diabetes was responsible for causing 5.0 million fatalities, and the total global healthcare spending related to DM reached an estimated amount of 673 billion US dollars (Ogurtsova et al. 2017). Low - and middle - income countries have higher probability for the increasing trend of citizen with DM (Rabi et al. 2006). Projections indicated that the number of individuals aged 20 to 79 with diabetes would escalate to 642 million (with an uncertainty range of 521 to 829 million) by the year 2040 (Ogurtsova et al. 2017). Since DM represent a modern age disease with pandemic tendencies and erythrocytes mechanical and rheological properties are affected with DM complications (Wang et al. 2021; Lee et al. 2015), we tried to expand hemorheological parameters diagnostic potential in DM patients. It is postulated that hemorheological determinants, such as calculated Elongation index (EI) have influence in the pathogenesis of diabetic organ complications, particularly retinopathy, nephropathy, and neuropathy (Schut et al. 1993; Jensen et al. 1989; Lee et al. 2015; Chung et al. 2018). Reduction in erythrocyte EI in DM is connected to escalated levels of glycosylated hemoglobin, higher sorbitol content, and increased level of oxidized hemoglobin that can be bound to the inner side of the erythrocyte membrane, all of which may disrupt the erythrocyte surface-to-volume ratio (Malandrino et al. 2012; Mawatari et al. 2004; Schut et al. 1993; Ercan et al. 2002). Moreover, there has been shown a direct correlation between microvascular complications and reduced erythrocytes deformability (Kobayashi et al. 2022). Thus, EI represent important hemorheological parameter applied in clinical studies (Baskurt et al. 2004, Baskurt et al. 2009).

Nevertheless, a degree of discordance is present in the available scientific literature related to the calculation of EI of diabetic erythrocytes. It's not established a unique standard methodology for determining EI (Baskurt et al. 2009). For comparison of EI curves between different experimental groups, it's often necessary to standardize and parametrize measurements (Bronkhorst et al. 1995), methodological diversity is present, encompassing a spectrum of investigative techniques, such as filtration, ektacytometry, micropipette aspiration, viscosity assessments of erythrocyte suspensions, as well as osmotic gradient ektacytometry (Schut et al. 1993; Musielak et al. 2009).

We investigated erythrocyte deformability in DM patients by calculating EI and its first derivative to shear stress (SS) (dEI / dSS) in a $\frac{1}{2}$ maximal value of deformability curve. In this way, we aimed to determine the rate of erythrocyte deformation change by introducing a new hemorheological parameter dEI / dSS , which is beyond standard diffraction optical measurements. We have shown that dEI / dSS is directly correlated with serum cholesterol level ($s - \text{cholesterol}$) and inversely correlated with $\frac{1}{2}$ EI. Thus, we indicate that dEI / dSS can be potentially used as a deformability parameter in clinical practice for better management of DM patients.

2 Materials and methods

2.1 Blood samples

Venous blood samples were taken in K₂EDTA vacutainers (BD, United States), by puncture of the forearm vein of both type I ($n=7$) and type II ($n=6$) diabetic patients, undergoing regular check-ups in the Clinic for Endocrinology, Diabetes and Metabolic Diseases of the University Clinical Center of Serbia. Before sample collection, the patients signed an informed consent as an obligatory procedure within obtained ethical approval No 1332/VII-5 from 7th July 2020 issued by the Faculty of Medicine at University of Belgrade. We tried to ensure homogeneity of the diabetic patients by designing inclusion and exclusion criteria and by matching number of male and female individuals. For DM group inclusion criteria were: individuals diagnosed with DM, age between 18 and 75 years, stable diabetic condition, defined as no significant changes in medication regimen within the past three months. Exclusion criteria for DM group were: pregnant individuals, coexisting medical conditions that could significantly impact glucose metabolism (e.g., pancreatic disorders, malignancies), current use of investigational drugs or participation in other clinical trials involving diabetes management. For control, blood from 11 healthy age- and sex-matched donors (individuals having no systematic disease) were obtained, the inclusion criteria were: individuals without a diagnosis of DM, age-matched to the diabetic group (between 18 and 75 years), no current use of medications known to affect glucose metabolism. The exclusion criteria for control group were: individuals with a history of impaired glucose tolerance, pregnancy, any chronic medical condition that could affect glucose metabolism (e.g., polycystic ovary syndrome, Cushing's syndrome), current use of medications known to affect glucose metabolism. The pseudo-anonymized samples were stored at 4 °C (no longer than 1 h after blood collection) until transport and processing at the Institute for Medical Research University of Belgrade was performed.

2.2 Erythrocyte isolation

Whole blood (10 mL) underwent centrifugation at $1811 \times g$ for 20 min at 4 °C using the Megafuge 1.0R equipment from Heraeus centrifuge (Germany). The resulting supernatant, containing leukocytes in plasma, was carefully aspirated, and discarded. The precipitated erythrocytes were reconstituted in an isotonic saline solution (0.9% NaCl, specifically Natrii chloridi infundibile 9 g/L from Hemofarm (Serbia)) at a volumetric ratio of 1:4. The suspension was homogenized by a twisting motion applied to the test tube. Residual plasma proteins were separated from the erythrocyte suspension via centrifugation at $1257 \times g$ for 10 min at 4 °C. These procedures were repeated thrice. Finally, the packed erythrocytes were reconstituted in an isotonic phosphate-buffered saline solution (PBS; 0.8% saline buffered with 10 mM sodium phosphate, pH 7.2–7.4, EuroClone (Italy) at the same volumetric ratio of 1:4.

2.3 Ektacytometry measurements

Ektacytometry, also recognized as laser diffraction ektacytometry, is a non-invasive and highly sensitive technique for assessing erythrocyte deformability. This method employs

laser light scattering patterns generated by erythrocytes under controlled SS, enabling a quantitative evaluation of deformability through diffraction image Fig. 1a, b. Erythrocytes were isolated as described above (Material and Methods Sect. 2.2.), and then suspension of 6 μL of packed erythrocytes in 600 μL of polyvinylpyrrolidone (PVP) were prepared, and deformability measurements were performed by utilizing the RheoSCAN-AnD300 ektacytometer (RheoMeditech, Korea). Specifically, 500 μL of this PVP-packed erythrocyte solution was introduced into the microchannel cuvette and placed in the ektacytometer. The microchannel width was set at 200 μm . For any specific pressure, a diffraction image was recorded Fig. 1a and b. The acquisition time for the one diffraction image was 1s. From every image (recorded on specific pressure) EI was calculated (Eq. 1). One measurement on different pressures requires 100 diffraction images for effective deformability curve construction. After 90 images (recorded per one measurement), EI values do not change too much with pressure and converge to some value, and because of that, 100 diffraction images were used per one measurement. Deformability curve represents mechanical characteristics of erythrocytes through change deformation in different externally applied SS. They are fitted using Hill function family curve (Baskurt et al. 2009). For the EI estimation from the raw data Lineweaver – Burk Plot can be used (Baskurt et al. 2009), which represents double linear form of Hill function which is based on. However, the double reciprocal plot distorts the error structure of the data fit and, therefore, is not the most accurate tool for representing kinetics (Greco et al. 1979) or any other processes, From the fitted deformability curves all parameters such as: SS at one half maximal value of deformability curve ($\frac{1}{2}$ SS), value of EI at one half maximum of deformability curve ($\frac{1}{2}$ EI), value of EI at the pressure of 3 Pa and dEI / dSS also at one half maximal value of deformability curve was determined. The definition of EI is given in Eq. 1. (Shin et al. 2005a). EI is calculated from the diffraction images at the specific SS. dEI / dSS at the specific SS is calculated using the finite difference method; this calculation is performed on the fitted deformability curves. The individual values of determined hemorheological parameters for all examined DM patients and controls are given in Table S1 (Supplementary material).

$$EI = \frac{a - b}{a + b} \quad (1)$$

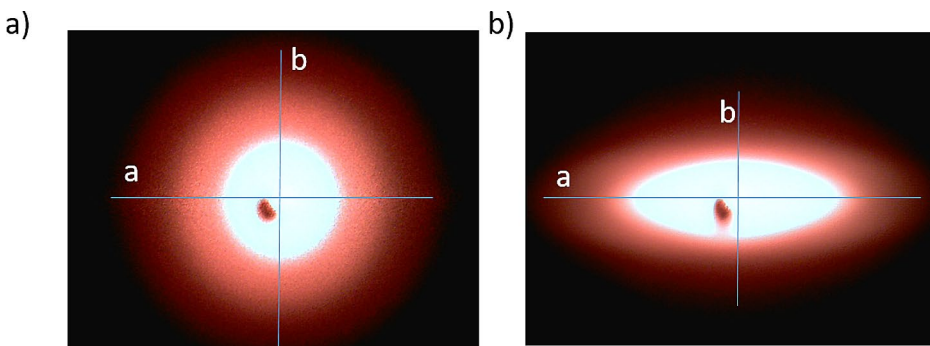


Fig. 1 Diffraction images of erythrocyte population recorded on the ektacytometer RheoScan-D300, (a) without SS, undeformed erythrocyte, (b) maximal shear stress (18 Pa), maximally deformed erythrocytes. “a” and “b” represents deformation axis. More specifically, deformation axis are lengths of diffraction pattern recorded on ektacytometer camera, represented as pixel number

2.4 Statistical analysis

Statistical analysis of the results was done using R Software for statistical computing (R version 4.3.2). The results are expressed as mean±standard deviation. The normality of distribution was determined with the Shapiro–Wilk test. The statistical significance of differences between the groups was determined with a two-tailed t-test or a two-tailed t-test or the Mann–Whitney U test, depending on the distribution's normality. Differences with p values of <0.05 were considered significant. For correlation analysis, correlated variables that have $p < 0.05$ were only considered in further analysis and discussion. The association between two parameters was determined, depending on the normality of their distributions, by Pearson product-moment correlation or Spearman rank-order correlation test. Descriptive statistics is given as Table S2 in the Supplementary material.

3 Results and discussion

Impaired deformability, as a typical hemorheological index has been associated with several pathological conditions, including certain hematological disorders, malaria, cardiovascular diseases, and metabolic disorders, such as highly prevalent DM (Huisjes et al. 2020, Di Giacinto et al. 2020). Glucose is a main substrate for energetic metabolism of erythrocytes, and it is well known that in the presence of long-lasting hyperglycemia in DM, the morphology, metabolism, and function of erythrocytes are inevitably subject to a series of changes that further affect hemorheology and microcirculation (Zhou et al. 2018; Sprague et al. 2006). Nevertheless, DM still represents an example of “covertly abnormal” blood rheology (Schmid-Schönbein, 1987, Brun et al. 2022) since it cannot be always determined by commercially available point-of-care (POC) devices within clinical environment. Ektacytometry, a laser diffraction technique, is the primary method for evaluating the deformability of erythrocytes in both research and clinical settings (Piety et al. 2021), based on the calculated EI from the diffraction images recorded on different shear stresses. However, since ektacytometry measures average deformability in bulk erythrocyte populations and does not provide information on the deformability of single cell, the reports on deformability in DM patients are still contradictory, i.e., the EI in DM have still not been validated as a clinical utile rheological biomarker, while the prognostic importance of EI for complications predictions in the case of sickle cell disease has been confirmed (Franck et al. 2022). Motivated by the previously mentioned, we aimed to represent erythrocyte deformability measurement by extracting a new hemorheological parameter and its fluctuations in DM patients.

The obtained deformability curves, presented in Fig. 2a, illustrate the comparative analysis of erythrocytes between control samples (blue curve) and DM samples (red curve). While control exhibits slightly elevated EI values compared to DM, no statistically significant differences in EI values are found between the two groups. The inherent variability among healthy donors and DM patients probably contributes to subtle distinctions in deformability that are challenging to quantify. Furthermore, our analysis indicates a lack of statistical differences in EI values at the half maximum of deformation curve and at 3 Pa between these two conditions, as illustrated in Fig. 2b.

Considering this, our focus shifts towards discerning specific physiologically relevant points along the deformability curve, such as EI at the half maximum value and EI values

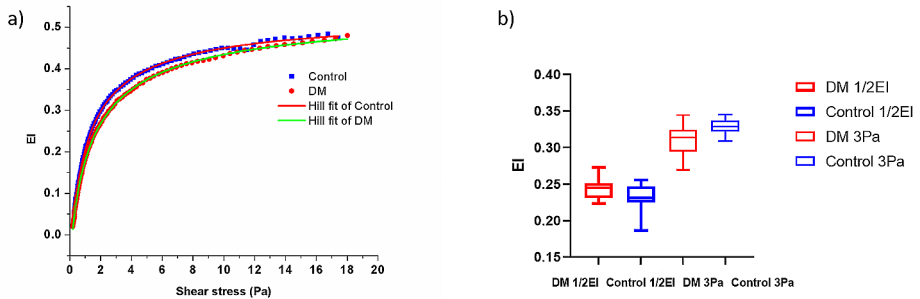


Fig. 2 (a) Deformability curve of healthy volunteer (blue curve) and DM patient (red curve). Raw data are fitted using Hill function, where $EI = x^n / (\frac{1}{2} SS^n + x^n)$, x represent Shear stress (Pa), $\frac{1}{2} SS$ represent value of SS at half maximum of the curve, n is Hill coefficient, in control sample parameters are: $\frac{1}{2} SS = 1.53$, $n = 0.86$ and in DM patients: $\frac{1}{2} SS = 1.32$, $n = 0.93$. (b) EI measured on 3 Pa and on the EI half maximum value on control (number of individuals = 11) and DM patients (number of individuals = 12)

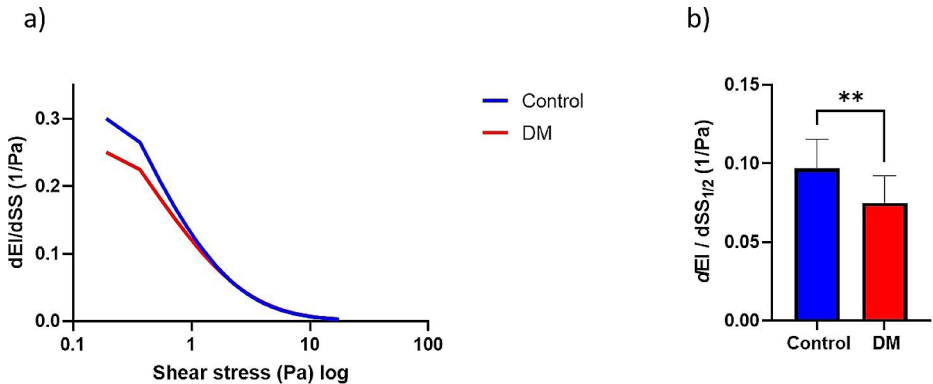


Fig. 3 (a) Derivation of deformability curves from Fig. 2a), blue (Control), red (DM patients) abscissa is presented on log scale for better observation of differences in dEI / dSS ; (b) Change in dEI / dSS at the half maximum value of the derivation curve between erythrocytes of healthy donors (control) and DM patients

at 3 Pa. The calculation of the first derivative at these points is established as a metric for assessing EI alterations.

The derivative curves in Fig. 3 reveal that dEI / dSS emerges as a suitable metric for quantifying erythrocyte deformation, particularly in assessing erythrocyte responsiveness to shear stress, compared to regular EI.

Our investigation has revealed statistically significant differences in the values of dEI / dSS at the half maximum deformability curve between the healthy donor group and individuals diagnosed with DM (depicted in Fig. 3b, where the blue bar corresponds to the control sample and the red bar represents the DM sample).

Here we indicate a non-clearly observable disparity in erythrocyte response to stress between DM patients and the control group, where DM erythrocytes exhibited a comparatively slower response. This insight underscores the potential clinical relevance of dEI / dSS

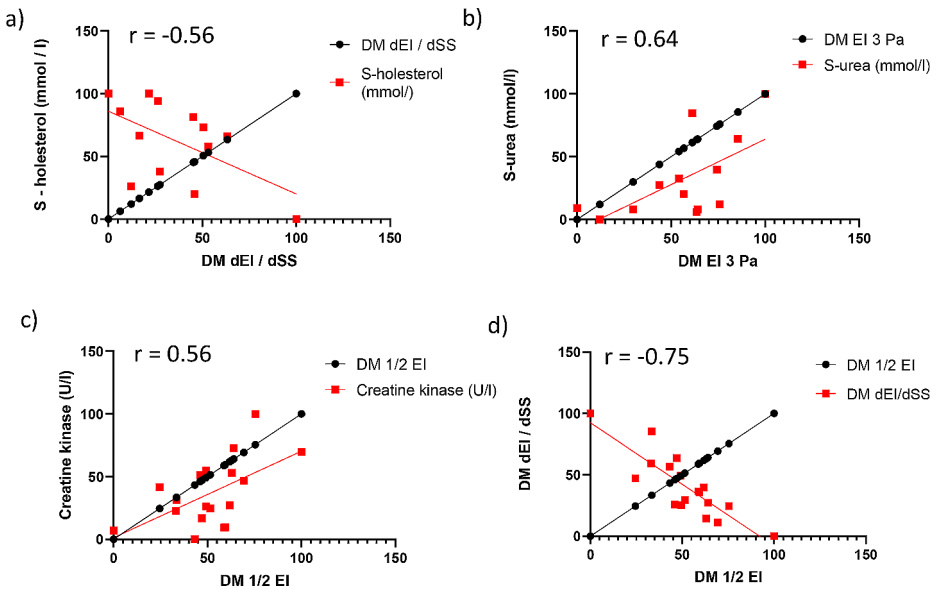


Fig. 4 Multiple correlation analysis of hemorheological parameter with clinical data of DM patients. r – Pearson coefficient. (a) Correlation plot of DM dEI / dSS and S – cholesterol ($p < 0.05$), (b) correlation plot of DM EI 3 Pa and S – urea ($p < 0.05$), (c) correlation plot of DM $\frac{1}{2}$ EI and creatine kinase ($p < 0.05$), (d) correlation plot of DM $\frac{1}{2}$ EI and DM dEI / dSS ($p < 0.05$)

as a valuable metric in characterizing erythrocyte deformability and provides better understanding on the altered physiological dynamics in DM patients. For better characterization of erythrocyte mechanical properties between control and DM patients, we separated DM group to Diabetes mellitus type1 (DMT1) and Diabetes mellitus type 2 (DMT2) patients. We observe significant difference on EI 3 Pa between DMT1 group and control (Supplement material Fig S1a). We didn't observe any differences between the patients' groups and control in $\frac{1}{2}$ EI parameter (Supplement material Fig S1b). However, we have shown that dEI / dSS is more sensitive hemorheological parameter than EI 3 Pa, by observing differences between DMT1 group and control with stronger statistical significance (Supplement material Fig S1c), although we are aware of small group size at the moment.

The connection between the mechanical properties of red blood cells and various physiological processes can provide valuable insights. For instance, when examining parameters EI 3 Pa, $\frac{1}{2}$ EI, and the rate dEI / dSS in relation to clinical factors as depicted in Fig. 4, we gain a deeper understanding of their interplay.

An interesting observation emerged when comparing dEI / dSS with serum cholesterol levels, indicating a statistically significant correlation ($p < 0.05$), as shown in Fig. 4a. This finding aligns with existing literature, which suggests that higher cholesterol levels lead to increased rigidity of cell membranes (Subczynski et al. 2017; Chen et al. 1997). Conversely, while no significant correlation was found between EI 3 Pa and cholesterol, a direct relationship was noted between EI 3 Pa and serum urea levels (Fig. 4b). Urea plays a role in maintaining the osmotic stability of erythrocytes (Macey 1984), hence the correlation with EI 3 Pa.

Additionally, the parameter $\frac{1}{2}$ EI exhibited a positive correlation with creatine kinase enzyme levels (Fig. 4c). Studies suggest that both liver and blood cells are involved in clearing creatine kinase from circulation (Pan et al. 2023). Moreover, previous research has highlighted a strong correlation between serum creatine levels and erythrocyte deformability in patients with diabetic nephropathy (Brown et al. 2005).

Considering diabetic nephropathy, it was anticipated that the dEI / dSS in diabetic patients would inversely correlate with half-maximal deformation force ($\frac{1}{2}$ EI), as depicted in Fig. 4d.

To understand the relationship between dEI / dSS and the $\frac{1}{2}$ SS, we employed a scatter plot analysis as shown in Fig. 5. Both experimental groups exhibit a linear declining trend, indicating a decrement in dEI / dSS with an increment in $\frac{1}{2}$ SS. This observation underscores a mechanical phenomenon wherein erythrocyte responsiveness to mechanical stress diminishes with higher shear stress values and conversely increases with lower shear stress values.

Specifically, the erythrocytes from DM individuals manifest a more pronounced and rapid alteration in dEI / dSS (depicted by the red line in Fig. 5 with a slope of -0.03) compared to those in the control group (represented by the blue line in Fig. 5 with a slope of -0.015). This discrepancy suggests that erythrocytes from DM patients exhibit a constrained range of membrane deformation control, indicative of an altered mechanical response to shear stress.

However, it is important to acknowledge that at lower shear stress values, the fluctuation of EI in both groups is subject to random variations in EI. This is attributed to the absence of established laminar flow of erythrocytes in the microchannel under such conditions (Shin et al. 2005b; McNamee et al. 2020). The results shown in the Fig. 5 elucidate the differential mechanical behavior of erythrocytes in response to varying shear stress levels, contributing to an understanding of underlying biophysical mechanism of erythrocyte deformability in the context of DM pathology. Diffraction signal intensity of the erythrocyte population

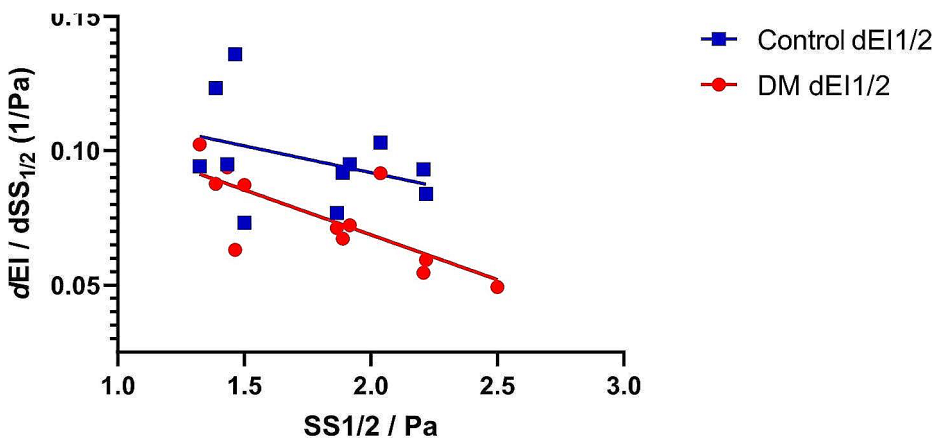


Fig. 5 Linear regression model of dEI / dSS at the half-maximal value of the deformability curve change in relation to $\frac{1}{2}$ SS, control represented as blue line (R Squared=0.129) and DM represented as the red line (R Squared=0.568). Data was presented for each individual patient (DM) and healthy volunteer (Control)

also depends on hemoglobin and glucose concentration (Streekstra et al. 1994) which can be determined by standard biochemical, but also different optical techniques (Biswas et al. 2020; Cherkasova et al. 2016). Thus, our future studies will still include the correlation of dEI / dSS with the clinic-demographic data such age, sex, level of HbA1c, DM type, therapy, BMI, and other clinically established biomarkers of the disease in large-scale studies, since we identified small sample size in each group as a limitation of the present work.

Ektacytometry is a widely used method to measure the deformability of erythrocytes, but it only provides an average measure and doesn't account for variations in individual cells. This is where optical tweezers and microfluidic devices can find applications since recent studies have shown that these methods are more sensitive in assessing the progressive impairment of erythrocyte deformability than ektacytometry (Kim et al. 2015; Piety et al. 2021; Kang et al. 2022). The presence of rigid erythrocytes in blood flow can have a significant impact on the immune response as well. A recent study has found that the adhesion of leukocytes to the vascular wall gets disrupted by the presence of rigid erythrocytes (Gutierrez et al. 2018). This is where monitoring erythrocytes with impaired deformability on an individual level becomes crucial. Motivated by the findings of this study, our future research will include some other optics-based techniques, such as flow-cytometry, in combination with ektacytometry to better distinguish between populations of healthy and rigid erythrocytes from patients with DM, as one of the most frequent modern-age diseases.

There is paramount interest in finding the new metric as a potential prognostic marker for the prevalent clinical complications in DM patients, and our upcoming experiments will include the validation of the clinical utility of dEI / dSS in DM patients with specific micro- and macrovascular complications as well.

4 Conclusion

The dEI / dSS at the half maximum value of the deformability curve emerges as a particular metric for quantifying erythrocyte deformation response.

The statistically significant differences ($p < 0.05$) observed in dEI / dSS at the half maximum of deformability curve between the control group and DM patients underscore the potential clinical relevance of this parameter. Moreover, no statistical differences were found in EI values at the half maximum value of deformability curve and at 3 Pa between the two conditions, highlighting the specificity of dEI / dSS in capturing alterations associated with DM pathology.

The scatter plot analysis further reveals a certain linear declining trend in both groups, indicating a decrement in dEI / dSS with an increment in shear stress. Importantly, erythrocytes from DM individuals exhibit a more pronounced and rapid alterations in dEI / dSS compared to the control group, suggesting a constrained range of membrane deformation control, and altered mechanical response to shear stress in DM patients. By exploration of the mechanical properties of red blood cells in conjunction with various physiological parameters we have uncovered significant associations between dEI / dSS and serum cholesterol levels ($p < 0.05$). This finding supports existing literature indicating that elevated cholesterol levels contribute to increased rigidity of cell membranes. Conversely, although no direct correlation was found between EI 3 Pa and cholesterol, a clear relationship emerged between EI 3 Pa and serum urea levels, with urea playing a crucial role in main-

taining erythrocyte osmotic stability. Furthermore, the positive correlation between $\frac{1}{2}$ EI and creatine kinase enzyme levels highlights the involvement of both liver and blood cells in the clearance of creatine kinase from circulation, having particular importance in patients with diabetic nephropathy. Considering diabetic nephropathy, our anticipation of an inverse correlation between dEI / dSS and $\frac{1}{2}$ EI was confirmed, indicating potential implications for understanding the mechanical characteristics of erythrocytes in diabetic patients. Future work is needed to provide better understanding of dEI / dSS in prediabetic stage or in complication caused by DM. Moreover, oxidative stress of erythrocytes and its correlation with dEI / dSS should be the topic for future studies.

Overall, our findings support the notion that dEI / dSS should be considered as a potent biophysical parameter with the perspective of long-term clinical applications, offering valuable insights into the altered mechanical behavior of erythrocytes in individuals with DM and their future management. However, we need to emphasize that application of dEI / dSS in clinical practice needs large scale studies providing more deformability data to be processed and analyzed.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11082-024-06973-9>.

Author contributions M. R. (Mihajlo Radmilović): Writing – original draft, Data curation, Formal analysis, V. I.: Investigation, Visualization, Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing, D.T.: Data curation, Formal analysis, M. R. (Mihailo Rabasović): Writing – review & editing, A. P.: Resources, K. L.: Resources, A. K.: Writing – review & editing, Supervision, Project administration, I. D.: Investigation, Conceptualization, Validation, Writing – review & editing, Project administration.

Funding This work was supported by the Science Fund of the Republic of Serbia [program PROMIS, project HEMMAGINERO, grant number 6066079]. The authors acknowledge funding provided by the Institute of Physics Belgrade, through the grant by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia and the Institute for Medical Research University of Belgrade, National Institute of the Republic of Serbia, through the contract No. 451-03-66/2024-03/200015. The authors acknowledge funding provided also by the Project Advanced Biophysical Methods for Soil Targeted Fungi-Based Biocontrol Agents -BioPhysFUN [Grant number 4545] from the Program DEVELOPMENT – Green program of cooperation between science and industry, Science Fund of the Republic of Serbia.

Data availability The data that support the findings of this study are not openly available, but will be available from the corresponding author upon reasonable request.

Code availability Not applicable.

Declarations

Ethics approval Before sample collection for this study, the patients signed an informed consent as an obligatory procedure within obtained ethical approval No 1332/VII-5 from 7th July 2020 issued by the Faculty of Medicine at University of Belgrade.

Consent to participate Not applicable for this study.

Consent for publication All authors of the manuscript agree to its submission and publication.

Competing interests The authors declare no competing interests.

References

- Babu, N.: Hemorheological study on erythrocyte aggregation in patients with type 2 diabetes mellitus without cholesterol and with hypercholesterol. *Thromb. Updat.* **5**, 100085 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.tru.2021.100085>
- Baskurt, O.K., Meiselman, H.J.: Analyzing shear stress–elongation index curves: Comparison of two approaches to simplify data presentation. *Clin. Hemorheol Microcirc.* **31**, 23–30 (2004). PMID: 15272150
- Baskurt, O.K., Hardeman, M.A.X.R., Uyuklu, M., Ulker, P., Cengiz, M., Nemeth, N., Shin, S., Alexy, T., Meiselman, H.J.: Parameterization of red blood cell elongation index – shear stress curves obtained by ektacytometry. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **69**, 777–788 (2009). <https://doi.org/10.3109/00365510903266069>
- Biswas, U., Kumar, J.: Detection and analysis of hemoglobin concentration in blood with the help of photonic crystal based micro ring resonator structure. *Opt. Quantum Electron.* 1–16 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11082-020-02566-4>
- Bronkhorst, P.J., Nijhof, E.J., Sixma, J.J.: Parametrization of the deformation curve as a tool for standardization and interpretation of ektacytometric measurements. *Clin. Hemorheol Microcirc.* **15**, 803–816 (1995). <https://doi.org/10.3233/CH-1995-15602>
- Brown, C.D., Ghali, H.S., Zhao, Z., Thomas, L.L., Friedman, E.A.: Association of reduced red blood cell deformability and diabetic nephropathy. *Kidney Int.* **67**, 295–300 (2005). <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00082.x>
- Brun, J.-F., Varlet-Marie, E., Myzia, J., de Mauverger, E.R., Pretorius, E.: Metabolic influences modulating erythrocyte deformability eryptosis metabolites. **12**, 4 (2022). <https://doi.org/10.3390/metabo12010004>
- Chen, Z., Rand, R.P.: The influence of cholesterol on phospholipid membrane curvature and bending elasticity. *Biophys. J.* **73**, 267–276 (1997)
- Cherkasova, O., Nazarov, M., Shkurinov, A.: Noninvasive blood glucose monitoring in the terahertz frequency range. *Opt. Quantum Electron.* **1–12** (2016). <https://doi.org/10.1007/s11082-016-0490-5>
- Cho, M., Shin, S., Moon, H., Chung, H.: Effect of clinical and RBC hemorheological parameters on myocardial perfusion in patients with type 2 diabetes mellitus. *Biorheology.* **51**, 215–226 (2014). <https://doi.org/10.3233/BIR-140659>
- Chung, S.M., Oh, J.H., Moon, J.S., Kim, Y.K., Yoon, J.S.: Critical shear stress is associated with diabetic kidney disease in patients with type 2 diabetes. *Sci. Rep.* 1–7 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19274-5>
- Ercan, M., Konukoğlu, D., Erdem, T., Önen, S.: The effects of cholesterol levels on hemorheological parameters in diabetic patients. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 26 257–263 PMID: 12122231 (2002)
- Franck, P., Buijs, P., Meenhuis, A., Dane, M., Postma, C., Spaans, A., Gijsbertha, N., Kuypers, F.A., Hudig, C., Kerkhoffs, J.L.: The ektacytometric elongation Index (EI) of erythrocytes, validation of a prognostic, rheological biomarker for patients with sickle cell disease. *Eur. J. Haematol.* 1–10 (2022). <https://doi.org/10.1111/ejh.13748>
- Di Giacinto, F., Tartaglione, L., Nardini, M., Mazzini, A., Romano, S., Rizzo, G.E., Papi, M., Spirito, M., Pitocco, D., Ciasca, D.: Searching for the mechanical fingerprint of pre-diabetes in T1DM: A case report study. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 569978 (2020). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.569978>
- Greco, W.R., Hakala, M.T.: Evaluation of methods for estimating the dissociation constant of tight binding enzyme inhibitors. *J. Biol. Chem.* **254**, 12104–12109 (1979). [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)86435-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)86435-9)
- Gutierrez, M., Fish, M.B., Golinski, A.W., Eniola-Adefeso, O.: Presence of rigid red blood cells in blood flow interferes with the vascular wall adhesion of leukocytes. *Langmuir.* **34**(6), 2363–2372 (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b03890>
- Huisjes, R., Makhro, A., Llaudet-planas, E., Hertz, L., Verhagen, L.P., Pignatelli, S., Rab, M.A.E., Schiffelers, R.M., Seiler, E., Solinge, W.W., Van, Corrons, V., Kaestner, L., Mañú-pereira, M., Bogdanov, A., Wijk, R.: Van.: Red cells as markers of clinical severity in hereditary spherocytosis. *Haematologica.* **105**, 338–347 (2020). <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.188151>
- Jensen, T., Feldt-Rasmussen, B.O., Bjerre-Knudsen, J., Deckert, T.: Features of endothelial dysfunction in early diabetic nephropathy. *Lancet.* **75**, 461–463 (1987). [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)91365-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)91365-2)
- Kang, Y.J., Serhrouchni, S., Makhro, A., Bogdanova, A., Lee, S.S.: Simple assessment of red blood cell deformability using blood pressure in capillary channels for effective detection of subpopulations in red blood cells. *ACS Omega.* **7**(43), 38576–38588 (2022). <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04027>
- Kim, J., Lee, H., Shin, S.: Advances in the measurement of red blood cell deformability: A brief review. *J. Cell. Biotechnol.* **1**, 63–79 (2015). <https://doi.org/10.3233/JCB-15007>

- Kobayashi, J., Ohtake, K., Murata, I., Sonoda, K.: Nitric oxide nitric oxide bioavailability for red blood cell deformability in the microcirculation: A review of recent progress. *Nitric Oxide*. **129**, 25–29 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.niox.2022.09.004>
- Lee, S., Lee, M.Y., Nam, J.S., Kang, S., Park, J.S., Shin, S., Ahn, C.W., Kim, K.R.: Hemorheological approach for early detection of chronic kidney disease and diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* **17**, 1–8 (2015). <https://doi.org/10.1089/dia.2014.0295>
- Macey, R.I.: Transport of water and urea in red blood cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **246**, C195–C203 (1984). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.246.3.C195>
- Maeda, N.: Erythrocyte rheology in microcirculation. *Jpn J. Physiol.* **46**, 1–14 (1996). <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.46.1>
- Malandrino, N., Wu, W.C., Taveira, T.H.: Association between red blood cell distribution width and macrovascular and microvascular complications in diabetes. *Diabetologia*. 226–235 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2331-1>
- Mawatari, S., Saito, K., Murakami, K., Fujino, T.: Absence of correlation between glycated hemoglobin and Lipid Composition of Erythrocyte Membrane in type 2 Diabetic patients. *Front. Physiol.* 123–127 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2003.07.016>
- McNamee, A.P., Fitzpatrick, T., Tansley, G.D., Simmonds, M.J.: Sublethal supraphysiological shear stress alters erythrocyte dynamics in subsequent low-shear flows. *Biophys. J.* **119**, 2179–2189 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.10.022>
- Mokken, F.C., Kedaria, M., Henny, C.P., Hardeman, M.R., Gelb, A.W.: The clinical importance of erythrocyte deformability, a hemorrheological parameter. *Ann. Hematol.* **64**, 113–122 (1992). <https://doi.org/10.1007/BF01697397>
- Musielak, M.: Red blood cell-deformability measurement: Review of techniques. *Clin. Hemorheol Microcirc.* **42**, 47–64 (2009). <https://doi.org/10.3233/CH-2009-1187>
- Ogurtsova, K., da Rocha Fernandes, J.D., Huang, Y., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, N.H., Cavan, D., Shaw, J.E., Makaroff, L.E.: IDF diabetes atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **128**, 40–50 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.03.024>
- Pan, N., Wu, Y., Yang, B., Zhang, M., He, Y., Wang, Z., Zhang, L.: The liver and blood cells are responsible for creatine kinase clearance in blood circulation: A retrospective study among different human diseases. *Clin. Chim. Acta.* **544**, 117335 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117335>
- Piety, N.Z., Stutz, J., Yilmaz, N., Xia, H., Yoshida, T.: Microfluidic capillary networks are more sensitive than ektacytometry to the decline of red blood cell deformability induced by storage. *Sci. Rep.* 1–11 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79710-3>
- Pretorius, E.: Erythrocyte deformability and eryptosis during inflammation, and impaired blood rheology. *Clin. Hemorheol Microcirc.* **69**, 545–550 (2018). <https://doi.org/10.3233/CH-189205>
- Rabi, D.M., Edwards, A.L., Southern, D.A., Sargious, P.M., Norton P., Larsen, E.T., Ghali, W.A.: Association of socio-economic status with diabetes prevalence and utilization of diabetes care services. *BMC Health Serv. Res.* **124** (2006). <https://doi.org/10.1186/1472-6963-6-124>
- Schmid-Schönbein, Teitel, P.: In vitro assessment of covertly abnormal blood rheology: Critical appraisal of presently available microrheological methodology. A review focusing on diabetic retinopathy as a possible consequence of rheological occlusion. *Clin. Hemorheol Microcirc.* **7**, 203–238 (1987). <https://doi.org/10.3233/CH-1987-7206>
- Schut, N.H., Arkel, E.C., Van, Hardeman, M.R., Bilo, H.J.G., Michels, R.P.J., Vreeken, J.: No decreased erythrocyte deformability in type 1 (insulin-dependent) diabetes, either by filtration or by ektacytometry. *Acta Diabetol.* 89–92 (1993). <https://doi.org/10.1007/BF00578220>
- Shaw, J.E., Sicree, R.A., Zimmet, P.Z.: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **87**, 4–14 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2009.10.007>
- Shin, S., Ku, Y., Park, M.S., Suh, J.S.: Deformability of red blood cells: A determinant of blood viscosity. *J. Mech. Sci. Technol.* **19**, 216–223 (2005a). <https://doi.org/10.1007/BF02916121>
- Shin, S., Ku, Y., Park, M.S., Suh, J.S.: Slit-flow ektacytometry: Laser diffraction in a slit rheometer. *Cytometry*. **65B**, 6–13 (2005b). <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20048>
- Shin, S., Ku, Y., Babu, N., Singh, M.: Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus. *Indian J. Exp. Biol.* **45**, 121–128 PMID: 17249336 (2007)
- Sokolova, I.A., Kachalova, A.V., Fabrichnova, A.A., Kovaleva, Y.A., Shahnazarov, A.A., Koshelev, V.B.: Hemorheological properties in patients with type-1 and type-2 diabetes mellitus. *J. Biomed. Photonics Eng.* **51**, 457–459 (2017). <https://doi.org/10.18287/JBPE17.03.030402>
- Sprague, R.S., Stephenson, A.H., Bowles, E.A., Stumpf, M.S., Lonigro, A.J.: Reduced expression of G(i) in erythrocytes of humans with type 2 diabetes is associated with impairment of both cAMP generation and ATP release. *Diabetes*. **55**, 3588–3593 (2006). <https://doi.org/10.2337/db06-0555>

- Streekstra, G.J., Hoekstra, A.G., Heethaar, R.M.: Anomalous diffraction by arbitrarily oriented ellipsoids: Applications in ektactometry. *Appl. Opt.* **33**, 7288–72896 (1994). <https://doi.org/10.1364/AO.33.007288>
- Subczynski, W.K., Mainali, L., Raguz, M., O'Brien, W.J.: Organization of lipids in fiber-cell plasma membranes of the eye lens. *Exp. Eye Res.* **156**, 79–86 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.03.004>
- Wang, Y., Yang, P., Yan, Z., Liu, Z., Ma, Q., Zhang, Z., Su, Y.: The relationship between erythrocytes and diabetes mellitus. *J. Diabetes Res. ID.* **6656062** (2021). <https://doi.org/10.1155/2021/6656062>
- Zhou, Z., Mahdi, A., Tratsiakovich, Y., Zahorán, S., Kövamees, O., Nordin, F., Uribe Gonzalez, A.E., Alvarsson, M., Östenson, C.G., Andersson, D.C., Hedin, U., Hermes, E., Lundberg, J.O., Yang, J., Pernow, J.: Erythrocytes from patients with type 2 diabetes induce endothelial dysfunction via arginase I. *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**, 769–780 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.05.052>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Authors and Affiliations

Mihajlo D. Radmilović¹ · Vesna Lj. Ilić² · Drenka Trivanović² · Ana Petakov³ · Katarina Lalić^{3,4} · Mihailo D. Rabasović¹ · Aleksandar J. Krmpot¹ · Ivana T. Drvenica²

✉ Ivana T. Drvenica
ivana.drvenica@imi.bg.ac.rs

Mihajlo D. Radmilović
mihajlor@ipb.ac.rs

Vesna Lj. Ilić
vesnai@imi.bg.ac.rs

Drenka Trivanović
drenka.trivanovic@imi.bg.ac.rs

Ana Petakov
anapetakov@gmail.com

Katarina Lalić
katarina.s.lalic@gmail.com

Mihailo D. Rabasović
rabasovic@ipb.ac.rs

Aleksandar J. Krmpot
krmpot@ipb.ac.rs

¹ Institute of Physics Belgrade, University of Belgrade, Pregrevica 18, Belgrade, Serbia

² Institute for Medical Research, National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade, Dr. Subotića 4, Belgrade, Serbia

³ Clinic for Endocrinology, Diabetes and Metabolic Diseases, University Clinical Center of Serbia, Dr. Subotića 13, Belgrade 11000, Serbia

⁴ Faculty of Medicine, University of Belgrade, Dr. Subotića 8, Belgrade 11000, Serbia

ARTICLE OPEN



Naltrexone blocks alcohol-induced effects on kappa-opioid receptors in the plasma membrane

Sho Oasa¹, Erdinc Sezgin², Yuelong Ma³, David A. Horne⁴, Mihajlo D. Radmilović⁵, Tijana Jovanović-Talisman⁴, Rémi Martin-Fardon⁶, Vladana Vukojević^{1,7}✉ and Lars Terenius^{1,7}✉

© The Author(s) 2024

Naltrexone (NTX), a homolog of the opiate antidote naloxone, is an orally active long-acting general opioid receptor antagonist used in the treatment of opiate dependence. NTX is also found to relieve craving for alcohol and is one of few FDA-approved medications for treatment of alcohol use disorder (AUD). While it was early on established that NTX acts by blocking the binding of endogenous opioid peptide ligands released by alcohol, experimental evidence emerged that could not be fully accounted for by this explanation alone, suggesting that NTX may have additional modes of action. Mu- and kappa-opioid receptors (MOP and KOP, respectively) are structurally related G-protein-coupled receptors (GPCRs), but they are anatomically differently distributed and functionally distinct, often mediating opposite responses, with MOP typically promoting euphoria and reward, while KOP is associated with dysphoria and aversive states. While the actions of NTX on MOP are extensively characterized, the interactions with KOP are not. Here, we used sensitive fluorescence-based methods with single-molecule sensitivity to study in live cells the influence of alcohol (ethanol, EtOH) on KOP and the interaction between KOP and NTX. Our data show that alcohol, at relevant concentrations (10–40 mM), alters KOP interactions with the lipid environment in the plasma membrane. The counteracting effects of NTX are exerted by both its canonical action on KOP and its hitherto unrevealed effects on the lateral dynamics and organization of lipids in the plasma membrane. The KOP-specific antagonist LY2444296, in clinical trial for major depressive disorder (MDD), blocks KOP but does not show the full action profile of NTX. The therapeutic effect of NTX treatment in AUD may in part be due to direct actions on KOP and in part due to its effect on the surrounding lipid environment.

Translational Psychiatry (2024)14:477; <https://doi.org/10.1038/s41398-024-03172-8>

INTRODUCTION

Social drinking, i.e. moderate consumption of alcohol (ethanol (EtOH)) gives a sensation of elatedness and relaxation. This is very different from the drive to binge drinking, to get intoxicated. While the euphoric effects of alcohol, primarily mediated through the mu-opioid receptor (MOP), have been well studied, much less is known about the effects mediated by the kappa-opioid receptor (KOP) that contribute to alcohol abuse. We have decided to assess at the cellular and molecular level actions of alcohol on KOP and its interactions with naltrexone (NTX), which is approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of alcohol use disorder (AUD). Recently, NTX has been advocated for the treatment of alcohol misuse as “one of the most underutilized interventions in medicine” [1].

Early experimental studies reporting the potential therapeutic effects of NTX in alcohol dependence [2, 3] were followed by clinical studies in human subjects showing that NTX reduces the feeling of “high” induced by alcohol in alcohol-dependent individuals [4]. NTX was early-on shown to counteract alcohol-induced release of endogenous opioids (enkephalins and

β -endorphin) acting on MOP [5, 6]. However, the response was not universal and it has been suggested that differences in response may be genetically determined. The potential therapeutic effects of NTX for the treatment of AUD eventually led to an FDA approval for this indication, which is significant since very few medications for this condition are available.

It is commonly assumed that AUD is a consequence of the euphoriant activity of alcohol (positive reinforcement) and of craving, the urge to resume consumption in abstinence (negative reinforcement). Positive reinforcement is mainly exerted via MOP-mediated pathways, whereas negative reinforcement is mainly exerted via KOP-mediated pathways [7]. Classic binding analysis has shown that NTX primarily binds to MOP and has lower affinity for KOP. This has been an opening for the clinical use of compounds with overlapping affinities for MOP and KOP, such as pentazocine or buprenorphine. Our previous studies have shown that NTX has a significant influence on ethanol-induced effects on KOP lateral organization in the plasma membrane [8]. Using sensitive fluorescence microscopy imaging and correlation spectroscopy technologies, we have observed that ethanol in

¹Department of Clinical Neuroscience, Center for Molecular Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm SE-17176, Sweden. ²Science for Life Laboratory, Department of Women's and Children's Health, Karolinska Institutet, Stockholm SE-17165, Sweden. ³Synthetic Biopolymer Chemistry Core, Beckman Research Institute; City of Hope, 1500 East Duarte Road, Duarte, CA 91010, USA. ⁴Department of Cancer Biology and Molecular Medicine, Beckman Research Institute, City of Hope, 1500 East Duarte Road, Duarte, CA 91010, USA. ⁵Institute of Physics Belgrade, University of Belgrade, Pregrevica 118, Belgrade 11080, Serbia. ⁶Department of Molecular Medicine, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037, USA. ⁷These authors contributed equally: Vladana Vukojević, Lars Terenius. ✉email: vladana.vukojevic@ki.se; Lars.Terenius@ki.se

Received: 21 June 2023 Revised: 22 October 2024 Accepted: 28 October 2024

Published online: 24 November 2024

pharmacologically relevant concentrations, 10–40 mM, affects glycosylphosphatidylinositol-enriched membrane domains and MOP- and KOP-harboring nanoscale clusters; and that these effects are largely blocked by NTX [8]. Nanoscale cluster formation is a common feature of plasma membrane receptors that is necessary for their functions [9–11], in particular agonist-activated receptors are shown to be prone to form nanoscale clusters, probably also forming homodimers *via* the modulation of local receptor density [12]. Our previous studies suggest that ethanol modulates the functions of MOP and KOP *via* their cluster formation and dimerization capacity. This may also be an underlying molecular mechanism for the KOP supersensitivity observed in a behavioral/neurochemistry analysis in mice [13].

An asset for drug development is the reported structural characterization of the dynorphin/KOP system. The X-ray structure of KOP with the antagonist JDTC was one of the first in the opioid receptor family [14]. The dynamics of the interaction between dynorphin and KOP were followed using nuclear magnetic resonance (NMR) [15]. Membrane lipids have been seen as catalysts for dynorphin-KOP interactions: ligand accumulation at the plasma membrane by electrostatic attraction and direct ligand-plasma membrane lipid interaction result in lower energy needed for the ligand to bind to the receptor [16]. This is possibly also relevant for NTX-KOP interactions: under normal physiology (pH 7.4), NTX is neutral/protonated (literature findings for the acid dissociation constant of NTX vary, $7.5 \leq pK_{a,NTX} \leq 8.6$), and moderately lipophilic (partition coefficient $\log P = 1.76$ for *n*-octanol/buffer pH 7.4 at 37 °C). Ethanol-induced reduction of the dielectric constant of the surrounding water medium can affect the interplay between electrostatic and lipophilic interactions, thus affecting NTX partitioning into the lipid bilayer and NTX-KOP interactions.

In this work, we used cells genetically modified to express KOP fused with the enhanced green fluorescent protein (KOP-eGFP) and employed fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to quantitatively characterize in live cells EtOH effects on KOP-eGFP in the plasma membrane by measuring eGFP fluorescence lifetime (FL). FL, i.e., the lifetime of a fluorescent molecule in the excited state, is an immanent property of the fluorescent molecule that neither depends on the concentration, nor on the laser intensity used for its excitation, nor on photobleaching of the fluorescent molecule. It is, however, sensitive to changes in the immediate environment, such as changes in temperature [17], pH [18], molecular crowding [19], protein oligomerization [20] /aggregation [21]. Although FLIM is most often integrated with Förster resonance energy transfer (FLIM-FRET) to assess molecular interactions [22, 23] or conformational changes [24], we have used it here to read out changes in the KOP-eGFP immediate environment that are caused by treatment of PC12/KOP-eGFP cells with EtOH or NTX. Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) was used to measure the lateral translational diffusion rate and the cell surface density, i.e., concentration of molecules of interest, such as KOP-eGFP, fluorescently labeled NTX and lipid probes, and read out how they are affected by EtOH and NTX [20, 25, 26]. In addition, FCS also measures molecular brightness, providing information on homodimerization/oligomerization of KOP-eGFP. We have also characterized EtOH effects on NTX-KOP interactions using fluorescently labeled NTX (fNTX; Fig. S1) [27]. Finally, Ca^{2+} imaging was used to characterize the effects of the investigated compounds on KOP-mediated signaling.

MATERIALS AND METHODS

Chemical reagents

Ethanol (EtOH, purity $\geq 99.5\%$) and NTX were purchased from VWR and Tocris, respectively. Methyl- β -cyclodextrin (m β CD) and Nalfurafine (NFF) were purchased from Sigma-Aldrich. Dynorphin A (1–17) peptide (DynaA: YGGFLRRIRPKLKWQDQ; $>99.5\%$ purity) was purchased from BIOMATIK. The

NTX enantiomer (+)-NTX was kindly provided by Dr. Kenner C. Rice [28]. The fluorescent NTX derivative with Alexa Fluor 633 (fNTX) was synthesized as detailed in the Supplementary Information (Fig. S1). The KOP-selective antagonist, LY2444296 was supplied by Eli Lilly, and the KOP-selective antagonist JDTC [29] was purchased from APEXBio. All chemical compounds except for EtOH, DynA and (+)-NTX were suspended in dimethyl-sulfoxide (DMSO). DynA and (+)-NTX aqueous solutions were freshly prepared for each experiment. 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) was conjugated with Abberior Star Red with a polyethylene glycol (PEG) linker (ASR-DOPE) [30]. MemGlow Nail Red 125 (NR125) for lipid fluidity studies was purchased from Cytoskeleton, Inc. All chemicals were *p.a.* grade and were used without further purification, unless specifically described. Ultrapure water, resistivity 18.2 M Ω -cm at 25 °C (Millipore Milli-Q lab water system) was used throughout.

Cell culture

PC12 cells (American Type Culture Collection), PC12/eGFP cells transiently expressing eGFP, and PC12 cells stably expressing human KOP fused with the enhanced green fluorescent protein (PC12/KOP-eGFP) [31] were maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C in RPMI1640 medium (Gibco) supplemented with 10% horse serum (Gibco), 5% fetal bovine serum (Gibco) and 1% penicillin-streptomycin (10,000 U/mL, Gibco). For fluorescence measurements, the cells were seeded in Lab-Tek 8-well chambered coverglass (Thermo Fisher Scientific) with 4.0×10^4 cells/well.

For FLIM/FRAP measurements, PC12/KOP-eGFP cells were pre-treated at 37 °C with the antagonists NTX or (+)-NTX for 30 min, or LY2444296 for 15 min; or the agonists DynA or NFF for 30 min, and then treated with EtOH + antagonists/agonist for 1 h. For treatments with EtOH alone, the cells were pre-treated with vehicle for 30 min, then with EtOH for 1 h.

For cholesterol depletion studies, the cells were treated for 3 h with 2.5 mM m β CD in serum free medium at 37 °C [32]. Antagonists, agonists, m β CD and EtOH were diluted with the FluoroBrite RPMI1640 (Gibco).

For Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) measurements of lipid fluidity or KOP-eGFP dynamics, PC12/KOP-eGFP cells were treated with the antagonists/EtOH or DynA as described above. The cells were further stained with ASR-DOPE for 5 min. To obtain eGFP brightness, PC12/eGFP cells were used. PC12/eGFP cells were generated by transfecting PC12 cells with 100 ng of the plasmid encoding eGFP, peGFP-N1, using 0.2 μ L of lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific). After the transfection, PC12/eGFP cells were cultured for 24 h and then subjected to FCS measurements.

For Ca^{2+} imaging, PC12/KOP-eGFP cells were stained with 10 μ M Fura Red in non-serum FluoroBrite RPMI1640 with 0.1% Pluronic F-127 (Invitrogen) for 3 h. Antagonists, DynA and EtOH were diluted with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline supplemented with 2.2 mM CaCl₂ and 3.5 mM KCl. PC12/KOP-eGFP cells were treated with antagonists/EtOH or DynA/NTX as described above.

For total internal reflection fluorescence microscopy-integrated FCS (TIR-FCS), we specifically used another cell line, the adhered human osteosarcoma cell line, U2OS (ATCC). U2OS cells were maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C in McCoy's 5A modified medium (Gibco) supplemented with 10% FBS. One day before transfection, the U2OS cells were seeded on the 8-well chambered coverglass. U2OS cells on the chambered coverglass were transfected with 100 ng of plasmid DNA encoding human KOP-eGFP in N1 vector (pKOP-eGFP-N1) and ViaFect (Promega). At 24 h after the transfection, the medium was replaced with a phenol-red free medium, Opti-MEM (Gibco), for TIR-FCS experiments.

Microscopic techniques and corresponding data analyses

Detailed description of the instrumentation for FCS, TIR-FCS and FLIM, optical settings, data acquisition and analysis is provided in the Supplementary Information. Briefly, confocal laser scanning microscopy (CLSM) imaging and conventional, single-point FCS measurements were performed using the LSM880 (Carl Zeiss) microscope system. TIR-FCS measurements [33–35] were performed using the Nikon Eclipse TE2000-E inverted microscope with a TIRF unit. FLIM was performed using our home-built scanning-free confocal microscope based on massively parallel fluorescence correlation spectroscopy (mpFCS) [22].

RESULTS

Live PC12/ KOP-eGFP cells are functional

To ascertain that KOP-eGFP is functional, PC12/KOP-eGFP cells were treated with DynA (Fig. S2). CLSM imaging showed that in

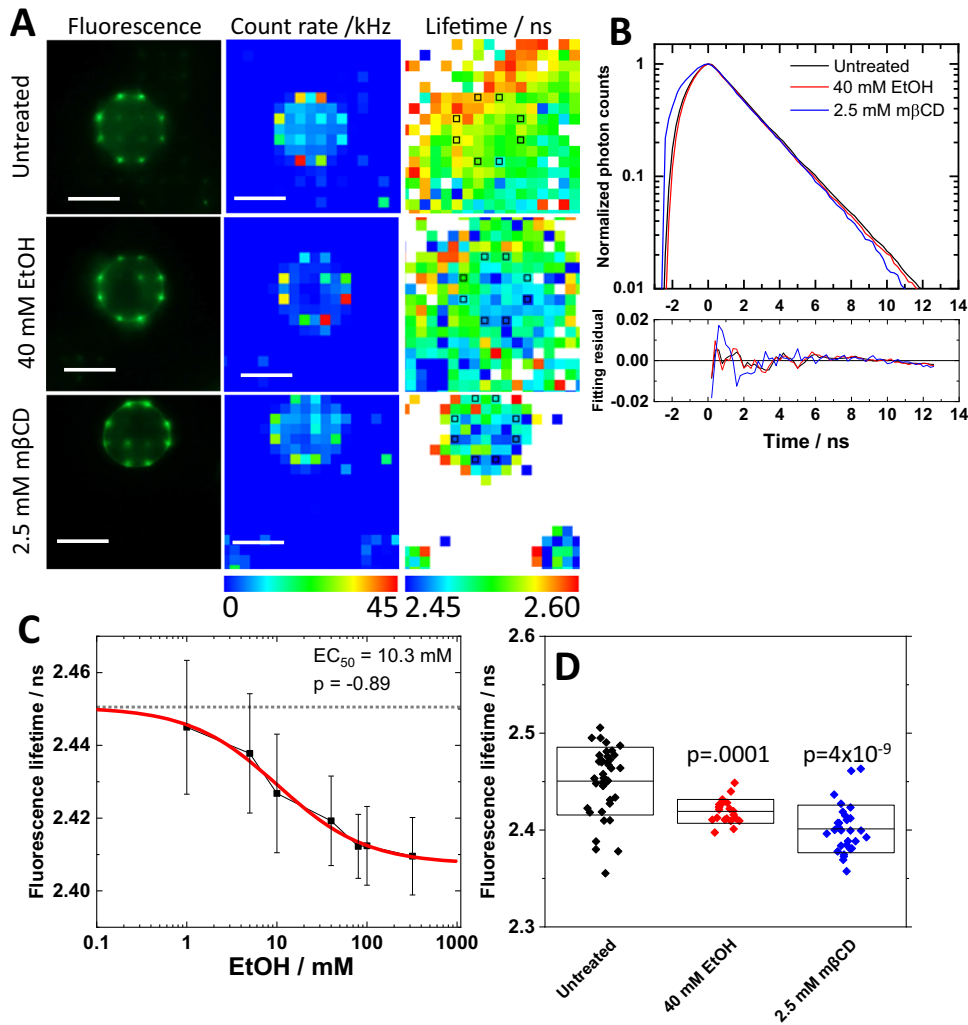


Fig. 1 eGFP fluorescence lifetime (FL) measured in live PC12/KOP-eGFP cells changes in response to ethanol treatment in a dose-dependent way. **A** Fluorescence images/photon counts map acquired using a high-resolution (2 mega pixel) CMOS camera (left column) and a 2D spc3 SPAD camera (middle column). FL map (right column) generated by fitting analysis of FLIM curves shown in **B**. Black squares indicate plasma membrane positions assigned by photon count map. Scale bar: 10 μm . **B** FLIM curves and corresponding fit residuals. Black: Untreated. Red: 40 mM EtOH. Blue: 2.5 mM m β CD. **C** Dose-response curve showing the magnitude of change in eGFP FL as a function of EtOH concentration. Best fit of dose-response curve determined 10.3 mM and -0.89 as EC_{50} value and allosteric factor (p), respectively. **D** eGFP FL, given as average \pm standard deviation, under the treatment with 40 mM EtOH and 2.5 mM m β CD. Statistical analysis was performed using the two-tailed Student's t-test against untreated.

untreated PC12/KOP-eGFP cells, KOP-eGFP is largely localized in the plasma membrane, with some trafficking vesicles binding visible in the cytoplasm (Fig. S2, upper left corner). Massive KOP-eGFP internalization is observed after 30 min treatment with 100 nM DynA (Fig. S2, upper right corner). Treatment with NTX does not alter KOP-eGFP distribution (Fig. S2, lower left corner), but efficiently blocks DynA-induced internalization (Fig. S2, lower right corner).

We have also characterized using FCS the mobility of DynA-activated KOP-eGFP in the plasma membrane (Fig. S3). The observed slow lateral diffusion and its further lowering following treatment with DynA is indicative of KOP-eGFP localization in nanoscale clusters, a common feature of plasma membrane receptors [10–12].

FLIM measurements (Fig. 1A, B), performed using our in-house instrument [22, 36], showed that treatment with 100 nM DynA significantly decreases eGFP FL (Fig. S4). Importantly, both NTX and the KOP-selective antagonist JDtic blocked this effect, suggesting that DynA binds to KOP-eGFP in the plasma membrane and that the observed change in eGFP FL is due to KOP-eGFP-mediated effects.

Finally, Ca^{2+} imaging was performed following extracellular K^{+} -induced membrane depolarization of cultured PC12/KOP-eGFP cells (Fig. S5). Ca^{2+} imaging showed that treatment with 100 nM DynA decreased the Ca^{2+} influx induced by the abrupt increase in extracellular K^{+} , in line with the notion that DynA-activated KOPs released G-protein subunits, inhibiting the Ca^{2+} ion channel *via* the released G_{By} subunits. 200 nM NTX blocked the 100 nM DynA-induced change in Ca^{2+} influx (Fig. S5).

Taken together, these data indicate that KOP-eGFP in PC12/KOP-eGFP cells is functional and that changes in eGFP FL are reliable indicators of KOP-eGFP activation status.

Ethanol induces dose-dependent changes in eGFP fluorescence lifetime

Ethanol is known to affect membrane lipid structures [37–39] and the lateral organization of KOP in the plasma membrane [8]. To determine whether these ethanol-induced changes can also lead to KOP activation, we have performed FLIM on PC12/KOP-eGFP (Fig. 1). As can be seen, KOP-eGFP fluorescence was localized in the plasma membrane in untreated PC12/KOP-eGFP cells and in

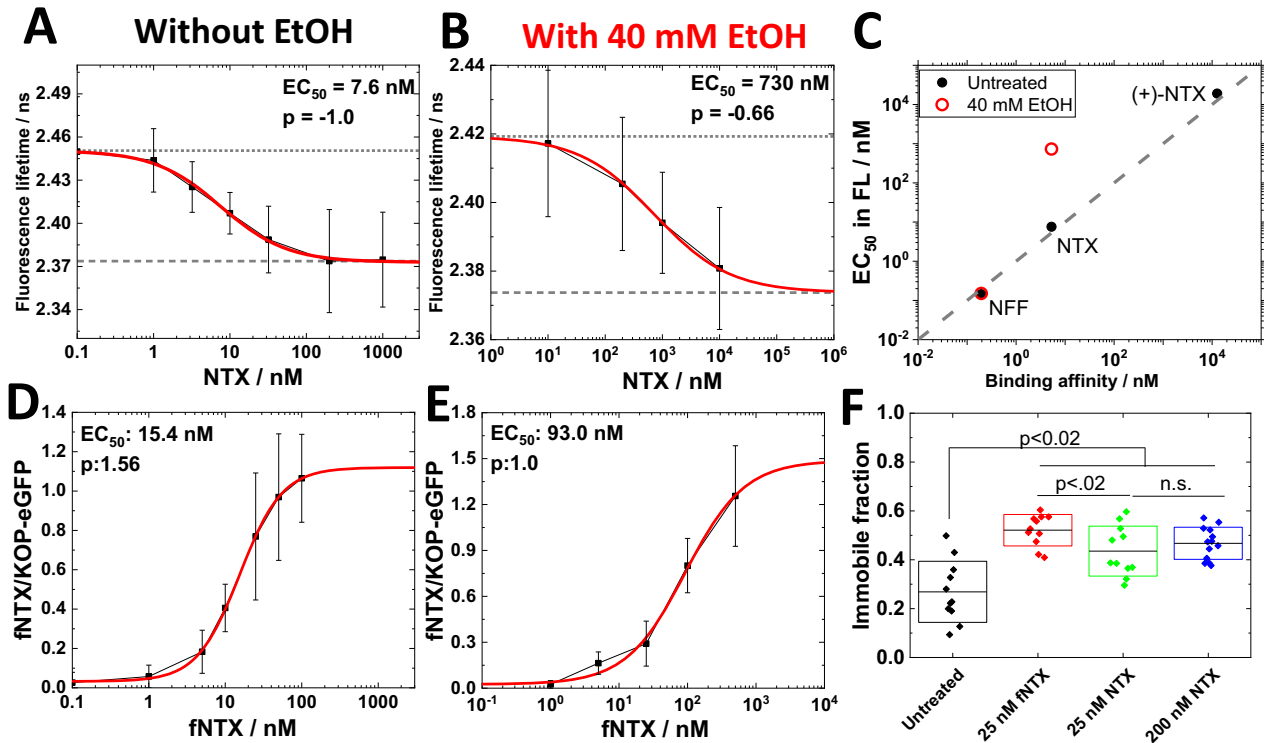


Fig. 2 Effect of ethanol on NTX interactions with KOP-eGFP. **A, B** Dose-response curve showing the magnitude of change in eGFP FL as a function of the concentration of NTX recorded in untreated cells (**A**) and cells treated with 40 mM EtOH (**B**). Best fit of dose-response curves yielded EC_{50} and allosteric factor (p) values of 7.6 nM and -1.0 (**A**) and 730 nM and -0.66 (**B**), respectively. **C** Correlation between the EC_{50} value measured using FLIM with literature binding affinity values of agonist/antagonist to KOP: Nalfurafine (NFF), naltrexone (NTX) and (+)-NTX. Plotted binding affinity values are taken from [40, 42, 43]. Binding affinity of (+)-NTX to KOP was estimated from binding affinity of (+)-NTX to MOP and the ratio of binding affinities of NTX to MOP and KOP. Black: Vehicle. Red: 40 mM EtOH. **D, E** Dose-response curve showing the magnitude of change in the fluorescence intensity ratio in the plasma membrane ($F_{NTX}/F_{KOP-eGFP}$) as a function of the concentration of fNTX recorded in untreated cells (**D**) and cells treated with 40 mM EtOH (**E**). Best fit of the dose-response curves yielded EC_{50} and allosteric factor (p) values of 15.4 nM and 1.56 (**D**) and 93.0 and 1.0 (**E**), respectively. **F** Changes in the immobile fraction of KOP-eGFP in the plasma membrane assessed by FRAP. Black: Untreated. Red: treated with 25 nM fNTX. Green: treated with 25 nM NTX; Blue: treated with 200 nM NTX. Statistical analysis was performed using the two-tailed Student's t test.

cells treated with 40 mM EtOH (Fig. 1A, top and middle rows), showing that EtOH treatment does not induce receptor internalization as observed with the DynA agonist (Fig. S2). Furthermore, FLIM curves recorded in the plasma membrane showed measurable differences in eGFP FL in response to different treatments (Fig. 1B). For ethanol treatment, the change in eGFP FL depended on the ethanol concentration, showing a dose-dependent change with a half-maximal effective concentration (EC_{50}) of 10.3 mM (Fig. 1C). Since dynamic properties of plasma membrane lipids and the lateral organization and size of nanoscale clusters harboring KOP-eGFP are influenced by cholesterol-enriched membrane domains [32], FLIM measurements were also performed under cholesterol depletion by 2.5 mM m β CD. As can be seen, eGFP FL significantly decreased upon cholesterol depletion from the plasma membrane (Fig. 1D), suggesting that EtOH affects dose-dependently the KOP-surrounding membrane environment including a change in the cholesterol-enriched plasma membrane domains.

EtOH affects NTX binding to KOP

We have previously observed that NTX enhances the formation of larger nanoscale clusters harboring KOP [8], blocks DynA binding (Figs. S2 and S4) and DynA-induced KOP-eGFP-mediated actions (Fig. S5). To assess whether EtOH affects NTX binding and actions in the plasma membrane, FLIM was performed on PC12/KOP-eGFP cells treated with NTX or NTX+EtOH (Fig. 2). Our data showed that NTX decreased eGFP FL in a dose-dependent

manner, with an EC_{50} value 7.6 nM (Fig. 2A). To confirm that these changes in eGFP FL are KOP-eGFP-mediated, we also assessed the effects of two related compounds: the inactive optical isomer of NTX, (+)-NTX [40] (Fig. S6) and the KOP-selective agonist nalfurafine (NFF) [41] (Fig. S7). Each compound caused changes in eGFP FL, with an EC_{50} value of 19 μ M for (+)-NTX (Fig. S6A) and 0.15 nM for NFF (Fig. S7B). Interestingly, the binding affinity measured using FLIM agreed well with the binding affinity of these compounds to KOP determined in other studies [40, 42, 43] (Fig. 2C). Given that PC12 cells endogenously express DynA, albeit at very lower levels [44], the good agreement between EC_{50} values measured by FLIM with literature findings suggests that endogenously expressed DynA exerts negligible competing binding effects. Finally, in line with what is expected, treatment with 200 nM NTX efficiently blocked 1 nM NFF binding (Fig. S7C), further corroborating our interpretation of the FLIM data.

Importantly, under treatment with 40 mM EtOH the dose-response curve for NTX shifted to higher NTX concentrations, as reflected by a change in the EC_{50} value from 7.6 nM, measured in untreated cells, to 730 nM, measured in cells treated with 40 mM EtOH (Fig. 2B). 40 mM EtOH disrupted the dose-response activity of (+)-NTX (Fig. S6B, C). In contrast, 40 mM EtOH did not change the EC_{50} value of NFF (Fig. S7D).

To further examine whether the high EC_{50} value for NTX binding in the presence of 40 mM EtOH measured by FLIM, $EC_{50,NTX+40mMEtOH}^{FLIM} = 730$ nM, is indeed due to EtOH-induced

lowering in NTX binding affinity, fNTX was synthesized and its binding to PC12/KOP-eGFP cells was characterized by CLSM (Fig. S8). As can be seen, fNTX binding to KOP-eGFP in live PC12/KOP-eGFP cells is significantly reduced in the presence of 40 mM EtOH and was efficiently blocked by a large excess of non-labeled NTX or by the KOP-selective antagonist LY2444296 (Fig. S8). This not only verified the observations by FLIM that EtOH lowers NTX binding affinity to KOP, but also confirmed that fNTX specifically binds to KOP-eGFP. Dose-response curves showing changes in the fluorescence intensity ratio ($F_{\text{fNTX}}/F_{\text{KOP-eGFP}}$) as a function of fNTX concentration showed EC_{50} values of 15.4 nM for fNTX treatment, and 93 nM for fNTX+40 mM EtOH treatment (Fig. 2D, E). NTX binding affinity to KOP was lower under combined treatment with 40 mM EtOH (Fig. S8B, black vs red line), in agreement with our FLIM data (Fig. 2A–C).

FRAP analysis (Fig. 2F) suggests that both NTX and fNTX increase the immobile fraction of KOP-eGFP in the plasma membrane, presumably by sorting the KOP-eGFP receptors to KOP-harboring clusters. This data confirmed that fNTX retained functionality similar to that of NTX.

NTX reduces EtOH effect on lipid dynamics

Taken together, our data presented above suggests that EtOH affects the KOP-eGFP surrounding lipid environment, including a change in the lateral organization and diffusion of cholesterol-enriched membrane domain (Fig. 1). To further investigate EtOH effects on the lipid environment in the plasma membrane, we selected the lipid marker Abberior Star Red-labeled DOPE (ASR-DOPE) probe. ASR-DOPE clearly stained the plasma membrane and colocalized with KOP-eGFP in untreated PC12/KOP-eGFP cells (Fig. 3A) and EtOH-treated PC12/KOP-eGFP cells (Fig. S9). Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) measurements were performed on both, ASR-DOPE (Fig. 3B₁, C₁, C₂) and KOP-eGFP (Fig. 3B₂, D₁, D₂). FCS measurements on ASR-DOPE yielded autocorrelation curves (Fig. 3B₁) with two distinct decay times that reflect ASR-DOPE diffusion in the cell culture medium (short decay time) and in the plasma membrane (long decay time). The counts per particle (CPP), i.e., brightness of the ASR-DOPE probe was not significantly changed under any treatment tested (Fig. 3C₁); whereas ASR-DOPE diffusion in the plasma membrane was significantly increased in PC12/KOP-eGFP cells treated with 40 mM EtOH (Fig. 3C₂). Pretreatment with 200 nM NTX warded off the EtOH-induced effects (Fig. 3C₂). To address whether this is an NTX-specific or general effect of KOP antagonists on EtOH-modulated effects on lipid dynamics, we also characterized the effects of treatment with (+)-NTX and the KOP-selective antagonist LY2444296 (LY) [45, 46]. In line with the results by FLIM (Fig. S6), we observed that treatment with 200 nM (+)-NTX did not ward off the EtOH-induced effects on lipid dynamics. Of note, treatment with (+)-NTX at a very large, 500-fold excess compared to the effective NTX concentration, 100 μ M (+)-NTX, shows NTX-like effect on the lipid dynamics (Fig. S10). Warding off EtOH-induced effects were not observed for treatment with 100 nM LY2444296 (Fig. S11). Taken together, these data suggest that NTX effects are not KOP-mediated only. Finally, we confirmed the effects of EtOH and NTX by examining in wild type PC12 cells their effects on ASR-DOPE diffusion (Fig. S12) and plasma membrane fluidity using General Polarization (GP) analysis (Fig. S13). Our data suggest that EtOH enhances lipid fluidity in the plasma membrane, as reflected by increased ASR-DOPE diffusion and a statistically significant decrease in plasma membrane GP, and that NTX wards off these EtOH-induced effects.

NTX wards off EtOH-induced decrease in KOP homodimer population in the plasma membrane

FCS analysis showed that the apparent average brightness of KOP-eGFP, as reflected by counts *per* particle (CPP), was significantly higher than that of eGFP, which is a good proxy for monomeric

KOP-eGFP, but less than twice this value (Fig. 3D₁). This is indicative of partial KOP-eGFP homodimerization, which is common in GPCRs [47–49]. EtOH significantly reduced the CPP of KOP-eGFP, lowering it down to the level of eGFP (Fig. 3D₁). This suggests that in EtOH-treated PC12/KOP-eGFP cells KOP-eGFP homodimers dissociate to the monomeric state. In contrast, NTX increased the CPP (Fig. 3D₁), presumably enhancing KOP-eGFP homodimerization and warded off the EtOH-induced dissociation of KOP-eGFP homodimers. Interestingly, this effect was also observed in cells treated with (+)-NTX, unless it was used in a very large excess (100 μ M), but not at concentrations that are relevant for NTX actions (200 nM; Fig. S10D). Unlike NTX, the KOP-selective antagonist LY2444296 did not interfere with EtOH-induced dissociation of KOP-eGFP dimers (Fig. S11C) and neither affected the lateral diffusion of lipids in the plasma membrane (Fig. S11B), nor KOP-eGFP dimerization, as reflected by CPP values that were not statistically significantly different from the value measured in untreated cells (Fig. S11C).

To further characterize KOP-eGFP lateral organization, we performed TIR-FCS [50, 51], using diffusion law analysis to assess KOP-eGFP confinement in membrane domains (Fig. S14). The diffusion law analysis examines the relationship between KOP-eGFP diffusion time (τ_D) as a function of the observation area (A_{eff}). For free diffusion, the diffusion time linearly increases as the observation area increases and the intercept of the linear regression is 0. For KOP-eGFP, a positive intercept is observed, which is an indication that KOP-eGFP is confined in domains (Fig. S14). In PC12/KOP-eGFP cells treated with 40 mM EtOH, the intercept of the linear regression $\tau_D = f(A_{\text{eff}})$ was significantly lower (Fig. S14D), suggesting that EtOH reduces the fraction of KOP-eGFP confined in domains. While conventional, single-point FCS could not observe treatment-related differences in KOP-eGFP diffusion coefficient (DC) in PC12/KOP-eGFP cells (Fig. 3D₂), a significant difference was observed by TIR-FCS in U2OS cells transiently expressing KOP-eGFP (Fig. S14C). We attribute this difference to differences in sensitivity between TIR-FCS and conventional FCS, rather than to differences in cell type. TIR-FCS uses total internal reflection to illuminate the sample, thus confining the excitation light into a thin (100–200 nm) region near the basal plasma membrane of the cell. This significant decrease in the observation volume reduces significantly background fluorescence and leads to a higher signal-to-noise ratio (SNR) and therefore greater sensitivity of TIR-FCS as compared to conventional FCS.

Since FCS can only observe the mobile pool of KOP-eGFP molecules in the plasma membrane and cannot give any information about the immobile fraction, we resorted to FRAP to assess to what extent the immobile pool of KOP-eGFP is affected by the investigated treatments. Our data show that EtOH reduced the immobile fraction of KOP-eGFP, whereas NTX increased it and warded off EtOH-induced changes (Fig. S15). In line with our published observation of KOP-harboring nanoscale domains [8], we propose that KOP-eGFP sequestered into domains constitute the immobile receptor pool; that EtOH redistributes KOP-eGFP between the domains and the surrounding lipid bilayer, shifting the equilibrium towards the mobile fraction. In contrast, NTX shifts the equilibrium towards KOP-eGFP sequestration in protein- and lipid-enriched plasma membrane domains, thereby counteracting EtOH-induced KOP-eGFP reorganization. In FRAP experiments, this is observed as EtOH-/NTX-induced rescinding/retention of the immobile KOP-eGFP fraction.

Taken together with FCS brightness analysis, our data suggest that EtOH and NTX affect KOP-eGFP association with surrounding lipid environment, modulating nanoscale cluster formation and the number of KOP-eGFP molecules in the cluster, followed by an EtOH-induced decrease/NTX-induced increase of KOP-eGFP homodimers.

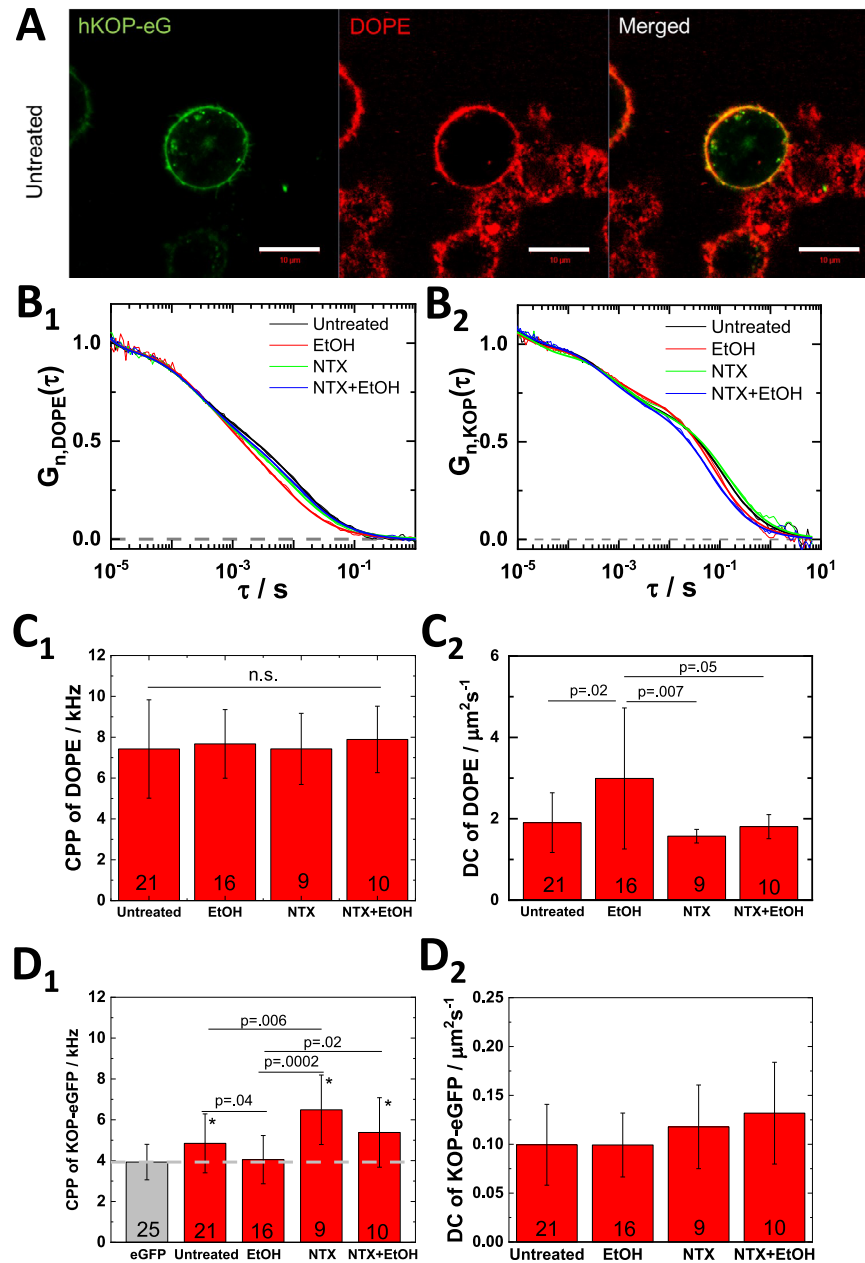


Fig. 3 NTX wards off EtOH-induced effects on the lateral lipid dynamics and KOP oligomerization. **A** Confocal fluorescence microscopy images of untreated PC12/KOP-eGFP cells (green) stained with ASR-DOPE (DOPE, red). Scale bar: 10 μm . (**B₁**, **B₂**) Normalized autocorrelation curves (ACCs) reflecting ASR-DOPE (**B₁**) and KOP-eGFP (**B₂**) dynamics in the plasma membrane of untreated and treated PC12/KOP-eGFP cells. Black: untreated. Red: treated with 40 mM EtOH. Green: treated with 200 nM NTX; Blue: treated with 200 nM NTX + 40 mM EtOH. The ACCs are normalized to the same amplitude, $\tau_D = 1$ at $\tau = 10 \mu\text{s}$. **C₁**, **C₂** Fitting results from ASR-DOPE. Counts per particle (CPP) (**C₁**) and diffusion coefficient (DC) (**C₂**) of membrane-bound component of ASR-DOPE. **D₁**, **D₂** Fitting results from KOP-eGFP and eGFP (gray). CPP (**D₁**) and DC of slow component (**D₂**) of KOP-eGFP. eGFP was used as brightness standard for the monomeric form of KOP-eGFP. The number of measured single cells is shown at the bottom of bars in **C**, **D**. Statistical analysis was performed using the two-tailed Student's *t* test. Asterisk (*) indicates significance, $p < 0.01$, for comparisons against eGFP.

EtOH and NTX modulate Ca^{2+} signaling via KOP-dependent and independent pathways

To assess how EtOH and NTX affect the function of KOP-eGFP, we performed Ca^{2+} imaging in PC12/KOP-eGFP cells using the Ca^{2+} -sensitive fluorescent dye Fura Red (Fig. 4A). After K^+ depolarization, fluorescence intensity of Ca^{2+} -bound Fura Red dramatically increased while fluorescence intensity of Ca^{2+} -unbound Fura Red decreased (Fig. 4B₁). The Fura Red ratio was calculated as the ratio of Ca^{2+} -bound intensity and Ca^{2+} -unbound intensity, which is reflecting on the intercellular Ca^{2+} ion concentration (Fig. 4B₂). We

assessed changes in the amplitude of Fura Red ratio generated by K^+ depolarization as a proxy for Ca^{2+} influx induced by the depolarization. EtOH-treated PC12/KOP-eGFP cells showed a gradual, dose-dependent increase of the amplitude of Fura Red ratio for EtOH concentrations of up to 80 mM EtOH. For EtOH concentrations ≥ 100 mM, a sudden drop was observed (Fig. 4C₁). The EC_{50} value was determined to be 13.1 mM EtOH (Fig. 4C₂), in good agreement with the EC_{50} value determined by FLIM (10.3 mM) (Fig. 1C). Cholesterol depletion caused similar changes of the amplitude of Fura Red ratio (Fig. S16), suggesting that EtOH

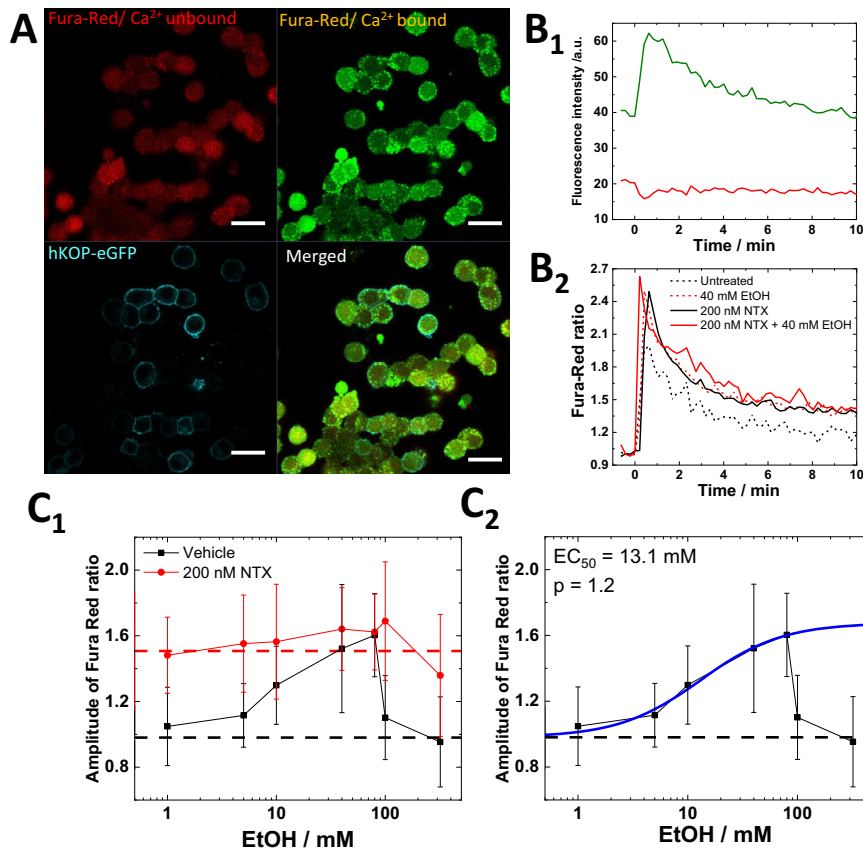


Fig. 4 EtOH and NTX modulate Ca^{2+} signaling via KOP-dependent and -independent pathways. **A** Confocal fluorescence microscopy images of untreated PC12/KOP-eGFP stained with Fura Red. Red: Ca^{2+} -unbound Fura Red. Green: Ca^{2+} -bound Fura Red. Cyan: KOP-eGFP. Scale bar: 20 μm . **B₁** Changes in Fura Red fluorescence intensity over time during K^{+} depolarization. Green: Ca^{2+} -bound Fura Red, Red: Ca^{2+} -unbound Fura Red. **B₂** Fura Red ratio normalized before the K^{+} stimulation. Black dashed line: Untreated. Red dashed line: 40 mM EtOH. Black solid line: 200 nM NTX. Red solid line: 200 nM NTX + 40 mM EtOH. **C₁** The magnitude of change in the amplitude of Fura Red ratio as a function of the concentration of EtOH. Black: vehicle + EtOH, Red: 200 nM NTX + EtOH. Dashed lines reflect mean values for vehicle (black) and for 200 nM NTX-treated cells (red). **C₂** Best fit of dose-response curve (blue) as a function of EtOH concentration yielded EC_{50} and allosteric factor (p) values of 13.1 mM and 1.2, respectively.

induces Ca^{2+} influx by modulating the lipid surroundings of KOP-eGFP, including formation/deformation of cholesterol-enriched KOP-eGFP harboring plasma membrane domains. To ascertain if this is a KOP-mediated pathway or not, Ca^{2+} imaging was performed in untransfected, wild-type PC12 cells, showing a higher Fura Red ratio in untreated PC12 cells (1.3 ± 0.2 ; Fig. S17, black dashed line) compared to untreated PC12/KOP-eGFP cells (1.0 ± 0.2 ; Fig. 4C₁, black dashed line) and a gradual decrease of the amplitude of Fura Red ratio, rather than its enhancement (Fig. S17). This is in good agreement with previous studies showing that the L-type channel is inhibited and the non-L-type channel is partially inhibited by EtOH [52]. Furthermore, EtOH did not affect the baseline of Fura Red ratio before K^{+} depolarization (Fig. S18), suggesting that pharmacologically relevant concentration of EtOH (~10 mM) does not affect the intercellular Ca^{2+} ion concentration and also does not induce endoplasmic reticulum (ER) stress, as reported in pancreatic acinar cells using extremely high EtOH concentration [53]. Considering the lower effect of endogenous DynA in PC12 cells, which is described in the section “EtOH affects NTX binding to KOP”, this suggests that KOP activated by thermal fluctuations, which may be localized in cholesterol-enriched membrane domains, partially exists even in the absence of agonists, inhibiting Ca^{2+} influx at the basal level and that EtOH treatment affects components in the plasma membrane, enhancing Ca^{2+} influx through a KOP-mediated pathway.

To clarify the impact of NTX on Ca^{2+} influx, we pre-treated PC12/KOP-eGFP cells and wild type PC12 cells with 200 nM NTX. NTX-treated PC12/KOP-eGFP cells showed higher amplitude of Fura Red ratio (Fig. 4C₁), which is opposite to the change observed in DynA-treated cells (Fig. S5). Likely, this suggests that NTX downregulates the inhibition of the Ca^{2+} ion channels *via* KOP activation and the subsequent release of $\text{G}_{\beta\gamma}$ subunits. Interestingly, a constant amplitude of the Fura Red ratio was observed even for treatments with EtOH concentrations >100 mM (Fig. 4C₁). The constant amplitude of Fura Red ratio was also confirmed in wild type cells (Fig. S17). This may suggest that EtOH-induced disruption of the Ca^{2+} influx for EtOH concentrations >100 mM and the gradual decrease of Ca^{2+} influx observed in wild type PC12 cells are due to changes in the plasma membrane, including membrane domains, and that NTX blocked this EtOH-induced effect, thereby retaining constant amplitude of Fura Red ratio across all EtOH concentrations tested.

In summary, our data suggest that NTX actions in live PC12/KOP-eGFP cells are complex; occurring through two principal pathways: 1) direct binding to KOP-eGFP and 2) KOP-unmediated modulation of cholesterol-enriched membrane domains, which is in good agreement with our FCS data (Fig. 3) and previous work [8].

To further characterize the contribution of these two pathways, effects of NTX on Ca^{2+} influx were tested using (+)-NTX (Fig. S19)

and LY2444296 (Fig. S20). 200 nM (+)-NTX clearly showed no effect on Ca^{2+} influx (Fig. S19, red), while 100 μM (+)-NTX slightly increased Ca^{2+} influx without EtOH treatment, following a similar pattern under co-treatment with EtOH (Fig. S19, blue). LY2444296 (100 nM) was found to enhance Ca^{2+} influx, a direct KOP antagonistic effect achieved *via* binding to KOP-eGFP (Fig. S20), but did not show any KOP-unmediated effect (Fig. S11).

Taken together, our FLIM data (Figs. 1 and 2) and FCS data (Fig. 3), suggest that EtOH modulates Ca^{2+} influx *via* changes of membrane environment, in particular deformation of cholesterol-enriched membrane domains. NTX does not only show the KOP-mediated antagonistic effects on Ca^{2+} influx, but also KOP-unmediated effects on lipid dynamics in the receptor surrounding lipid environment, which is related to KOP-harboring nanoscale cluster formation.

DISCUSSION

Alcohol abuse and dependence remain the most significant substance abuse problems worldwide and in the US alone more than 140,000 people are dying from alcohol-related causes annually [54]. While there is an ongoing debate whether psychotherapy or medication have superiority for treatment, it is a fact that the majority of individuals with AUD receive no treatment at all.

Earlier studies of medication in AUD have been subjected to a meta-analysis, showing the NTX and acamprosate are superior to placebo; NTX is particularly effective in heavy drinking and prevention of recurrence [55]. A more recent survey supports the efficacy of NTX. Moreover, effectiveness of extended-release NTX medication was recently demonstrated [56]. However, NTX-based prescriptions were primarily given to higher income males with private insurance, leaving women and minorities without such intervention [57]. A certain rise in AUD have been recorded during the covid-19 pandemic [58], prompting an editorial advocating higher rate of NTX prescriptions [1].

Behavioral effects mediated by KOP differ markedly from those of the other opioid receptors, MOP and the delta-opioid receptor (DOP). Kappa-agonists are not self-injected and clinical use is compromised by psychotomimetic side effects. It has even been proposed that the overt euphorogenic effects of MOP and DOP pathways are related to positive reinforcement whereas effects on KOP are balancing and related to the negative reinforcement (craving) [59]; both effects have been related to AUD.

NTX has found a therapeutic niche for the treatment of AUD and is one of the very few medications that can be prescribed for this indication. One characteristic of AUD in humans is that dependent subjects will consume alcohol to relieve or avoid withdrawal symptoms. Similarly, in preclinical studies, alcohol postdependent rats exhibit an alcohol dependence syndrome that is characterized by both somatic and motivational withdrawal symptoms that usually begin after 6 to 8 h of abstinence and engage in excessive drinking when alcohol is made available again. Using a rat model of alcohol dependence (i.e., chronic intermittent alcohol vapor exposure) we showed that NTX decreased alcohol intake in nondependent rats, regardless of sex and abstinence time point [60]. In postdependent rats, NTX significantly decreased the exaggerated alcohol intake only at a delayed abstinence time point (i.e., 6 weeks) in males, whereas it similarly reduced alcohol drinking in females at 8 h, 2 weeks, and 6 weeks abstinence time points. These findings further support targeting the endogenous opioid system to prevent excessive drinking that is characteristic of AUD, even after long periods of abstinence and further suggest that alcohol dependence causes neuroadaptation [60].

The access of a fluorescent derivative of NTX was a priority in the study. While fluorescent NTX derivatives have been described before [27], the strategy here was to extend the separation of the

fluorescent marker to NTX by a longer linker, considering the X-ray analysis data showing that the JD_{Tic}, a KOP antagonist, binds in a deep pocket [14] and NMR analysis of the KOP/dynorphin interaction [15].

NTX has been reported to have a lower affinity for KOP as compared to MOP and may therefore not be considered a KOP antagonist. However, under our conditions, affinity is strong and more in line with previous studies using competition assays in transfected cell cultures that identified approximately equal affinity of NTX for KOP and MOP [61]. Constitutive activity and inverse agonism were also observed, which increased after agonist pretreatment [61]. To approach the effects of alcohol on both MOP and KOP at a molecular level, we introduced high-resolution molecular imaging with FCS to follow the dynamics in cell culture of MOP and KOP labeled with fluorescent tags. The addition of pharmacologically relevant concentrations of EtOH influenced their lateral movements in the plasma membrane [62]. Significantly, EtOH-induced effects showed differences between MOP and KOP, with higher presence of MOP in the membrane, whereas KOP presence declined. Differences related to EtOH-induced effects were also observed with super-resolution microscopy [8].

In our studies, we have also used high-resolution technologies to investigate the effects of EtOH on both MOP and KOP in cell culture. As expected, NTX blocks the activation of MOP. At the ultrastructure, nanoscale level, EtOH affects the distribution of both MOP and KOP (induces the formation of smaller and less occupied MOP and KOP nanodomains) [8]. These studies also revealed that NTX induces formation of larger and more occupied KOP nanodomains and that NTX pretreatment has protective effects against EtOH-induced changes in nano-organization of both receptors [8].

Another approach to the specificity of the studies effects is the use of stereoisomers. The (+) isomer of NTX ((+)-NTX) was available to us. This isomer has its own pharmacologic profile and shows equipotent binding for MOP and the toll-like receptor TR4, and interacts with opioid (morphine) analgesia [63, 64] as well as drug reward [65]. The results are clear, the (+) isomer is much less active demonstrating that the NTX effects we observe are mediated by interaction with KOP and not due to off-target effects (Fig. 2).

Based on our data, we have developed a model to describe EtOH, and the direct and indirect actions of naltrexone (NTX) on KOP function (Fig. 5). In untreated cells under normal culture conditions, KOPs exist partly as monomers and partly as homodimers. They are distributed between the lipid bilayer and nanoscale clusters within the plasma membrane. Under these conditions, thermal fluctuations can activate the fraction of KOPs localized in clusters, resulting in a basal level of KOP activity even in the absence of a specific ligand. This basal KOP activation leads to the release of $\text{G}_{\beta\gamma}$ subunits, which inhibits Ca^{2+} channels. EtOH disrupts the plasma membrane organization, causing deformation of the cholesterol-enriched membrane domains that harbor KOP, thereby promoting the dissociation of KOP homodimers into monomers. This reduces the number of KOPs that can be activated by thermal fluctuations, thereby diminishing KOP-mediated Ca^{2+} channel inhibition. Consequently, Ca^{2+} influx is enhanced, as observed with lower concentrations of EtOH (1–80 mM). In contrast, higher EtOH concentrations (>100 mM) cause significant distortion of the plasma membrane organization, leading to inhibition of Ca^{2+} channels.

Under treatment with NTX, larger nanoscale KOP-harboring clusters are being formed and the population of KOP homodimers increases. NTX also exerts its antagonistic effect through its action on KOP, which results in the enhancement of Ca^{2+} influx. These NTX effects are sustained even under combined treatment with EtOH. Under combined treatment, both NTX and EtOH affect the KOP-harboring-cholesterol-enriched membrane domains, as observed in

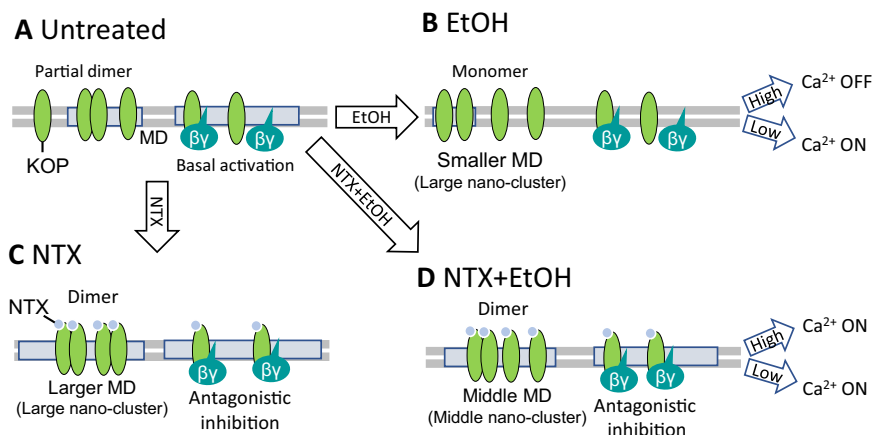


Fig. 5 Model of NTX and ethanol effects on KOP lateral organization and interactions with lipids. **A** In untreated cells, KOP largely diffuses freely in the lipid bilayer, with a small fraction that localizes in cholesterol-enriched membrane domains (MDs) and forms homodimers. KOPs that localize in MD can be activated by thermal fluctuations, even without the presence of an externally introduced agonist. Through this basal activation of KOP, KOP-mediated inhibition of Ca^{2+} channel can take place. **B** Under treatment with EtOH, deformation of MD is taking place, KOP dimers dissociate, forming monomers that freely diffuse in the lipid bilayer. This, in turn leads to reduction in the KOP-mediated inhibition of the Ca^{2+} channel, and the Ca^{2+} channel is in the ON-state under lower EtOH concentrations (0 mM–80 mM). Under high EtOH concentration (>100 mM), plasma membrane deformation is excessive and the Ca^{2+} channel may be generally inhibited. **C** Under the treatment with NTX, larger nanoscale KOP clusters form (based on evidence from [8]). NTX-bound KOP forms predominantly homodimers in larger MDs. The Ca^{2+} channel is released from the inhibiting action of KOP by NTX binding. **D** EtOH-modulated lipid dynamics is suppressed by NTX. Middle-sized nano-clusters are being formed. NTX also exerts its antagonist activity at KOP, thus the Ca^{2+} channel is released from KOP-activated-inhibition.

our previous study [8]. Under combined treatment with EtOH, cholesterol-enriched membrane domains of intermediate size form, and the KOP homodimer population is still decisive, albeit lower than under treatment with NTX alone. As a result, the Ca^{2+} influx remains the same in the whole EtOH concentration range. In other words, the EtOH-induced enhancement and distortion of Ca^{2+} influx are suppressed by NTX. Considering the lipid dynamics/membrane fluidity and KOP clustering, NTX shows a protective effect against EtOH, possibly through the retention of membrane-anchored actin fibers and membrane domains.

Comparative studies were performed using the known KOP antagonist LY2444296 that is a homolog of JNJ-67953964 (a.k.a. CERC-501 and LY2456302) and a NTX-related agent, and nalfurafine, a KOP agonist recently introduced for the treatment of itch (as developed in patients receiving opiates chronically) [66]. We confirm that nalfurafine, like the natural ligand DynA, induces KOP internalization (Fig. S7). But, unlike DynA (Fig. S2) nalfurafine leads to the formation of large cytoplasmic vesicles with a clear KOP-eGFP harboring rim (Fig. S7), that are significantly larger (can be readily distinguished by confocal microscopy) than the typically observed KOP-eGFP trafficking vesicles the size of which is below/at the resolution limit defined by the diffraction of light. The observed activity of the LY2444296 confirmed KOP antagonism and as is shown here, NTX and LY2444296 share binding sites (Fig. S8).

It can be noted that KOP has been identified as one of the strongest genetic linkages in major depressive disorder along with dopamine receptor 2 (D2R) [67]. It is noticeable that there is a striatonigral dynorphin pathway reciprocal to the classic nigrostriatal dopamine pathway [68, 69]. The close connection between two potentially relevant neurotransmitter systems may be an indication of a functional relationship. A recent “fast-fail” study of JNJ-67953964 in major depressive disorder showed activity in anhedonia [70]. It is now in Phase III trial as Aticaprant. Another chemically distinct KOP antagonist BTRX-335140, Navacaprant is in Phase II clinical trial in depression [71]. To our knowledge, there are so far no clinical studies of KOP antagonists in AUD. Our research using an alcohol-dependent rat model demonstrated that LY2444296 significantly reduced alcohol self-administration in

both male and female rats. These findings suggest that KOP-selective antagonists could be promising candidates for developing medications to treat AUD [72].

CONCLUDING REMARKS

NTX, an analog of naloxone—a well-known opiate antidote in emergencies, was developed as a long-acting MOP antagonist to protect against further intoxication. Its activity in AUD, initially thought to be limited to its antagonistic action on MOP, is multifaceted, involving its potent antagonistic action on KOP, also shown here. Our data suggest that in addition to these systemic effects, alcohol also exerts its effects on KOP function at the cellular level. By changing KOP distribution between the lipid bilayer and nanoscale clusters within the plasma membrane, alcohol changes cellular KOP-mediated signaling. While NTX is blocking both constitutive and alcohol-induced KOP-mediated activity, it is important to note that it is much less active at KOP when alcohol is abundant. This is an obvious caveat for NTX use in binge drinking (to intoxication), which is of medical concern and is very different from social alcohol use [73].

The interactions of alcohol, NTX and the opioid receptors, particularly MOP, have been studied with a variety of technologies [6, 74]. The current data illustrate that the KOP receptor and KOP-lipid interactions are also a relevant target.

DATA AVAILABILITY

Raw data can be provided for investigations from SO.

REFERENCES

1. Avery J. Naltrexone and alcohol use. *Am J Psychiatry*. 2022;179:886–7.
2. Altshuler HL, Phillips PE, Feinhandler DA. Alteration of ethanol self-administration by naltrexone. *Life Sci*. 1980;26:679–88.
3. Volpicelli JR, Davis MA, Olgin JE. Naltrexone blocks the post-shock increase of ethanol consumption. *Life Sci*. 1986;38:841–7.
4. Volpicelli JR, Watson NT, King AC, Sherman CE, O'Brien CP. Effect of naltrexone on alcohol “high” in alcoholics. *Am J Psychiatry*. 1995;152:613–5.

5. Mitchell JM, O'Neil JP, Janabi M, Marks SM, Jagust WJ, Fields HL. Alcohol consumption induces endogenous opioid release in the human orbitofrontal cortex and nucleus accumbens. *Sci Transl Med.* 2012;4:116ra6.
6. Nutt DJ. The role of the opioid system in alcohol dependence. *J Psychopharmacol.* 2014;28:8–22.
7. Koob GF. Alcoholism: allostasis and beyond. *Alcohol Clin Exp Res.* 2003;27:232–43.
8. Tobin SJ, Wakefield DL, Terenius L, Vukojevic V, Jovanovic-Talman T. Ethanol and naltrexone have distinct effects on the lateral nano-organization of Mu and kappa opioid receptors in the plasma membrane. *ACS Chem Neurosci.* 2019;10:667–76.
9. Halls ML, Yeatman HR, Nowell CJ, Thompson GL, Gondin AB, Covicristov S, et al. Plasma membrane localization of the μ -opioid receptor controls spatiotemporal signaling. *Sci Signal.* 2016;9:ra16–ra16.
10. Wang Y, Gao J, Guo X, Tong T, Shi X, Li L, et al. Regulation of EGFR nanocluster formation by ionic protein-lipid interaction. *Cell Res.* 2014;24:959–76.
11. Gormal RS, Padmanabhan P, Kasula R, Bademosi AT, Coakley S, Giacomotto J, et al. Modular transient nanoclustering of activated β_2 -adrenergic receptors revealed by single-molecule tracking of conformation-specific nanobodies. *Proc Natl Acad Sci.* 2020;117:30476–87.
12. Möller J, Isbilir A, Sungkaworn T, Osberg B, Karathanasis C, Sunkara V, et al. Single-molecule analysis reveals agonist-specific dimer formation of μ -opioid receptors. *Nat Chem Biol.* 2020;16:946–54.
13. Rose JH, Karkhanis AN, Chen R, Gioia D, Lopez MF, Becker HC et al. Supersensitive kappa opioid receptors promotes ethanol withdrawal-related behaviors and reduce dopamine signaling in the nucleus accumbens. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2016;19:pyv127.
14. Wu H, Wacker D, Mileni M, Katritch V, Han GW, Vardy E, et al. Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JDTic. *Nature.* 2012;485:327–32.
15. O'Connor C, White KL, Doncescu N, Didenko T, Roth BL, Czaplicki G, et al. NMR structure and dynamics of the agonist dynorphin peptide bound to the human kappa opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112:11852–7.
16. Sargent DF, Schwyzer R. Membrane lipid phase as catalyst for peptide-receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:5774–8.
17. Hayashi T, Fukuda N, Uchiyama S, Inada N. A cell-permeable fluorescent polymeric thermometer for intracellular temperature mapping in mammalian cell lines. *PLoS One.* 2015;10:e0117677.
18. Rennick JJ, Nowell CJ, Pouton CW, Johnston APR. Resolving subcellular pH with a quantitative fluorescent lifetime biosensor. *Nat Commun.* 2022;13:6023.
19. Kitamura A, Oasa S, Kawaguchi H, Osaka M, Vukojevic V, Kinjo M. Increased intracellular crowding during hyperosmotic stress. *Sci Rep.* 2023;13:11834.
20. Li T, Oasa S, Ciruela F, Terenius L, Vukojevic V, Svenningsson P. Cytosolic GPR37, but not GPR37L1, multimerization and its reversal by parkin: a live cell imaging study. *FASEB J.* 2021;35:e22055.
21. Ghukasyan V, Hsu C-C, Liu C-R, Kao F-J, Cheng T-H. Fluorescence lifetime dynamics of enhanced green fluorescent protein in protein aggregates with expanded polyglutamine. *J Biomed Opt.* 2010;15:016008.
22. Oasa S, Krmpot AJ, Nikolic SN, Clayton AHA, Tsigelny IF, Changeux JP, et al. Dynamic cellular cartography: mapping the local determinants of oligodendrocyte transcription factor 2 (OLIG2) function in live cells using massively parallel fluorescence correlation spectroscopy integrated with fluorescence lifetime imaging microscopy (mpFCS/FLIM). *Anal Chem* 2021;93:12011.
23. Asher WB, Geggier P, Holsey MD, Gilmore GT, Pati AK, Meszaros J, et al. Single-molecule FRET imaging of GPCR dimers in living cells. *Nat Methods.* 2021;18:397–405.
24. Maslov I, Volkov O, Khorn P, Orekhov P, Gusach A, Kuzmichev P, et al. Sub-millisecond conformational dynamics of the A2A adenosine receptor revealed by single-molecule FRET. *Commun Biol.* 2023;6:362.
25. Vukojevic V, Ming Y, D'Addario C, Hansen M, Langel U, Schulz R, et al. Mu-opioid receptor activation in live cells. *FASEB J.* 2008;22:3537–48.
26. Schneider F, Waithe D, Lagerholm BC, Shrestha D, Sezgin E, Eggeling C, et al. Statistical analysis of scanning fluorescence correlation spectroscopy data differentiates free from hindered diffusion. *ACS Nano.* 2018;12:8540–46.
27. Kolb VM, Koman A, Terenius L. Fluorescent probes for opioid receptors. *Life Sci.* 1983;33:423–6.
28. Selfridge BR, Wang X, Zhang Y, Yin H, Grace PM, Watkins LR, et al. Structure-activity relationships of (+)-naltrexone-inspired toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists. *J Med Chem.* 2015;58:5038–52.
29. Carroll I, Thomas JB, Dykstra LA, Granger AL, Allen RM, Howard JL, et al. Pharmacological properties of JDTic: a novel κ -opioid receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 2004;501:111–19.
30. Schneider F, Waithe D, Clausen MP, Galiani S, Koller T, Ozhan G, et al. Diffusion of lipids and GPI-anchored proteins in actin-free plasma membrane vesicles measured by STED-FCS. *Mol Biol Cell.* 2017;28:1507–18.
31. Vukojevic V, Ming Y, D'Addario C, Hansen M, Langel U, Schulz R, et al. Mu-opioid receptor activation in live cells. *FASEB J.* 2008;22:3537–48.
32. Rogacki MK, Golfetto O, Tobin SJ, Li T, Biswas S, Jorand R et al. Dynamic lateral organization of opioid receptors (kappa, mu and muN40D) in the plasma membrane at the nanoscale level. *Traffic* 2018;18:690–709
33. Machañ R, Wohland T. Recent applications of fluorescence correlation spectroscopy in live systems. *FEBS Lett.* 2014;588:3571–84.
34. Sankaran J, Balasubramanian H, Tang WH, Ng XW, Röllin A, Wohland T. Simultaneous spatiotemporal super-resolution and multi-parametric fluorescence microscopy. *Nat Commun.* 2021;12:1748.
35. Bag N, Ng XW, Sankaran J, Wohland T. Spatiotemporal mapping of diffusion dynamics and organization in plasma membranes. *Methods Appl Fluoresc.* 2016;4:034003.
36. Krmpot AJ, Nikolic SN, Oasa S, Papadopoulos DK, Vitali M, Oura M, et al. Functional fluorescence microscopy imaging: quantitative scanning-free confocal fluorescence microscopy for the characterization of fast dynamic processes in live cells. *Anal Chem* 2019;91:11129.
37. Goldstein DB. Effect of alcohol on cellular membranes. *Ann Emerg Med.* 1986;15:1013–8.
38. Sergeant O, Pereira M, Belhomme C, Chevanne M, Huc L, Lagadic-Gossmann D. Role for membrane fluidity in ethanol-induced oxidative stress of primary rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313:104–11.
39. Tobin SJ, Cacao EE, Hong DW, Terenius L, Vukojevic V, Jovanovic-Talman T. Nanoscale effects of ethanol and naltrexone on protein organization in the plasma membrane studied by photoactivated localization microscopy (PALM). *PLoS One.* 2014;9:e87225.
40. Theberge FR, Li X, Kambhampati S, Pickens CL, St Laurent R, Bossert JM, et al. Effect of chronic delivery of the Toll-like receptor 4 antagonist (+)-naltrexone on incubation of heroin craving. *Biol Psychiatry.* 2013;73:729–37.
41. Nagase H, Imaide S, Hirayama S, Nemoto T, Fujii H. Essential structure of opioid kappa receptor agonist nalfurafine for binding to the kappa receptor 2: synthesis of decahydro(iminoethano)phenanthrene derivatives and their pharmacologies. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012;22:5071–4.
42. Nagase H, Fujii H. Essential structure of the kappa opioid receptor agonist nalfurafine for binding to the kappa receptor. *Curr Pharm Des.* 2013;19:7400–14.
43. Yamagami C, Motohashi N, Emoto T, Hamasaki A, Tanahashi T, Nagakura N, et al. Quantitative structure-activity relationship analyses of antioxidant and free radical scavenging activities for hydroxybenzalacetones. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004;14:5629–33.
44. Margioris AN, Venihaki M, Stournaras C, Gravanis A. PC12 cells as a model to study the effects of opioids on normal and tumoral adrenal chromaffin cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;771:166–72.
45. Rorick-Kehn LM, Witkin JM, Statomic MA, Eberle EL, McKinzie JH, Kahl SD, et al. LY2456302 is a novel, potent, orally-bioavailable small molecule kappa-selective antagonist with activity in animal models predictive of efficacy in mood and addictive disorders. *Neuropharmacology.* 2014;77:131–44.
46. Valenza M, Butelman ER, Kreek MJ. "Effects of the novel relatively short-acting kappa opioid receptor antagonist LY2444296 in behaviors observed after chronic extended-access cocaine self-administration in rats". *Psychopharmacol (Berl).* 2017;234:2219–31.
47. Jordan BA, Devi LA. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature.* 1999;399:697–700.
48. Milligan G, Ward RJ, Marsango S. GPCR homo-oligomerization. *Curr Opin Cell Biol.* 2019;57:40–47.
49. Cechova K, Lan C, Macik M, Barthes NPF, Jung M, Ulbrich MH. Kappa but not delta or mu opioid receptors form homodimers at low membrane densities. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78:7557–68.
50. Veerapathiran S, Wohland T. The imaging FCS diffusion law in the presence of multiple diffusive modes. *Methods.* 2018;140:141:140–50.
51. Ng XW, Bag N, Wohland T. Characterization of lipid and cell membrane organization by the fluorescence correlation spectroscopy diffusion law. *CHIMIA.* 2015;69:112.
52. Walter HJ, Messing RO. Regulation of neuronal voltage-gated calcium channels by ethanol. *Neurochem Int.* 1999;35:95–101.
53. Criddle DN, Raraty MGT, Neoptolemos JP, Tepikin AV, Petersen OH, Sutton R. Ethanol toxicity in pancreatic acinar cells: Mediation by nonoxidative fatty acid metabolites. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101:10738–43.
54. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Alcohol and Public health: alcohol-related disease impact. https://nccd.cdc.gov/DPH_ARLD/default/default.aspx.
55. Maisel NC, Blodgett JC, Wilbourne PL, Humphreys K, Finney JW. Meta-analysis of naltrexone and acamprostate for treating alcohol use disorders: when are these medications most helpful? *Addiction.* 2013;108:275–93.
56. Murphy CET, Wang RC, Montoy JC, Whittaker E, Raven M. Effect of extended-release naltrexone on alcohol consumption: a systematic review and meta-analysis. *Addiction.* 2022;117:271–81.

57. Qeadan F, Mensah NA, Gu LY, Madden EF, Venner KL, and English K. Trends in the use of naltrexone for addiction treatment among alcohol use disorder admissions in U.S. substance use treatment facilities. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18:8884.
58. Santos GM, Ikeda J, Coffin P, Walker J, Matheson T, Ali A, et al. Targeted oral naltrexone for mild to moderate alcohol use disorder among sexual and gender minority men: a randomized trial. *Am J Psychiatry*. 2022;179:915–26.
59. Koob GF, Le Moal M. Plasticity of reward neurocircuitry and the ‘dark side’ of drug addiction. *Nat Neurosci*. 2005;8:1442–4.
60. Matzeu A, Terenius L, Martin-Fardon R. Exploring sex differences in the attenuation of ethanol drinking by naltrexone in dependent rats during early and protracted abstinence. *Alcohol Clin Exp Res*. 2018;42:2466–78.
61. Wang D, Sun X, Sadee W. Different effects of opioid antagonists on mu-, delta-, and kappa-opioid receptors with and without agonist pretreatment. *J Pharm Exp Ther*. 2007;321:544–52.
62. Vukojevic V, Ming Y, D’Addario C, Rigler R, Johansson B, Terenius L. Ethanol/naltrexone interactions at the mu-opioid receptor. CLSM/FCS study in live cells. *PLoS One*. 2008;3:e4008.
63. Hutchinson MR, Bland ST, Johnson KW, Rice KC, Maier SF, Watkins LR. Opioid-induced glial activation: mechanisms of activation and implications for opioid analgesia, dependence, and reward. *Sci World J*. 2007;7:98–111.
64. Wang X, Zhang Y, Peng Y, Hutchinson MR, Rice KC, Yin H, et al. Pharmacological characterization of the opioid inactive isomers (+)-naltrexone and (-)-naloxone as antagonists of toll-like receptor 4. *Br J Pharm*. 2016;173:856–69.
65. Northcutt AL, Hutchinson MR, Wang X, Baratta MV, Hiranita T, Cochran TA, et al. DAT isn’t all that: cocaine reward and reinforcement require toll-like receptor 4 signaling. *Mol Psychiatry*. 2015;20:1525–37.
66. Schattauer SS, Kuhar JR, Song A, Chavkin C. Nalfurafine is a G-protein biased agonist having significantly greater bias at the human than rodent form of the kappa opioid receptor. *Cell Signal*. 2017;32:59–65.
67. Levey DF, Stein MB, Wendt FR, Pathak GA, Zhou H, Aslan M, et al. Bi-ancestral depression GWAS in the Million Veteran Program and meta-analysis in >1.2 million individuals highlight new therapeutic directions. *Nat Neurosci*. 2021;24:954–63.
68. You ZB, Nylander I, Herrera-Marschitz M, O’Connor WT, Goiny M, Terenius L. The striatonigral dynorphin pathway of the rat studied with in vivo microdialysis-I. Effects of K(+)–depolarization, lesions and peptidase inhibition. *Neuroscience*. 1994;63:415–25.
69. You ZB, Herrera-Marschitz M, Nylander I, Goiny M, O’Connor WT, Ungerstedt U, et al. The striatonigral dynorphin pathway of the rat studied with in vivo microdialysis-II. Effects of dopamine D1 and D2 receptor agonists. *Neuroscience*. 1994;63:427–34.
70. Krystal AD, Pizzagalli DA, Smoski M, Mathew SJ, Nurnberger J Jr, Lisanby SH, et al. A randomized proof-of-mechanism trial applying the ‘fast-fail’ approach to evaluating kappa-opioid antagonism as a treatment for anhedonia. *Nat Med*. 2020;26:760–68.
71. Study in major depressive disorder with BTRX-335140 vs placebo. *Clinical-Trials.gov Identifier: NCT04221230*. Ongoing study.
72. Flores-Ramirez FJ, Illenberger JM, Pascasio G, Terenius L, Martin-Fardon R. LY2444296, a kappa-opioid receptor antagonist, selectively reduces alcohol drinking in male and female Wistar rats with a history of alcohol dependence. *Sci Rep*. 2024;14:5804.
73. Koob GF, Colrain IM. Alcohol use disorder and sleep disturbances: a feed-forward allostatic framework. *Neuropsychopharmacology*. 2020;45:141–65.
74. Morris LS, Baek K, Tait R, Elliott R, Ersche KD, Flechais R, et al. Naltrexone ameliorates functional network abnormalities in alcohol-dependent individuals. *Addict Biol*. 2018;23:425–36.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge the supply of (+) NTX from Dr. Kenner Rice, Drug Design and Synthesis Section, MTMDB, was supported by the NIH Intramural Research Programs of the NIDA and the NIAAA, Bethesda, MD. Compound LY2444296 was generously donated by Eli Lilly and Company with help from Dr. Linda Rorick-Kehn. We thank Dr. Barbara Mason for the valuable comments regarding an earlier version of this paper. This work was supported by the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (grants no. AA006420, AA026999 to RM-F, and AA028549 to LT, TJ-T,

and RM-F) and the Swedish Research Council (grant no. VR 2022-03402 to VV). SO acknowledges the financial support by the Nakatani Foundation for Advancement of Measuring Technologies in Biomedical Engineering and the Strategic Research Program in Neuroscience (StratNeuro) at the Karolinska Institutet. ES is supported by the Swedish Research Council Starting Grant (grant no. 2020-02682). We thank the SciLifeLab Advanced Light Microscopy facility and National Microscopy Infrastructure (VR-RFI 2016-00968) for their support of spectral imaging. Research reported in this publication included work performed in the City of Hope Drug Discovery and Structural Biology Core supported by the National Cancer Institute of the National Institutes of Health under grant number P30CA033572. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LT, VV, SO conceived and designed the research project. SO, ES and MDR performed and analyzed the data. YM, DAH and TJ-T designed and synthesized the fluorescent NTX derivative. All authors contributed to the writing and have approved the manuscript.

FUNDING

Open access funding provided by Karolinska Institute.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

All experiments were done in the laboratory and did not involve humans or animals. The experiments did not involve tissues from humans or other vertebrates. All experiments were done in accordance with scientific standards.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41398-024-03172-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Vladana Vukojević or Lars Terenius.

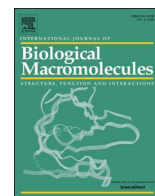
Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024



Interactions of ultrashort laser pulses with hemoglobin: Photophysical aspects and potential applications

Mihajlo D. Radmilović^a, Ivana T. Drvenica^b, Mihailo D. Rabasović^a, Vesna Lj. Ilić^b, Danica Pavlović^a, Sho Oasa^c, Vladana Vukojević^c, Mina Perić^{d,e}, Stanko N. Nikolić^{a,f}, Aleksandar J. Krmpot^{a,f,*}

^a Institute of Physics Belgrade, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

^b Institute for Medical Research, National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

^c Department of Clinical Neuroscience, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

^d Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

^e Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

^f Division of Arts and Sciences, Texas A&M University at Qatar, Doha, Qatar

ARTICLE INFO

Keywords:

Erythrocytes
Two-photon excitation fluorescence
Hemoglobin photoproduct
Femtosecond laser
Protoporphyrin IX

ABSTRACT

Hemoglobin (Hb), a life-sustaining and highly abundant erythrocyte protein, is not readily fluorescent. A few studies have already reported Two-Photon Excited Fluorescence (TPEF) of Hb, however, the mechanisms through which Hb becomes fluorescent upon interaction with ultrashort laser pulses are not completely understood. Here, we characterized photophysically this interaction on Hb thin film and erythrocytes using fluorescence spectroscopy upon single-photon/two-photon absorption, and UV-VIS single-photon absorption spectroscopy. A gradual increase of the fluorescence intensity, ending up with saturation, is observed upon prolonged exposure of Hb thin layer and erythrocytes to ultrashort laser pulses at 730 nm. When compared to protoporphyrin IX (PpIX) and oxidized Hb by H₂O₂, TPEF spectra from a thin Hb film and erythrocytes showed good mutual agreement, broad peaking at 550 nm, supporting hemoglobin undergoes degradation and that same fluorescent specie(s) originating from the heme moiety are generated. The uniform square shaped patterns of the fluorescent photoproduct exhibited the same level of the fluorescence intensity even after 12 weeks from the formation, indicating high photoproduct stability. We finally demonstrated the full potential of the formed Hb photoproduct with TPEF scanning microscopy towards spatiotemporally controlled micropatterning in HTF and single human erythrocyte labelling and tracking in the whole blood.

1. Introduction

Human adult hemoglobin (Hb) is an iron-containing metalloprotein in erythrocytes, the primary function of which is to transport oxygen from the lungs to all other organs and tissues. It is made up of two α - and two β -polypeptide chains, each associated with one heme prosthetic group [1]. While the absorption spectrum of oxyhemoglobin (oxyHb) shows several bands, as the intense Soret or B band in the region of 370 nm - 450 nm and the so-called Q-band in the region of 500 nm - 650 nm in the porphyrin ring [2], the conventional single-photon excitation fluorescence (SPEF) of Hb is not or hardly detectable due to the fast non-radiative decay that dominates over spontaneous fluorescence emission [3–5]. In contrast, the intense two-photon absorptivity of Hb in the near-

infrared range [6] followed by strong fluorescence emission, have made Two-Photon Excited Fluorescence (TPEF) imaging possible [4] and applicable in a number of studies: for erythrocytes imaging [7,8], analysis of residual Hb distribution in empty erythrocytes membranes (i. e., erythrocyte ghosts) [9], in vivo imaging of microvasculature [10–12], and even time-resolved diagnostic imaging [13]. Of note, Hb excitation through a two-photon absorption process, which is governed by significantly different selection rules than single photon absorption, is described in detail in [3,5], while the corresponding single and two photon absorption spectra are given in [6].

Due to high absorptivity of Hb in the VIS and near infrared (NIR) region, erythrocytes are also readily imaged using absorption-based techniques, such as photo-acoustic microscopy [14]. Photo-acoustic

* Corresponding author: Institute of Physics Belgrade, University of Belgrade, Belgrade, Serbia, Pregrevica 118, Belgrade 11080, Serbia.

E-mail address: krmpot@ipb.ac.rs (A.J. Krmpot).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125312>

Received 21 March 2023; Received in revised form 16 May 2023; Accepted 8 June 2023

Available online 10 June 2023

0141-8130/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

microscopy is an imaging technique that leverages the non-radiative decay of Hb, which happens to be the most frequently used contrast agent for this modality [15–17]. Another type of label free imaging techniques, used for erythrocytes imaging is the nonlinear Third Harmonic Generation (THG) microscopy. This method has demonstrated efficacy in imaging erythrocytes contained within transfusion bags. [18].

The significance of photochemical manipulation of proteins is especially boosted by the discoveries of their optogenetics, photobiomodulation and bioimaging applications in recent years [19,20]. Understanding the photophysical and photochemical processes during the interaction of Hb with ultrashort laser pulses is of great importance for the development of functional imaging aimed for the assessment of erythrocytes functional status [21], where hemoglobin is the main intracellular protein of these cells. Besides, a better understanding of the interaction of Hb with ultrashort laser pulses could contribute to the development of new methods for the characterization and tracking of extracellular Hb presence. This implies extracellular Hb from endogenous sources due to hemolysis (in all diseases where in common feature is hemoglobinemia, such retinopathy, neuropathy, nephropathy and brain hemorrhages) [22], or exogenous sources, such in the cases of use of hemoglobin-based oxygen carriers [23] and hemoglobin-based drug delivery system, which have great potential in cancer therapy [22,24,25]. So far it was only shown that upon ultrashort laser pulses interaction with Hb, there is relation between TPEF spectra of heme and hemoglobin, as stated in [3].

However, despite already established, as well as emerging applications of Hb-based TPEF microscopy, the origin of generated fluorescence still needs to be completely understood. While it was initially proposed that the origin of the observed Soret fluorescence (420–460 nm) with a fluorescence emission peak at 438 nm originates from Hb [3], it was shown that TPEF does not directly originate from Hb, but rather from a photoproduct created upon the interaction of ultrashort laser pulses used in this nonlinear imaging technique with Hb [26]. This lack of basic understanding motivated us to deeper study ultrashort laser pulses interaction with Hb, with a particular focus on characterizing the durability of the Hb photoproduct and experimental conditions under which it is being formed. Since we efficiently demonstrated utility of TPEF microscopy to image the erythrocytes, the ultrashort laser pulses interaction with Hb was further photophysically characterized on thin Hb films using fluorescence spectroscopy upon two-photon absorption, UV-VIS single-photon absorption spectroscopy, and spectral fluorescent imaging. To examine whether degradation of the heme moiety occurs when ultrashort laser pulses used in TPEF microscopy imaging interact with Hb, spectroscopic properties of heme precursor protoporphyrin IX (PpIX), a heterocyclic organic compound that consists of four pyrrole rings, were analyzed. In addition, photophysical properties of the Hb photoproduct were compared to photophysical properties of compound (s) formed under Hb oxidation with hydrogen peroxide (H_2O_2) [27,28] to determine whether there are differences in the optical response of products formed under chemically induced Hb degradation. Finally, we examined the potential of the Hb photoproduct to be used for micro-patterning and single erythrocyte tracking.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and processing

Venous blood from healthy human volunteer was collected at the Institute for Transfusiology and Hemobiology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia. The protocol was approved by the Institutional Ethical Review Board (No 9/2021). In conformance with the World Medical Association Declaration of Helsinki, informed consent was obtained from potential participants. The blood was drawn using vacutainer tubes (10 mL plastic vacutainer (BD Vacutainer® EDTA Tubes) with BD Hemogard™ lavender closure containing 18 mg K2EDTA). To

prepare slides for direct TPEF microscopy imaging of erythrocytes, 10 μ L of whole blood was diluted in isotonic saline solution (0.9 % NaCl, Natrii chloridi infundibile 9 g/L, Hemofarm, Serbia) in the volume: volume ratio 1:30. 3 μ L of diluted whole blood sample was smeared onto a microscope slide, covered by a No. 1.5 coverslip and sealed.

2.2. Hb isolation

To isolate hemoglobin, human erythrocytes were precipitated by whole blood centrifugation. To this aim, 10 mL of whole blood was centrifuged at 1811 \times g for 20 min at 4 °C (Megafuge 1.0R, Heraeus centrifuge, Langensfeld, Germany). The supernatant, consisting of leucocytes in plasma, was carefully removed by aspiration and discarded. The precipitated erythrocytes were resuspended in isotonic saline solution (0.9 % NaCl, Natrii chloridi infundibile 9 g/L, Hemofarm, Serbia) in a volume:volume ratio of 1:4 and the suspension was homogenized by fine twisting the test tube. The remaining plasma proteins were removed by centrifugation of the erythrocyte suspension at 1257 \times g for 10 min at 4 °C. These steps were repeated three times. Finally, the precipitated erythrocytes (packed) were resuspended in the isotonic phosphate buffered saline solution (PBS; 0.8 % saline buffered with 10 mM sodium phosphate, pH 7.2–7.4) in the volume: volume ratio of 1:4.

The hemolysis of erythrocytes suspension was performed using hypotonic 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, at 4 °C. Specifically, in 1 mL of erythrocytes suspension in PBS, 9 mL of 5 mM sodium phosphate buffer was added, and the tube was slightly mixed and then left at 4 °C for 1 h. The suspension was centrifuged at 3220 \times g for 40 min at 4 °C. After centrifugation, the supernatant fluid containing released Hb molecules was collected, and the aliquots were filtered through 0.2 μ m syringe filter. If not used immediately, the samples of Hb were aliquoted and stored at –20 °C for future use. Just before the experiment, a Hb aliquot would be thawed, and its concentration checked. Only one freeze-thaw cycle was allowed so the aliquots were discarded after experiment performed. All tests were done with Hb stored for less than two years from Hb isolation, since our previous results showed that it remains intact-undecomposed and non-aggregated under these storage conditions [29].

2.3. Hb thin film preparation for TPEF microscopy imaging

Thin Hb films were prepared by smearing 5 μ L of Hb on the microscope slide, air-drying for 3 min and covered by No. 1.5 coverslip and sealed. The film thickness was <50 μ m, as measured by confocal laser scanning microscopy, i.e., scanning along the z-axis. The smallest step of motorized the microscope stage stepper motor was 0.3 μ m.

2.4. Protoporphyrin IX (PpIX) thin film preparation for TPEF microscopy imaging

Protoporphyrin IX (PpIX) in the form of a disodium salt was purchased from Sigma Aldrich (USA) and used without further purification. 20 μ M stock solution of PpIX was prepared by dissolving 0.1 g of PpIX in 1 M HCl to the total volume of 50 mL. The stock solution was stored at 25 °C protected from light, to minimize photo-induced degradation of PpIX. To prepare slides for TPEF spectroscopy and spectral imaging, the PpIX stock solution was diluted in 1 \times PBS (Sigma Aldrich, 140 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, and 3 mM KCl, pH 7.4) to the final concentration of 5 μ M. 5 μ L of this solution was placed on a microscope slide and treated in the same way as for Hb thin film preparation described above.

2.5. TPEF imaging of Hb treated with H_2O_2

The 22.5 M H_2O_2 was diluted using PBS (Sigma Aldrich, 140 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, and 3 mM KCl, pH 7.4) to a concentration of 250 μ M. Further, 1 mL of Hb at a concentration of 22.3 g/L,

was incubated with 0.5 mL of 250 μ M H₂O₂ for 30 min at room temperature (\approx 21 °C). After incubation, 5 μ L of this mixture was placed on a microscope slide, smeared, dried, covered by a #1.5 coverslip and sealed.

2.6. TPEF scanning microscopy, micropatterning, and micro-spectroscopy

The experimental setup and home built TPEF microscope have been previously reported [30,31]. In this work, we upgraded it for micropatterning and micro-spectroscopic experiments. Schematic drawing of the experimental setup is shown in Fig. 1. The Ti:Sapphire laser (Coherent, Mira 900-F), pumped by a frequency-doubled Nd:YVO4 laser (Coherent, Verdi V10), was used to generate ultrashort laser pulses with the repetition rate of 76 MHz and pulse duration of 160 fs. Galvo-scanning mirrors (Cambridge Technology) are used for raster scanning and micropatterning. Two microscope objectives were used in this study: EC Plan-NEOFLUAR 40 \times /1.3 N.A. oil (Carl Zeiss) for erythrocyte imaging and Plan-Apochromat 20 \times /0.8 N.A. air (Carl Zeiss) for Hb micropatterning. The laser beam was expanded to fulfill the back aperture of the objective lens. A short-pass dichroic mirror was used to reflect the laser beam towards the objective lens and transmit the signal to the 15.1-megapixel digital single-lens reflex (DSLR) camera (Canon, EOS

50D) and the Photomultiplier Tube (PMT) (RCA, PF1006). The DSLR camera was used for taking bright-field images. We removed the infrared filter from the camera to see the back reflection of the laser beam from the cover glass for the purpose of system alignment and to facilitate axial positioning of the thin Hb layer. Band pass filters (VIS and/or 450 nm short pass) were placed in front of the PMT to collect Hb photoproduct fluorescence. A 700 nm long pass filter was used to remove parasitic laser lines shorter than 700 nm. A short pass 700 nm filter was placed in front of the PMT detector to additionally remove back scattered laser light. The Hb photoproduct formation and erythrocytes imaging were performed at 730 nm ultrashort laser pulses. This wavelength is chosen as optimal according to the optical setup and properties of Hb molecule, whilst details are given in our previous study [9].

In addition, we were able to record in situ TPEF emission spectra of the Hb photoproduct and erythrocytes using fiber-coupled, thermoelectrically (TE) cooled charge-coupled device (CCD) spectrometer with reduced thermal noise (Glacier X, BWTEK). To collect the TPEF emission from arbitrary chosen excitation point, the fiber was attached to the adapter plate (Thorlabs, S1SMA) mounted on the precise translation stage (Thorlabs, ST1XY-D/M). Henceforth, we refer to the in situ acquisition of TPEF emission spectra from an arbitrarily chosen point in

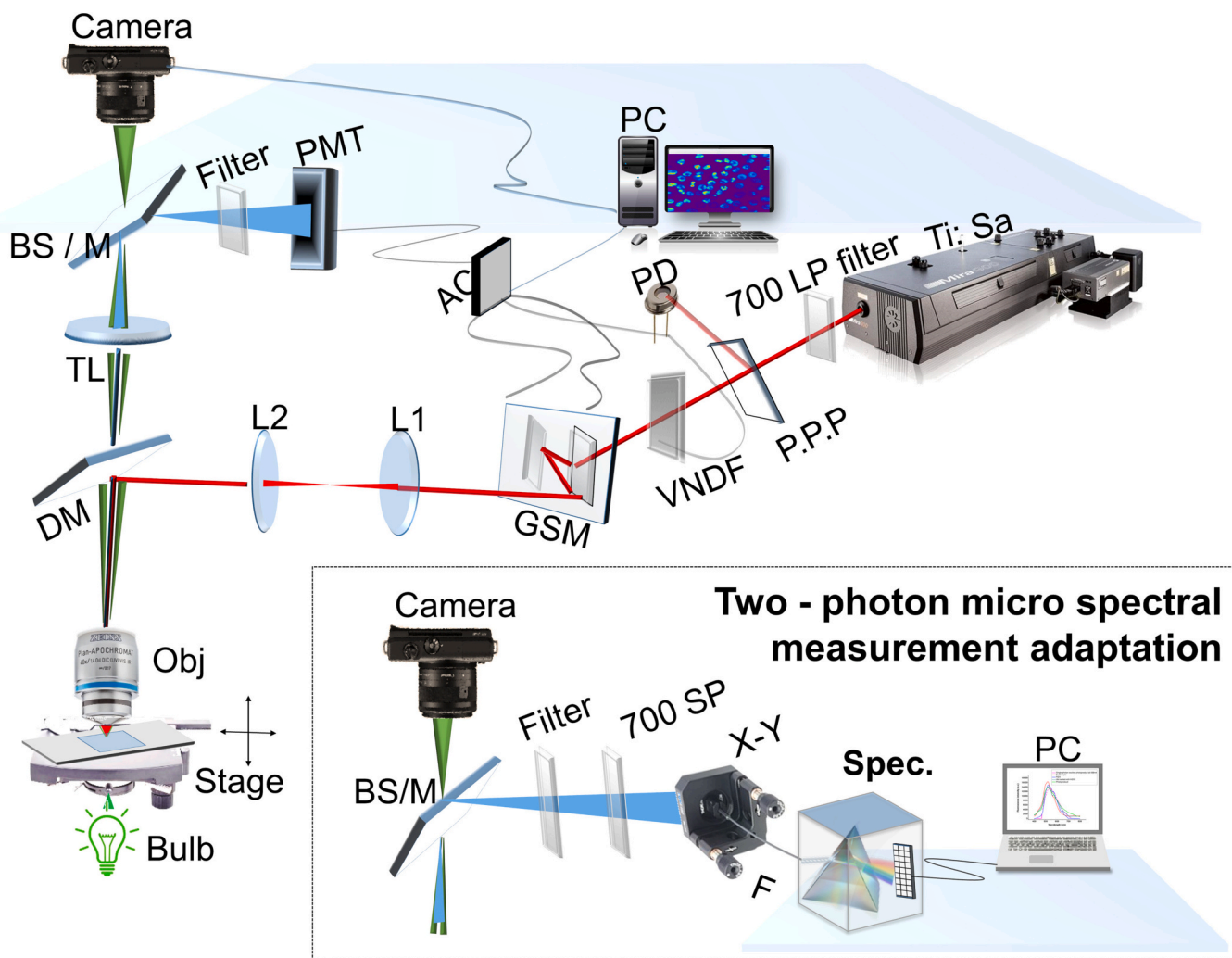


Fig. 1. Schematic 3D drawing of the home-built TPEF microscope with specific adaptations for in situ emission spectra measurement (inset). The TPEF microscope comprising the: Ti:Sa, Ti:Sapphire laser; 700 LP filter, 700 nm long pass filter; P.P.P., plan parallel plate; PD, photo-diode; VNDF, variable neutral density filters; GSM, galvo scanning mirrors; L1 and L2 lenses; AC, acquisition card; DM, dichroic mirror (short pass); Bulb, bulb for bright-field imaging; TL, tube lens; BS/M, beam splitter or mirror; PMT, photomultiplier tube. Inset: The module for micro spectral measurements comprises: 700 SP filter, 700 nm short pass filter; X-Y F, functional X-Y stage controller, Spec, compact high-performance CCD spectrometer with TE cooling.

the sample as micro-spectroscopy. Square-shaped TPEF emission patterns were inscribed by raster-scanning of the sample, whereas arbitrary patterns were inscribed by scanning the beam along a corresponding line. The latter is enabled by a specially written program that recognizes arbitrary figures in both vector, and bitmap formats, and controls the dwell time, power and writing speed of the fs laser beam.

2.7. Single-photon excitation fluorescence (SPEF) and confocal laser scanning microscopy (CLSM)

Hb photoproduct lastingness was assessed by single-photon excitation fluorescence (SPEF) using a confocal laser scanning microscope (LSM 510, Carl Zeiss), equipped with an Ar multi-line (458 nm, 488 nm, and 514 nm) laser and a Plan Apochromat 40 × 1.3 N.A. oil-immersion objective (Carl Zeiss). Optical slice thickness was set to <math><4.3 \mu\text{m}</math>, by choosing the pinhole diameter of 5.65 Airy units, to collect as much as possible fluorescence light from the photoproduct and to increase Signal to noise ratio (SNR). The best signal-to-noise-ratio in the SPEF images of the Hb photoproduct in the square-shaped patterns was at 488 nm excitation wavelength. Emission was collected using the main dichroic beam splitter, HFT 488 nm and long pass filter LP 505 nm.

2.8. Absorption spectra measurements

Absorption spectra of Hb and TPEF irradiated Hb in the intact thin film were measured using the Beckman Coulter DU700

spectrophotometer. A special aluminum holder was designed to hold the microscope slide with Hb specimen, to mimic a cuvette for the spectrophotometer. The dimensions of the holder were 45 mm × 10 mm × 10 mm. The mask with the round hole was placed over the cover glass with Hb layer and photoproduct square pattern. The hole matches the Hb photoproduct enabling the portion of incident light from the spectrophotometer to pass only through the region where the Hb photoproduct is. Prior to the absorption measurements, necessary calibration was performed for the overall transmission.

2.9. Spectral imaging

Spectral confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) imaging was performed using an LSM880 (Carl Zeiss) instrument, equipped with several lasers: three diode lasers (543 nm and 633 nm), and an Ar-ion laser (lines: 458 nm, 488 nm and 514 nm); objective lens (Plan-Apochromat 20×/0.8 N.A.); and gallium arsenide phosphide (GaAsP) spectral array detector. The pinhole size was adjusted to 33 μm (1 Airy unit at 488 nm). The fluorescence (single-photon excitation fluorescence (SPEF)) was spectrally split by a diffraction grating and detected in the 418 nm - 723 nm range with a 3 nm wavelength resolution using the GaAsP spectral array detector. For all wavelengths, the laser power was 9.4 μW at the objective lens. SPEF emission spectra are displayed only for wavelengths that are longer than the wavelength of the excitation laser.

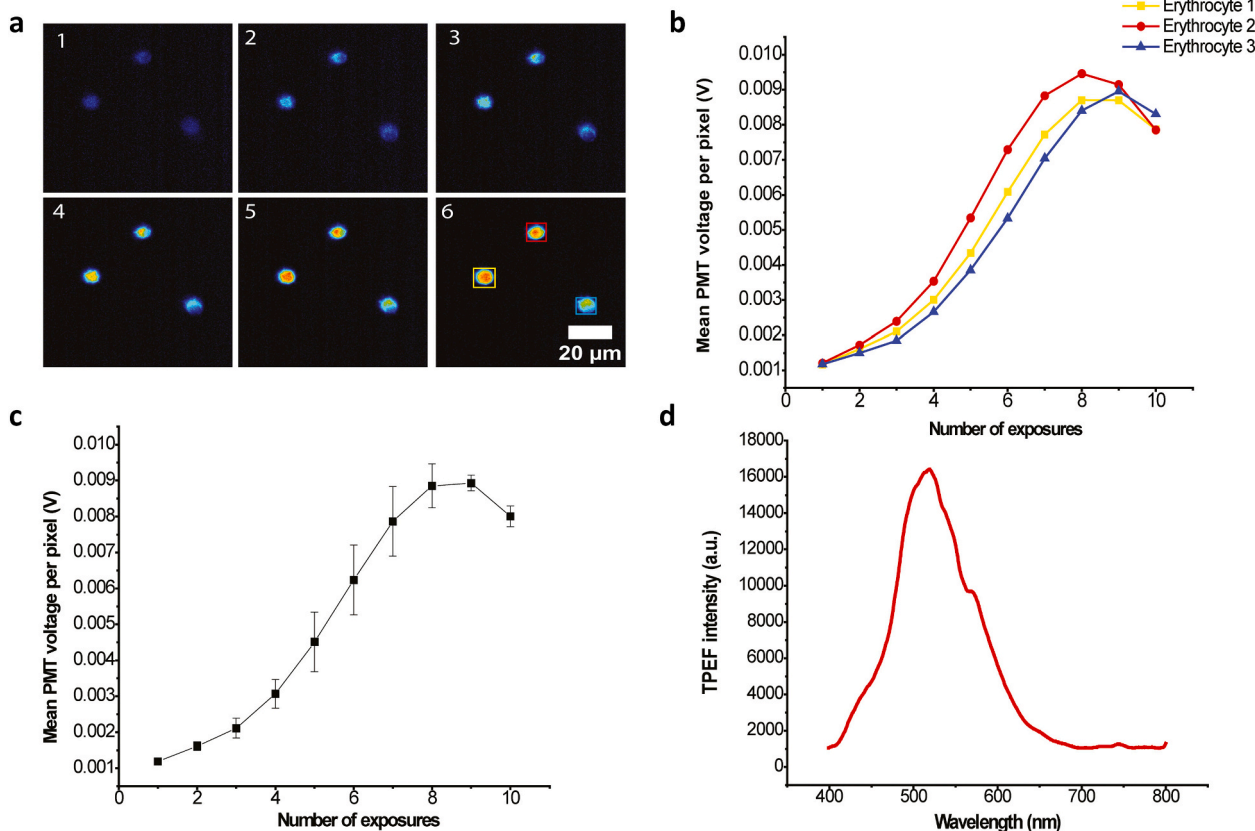


Fig. 2. TPEF microscopy enables both selective erythrocyte photolabeling and imaging in the whole blood. (a) Label-free TPEF microscopy images (6 out of 10) of erythrocytes. The image pixel size is 1024 × 1024 pixels; it is averaged out from 30 scans with the pixel dwell time is 8.53×10^{-4} s. In total, each image took 26.1 s to be recorded, which represents a single unit of exposure. The image intensity is represented by pseudocolor code of PMT voltage values for each pixel (dark blue – lowest TPEF signal, red – highest TPEF signal); (b) Mean pixel values of PMT voltage proportional to the TPEF intensity for each ROI (yellow, red and blue square box) shown in (a), presented with the curve of the corresponding colour. Mean pixel values were calculated from region of interest (ROI), (yellow, red and blue squares) and for each image, the square size is 100 × 100 pixels; (c) Black curve is average of three erythrocytes shown in (b), standard error was presented for the ordinate (voltage); (d) TPEF spectrum recorded in an arbitrarily selected point in a single erythrocyte, using micro-spectral measurement adaptation. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3. Results and discussion

3.1. Photo-labeling of erythrocytes using TPEF microscopy and micro-spectroscopy analysis of erythrocytes fluorescence emission

To confirm already demonstrated feasibility of TPEF microscopy for erythrocytes imaging [8,9], we initially performed an analysis on diluted human whole blood. The blood was diluted in order to get sparse erythrocytes that are not stacked to each other and clearly distinguishable at the image. TPEF microscopy allowed us to selectively photo-label individual erythrocytes in a whole blood specimen. Here, photo-labeling refers to the process of rendering fluorescent individual erythrocytes using ultrashort 730 nm laser pulses. The gradual increase of TPEF from the irradiated erythrocytes as the laser beam scans over them is shown in Fig. 2a. This result was in accordance with the already demonstrated increase of the fluorescence intensity in the erythrocytes upon illumination with ultrashort laser pulses and formation of a so called Hb photoproduct [26]. Herein, the increase of TPEF signal has been proven through the PMT voltage dependence on the number of exposures (Fig. 2b), since PMT voltage is directly proportional to the fluorescence

intensity. The abscissa shows the number of exposures whereat one exposure refers to a series of 30 consecutive image frames acquired by raster laser scanning, the acquisition of which lasted ~ 26.1 s. The ordinate shows the mean PMT voltage *per exposure per pixel* of the rectangular regions given in the last image (no.6) at Fig. 2a. The average PMT voltage i.e., fluorescence intensity curve is presented in Fig. 2c. In addition, the TPEF emission spectrum was acquired (Fig. 2d) using a CCD array fiber optic spectrometer mounted on the nonlinear microscope (Fig. 1 inset).

3.2. Hb photoproduct formation using 730 nm ultrashort laser pulses

To ascertain that the observed increase in TPEF intensity comes solely from the Hb photoproduct that was formed upon erythrocytes illumination with ultrashort 730 nm laser pulses, but not from other molecules, we performed experiments using isolated Hb. To this aim, square-shaped patterns were inscribed in the thin Hb film in a spatio-temporally controlled manner: 1024×1024 pixels at average laser power of 20 mW (Fig. 3a). Both SPEF (Fig. 3b) and TPEF images (Fig. 3c) were acquired. The acquisition procedure was repeated 10 times

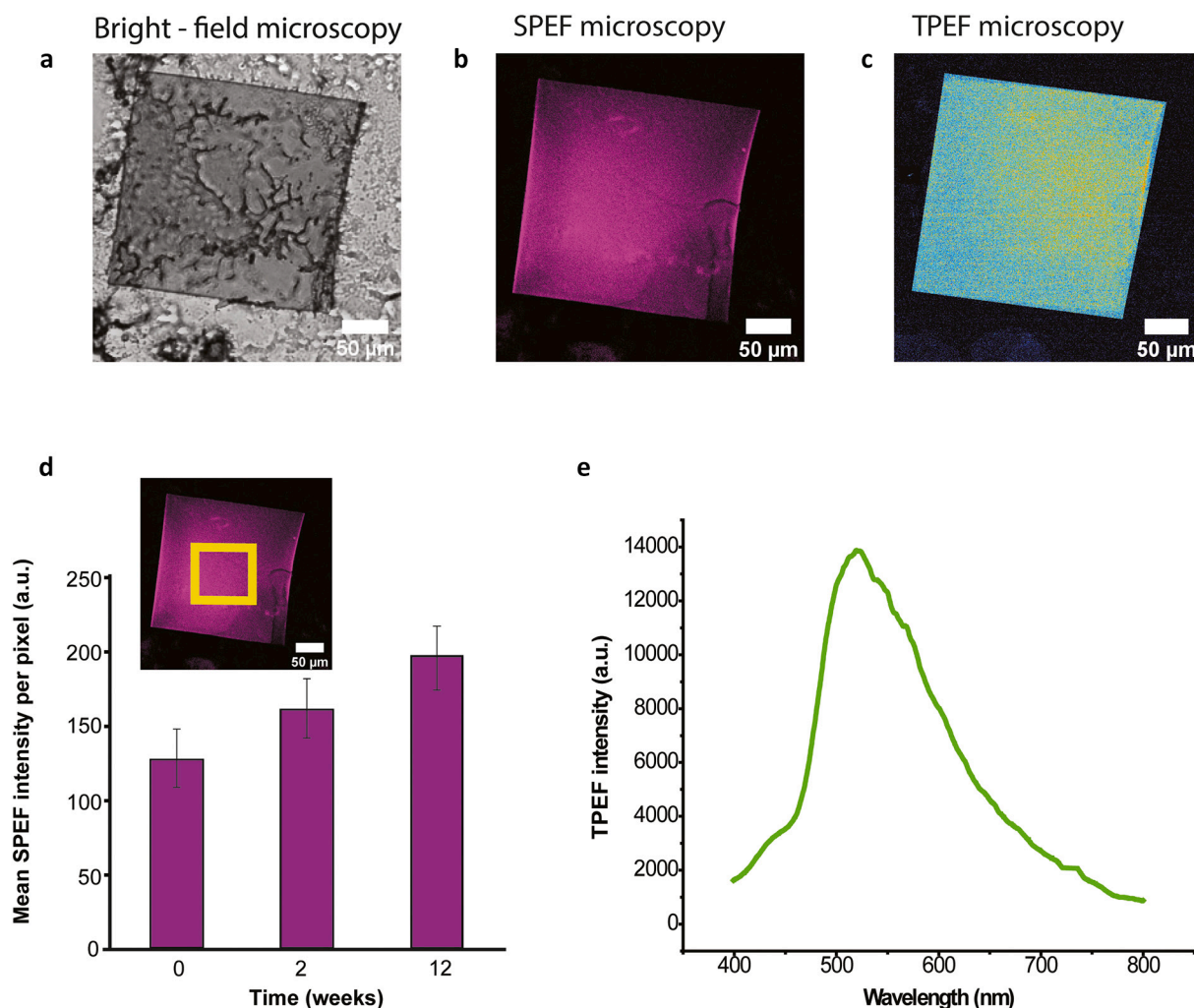


Fig. 3. SPEF spectra of the Hb photoproduct formed upon Hb thin film exposure to ultrashort 730 nm laser pulses. (a) Bright-field microscopy image of the specimen shown reveals that the Hb photoproduct (dark grey square) is less optically translucent than Hb (light grey surrounding); (b) Single-photon excitation fluorescence (SPEF) emission image of the specimen shown in (a) reveals that Hb photoproduct SPEF can be excited at 488 nm (plum square) whereas Hb cannot (black surrounding); (c) Representative TPEF microscopy image showing intense emission in the yellow-green square-shaped area where the Hb photoproduct was formed, in comparison to the non-fluorescent Hb in the surrounding (black); (d) The Hb photoproduct is lasting and its SPEF emission properties are preserved over extended time, as evident from the mean SPEF intensity per pixel (measured in the yellow rectangular area in the inset); (e) TPEF spectrum of the Hb photoproduct recorded in an arbitrarily selected point in the thin layer. (For interpretation of the references to this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(number of exposures) after 8 scanning times the maximum TPEF intensity was reached, after that the TPEF intensity started to decrease due to photobleaching (see Fig. 2b). To demonstrate that strong TPEF emission is observed only from the region that was exposed to ultrashort 730 nm laser pulses, the field of view, i.e., the scanned region was expanded, the average laser power was lowered down to 2.5 mW and a TPEF image was acquired (Fig. 3c). In addition, bright field imaging clearly showed that transmission properties of the extensively illuminated square-shaped area have become less transparent (Fig. 3a). Finally, using single-photon excitation at 488 nm, we detected SPEF emission from the Hb photoproduct formed only in the region exposed to ultrashort 730 nm laser pulses, but not in the surrounding region (Fig. 3b, plum). Here, it is worth reminding that Hb is not naturally fluorescent [26], which is obvious from the dark region around the fluorescent square (Fig. 3a and c). The photoproduct formation depends on exposure time and laser average power, among other parameters that are fixed in our experiment (wavelength, repetition rate, pulse duration etc.). The fluorescence intensity signal starts to increase even after the first exposure. For Hb isolated as stated in previous Section 2.2, TPEF intensity of the Hb photoproduct becomes detectable at a laser excitation power of approximately 10 mW after the first exposure, which corresponds to the deposited energy of 261 mJ on the square area $62,500 \mu\text{m}^2$.

Similarly, to erythrocytes, the increase in fluorescence intensity was gradual with the number of scanning times (i.e., number of exposures) across the square area which is proportional to the total absorbed dose/energy (plot is equivalent to the plot shown in Fig. 2b). This suggests that ultrashort laser pulses interact directly with Hb to form photoproduct in the erythrocyte. Longitudinal SPEF recordings showed that the Hb photoproduct is stable over a considerably long time (Fig. 3d). The TPEF spectrum of the Hb photoproduct in the thin film showed maximum at (550 ± 2) nm (Fig. 3e), the same to the TPEF emission spectrum recorded from a single erythrocyte (Fig. 2c). This observation suggests that ultrashort laser pulses interact solely with Hb in the erythrocytes from the whole blood, forming the same photoproduct. Or, at least, one could say that the interaction of the ultrashort laser pulses with other molecular species in erythrocytes is negligible, at the given conditions. The dynamic of Hb photoproduct formation is also the same in erythrocytes and Hb thin film: gradual increase of the fluorescence intensity with number of exposures that end up with saturation plateau. We might anticipate that interaction of ultrashort laser pulses with Hb is mainly followed up with an intensive Hb degradation, due to the increasing fluorescence intensity over time and the eventual saturation of the fluorescence when the majority of Hb in focal volume is degraded.

3.3. UV-VIS absorption spectroscopy of TPEF irradiated and non-irradiated thin Hb layer

To characterize the single-photon absorption spectra of Hb and the TPEF irradiated Hb in the intact thin film, measurements were performed outside and inside the illuminated square-shaped region (Fig. 3a-c), respectively. The term irradiated Hb was used because of the measurement procedure of the absorption spectra. Since photoproduct was formed in a thin layer of Hb film so that both Hb and the photoproduct are on the same optical path. In addition, some Hb remains unconverted into the photoproduct even in the treated volume. That's why the recorded absorption spectrum is not solely from the photoproduct, but from both, photoproduct and Hb together.

As expected, the UV-VIS absorption spectrum of Hb thin film showed spectral bands that are characteristic of oxyHb: an absorption band in the UV region with a maximum at $\lambda_{\text{max}}^{\text{UV}} \approx 275$ nm due to $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions; and several absorption bands, such as the $\lambda_{\text{max}}^{\text{His}}$ 350 nm attributed to the absorption of the non-covalent bond between iron and histidine in the Hb protein part; the Soret or B band $\lambda_{\text{max}}^{\text{Soret}}$ at (410 ± 2) nm and the Q band with two transitions, the $\lambda_{\text{max}}^{\text{Q}\beta}$ band at 539 nm and $\lambda_{\text{max}}^{\text{Q}\alpha}$ band at

577 nm [32] (Fig. 4, blue line). Similarly, the UV-VIS absorption spectrum of the TPEF irradiated Hb thin film showed the same bands, but clear differences in band intensity and/or peak position were noted (Fig. 4, red line). The observed differences and important relations between them are summarized in Table 1.

A 7 nm bathochromic shift of the Soret band was noted in the irradiated Hb with a significant decrease in Soret band intensity (Fig. 4, Table 1). The bands in the VIS part of the Hb absorption spectrum originate from the heme group, and changes in their positions and intensities are indicators of displacements along the normal coordinates of the porphyrin ring [33]. The ratio of $\Delta\alpha/\Delta\beta$ was <1 for both Hb and Hb after irradiation with fs laser pulses (Fig. 4, Table 1). Still, this ratio in irradiated Hb was significantly lower than untreated Hb indicating the degradation of Hb upon the interaction with fs laser pulses. The mentioned 7 nm bathochromic shift of the Soret peak in the irradiated Hb, indicates the transformation of oxygenated to oxidized Hb species [33–35]. Reduced ratio $A_{\text{max}}^{\text{Soret}}/A_{560}$ ratios of irradiated Hb in comparison to intact Hb indicate free heme presence and breakdown of Hb molecule [33].

3.4. Single-photon excitation fluorescence (SPEF) emission spectra of thin film Hb photoproduct by confocal microscopy spectral imaging

The Hb photoproduct square shape patterns are imaged using single-photon excitation confocal microscopy (Fig. 5a), and square shape patterns (Fig. 5b) were formed previously by the exposure to the ultrashort laser pulses as explained in Section 2.9. SPEF emission spectra were recorded for different excitation wavelengths (Fig. 5c) from the Hb region of interest 1 (ROI1, dashed circle) and from the photoproduct region of interest (ROI 2, solid circle). Excitation efficiency dependence was constructed by extracting emission maxima at different excitation wavelengths (Fig. 5d). The SPEF emission spectrum acquired using the shortest excitation wavelength, $\lambda_{\text{exc}} = 458$ nm, showed a fluorescence emission maximum at $\lambda_{\text{em}} = 550$ nm and a broad emission band (red curve), being good agreement with TPEF emission spectrum (Fig. 3e). The emission spectra acquired using excitation wavelengths longer than 458 nm, $\lambda_{\text{exc}} > 458$ nm, showed emission maxima that are slightly red shifted to one another, possibly suggesting that the Hb photoproduct may comprise several spectrally distinct molecules. The existence of more than one molecular species is confirmed by the absorption spectroscopy (Section 3.3) and it is in accordance with the results given in

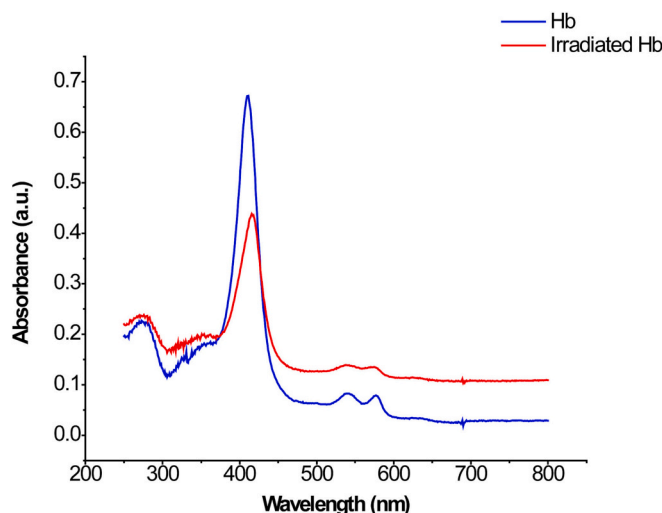


Fig. 4. Absorption spectra of Hb and the irradiated Hb thin layers. UV-VIS absorption spectra of intact Hb thin layer (blue) and irradiated Hb that contains the photoproduct (red line). All characteristics of absorption spectra are given in Table 1. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1

Characteristics of Hb and Hb photoproduct UV-VIS absorption spectra. The mean and standard deviation of four separate absorbance measurements is represented.

Absorption band maximum position / intensity	Hb	Irradiated Hb region containing the photoproduct
λ_{max}^{UV} / nm	273 ± 2	272 ± 2
λ_{max}^{His} / nm	351 ± 2	351 ± 2
λ_{max}^{Soret} / nm	410 ± 2	417 ± 2
$\lambda_{max}^{Q\beta}$ / nm	539 ± 2	538 ± 2
$\lambda_{max}^{Q\alpha}$ / nm	577 ± 2	576 ± 2
A_{max}^{UV}	0.226 ± 0.003	0.237 ± 0.001
A_{max}^{His}	0.179 ± 0.008	0.200 ± 0.002
A_{max}^{Soret}	0.671 ± 0.002	0.438 ± 0.001
$A_{max}^{Q\beta}$	0.082 ± 0.007	0.139 ± 0.003
$A_{max}^{Q\alpha}$	0.079 ± 0.001	0.134 ± 0.003
A_{560}	0.063 ± 0.002	0.132 ± 0.005
$\Delta A_{Q\alpha} / \Delta A_{Q\beta}$	0.804 ± 0.027	0.371 ± 0.014
$= (A_{max}^{Q\alpha} - A_{560}) / (A_{max}^{Q\beta} - A_{560})$	0.027	
$A_{max}^{Soret} / A_{max}^{Q\alpha}$	8.506 ± 0.046	3.254 ± 0.007
$A_{max}^{Soret} / A_{max}^{UV}$	2.962 ± 0.042	1.848 ± 0.014

[33–35]. In addition, excited by the different wavelengths one molecular species would give just the change in the fluorescence intensity while keeping the position of the spectral maximum fixed.

3.5. TPEF emission of PpIX

To characterize the Hb iron ion role in Hb photoproduct formation, TPEF spectra of PpIX were investigated. The obtained TPEF emission spectrum of PpIX (Fig. 6a black line) shows both distinctions and similarities to TPEF spectrum of the Hb photoproduct (Fig. 3e). Most notably, unlike Hb, PpIX is easily excited and TPEF emission is readily observed even at low irradiation intensities (Fig. 6a, black curve). However, the TPEF emission observed at low irradiation intensities originated predominantly from unaltered PpIX molecules, as evident from previously published data [36]. When using higher laser power (e. g., 16.5 mW), the TPEF emission spectrum of PpIX is considerably changed: becoming broader and with a maximum peak around 550 nm (Fig. 6a, blue curve), resembling the TPEF emission spectrum of the Hb photoproduct (Fig. 3e). This, in turn, suggests that intense irradiation of PpIX leads to the generation of PpIX photoproduct that is similar to the Hb photoproduct, so that iron atom is not necessary for the formation of Hb photoproduct.

3.6. TPEF emission of Hb treated with H₂O₂

It has been shown that Hb treatment with H₂O₂ also leads to the formation of a fluorescent product [27,28]. To determine whether similar photoproducts are formed under Hb treatment with H₂O₂ as upon its interaction with 730 nm ultrashort laser pulses, we compared how the TPEF intensity changed when increasing the exposure time (Fig. 6b) and TPEF spectra (Fig. 6c). Unlike for Hb thin film, where increase of fluorescence intensity and saturation were eventually observed (Fig. 6b, light green squares), the fluorescence of the H₂O₂-treated Hb shows a high TPEF emission intensity immediately upon excitation, even at the first exposure (Fig. 6b, olive dots). The increase of fluorescence in Hb film (Fig. 6b, light green) has the same trend as in erythrocytes (Fig. 2b). The slight discrepancy is due to different number of graph points and concentration of Hb in erythrocytes and thin Hb film.

Moreover, the observed TPEF intensity was independent on the number of exposures, i.e., absorbed dose, of 730 nm ultrashort laser pulses. This confirms the hypothesis of the photodegradation of Hb involved in the photoproduct formation, since interaction between Hb and a 10 (or more) fold excess H₂O₂ leads to Hb degradation according to the [28]. Finally, the TPEF spectrum of H₂O₂-treated Hb thin film showed very good agreement with the TPEF spectra of Hb thin film treated with ultrashort laser pulses, the erythrocytes and the PpIX layer under high laser power, 16.5 mW (Fig. 6c).

Taken together, this suggests that upon Hb reaction with H₂O₂ and in the photochemical interaction of ultrashort laser pulses with Hb, the Hb photoproduct shows, at least with regard to TPEF emission, similar features. The overlap between the TPEF emission spectra of PpIX and Hb thin film suggests that heme, i.e., porphyrin rings photoexcitation playing a significant role in the Hb photoproduct formation. This could even include heme degradation, as already demonstrated within diseased so-called Köln erythrocytes, where observed fluorescence does not resemble that of porphyrins, chelated or otherwise, but does reveal some characteristics of dypyrrolic compound spectra [37]. Since dypyrrolic urinary pigments in patients with unstable hemoglobin disease are characterized and support the previous assumption regarding fluorescent Köln erythrocytes, it is more likely that under ultrashort laser pulses the heme's porphyrin ring breakage is enhanced. Importantly, fluorescent heme degradation products are already recognized as markers of red blood cell (RBC) oxidative stress [38], based on the original work of Nagababu and Rifkind, 1998, who have found that even small portion of the non-neutralized hydrogen peroxide in erythrocytes degrades the protoporphyrin and produce stable fluorescent heme degradation products. Nagababu and Rifkind 1998 reported two heme degradation products, one with an excitation wavelength of 321 nm and emission wavelength in the region of 465 nm and the second one with the excitation wavelength of 460 nm and emission wavelength in the region of 525 nm, based on the results that the same fluorescent bands were obtained after hydrogen peroxide treatment of heme or hemin. The broad emission spectra of a Hb photoproduct obtained in our study indicates that there are probably more than one Hb photoproduct species as well. The same authors [39] revealed that the mechanism for the generation of heme degradation products needs an initial reaction with hydrogen peroxide, producing Fe (IV) ferrylhemoglobin (ferrylHb) species, which further reacts with the second molecule of hydrogen peroxide producing superoxide radical, that can be retained longer in heme pocket than the superoxide formed during Hb autoxidation, and consequently initiating degradation of heme [28]. Namely, even in physiological conditions, RBCs are continuously exposed to both endogenous and exogenous sources of reactive oxygen species (ROS) (i.e., superoxide and hydrogen peroxide (H₂O₂)), which are mainly neutralized by the RBC antioxidant system. However, the autoxidation of Hb bound to the membrane is unavailable to the RBC antioxidant system which is mostly cytosolic. This process is especially pronounced when Hb is partially oxygenated, resulting in an increased rate of autoxidation and increased affinity for the RBC membrane, eventually affecting RBC deformability [38]. Even in fresh RBC samples heme degradation products can be found, and the amount of heme degradation increases in older RBCs [38]. Taking all these findings together, the interaction of ultrashort laser pulses with hemoglobin more likely accelerates the deoxygenation of hemoglobin and generation of superoxide radical, which affects heme, inducing the formation of stable fluorescent photoproduct.

3.7. Applications

3.7.1. Selective photo-labeling and live tracking of photo-labeled erythrocytes

Thanks to the high stability of the Hb photoproduct obtained upon interaction of the 730 nm ultrashort laser pulses with Hb molecules (Fig. 3d) and high spatiotemporal selectivity of our TPEF scanning microscope, we performed live tracking of individually labeled erythrocyte

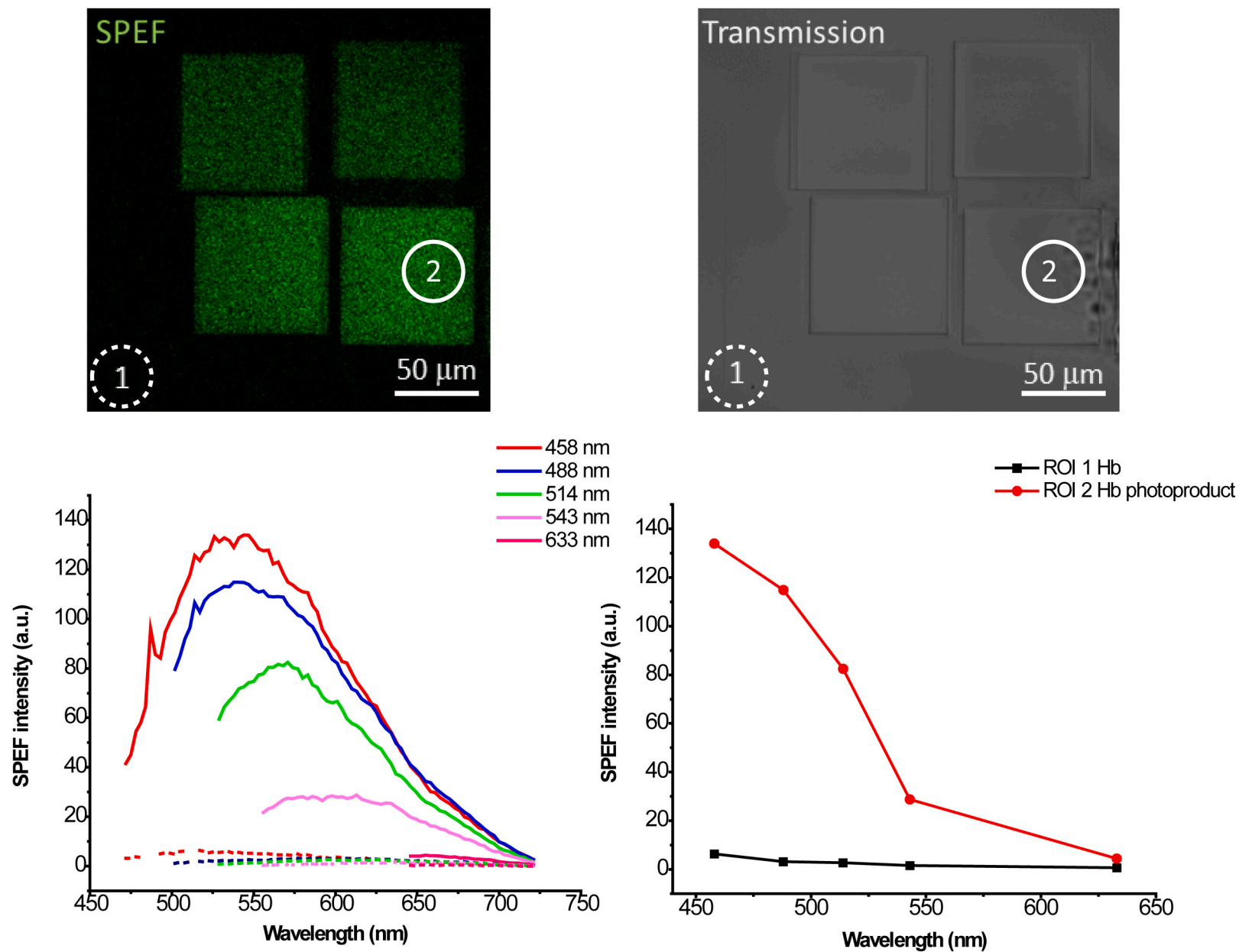


Fig. 5. Spectral imaging of Hb photoproduct patterns. (a) Single-photon excitation (SPEF) fluorescent image of the Hb photoproduct patterns recorded at 458 nm excitation, dashed circle represents region of interest (ROI 1) which is not irradiated by ultrashort pulsed laser beam under conditions needed for photoproduct formation, and solid circle represents ROI 2 which is irradiated by ultrashort pulsed laser beam, and it's clearly separate by photoproduct fluorescence emission, (b) Corresponding Bright-field image; (c) Single-photon excitation fluorescence spectra, read-out from ROI 1 (dashed line) for different excitation wavelengths and from ROI 2 (solid line); (d) Excitation efficiency: the emission intensity maxima at the different excitation wavelengths from ROI 1 Hb (untreated Hb) and ROI 2 (Hb photoproduct).

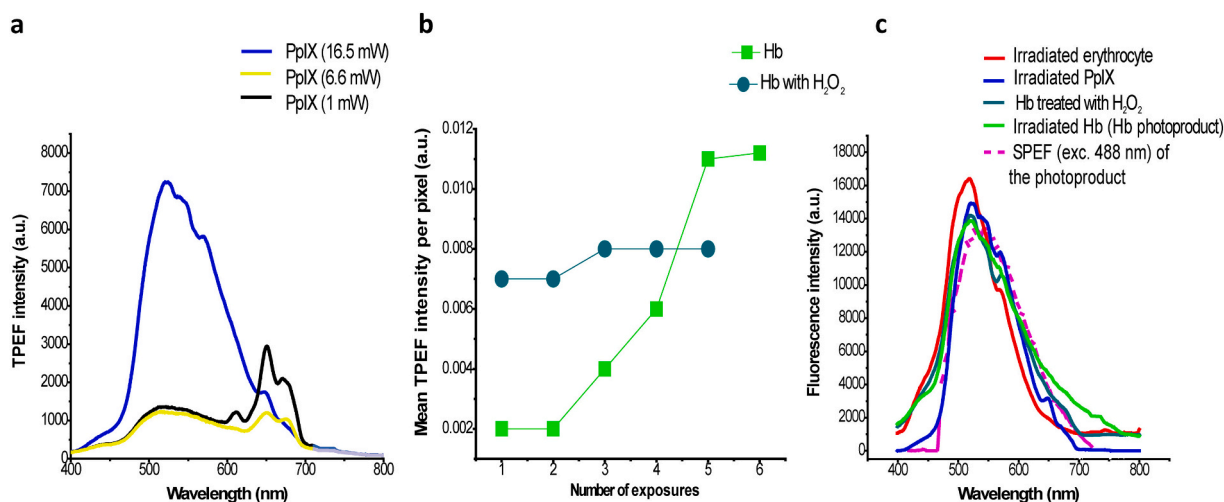


Fig. 6. TPEF spectra of PpIX and H₂O₂-treated Hb. (a) TPEF spectra of PpIX irradiated using different ultrashort pulsed laser powers (1.0 mW, black; 6.6 mW, yellow; 16.5 mW, dark blue); (b) Dependence of TPEF intensity vs. number of exposures in Hb thin film and H₂O₂-treated Hb thin film; (c) Overlapped TPEF spectra of Hb photoproduct (obtained in thin layer of Hb, green), the erythrocyte (red), thin layer PpIX under the laser power conditions (16.5 mW, blue), H₂O₂-treated Hb thin layer (cobalt blue) and Hb photoproduct SPEF spectrum (dashed purple). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(s) *in vitro* in the whole blood (Fig. 7 a-d). We present four timelapse images from the video (Supplemental Information) in which one erythrocyte is labeled by focused fs laser beam and then traced during its random motion. This was inspired by [11] where flow of the erythrocytes was shown in the vasculature of a whole, live animal but only with static images, while we bring the dynamics of movement (Fig. 7 and corresponding video). Although the photo-labeling and tracking were performed *in vitro*, this method based on TPEF microscopy will enable to track with long-term period individual erythrocyte in a tissue [40] and blood vessel in laboratory animals, for instance in zebra fish [11] or even in mouse brain vasculature [41–43]. According to [41–43], where shadows of erythrocytes were traced in the blood flow in live animals through the cranial window using TPEF imaging, erythrocytes could be fluorescently activated by a fs laser beam and tracked through the vessels. In addition to selective photo-labeling of solely and deliberately chosen erythrocytes, that can be achieved by spatiotemporal control of the laser beam, but not by bulk H₂O₂ treatment, there are some more advantages of the presented method. Namely, treating the erythrocytes with H₂O₂ is rather uncontrollable in terms of targeted transformation of Hb only into the fluorescent molecule(s). H₂O₂ interact with other molecules in the erythrocytes' membrane and other structures which might be damaged or altered. Also, erythrocytes' morphology and related Hb distribution would be altered. Using the method of the laser photo-labeling presented in this work, only Hb molecules would be affected, and the erythrocytes would preserve their original morphology as well as its original Hb distribution which was already shown in [9]. The erythrocytes morphology and internal Hb distribution are one of key markers indicating the cell adaptation to physiological processes and their response to pathological conditions [9]. Eventually, the proposed method might have application for erythrocytes tracing in the blood vessels of the live animals even in imaging of highly bloodied and low transparent organs such as kidneys, since TPEF microscopy is extensively used nowadays for those purposes [41]. Prior investigations have unequivocally demonstrated that the morphology of erythrocytes can be studied using Two-Photon Excitation Fluorescence (TPEF) imaging, which enables examination of their oxygenation status [15], as well as distribution of Hb [9]. However, it is unclear whether the ultrashort laser pulses interferes with Hb's ability to perform its primary function of binding and releasing oxygen. In our present study, we establish that Hb undergoes alterations as a result of such interaction.

Having in mind the relationship of oxidative stress and hemoglobin,

hemoglobin-based TPEF methodology is an emerging platform for the assessment of redox status of erythrocytes and their deformability under both physiological and pathophysiological conditions and even a broader spectrum of diseases that share the common feature of the appearance of extracellular hemoglobin or early cancer progression in means of neoangiogenesis. In this respect, photo acoustic microscopy can be employed for tracking of erythrocytes as suggested in [11] but with higher repetition rate lasers. Also, this technique can be used for investigation of oxygen saturation in the blood vessels [15].

3.7.2. Pattern inscription (micropatterning) in Hb layer

The long-term stability of the Hb photoproduct, its fluorescence and spatial precision of TPEF emission microscopy, enabled one more application – micro patterning of the Hb layer (Fig. 8). The inscribed patterns can stay fluorescent even for several months after being inscribed. In Fig. 8 a-d simple, spot-wise, patterns are presented in addition to the uniform square area. The spots were obtained from the diffraction limited focal volume and demonstrate the method limitation in terms of the spatial resolution. At each figure, a new spot-wise pattern was added, while the previous ones are still clearly visible. To demonstrate possibility and versatility of the method, as well as potential applications, we further wrote the letters “HEMMAGINERO” (dimensions 60 μm × 6 μm) in the Hb layer (Fig. 8e).

In terms of optical and spectroscopic response to the treatment with ultrashort laser pulses all mammalian [4,9,12,44,45] or even other vertebrates [46] Hb and erythrocytes are the same [47]. On the other hand, the slaughterhouses mammalian blood is a waste material from which Hb can be isolated in relatively low cost and relatively simple technological processes [48,49]. This might be a starting point for utilization of the Hb as the material for optical memories [50], hemoglobin-based therapeutics [51], intravital microscopy [52], conversion of micro fluorescent information into the document security or mass production of calibration samples in fluorescent microscopy [53–55]. Microscopic slides with fluorescent patterns are already commercially available [56] and broadly used for calibration and resolution measurements. While the fluorescence durability of the patterns in the existing materials remains unknown, we suggest Hb as a material for long lasting fluorescent patterns. In addition, the utilization of Hb from wasted slaughterhouse blood as the widely available material will be nature friendly since this material is considered to be severe pollutant [49].

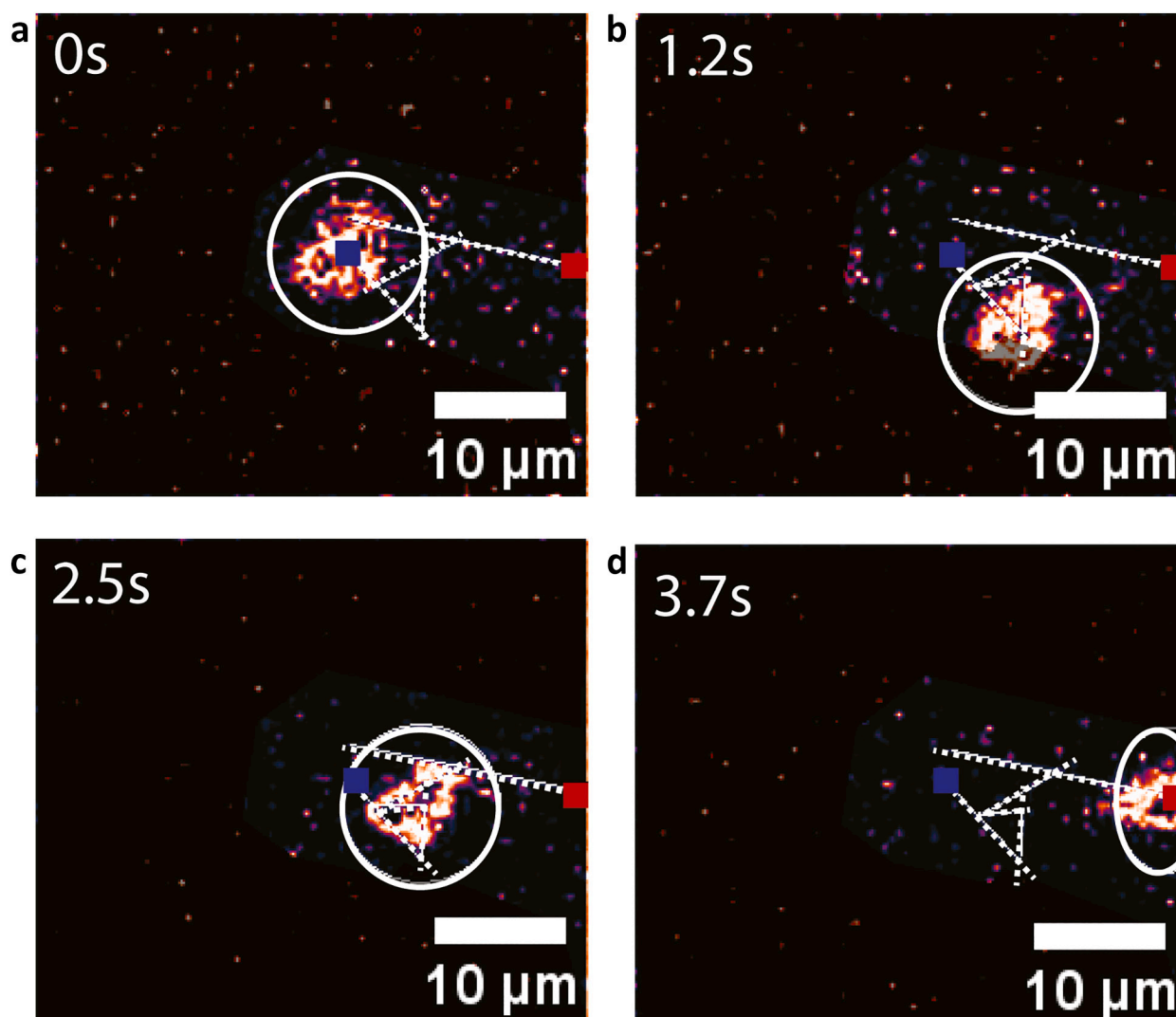


Fig. 7. Timelapse TPEF emission images of a single erythrocyte (encircled white). (a-d) Photo-labeled erythrocyte tracking in whole blood. The white dashed lines represent erythrocyte's trajectory with starting position (blue square) and final position (red square). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

4. Conclusion

Using different spectroscopic techniques, in this study, we presented a novel insight into the photophysical properties of the fluorescent product emerged after exposure of Hb to 730 nm ultrashort laser pulses (hence Hb photoproduct) and its possible applications. We suggest that the interaction of the Hb with the ultrashort laser pulses in NIR region leads to the degradation of the Hb molecules and release of the iron, ending up with iron-free fluorescent species comparable to those emerged from the interaction of Hb with H_2O_2 . Unlike the chemical interaction of Hb with H_2O_2 that occurs in bulk solution, using the tightly focused ultrashort pulsed laser beam the Hb photoproduct can be formed in spatiotemporal controllable manner without interaction with other molecules and erythrocytes structures (e.g. membrane). In other words, we can irradiate selected erythrocytes solely, and the laser pulses will alter primarily Hb, but not the other molecules. We inscribed sub-micrometer fluorescent patterns on a Hb thin film by the spatiotemporal control, of ultrashort pulsed laser beam. We have also induced the Hb photoproduct formation in a single human healthy erythrocyte making them fluorescent in the sample of whole blood and track their movement in space and time. The present study could contribute towards understanding photophysical properties of photoproduct, formed

by the interaction of ultrashort laser pulses with Hb and erythrocytes, establishing a foundation for the future progress in the field of bio-derived biomaterials.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125312>.

CRediT authorship contribution statement

M. Radmilović prepared the samples, performed TPEF imaging, TPEF spectra measurements and absorption spectra measurements, erythrocytes tracking, Hb micro-patterning, and prepared all the images; I. Drvenica prepared the samples and supervised Hb and erythrocytes isolation, managed the research; M. Rabasović constructed the TPEF experimental setup, supervised the TPEF imaging and spectra measurements, managed the research; V. Ilić supervised sample preparation, managed the research; D. Pavlović prepared the samples and imaged the erythrocytes by TPEF microscopy and measured absorption spectra; S. Oasa performed spectral imaging; V. Vukojević supervised spectral imaging; M. Perić performed confocal imaging; S. Nikolić maintained TPEF experimental setup and modified the imaging software; A. Krmpot constructed the TPEF experimental setup, supervised the measurements, managed the research. All the authors wrote and reviewed the

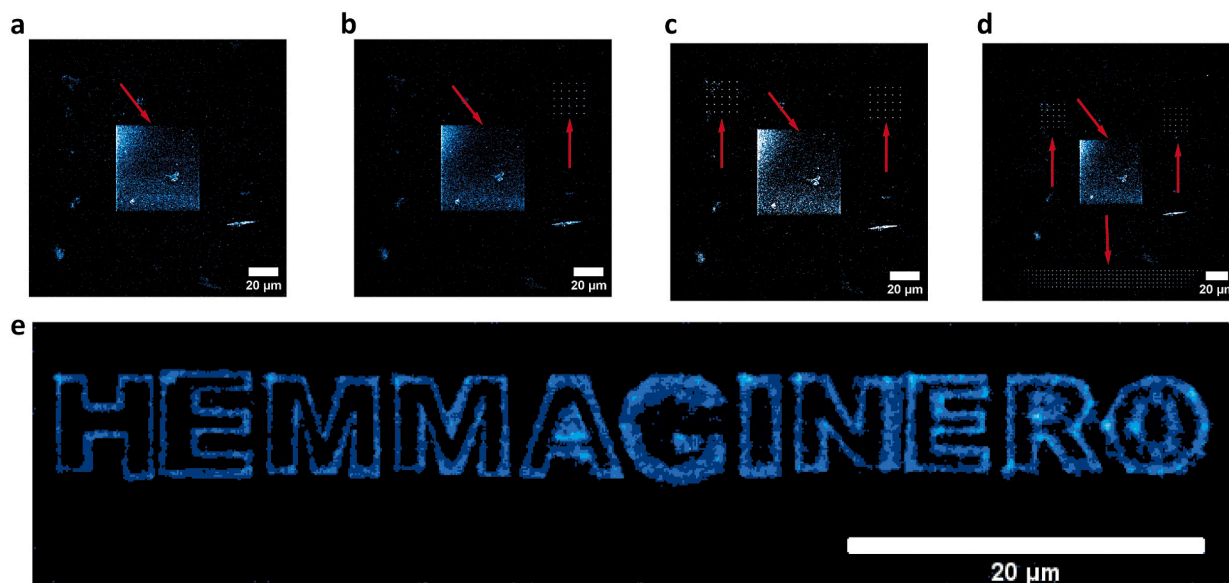


Fig. 8. Micropatterning in Hb layer by fs laser pulses. (a-d) Arbitrary uniform and spot-wise patterns (red arrow pointed) inscribed in the thin Hb film by ultrashort laser pulses. The patterns exhibit increased TPEF signal (marked by red arrows). (e) Fluorescent Hb photoproduct in the form of letters pattern. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

manuscript. This article is a part of M. Radmilović's PhD thesis.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgement

We would like to thank to Milan Minić, Institute of Physics Belgrade for the technical support and to the staff of the Center for Laser Microscopy, Faculty of Biology, University of Belgrade, Serbia. This work was supported by the Science Fund of the Republic of Serbia [program PROMIS, project HEMMAGINERO, grant number 6066079] and Qatar National Research Fund [grant number PPM 04-0131-200019]. The authors acknowledge funding provided by the Institute of Physics Belgrade, through the grant by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia and the Institute for Medical Research University of Belgrade, National Institute of the Republic of Serbia, through the contract No. 451-03-47/2023-01/200015.

References

- [1] L. Kiger, C. Vasseur, E. Domingues-Hamdi, G. Truan, M.C. Marden, V. Baudin-Creuzat, Dynamics of α -Hb chain binding to its chaperone AHSP depends on heme coordination and redox state, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2014 (1840) 277–287, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.015>.
- [2] M. Weissbluth, *Hemoglobin*, Springer, Berlin, 1974, pp. 10–26.
- [3] Q. Sun, W. Zheng, J. Wang, Y. Luo, J.Y. Qu, Mechanism of two-photon excited hemoglobin fluorescence emission, *J. Biomed. Opt.* 20 (2015) 105014, <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.10.105014>.
- [4] W. Zheng, D. Li, Y. Zeng, Y. Luo, J.Y. Qu, W.R. Zipfel, R.M. Williams, R. Christie, A. Y. Nikitin, B.T. Hyman, W.W. Webb, Two-photon excited hemoglobin fluorescence, *Biomed. Opt. Express* 2 (2011) 71–79, <https://doi.org/10.1364/BOE.2.000071>.
- [5] G.O. Clay, A.C. Millard, C.B. Schaffer, J. Aus-der-Au, P.S. Tsai, J.A. Squier, D. Kleinfeld, Spectroscopy of third-harmonic generation: evidence for resonances in model compounds and ligated hemoglobin, *J. Opt. Soc. Am. B.* 23 (2006) 932, <https://doi.org/10.1364/josab.23.000932>.
- [6] G.O. Clay, C.B. Schaffer, D. Kleinfeld, Large two-photon absorptivity of hemoglobin in the infrared range of 780–880 nm, *J. Chem. Phys.* 126 (2007) 01B609, <https://doi.org/10.1063/1.2404678>.
- [7] N.L. Garrett, A. Lalatsa, I. Uchegbu, A. Schätzlein, J. Moger, Exploring uptake mechanisms of oral nanomedicines using multimodal nonlinear optical microscopy, *J. Biophotonics* 5 (2012) 458–468, <https://doi.org/10.1002/jbio.201200006>.
- [8] G.D. Vigil, S.S. Howard, Photophysical characterization of sickle cell disease hemoglobin by multi-photon microscopy, *Biomed. Opt. Express* 6 (2015) 4098–4104, <https://doi.org/10.1364/boe.6.004098>.
- [9] K. Bukara, S.Z. Jovanić, I.T. Drvenica, A. Stanić, V. Ilić, M.D. Rabasović, D. V. Pantelić, B.M. Jelenković, B. Bugarski, A.J. Krmpot, Mapping of hemoglobin in erythrocytes and erythrocyte ghosts using two photon excitation fluorescence microscopy, *J. Biomed. Opt.* 22 (2017) 026003, <https://doi.org/10.1117/1.jbo.22.2.026003>.
- [10] D. Li, W. Zheng, Y. Zeng, Y. Luo, J.Y. Qu, Two-photon excited hemoglobin fluorescence provides contrast mechanism for label-free imaging of microvasculature in vivo, *Opt. Lett.* 36 (2011) 834–836, <https://doi.org/10.1364/OL.36.008034>.
- [11] Y. Zeng, J. Xu, D. Li, L. Li, Z. Wen, J.Y. Qu, Label-free in vivo flow cytometry in zebrafish using two-photon autofluorescence imaging, *Opt. Lett.* 37 (2012) 2490–2492, <https://doi.org/10.1364/OL.37.002490>.
- [12] D. Li, W. Zheng, S.K. Teh, Y. Zeng, Y. Luo, J.Y. Qu, Time-resolved detection enables standard two-photon fluorescence microscopy for in vivo label-free imaging of microvasculature in tissue, *Opt. Lett.* 36 (2011) 2638–2640, <https://doi.org/10.1364/OL.36.002638>.
- [13] R. Podlizec, J. Mur, J. Petelin, J. Štrancar, R. Petkovšek, Two-photon retinal theranostics by adaptive compact laser source, *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* 126 (2020) 1–9, <https://doi.org/10.1007/s00339-020-03587-2>.
- [14] R.L. Shelton, S.P. Mattison, B.E. Applegate, Volumetric imaging of erythrocytes using label-free multiphoton photoacoustic microscopy, *J. Biophotonics* 7 (2014) 834–840, <https://doi.org/10.1002/jbio.201300059>.
- [15] Y. Wang, S. Hu, K. Maslov, Y. Zhang, Y. Xia, L.V. Wang, In vivo integrated photoacoustic and confocal microscopy of hemoglobin oxygen saturation and oxygen partial pressure, *Opt. Lett.* 36 (2011) 1029, <https://doi.org/10.1364/ol.36.001029>.
- [16] J.J. Yao, L.V. Wang, Photoacoustic microscopy, *Laser Photonics Rev.* 7 (2013) 758–778.
- [17] G.J. Tservelakakis, M. Pavlidis, A. Samaras, G.D. Barmparis, K.G. Mavrikas, I. Draganidis, A. Oikonomou, E. Fanouraki, G.P. Tsironis, G. Zacharakis, Hybrid confocal fluorescence and photoacoustic microscopy for the label-free investigation of melanin accumulation in fish scales, *Sci. Rep.* 12 (2022) 1–14, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11262-0>.
- [18] I. Saytashev, R. Glenn, G.A. Murashova, S. Osseiran, D. Spence, C.L. Evans, M. Dantus, Multiphoton excited hemoglobin fluorescence and third harmonic generation for non-invasive microscopy of stored blood, *Biomed. Opt. Express* 7 (2016) 3449–3460, <https://doi.org/10.1364/boe.7.003449>.
- [19] M.E. Reinhard, M.W. Mara, T. Kroll, H. Lim, R.G. Hadt, R. Alonso-Mori, M. Chollet, J.M. Glownia, S. Nelson, D. Sokaras, K. Kunnus, T.B. van Driel, R.W. Hartsock, K. S. Kjaer, C. Weninger, E. Biasin, L.B. Gee, K.O. Hodgson, B. Hedman, U. Bergmann,

- E.I. Solomon, K.J. Gaffney, Short-lived metal-centered excited state initiates iron-methionine photodissociation in ferrous cytochrome c, *Nat. Commun.* 12 (2021) 1–8, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21423-w>.
- [20] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3822757/>.
- [21] J.G. Mohanty, E. Nagababu, J.M. Rifkind, Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging, *Front. Physiol.* 5 (2014) 1–6, <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00084>.
- [22] S. Sun, A. Lv, S. Li, C. Zhao, Q. Chen, Z. Li, Y. Wang, A. Wu, H. Lin, Biomolecule-based stimuli-responsive nanohybrids for tumor-specific and cascade-enhanced synergistic therapy, *Acta Biomater.* 152 (2022) 484–494, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.08.038>.
- [23] A.I. Alayash, Oxygen therapeutics: can we tame haemoglobin? *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 152–159, <https://doi.org/10.1038/nrd1307>.
- [24] D. Chakraborty, S. Sarkar, P.K. Das, Blood dots: hemoglobin-derived carbon dots as hydrogen peroxide sensors and pro-drug activators, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6 (2018) 4661–4670, <https://doi.org/10.1021/acsschemeng.7b03691>.
- [25] S. Li, W. Sun, M. Ouyang, B. Yu, Y. Chen, Y. Wang, D. Zhou, Hemoglobin-related biomaterials and their applications, *Adv. NanoBiomed Res.* 2200103 (2022) 1–12, <https://doi.org/10.1002/anbr.202200103>.
- [26] E.A. Shirshin, B.P. Yakimov, S.A. Rodionov, N.P. Omelyanenko, A.V. Priezzhev, V. V. Fadeev, M.E. Darwin, Formation of hemoglobin photoproduct is responsible for two-photon and single photon-excited fluorescence of red blood cells, *Laser Phys. Lett.* 15 (2018), 075604, <https://doi.org/10.1088/1612-202X/aac003>.
- [27] E. Nagababu, J.M. Rifkind, Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247 (1998) 592–596, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8846>.
- [28] E. Nagababu, J.M. Rifkind, Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: superoxide production and heme degradation, *Biochemistry.* 39 (2000) 12503–12511, <https://doi.org/10.1021/bi992170y>.
- [29] A.Z. Stanić, I.T. Drvenica, H.N. Obradović, B.M. Bugarski, V.L. Ilić, D.S. Bugarski, Native bovine hemoglobin reduces differentiation capacity of mesenchymal stromal cells in vitro, *Int. J. Biol. Macromol.* 144 (2020) 909–920, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.167>.
- [30] M.D. Rabasović, D.V. Pantelić, B.M. Jelenković, S.B. Čurčić, M.S. Rabasović, M. D. Vrbica, V.M. Lazović, B.P.M. Čurčić, A.J. Krmpot, Nonlinear microscopy of chitin and chitinous structures: a case study of two cave-dwelling insects, *J. Biomed. Opt.* 20 (2015) 016010, <https://doi.org/10.1117/1.jbo.20.1.016010>.
- [31] T. Lainović, J. Margueritat, Q. Martinet, X. Dagany, L. Blažić, D. Pantelić, M. D. Rabasović, A.J. Krmpot, T. Dehous, Micromechanical imaging of dentin with Brillouin microscopy, *Acta Biomater.* 105 (2020) 214–222, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.01.035>.
- [32] N.S. Selim, S.M. El-marakby, Radiation-induced changes in the optical properties of hemoglobin molecule, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 76 (2010) 56–61, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.02.046>.
- [33] E.K. Hanson, J. Ballantyne, A blue spectral shift of the hemoglobin sorbitol band correlates with the age (time since deposition) of dried bloodstains, *PLoS One* 5 (2010) 1–11, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012830>.
- [34] I.T. Drvenica, A.Z. Stanić, A.M. Kalušević, S.B. Marković, J.J. Dragišić Maksimović, V.A. Nedović, B.M. Bugarski, V.L. Ilić, Maltose-mediated, long-term stabilization of freeze- and spray-dried forms of bovine and porcine hemoglobin, *J. Serb. Chem. Soc.* 84 (2019) 1105–1117, <https://doi.org/10.2298/JSC190513067D>.
- [35] C. Bonaventura, R. Henkens, A.I. Alayash, S. Banerjee, A.L. Crumbliss, Molecular controls of the oxygenation and redox reactions of hemoglobin, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013) 2298–2313, <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4947>.
- [36] H. Lu, F. Floris, M. Rensing, S. Andersson-Engels, Fluorescence spectroscopy study of protoporphyrin IX in optical tissue simulating liquid phantoms, *Materials (Basel)* 13 (2020) 7–16, <https://doi.org/10.3390/ma13092105>.
- [37] S.M. Waugh, P.S. Low, Hemichrome binding to band 3: nucleation of Heinz bodies on the erythrocyte membrane, *Biochemistry.* 24 (1) (1985) 34–39, <https://doi.org/10.1021/bi00322a006>.
- [38] J.G. Mohanty, E. Nagababu, J.M. Rifkind, Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging, *Front. Physiol.* 5 (2014) 1–6, <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00084>.
- [39] E. Nagababu, S. Ramasamy, J.M. Rifkind, Y. Jia, A.I. Alayash, Site-specific cross-linking of human and bovine hemoglobins differentially alters oxygen binding and redox site reactions producing rhombic heme and heme degradation, *Biochemistry.* 41 (2002) 7407–7415, <https://doi.org/10.1021/bi0121048>.
- [40] U.N. Shroff, I.M. Schiessl, G. Gyarmati, A. Riquier-Brison, J. Peti-Peterdi, Novel fluorescence techniques to quantitate renal cell biology, *Methods Cell Biol.* 154 (2019) 85–107, <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.04.013>.
- [41] D. Sardella, A.M. Kristensen, L. Bordoni, H. Kidmose, A. Shahrokhtash, D. S. Sutherland, S. Frische, I.M. Schiessl, Serial Intravital 2-photon Microscopy and Analysis of the Kidney Using Upright Microscopes, 2023, pp. 1–17, <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1176409>.
- [42] E. Gutiérrez-jiménez, H. Angley, P.M. Rasmussen, M.J. West, L. Catalini, N. K. Iversen, M.S. Jensen, S. Frische, L. Østergaard, Disturbances in the control of capillary flow in an aged APPswe/PS1ΔE9 model of Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging* 62 (2018) 82–94, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.10.006>.
- [43] E. Gutiérrez-jiménez, C. Cai, I.K. Mikkelsen, P.M. Rasmussen, H. Angley, M. Merrild, K. Mouridsen, S.N. Jespersen, J. Lee, N.K. Iversen, S. Sakadzic, L. Østergaard, Effect of electrical forepaw stimulation on capillary transit-time heterogeneity (CTH), *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 36 (2016) 2072–2086, <https://doi.org/10.1177/0271678X166631560>.
- [44] T. Wu, J. Liao, J. Yu, Y. Gao, H. Li, J. Wu, X. Xia, K. Shi, W. Zheng, In vivo label-free two-photon excitation autofluorescence microscopy of microvasculature using a 520 nm femtosecond fiber laser, *Opt. Lett.* 45 (2020) 2704–2707, <https://doi.org/10.3364/OL.394242>.
- [45] S. He, C. Ye, Q. Sun, C.K.S. Leung, J.Y. Qu, Label-free nonlinear optical imaging of mouse retina, *Biomed. Opt. Expr.* 6 (2015) 2459–2465, <https://doi.org/10.1364/BOE.6.001055>.
- [46] Y. Zeng, J. Xu, D. Li, L. Li, Z. Wen, J.Y. Qu, Label-free in vivo flow cytometry in zebrafish using two-photon autofluorescence imaging, *Opt. Lett.* 37 (2012) 2490–2492, <https://doi.org/10.1364/OL.37.002490>.
- [47] J.F. Ortas, P. Mahou, S. Escot, C. Stringari, N.B. David, L. Bally-Cuif, N. Dray, M. Négrerie, W. Supatto, E. Beaurepaire, Label-free imaging of red blood cells and oxygenation with color third-order sum-frequency generation microscopy, *Light Sci. Appl.* 12 (2023), <https://doi.org/10.1038/s41377-022-01064-4>.
- [48] I.T. Kostić, V.L. Ilić, V.B. Dordević, K.M. Bukara, S.B. Mojsilović, V.A. Nedović, D. S. Bugarski, D.N. Veljović, D.M. Mišić, B.M. Bugarski, Erythrocyte membranes from slaughterhouse blood as potential drug vehicles: isolation by gradual hypotonic hemolysis and biochemical and morphological characterization, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 122 (2014) 250–259, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.06.043>.
- [49] C.S.F. Bah, A.E.D.A. Bekhit, A. Carne, M.A. McConnell, Slaughterhouse blood: an emerging source of bioactive compounds, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12 (2013) 314–331, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12013>.
- [50] L.A. Frolova, Y. Furmansky, A.F. Shestakov, N.A. Emelianov, P.A. Liddell, D. Gust, I. Visoly-Fisher, P.A. Troshin, Advanced nonvolatile organic optical memory using self-assembled monolayers of porphyrin-fullerene dyads, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 14 (2022) 15461–15467, <https://doi.org/10.1021/acsaami.1c24979>.
- [51] P. Charoenphol, K. Oswald, C.J. Bishop, Therapeutics incorporating blood constituents, *Acta Biomater.* 73 (2018) 64–80, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.046>.
- [52] W. Choe, A.P. Acharya, B.G. Keselowsky, B.S. Sorg, Intravital microscopy imaging of macrophage localization to immunogenic particles and co-localized tissue oxygen saturation, *Acta Biomater.* 6 (2010) 3491–3498, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.03.006>.
- [53] I. Begemann, A. Viplav, C. Rasch, M. Galic, Stochastic micro-pattern for automated correlative fluorescence - scanning electron microscopy, *Nat. Publ. Gr.* (2015) 1–12, <https://doi.org/10.1038/srep17973>.
- [54] L. Benedetti, E. Sogne, S. Rodighiero, D. Marchesi, P. Milani, M. Francolini, Customized patterned substrates for highly versatile correlative light-scanning electron microscopy, *Sci. Rep.* 4 (2014) 7033, <https://doi.org/10.1038/srep07033>.
- [55] A.D. Corbett, M. Shaw, A. Yacoot, A. Jefferson, L. Schermelleh, T. Wilson, M. Booth, P.S. Salter, Microscope Calibration Using Laser Written Fluorescence 26, 2018, pp. 21887–21900, <https://doi.org/10.1364/OE.26.021887>.
- [56] <https://www.psfcheck.com/psfcheck-slides>.

Article

Characterization and Optimization of Real-Time Photoresponsive Gelatin for Direct Laser Writing

Branka D. Murić ^{1,*}, Dejan V. Pantelić ¹, Mihajlo D. Radmilović ¹, Svetlana N. Savić-Šević ¹ and Vesna O. Vasović ²

¹ Institute of Physics, University of Belgrade, Pregrevica 118, 11080 Belgrade, Serbia; pantelic@ipb.ac.rs (D.V.P.); mihajlor@ipb.ac.rs (M.D.R.); savic@ipb.ac.rs (S.N.S.-Š.)

² Western Serbia Academy of Applied Studies, Užice Department, Trg Svetog Save 34, 31000 Užice, Serbia; bolex65@yahoo.com

* Correspondence: muric@ipb.ac.rs

Abstract: There is an abundance of plastic materials used in the widest range of applications, such as packaging, machine parts, biomedical devices and components, etc. However, most materials used today are non-decomposable in the environment, producing a huge burden on ecosystems. The search for better, safer alternatives is still on. Here we present a detailed analysis of a simple, cheap, non-toxic, even edible, eco-friendly material, which can be easily manufactured, laser patterned and used for the fabrication of complex structures. The base substance is gelatin which is made photoresponsive by adding plasticizers and sensitizers. The resulting films were analyzed with respect to their optical, thermal and mechanical properties, which can be modified by a slight variation of chemical composition. The material is optimized for rapid laser-manufacturing of elastic microstructures (lenses, gratings, cantilevers, etc.) without any waste or residues. Overall, the material properties were tailored to increase photothermal responsivity, improve the surface quality and achieve material homogeneity, transparency and long-term stability (as verified using electron microscopy, infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry).

Keywords: gelatin; bio-eco-polymers; physicochemical properties; optical elastomers; rapid laser printing; microstructures



Citation: Murić, B.D.; Pantelić, D.V.; Radmilović, M.D.; Savić-Šević, S.N.; Vasović, V.O. Characterization and Optimization of Real-Time Photoresponsive Gelatin for Direct Laser Writing. *Polymers* **2022**, *14*, 2350. <https://doi.org/10.3390/polym14122350>

Academic Editor: Oh Seok Kwon

Received: 29 April 2022

Accepted: 5 June 2022

Published: 9 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The mechanical strength, low production cost and manufacturability of petroleum-based plastics established them as the most popular packaging materials [1]. Unfortunately, their non-biodegradability makes them an important source of pollution [2]. The ecological impact of petroleum-based plastics has accelerated the worldwide interest in biodegradable polymers from renewable resources. Despite the great potential of biodegradable polymers to solve the problem of plastic waste, they are rarely used, considering that their production is relatively expensive and they do not possess all the other properties (e.g., mechanical, optical, and electrical) required by various end-applications [3]. Additionally, such materials may have quite variable properties. For example, tensile strength, strain at break and elasticity (Young's modulus) depend on the raw material source, additives, molecular structures, etc. [4,5].

A good example of a natural biodegradable polymer from renewable resources is starch which is inexpensive, readily available and biodegradable. However, its mechanical strength is strongly modulated by its moisture sensitivity while being difficult for thermal processing (it thermally decomposes before being melted). To modify these characteristics, starch is blended with other polymers [6–8]. Unfortunately, these blends can affect biodegradability. Furthermore, there is a direct relationship between the starch-based bioplastic properties and different starch botanical sources. Namely, the amylose and amylopectin proportion, which depends on starch biosynthesis enzymes, soil type, and

climatic conditions during plant growth, strongly influences the bioplastic gelation temperature and mechanical and rheological properties [9]. Nevertheless, significant research and technological work invested in the development of starch-based polymers in the packaging sectors of food, cosmetics, pharmaceuticals, etc. [10–12].

Gelatin, yet another biocompatible and biodegradable polymer, is widely used in photography, food, pharmaceutical, biomedical and many others applications [13–17]. It has poor mechanical properties that limit its potential applications. A variety of chemical agents (formaldehyde, epoxy, glutaraldehyde and some others) are capable of crosslinking gelatin, consequently overcoming the brittleness of gelatin films, improving its flexibility, reducing the degree of swelling and enhancing its thermal stability. Glutaraldehyde [18] is usually used but is being replaced with genipin because of its lower cytotoxicity [19,20].

Besides gelatin, many other natural polymers (such as albumen, alginate, cellulose, chitosan, pullulan, etc.) can be used too [21,22]. We emphasize that the photoresponsiveness and photosensitivity of most materials stem from harmful and poisonous chemicals (such as dichromate compounds).

Also, gelatin is often mixed with other substances, e.g., chitosan, poly(vinyl alcohol), alginate and carbon nanotubes. These hybrid materials are specifically of interest in biomedicine for drug delivery, wound healing, cell culture and tissue engineering [23–25].

Gelatin hydrogels are photosensitized by various dyes, making them suitable for laser writing of microstructures (such as microfluidic channels, microlenses, micro-optoelectromechanical systems (MOEMS), lab on a chip, etc.) intended for a wide variety of applications [26–28]. Gelatin was widely used previously in optics, primarily as a photosensitive material for holography. Photo-crosslinking was achieved by adding ammonium dichromate or potassium dichromate, which resulted in holograms of excellent quality. It is known that gelatin doped with ammonium dichromate (dichromated gelatin—DCG) represents an almost ideal high-resolution holographic photosensitive material [29]. Additionally, DCG can be used as a material for the production of micro-optical components [30,31]. Most of them are toxic, difficult to manufacture and require complex chemical postprocessing. Various silicate-based materials (silicones, silica glass, etc.) were used for the fabrication of micro-optical components [32,33]. Compared to gelatin, they have higher thermal and chemical stability, but the fabrication processes are mainly complex, multistep, time-consuming and costly, frequently including the use of poisonous chemicals.

Emerging applications in biomedicine, micro-mechanics, micro-optics, energy storage, and sensors require new materials, simultaneously possessing advanced optical, electrochemical, mechanical and biological properties [34–36]. Previously, we have described photosensitive tot'hema-gelatin as a good candidate material for applications requiring real-time manufacturing of micro-optical and micro-mechanical components [37–40]. Gelatin was modified with a complex aqueous mixture of various salts, plasticizers, humectants and preservatives (commercially sold under the trade name tot'hema, which is used to treat iron anemia). The material is simple to prepare, low-cost, non-toxic, biodegradable and can be patterned by direct laser writing (DLW—widely used non-contact high-precision processing technique [41,42]). Here, a variety of micro-optical and microfluidic structures were fabricated using DLW, and threshold laser energy was established. This kind of microprocessing is neither additive nor subtractive as the material is only redistributed without any waste.

Therefore, in order to fully explore and optimize the capabilities of tot'hema-gelatin films for real industrial applications, the physicochemical characteristics of the film were studied in more detail and disclosed in this paper. We correlated the applied concentration of tot'hema with the film properties, such as color, thickness, light transmission, mechanical (tensile strength, elongation at break and Young's modulus), thermal properties, moisture content, swelling, the functional group on the film surface as well as surface morphology. These properties are essential for establishing optimal conditions of material used as an elastomer for adaptive, rapid prototyping of micro-optics and micro-mechanics.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

All chemical components were analytical grade, well known, easily available, cheap and non-toxic. Commercial gelatin from bovine skin (gel strength ~225 g Bloom, Type B) and NaCl (puriss, p.a.) were purchased from Sigma Aldrich. Tot'hema, an oral solution for the treatment of human anemia, was manufactured by Laboratoire Innotech International, France. According to the manufacturer's data [43], this is a complex water solution of gluconate (iron, manganese and copper) and excipients (glycerol, glucose liquid, saccharine, citric acid, polysorbate 80, etc.). Saline solution was purchased from Hemofarm (Serbia).

2.2. Film Preparation

A 5% water solution of gelatin with added NaCl (20% by weight of dry gelatin) was prepared as described in previous papers [37,38]. The tot'hema (ranging from 0% to 30% *v/v*) was mixed with gelatin solution by a magnetic stirrer. The series of five solutions (denoted as TG_X, where the letter X indicates the tot'hema percentage in solution) were prepared and centrifuged in order to remove all remaining impurities.

TG_X films were prepared by the gravity settling method [39]. Namely, the accurately measured volume of TG_X solution was pipetted onto a very clean, horizontally leveled microscope glass slide and dried in a stable environmental condition over the night.

2.3. Mechanical Properties

A film thickness was determined using a digital micrometer (an accuracy of 0.01 mm) at eight randomly selected points in the center and edges of the films. Measurements were averaged and taken as the film thickness.

The surface morphologies of the tot'hema-gelatin films were analyzed using a high-resolution scanning electron microscope equipped with a high brightness Schottky field emission gun (FEGSEM) and using non-contact profilometry (3D optical surface profiler—Zygo New View 7100).

The mechanical properties of the films were determined using a tensile testing machine, at a strain rate of 20 mm/min, as previously described for photosensitive tot'hema-gelatin, with minor modifications [44]. The dried film was cut by a brass mold, designed according to the ASTM standard [45], into a dog-bone-shaped specimen (see Figure 1). Three measurements were made for each film, and the average value was calculated. The tensile strength, elongation at break and Young's modulus were determined.

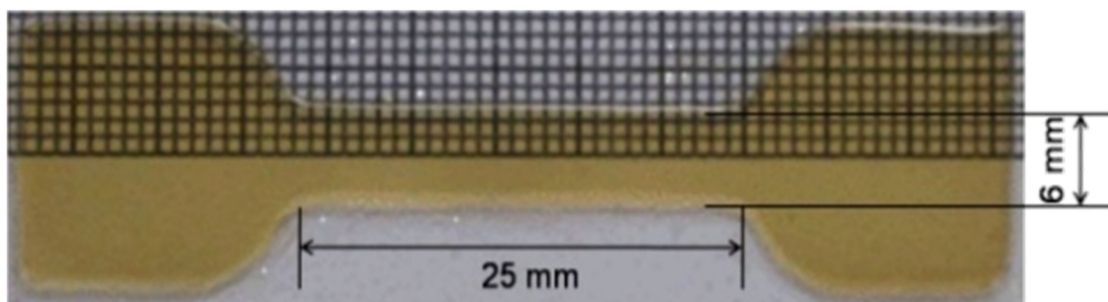


Figure 1. Optically transparent TG₂₀ film is used for tensile testing with dimensions according to the ASTM standards (gauge length 25 mm, width 6 mm).

2.4. Optical Properties

The transmittance of the TG_X films was analyzed using a fiber-type spectrometer (Ocean Optics) with a tungsten-halogen light as an illumination source in the wavelength range from 200 nm to 800 nm at room temperature.

A home-made direct laser writing system was used to fabricate microfluidic, micro-mechanic and micro-optical components on tot'hema modified gelatin film. A laser beam (488 nm wavelength, up to 100 mW power—iBEAM SMART, manufactured by Toptica)

was focused through the long-working-distance microscope objective. The samples were mounted on an xyz-coordinate stage to enable precise movement of the material along with the arbitrary pattern. The system was computer-controlled using G-code (standard programming language for CNC machines). More details about the system are given in a previous publication [46].

2.5. Physicochemical Properties

To determine how the number of water changes during the drying–dehydration of the film, the water content (WC) was measured. The TG_X films were weighted (w_1), then dried for 24 h at normal laboratory conditions, and weighted again (w_2). The WC for each film was determined as an average value of three measurements by the equation: $WC(\%) = [(w_1 - w_2)/w_1] \cdot 100$ [47].

In order to determine the influence of tot'hema concentration on the film swelling, TG_X films were immersed in saline solution for different intervals at laboratory conditions. Wet, swollen samples, after wiping with filter paper to remove excess liquid, were weighted again (w_w). The swelling factor (SF) of the films was calculated as the average value of three measurements by the equation: $SF(\%) = [(w_w - w_d)/w_d] \cdot 100$ where (w_d) corresponds to the weight of TG_X films before immersion [48].

Functional groups on the films were inspected by Fourier transformed infrared (FTIR) spectroscopy. The spectra were recorded on a Nicolet iS10 FTIR Spectrometer (Thermo Scientific Instruments) equipped with an attenuated total reflectance (ATR) accessory. ATR/FTIR measurements were done in the wavenumber interval from 500 to 4000 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1} .

The thermal stability of the films was analyzed by differential scanning calorimetry (DSC). An amount of about 2.5 mg of each film sample was packed in an aluminum pan (30 μL). The pan was sealed and analyzed using a DSC 131 EVO (SETARAM Instrumentation) differential scanning calorimeter previously calibrated with indium. An empty sealed pan was used as a reference. Both pans were placed in a chamber under the nitrogen flow of 20 mL/min, kept at 20 $^\circ\text{C}$ for 5 min and subsequently heated from 20 to 250 $^\circ\text{C}$ with a heating rate of 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$. To construct a baseline, two empty pans were placed in the chamber and measured under the same experimental conditions. The baseline subtraction was performed using the CALISTO Processing software (SETARAM Instrumentation).

3. Results

The pure gelatin film (TG_0) has a uniform, relatively smooth and flat surface, which indicates that the gelatin has a good film-forming ability. We have found that there is no noticeable difference in the gelatin film surface after tot'hema adding. Films still keep a rather smooth, uniform and homogeneous surface (without pores or cracks), indicating that there is good compatibility between tot'hema and gelatin molecules. Smoothness remains high after laser processing, as verified by SEM analysis of hexagonal concave microlenses array fabricated on photoresponsive tot'hema-gelatin film (Figure 2a). The lens-shaped dip is very symmetric (verified by the concentric shape of the corresponding interferogram in Figure 2b), and its roughness is of the order of several tens of nanometers (see Figure 2c). This makes photoresponsive tot'hema-gelatin an excellent material for the fabrication of micro-optical components.

To study mechanical properties, equal volumes of solution were used to prepare all TG_X films. An increase in tot'hema concentration resulted in the film thickening from 25 μm (pure gelatin) to 200 μm (30% of tot'hema) as a result of the plasticizer's interaction with the polymer chains. Tot'hema added to gelatin increases the distance between protein chains, increasing the film thickness. It can be noticed that the highest tot'hema concentration (30%) results in the thickest film due to the fact that most tot'hema ingredients are hydrophilic molecules that retain water and further increase the film thickness. Moreover, increased tot'hema content in gelatin film decreases the stress at break (reaching a minimum of 0.72 MPa at 30% of tot'hema) and increases the strain at break (turning tot'hema-gelatin

into an elastomer—maximum elasticity of about 220% was obtained). Mechanical properties of TG_X films, as a function of the concentration of tot'hema, are summarized in Table 1. The tot'hema addition (which is a mixture of different plasticizers and humectants) to the gelatin matrix improves the film flexibility and, consequently, makes it less rigid. Namely, glycerol is well known as a plasticizer. As a hydrophilic molecule with low molecular weight, glycerol can easily fit into protein chains creating hydrogen bonds [49]. Furthermore, tot'hema provides additional mobility of protein chains by increasing their distance, influencing a significant decrease of Young's modulus of elasticity, from 1933 MPa for pure gelatin (TG_0) to 948 MPa for the 5% tot'hema concentration (TG_5). As the tot'hema content increases further, Young's modulus value decreases even more (see Table 1). As demonstrated, the TG_30 film has Young's modulus of 0.32 MPa (which is very close to 0.35 MPa for PDMS), making it suitable for contact copying. Elastic properties of TG_X films are very important for the production of adaptive micro-optical components.

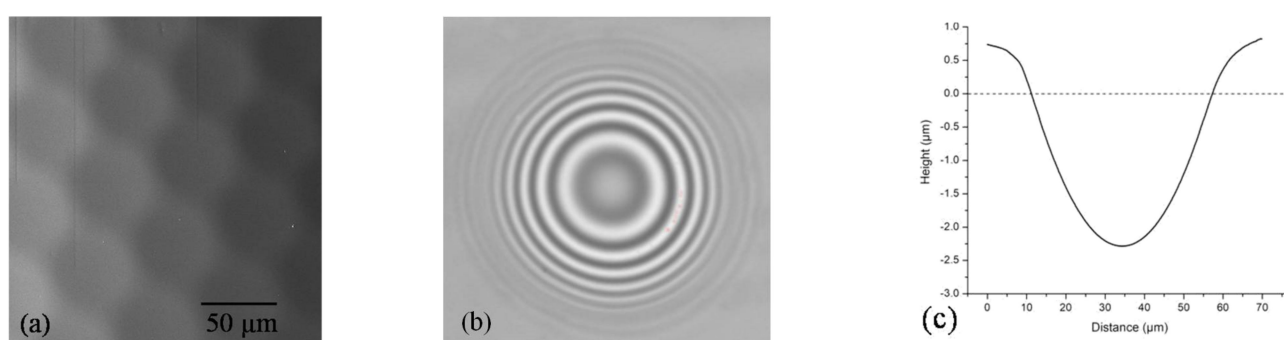


Figure 2. (a) SEM image of hexagonal microlens array; (b) Interference fringe pattern of a microlens; and (c) 2D surface profile of a microlens.

Table 1. The film thickness, stress at break, strain at break and Young's modulus.

Film	Tot'hema (%)	Thickness (μm)	Stress at Break (MPa)	Strain at Break (%)	Young's Modulus (MPa)
TG_0	0	25 ± 10	58 ± 1	2 ± 0.1	1933 ± 40
TG_5	5	35 ± 10	37.92 ± 0.76	4 ± 0.2	948 ± 10
TG_10	10	50 ± 10	4.89 ± 0.10	40 ± 2	12.23 ± 0.06
TG_20	20	100 ± 10	1.71 ± 0.03	140 ± 6	1.22 ± 0.02
TG_30	30	200 ± 10	0.72 ± 0.01	224 ± 10	0.32 ± 0.01

Results are expressed as mean value \pm standard deviation.

The change of color and transparency of the films varied from transparent (pure gelatin) and slightly yellow to yellow with increasing tot'hema content (see Figure 3).

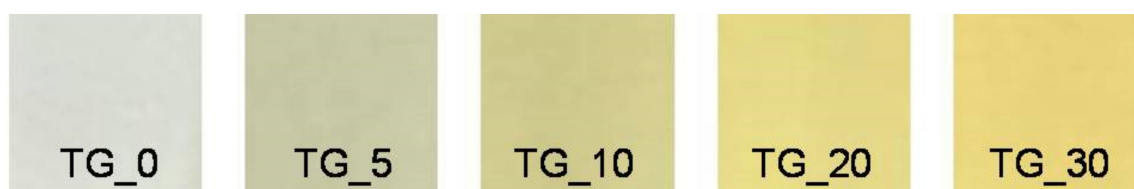


Figure 3. Colors of TG_X films – (gelatin with 0%, 5%, 10%, 20%, and 30% of tot'hema).

The corresponding spectral light transmittance of the TG_X films as a function of wavelength is presented in Figure 4. Light transmission (in the visible range of 350–800 nm) of the pure gelatin (TG_0) film was above 80%, and the transmission increased with increasing wavelength (see Figure 4). By adding tot'hema, a layer is transformed into a spectral filter whose characteristics strongly depend on the concentration. In all cases, UV

radiation is strongly suppressed, making tot'hema-gelatin films an excellent filter for UV-sensitive applications. As we see, pure gelatin film transmits light very well at wavelengths from 350 nm to about 800 nm, but this can be changed at will using appropriate colorants.

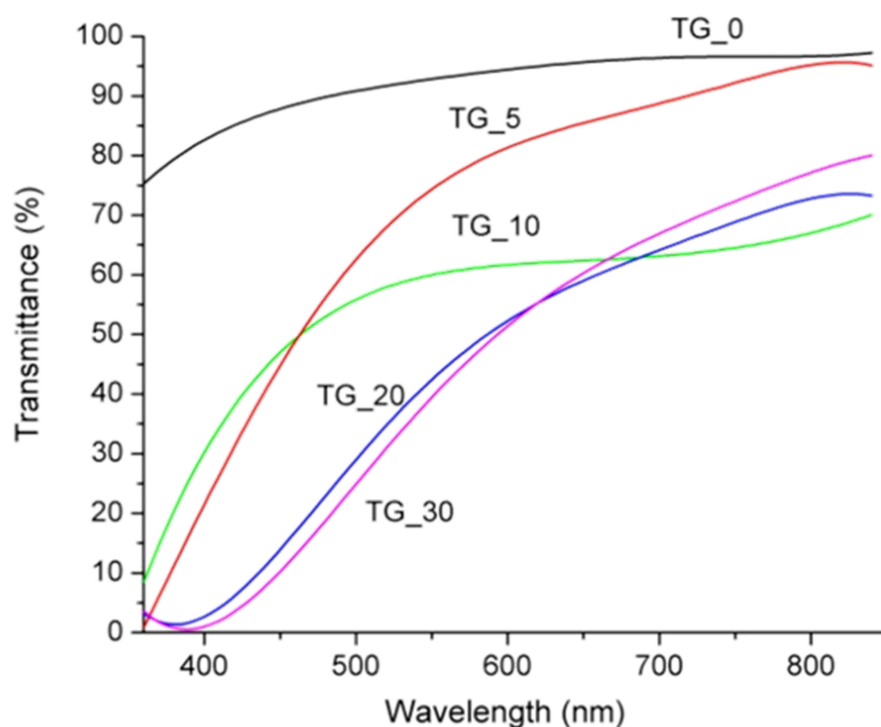


Figure 4. Spectral transmittance of the TG_X films (X = 0, 5, 10, 20, and 30% of tot'hema).

It was noticed that, after the initial rapid decrease of water content for all TG_X films during the drying process (see Figure 5a), the water content remains constant after 24 h of drying. After that, all the other properties remain stable, and the film is ready for further use (e.g., direct laser writing). Pure gelatin film had the lowest water content that exponentially increased with tot'hema content (see Figure 5b). This behavior is consistent irrespective of film thickness. The increase in water content in the presence of a tot'hema can be attributed to the additional hydrogen bonds formed between water molecules and gelatin chains. Water content can influence the physical properties of films (low-humidity films are generally stiff, while films with increased humidity are flexible and malleable). However, relatively high water content does not necessarily mean better physical properties in films [50] but makes the material suitable for a range of applications in biomedicine.

The influence of tot'hema concentration on the swelling of TG_X films during 1 h, 4 h and 24 h are shown in Figure 6. The longer the film is immersed in the saline solution, the higher swelling (without deterioration) was observed (after 24 h, the film is fully saturated). Water content and swelling factor of the films were correlated. Opposite to the water content, the film swelling (see Figure 6) decreases with increasing concentration of tot'hema: pure gelatin film has the highest swelling factors (around 220%), while the tot'hema addition reduces the film swelling. This might be due to the limited spaces in film (gelatin network) for absorbing water as already occupied by tot'hema (plasticizer) molecules. The lowest swelling factor for TG_30 is correlated with the largest water amount in the film. Namely, in contact with the film, water diffuses into it, which results in the movement of polymer chains, incorporating between them and the dissolving of added ingredients. In this way, swelling enhances the release effect of some ingredients added to the film, which later diffuse into the system, manifesting different roles (for example, protective) [51].

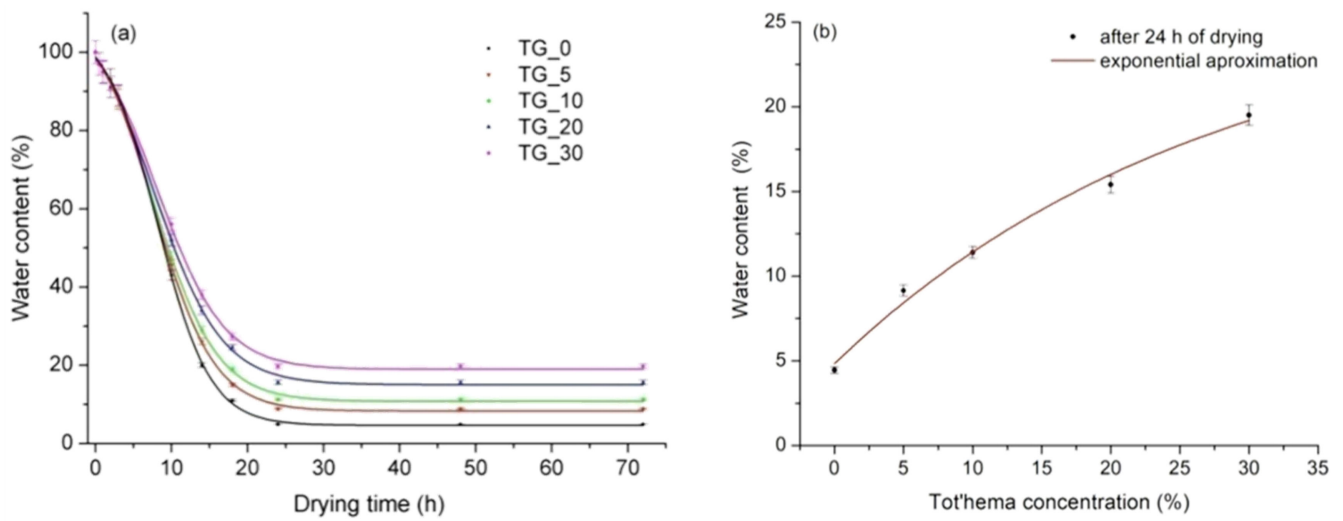


Figure 5. (a) Influence of drying time on the water content of TG_X films (X = 0, 5, 10, 20, and 30% of tot'hema); (b) The equilibrium water content as a function of tot'hema concentration.

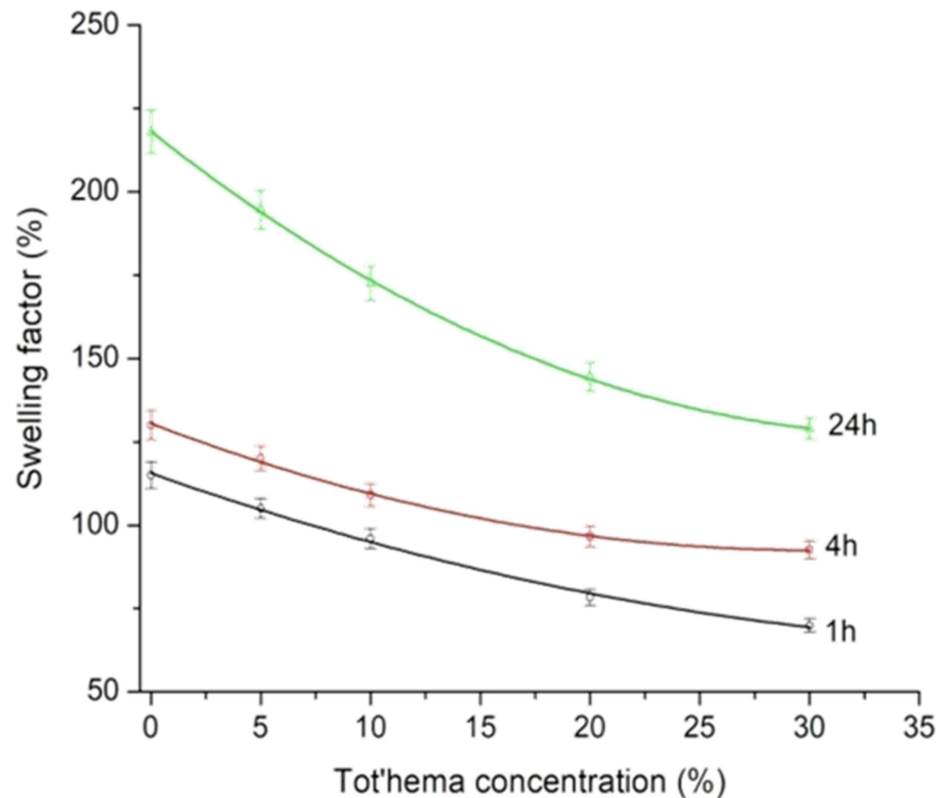


Figure 6. TG_X film (X = 0, 5, 10, 20, and 30% of tot'hema) swelling (during 1, 4 and 24 h) as a function of tot'hema concentration.

FTIR analysis was performed to study the interactions between tot'hema and gelatin matrix, i.e., to illustrate possible conformational changes in the gelatin films containing tot'hema. FTIR spectra of TG_X films are presented in Figure 7. A wide band in the range of $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ can be attributed to O–H stretching and N–H bending, which are able to form a hydrogen bond with the carbonyl group of the peptide bond in the gelatin, as suggested by a literature review [52,53].

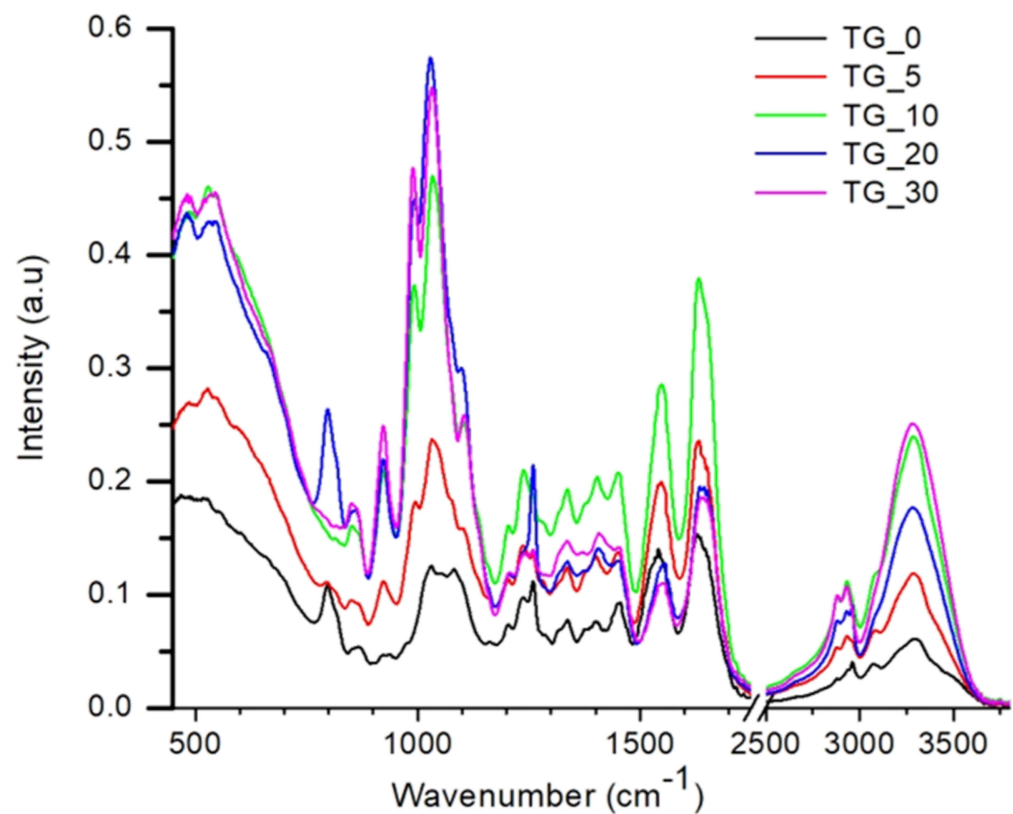


Figure 7. FTIR spectra of TG_X films (X = 0, 5, 10, 20, and 30% of tot'hema).

The FTIR spectrum of the pure gelatin film contains characteristic peaks at 3297 cm^{-1} and 2963 cm^{-1} , which can be attributed to $-\text{OH}$ and $-\text{CH}$ vibration stretching peaks. Further, it showed the characteristic amide I, amide II and amide III bands [54]. It is observed that the main absorption of the gelatin film such as $\text{C}=\text{O}$ stretching at 1629 cm^{-1} (Amide I), $\text{N}-\text{H}$ bending at 1542 cm^{-1} (Amide II), $\text{C}-\text{H}$ deformation at 1403 cm^{-1} , and $\text{C}-\text{N}$ stretching (Amide III) at 1237 cm^{-1} remains present in all films.

Compared to pure gelatin film, it was noticed that there are no new peaks in the spectrum of TG_X films. At the same time, the addition of tot'hema caused noticeable changes in the intensity of the Amide I, Amide II, and Amide III band. The peaks characteristic of $\text{C}-\text{H}$ stretching of CH_2 and CH_3 at 2963 cm^{-1} and 2876 cm^{-1} in TG_X films vary significantly in intensity relative to the TG_0. Further, there is a slight shift in the peak's position, which can be explained by the formation of hydrogen bonds. The shift of these bands to a lower wavelength can be explained by the crosslinking between the components of TG_X films. These data indicate that the polar groups of tot'hema solution interact with the amino acids of the protein chains via inter- and intra-molecular hydrogen bonding and hydrophobic interaction. Therefore, tot'hema adding does not change the chemical composition of gelatin, but it changes the structure of gelatin due to intermolecular hydrogen bonding.

DSC is used to establish thermal stability due to changes in the physical and chemical properties of a material as a function of temperature or time [55]. It is well known that heat can cause structural transitions in protein networks that break chemical bonds [56]. The thermal properties of the film are closely related to their applications. The DSC thermograms of the TG_X films up to a temperature of $250\text{ }^\circ\text{C}$ are shown in Figure 8.

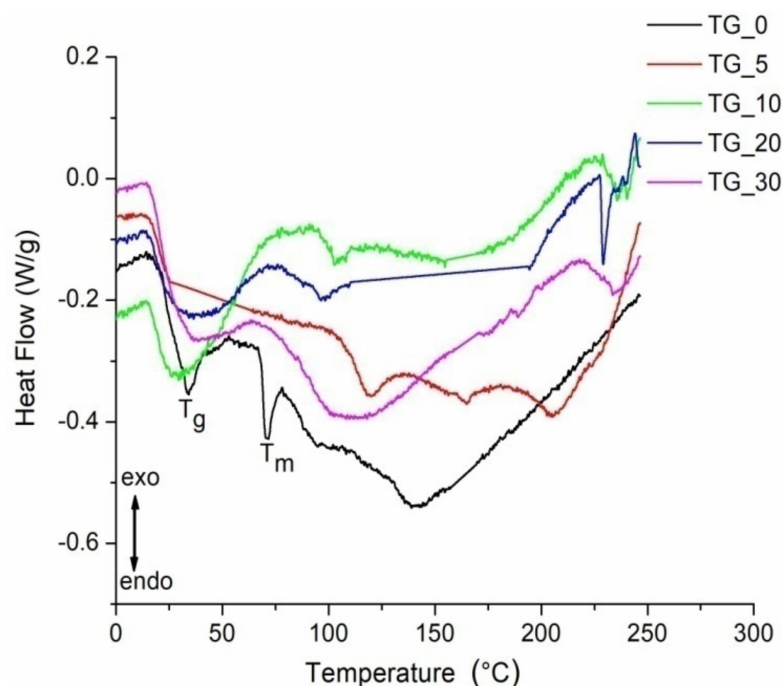


Figure 8. DSC curves of the TG_X films (X = 0, 5, 10, 20, and 30% of tot'hema). T_g and T_m – Endothermic peaks (denoted for pure gelatin film –TG_0) represent glass transition and melting temperature, respectively.

The first endothermic peak of pure gelatin film (TG_0) is recorded at a temperature of about 40 °C (see Figure 8). This endothermic peak represents glass transition (T_g) and is attributed to the transition from the glassy state to rubber. The endothermic peak that follows T_g, at a temperature around T_m ≈ 70 °C is attributed to the melting and dissociation of arranged polymer parts. Some authors attribute this peak to the overlap of various processes such as the water evaporation, melting and recrystallization of small and/or imperfect gelatin crystals [57,58].

It was found that the peak temperatures and the enthalpies of these endothermic processes depend on the film preparation and drying conditions [57]. The endothermic peak at about 160 °C represents the gelatin decomposition temperature. It was observed that by adding and increasing the tot'hema content, the endothermic peaks become significantly wider and larger than that of the pure gelatin film. In addition, DSC analysis demonstrated that tot'hema addition, depending on its content, improves gelatin thermal stability. The melting temperature (T_m) increased when compared to pure gelatin film for all concentrations of tot'hema. T_m is typically associated with thermal stability: a high value of T_m corresponds to high thermal stability. It is already established that the thermal stability of polymers is related to crosslinking density [59]. In Figure 8, it is noticed that pure gelatin film (TG_0) has the lowest melting temperature (T_m). This temperature increases after crosslinking gelatin by tot'hema. The highest value of T_m was obtained for TG_5 film, while the T_m for films prepared with 10–30% of tot'hema show lower values. This behavior is attributed to the hydrophobicity of the gelatin molecular structure resulting from the addition of a large quantity of tot'hema. The improved thermal stability of TG_X films indicates that the temperature range of the use has been extended to about 100 °C, which is very important for practical applications.

To summarize—tot'hema is added to gelatin in order to increase the light absorption, modify its melting temperature and make it permanently elastomeric. Tot'hema concentration was optimized in order to make a compromise between gelatin thermal (e.g., melting temperature), mechanical (flatness) and optical (transparency) properties.

4. Discussion

The gelatin-based material described above has a number of useful optical, thermal and mechanical properties, which can be modulated by slight variations of its chemical composition. In this way, it becomes suitable for a range of applications, primarily dealing with micro-mechanics, microfluidics and micro-optics.

The most important property is photoresponsiveness. The photoresponsive gelatin studied here belongs to the class of waste and natural biopolymers (such as alginates and eggshells already reported for the electronics industry [35,36]), which is very important for developing non-toxic, eco-friendly materials. In contrast to the classical photosensitive materials (for example, silver-halide films, photoresists, dichromated gelatin), the response of tot'hema modified material is a consequence of physical, rather than chemical, processes. Here, absorbed light locally heats the material above the melting point, and surface tension pushes the fluidized layer, thus producing a dip (concave, lens-shaped recess), as can be seen in Figure 2. After the light is turned off, rapid cooling “freezes” the surface shape. Due to the low melting point of the gel (approximately 50 °C), the effect is easily achieved by a few milliwatt laser beams and millisecond irradiation times. Depending on the focal point size, micron-sized structures are easily formed. It is important to note that there is no material ablation because the melting point is much higher, and the material is simply displaced [60].

This makes the material extremely useful for rapid fabrication of micron-sized features using direct laser writing (DLW)—see Video S1 in a Supplementary Material of this paper demonstrating manufacturing of a complex array of microlenses. By controllably guiding the laser beam across the surface, virtually any shape can be formed (see Figure 9), where a rather complex microchannel structure (with three Tesla valves) is shown [61,62]. The whole pattern was fabricated in less than a minute using a 488 nm laser with 10 mW power (focused by 0.4 NA microscope objective).

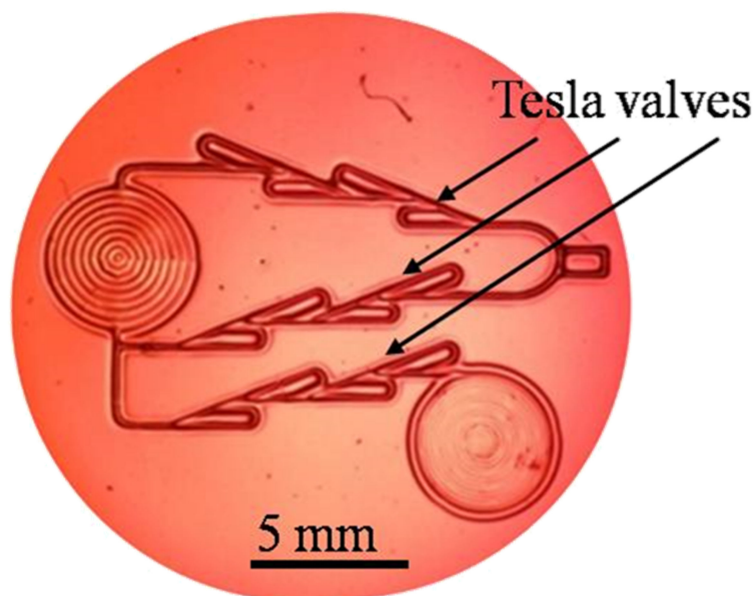


Figure 9. Complex microfluidic channels, with three Tesla valves formed on a tot'hema-gelatin.

Physicochemical processes during interaction with light depend strongly on the laser beam power and focus. The sensitivity threshold is reached at approximately $7.5 \text{ nJ}/\mu\text{m}^2$ of laser energy, which is easily achieved by focusing the laser beam through the long-working-distance microscope objective (Mitutoyo 20 \times , 0.4 NA). By appropriately controlling the laser beam size and power, irradiation time and writing speed, features can be fabricated with characteristic widths between 10 μm and 1000 μm and depths up to several hundred micrometers. By using high-power lasers, fabrication time can be significantly reduced

to milliseconds for the fabrication of individual microlenses or seconds for more complex structures like the one in Figure 9. Of course, the scanning speed of the laser beam must be increased to prevent material destruction. In most cases, there is no postprocessing, so the optical structures are usable immediately after fabrication.

We have mostly studied optical applications of the material [37,38], which simultaneously offers several key features—optical homogeneity, transparency, surface quality, easy fabrication and environmental friendliness. We have found that tot'hema ingredients mostly determine the material properties. As shown above, spectral absorption and melting point enable tailoring of the material to efficiently absorb the DLW beam.

The concept of microfabrication using meltable gels can be easily extended by replacing tot'hema with a suitable combination of plasticizers, humectants, preservatives and sensitizing dyes (e.g., betanin, eosin, anthocyanin, etc.) to achieve improved characteristics (faster melting, improved sensitivity, optical transparency after laser processing), which we described elsewhere [37]. In this way, we were able to fabricate a range of optical components, such as diffraction gratings and arrays of positive and negative microlenses.

Gelatin-based materials are biocompatible, and additional chemicals used in this research are non-toxic (even food grade), giving the advantage of quick and natural biodegradability. We have covered a piece of the material with a few centimeters of soil and found that it was completely absorbed, without a trace, within a few days. For some applications, this might be a problem as we observed fungi growing on the material after some time (several days). To prevent that, we added table salt (NaCl), which made it durable and usable over a long period of exposure time to normal room conditions. Normal laboratory conditions (humidity, temperature) do not affect the material properties, and laboratory illumination does not diminish the material sensitivity (i.e., the material does not have to be kept in darkness). Dust is the major problem because of the stickiness of the film, and the material surface must be protected by an additional cover glass.

Softness is yet another possible disadvantage. Surfaces should not be scratched or punched with hard objects as this will certainly damage the structure. On the positive side, films can be easily cut, peeled from the substrate, stacked together and transferred. Mechanical hardness can be further significantly increased by removing the plasticizer (by submerging the films in cold water and letting the plasticizer diffuse out) or by hardening (tanning) with, e.g., alum [63]. In addition, we have been able to use tot'hema-gelatin as a template for contact copying into harder materials (epoxies, photopolymer composites).

The usable temperature range is limited by the melting point to somewhere between 50 °C and 100 °C, depending on tot'hema concentration. For the majority of applications, this is quite satisfactory and makes the material usable in the widest range of applications: lab on a chip, sensors and micro-optics. We have also found that above the critical power density of the laser beam, material locally carbonizes and can be used as a blocking filter [39] and, possibly, as an electrical conductor.

Finally, the fabrication cost is really low. Materials used here are cheap and ubiquitous. Most of them can be found in the kitchen, while the fabrication of layers is straightforward and simple. Production methods are well known in the film industry and can be used both in low- and large-scale production.

5. Conclusions

To conclude, here we disclosed an innovative combination of well-known substances producing really versatile material for safe, real-time, low-cost, rapid microfabrication. Physicochemical properties of the material have been thoroughly studied, aiming to establish operational limits and optimize properties for the desired application. Application potential is high due to the simplicity of fabrication of highly complex structures, good optical properties, and manufacturability by direct laser writing without any further post-processing, micrometers resolution, elastomeric characteristics, environmental friendliness, and non-toxic character—a rare combination of properties concentrated in a single material. Elasticity, uniform and homogeneous surface and optical transparency were achieved,

making the material suitable for the production of adaptive micro-optical components and protective filters. The temperature range of the material's applicability is extended up to 100 °C.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/polym14122350/s1>, Video S1: Microoptics fabrication.

Author Contributions: B.D.M.: Conceptualization, methodology, investigation, visualization, writing original draft, reviewing, editing, resources, project administration; D.V.P.: Software, supervision, writing, editing, reviewing; M.D.R.: Software, data curation, reviewing; S.N.S.-Š.: Investigation, editing, reviewing; V.O.V.: Editing, project administration. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The authors acknowledge funding provided by the Institute of Physics University of Belgrade through the grant by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Smilja B. Marković from the Institute of Technical Sciences of the Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade, Serbia for help with FTIR and DSC measurements.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Chaudhary, V.; Bangar, S.P.; Thakur, N.; Trif, M. Recent advancements in smart biogenic packaging: Reshaping the future of the food packaging industry. *Polymers* **2022**, *14*, 829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Tokiwa, Y.; Calabia, B.P.; Ugwu, C.U.; Aiba, S. Biodegradability of plastics. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 3722–3742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Vroman, I.; Tighzer, L. Biodegradable polymers. *Materials* **2009**, *2*, 307–344. [[CrossRef](#)]
4. Shamsuddin, I.M.; Jafar, J.A.; Shawai, A.S.A.; Yusuf, S.; Lateefah, M.; Aminu, I. Bioplastics as better alternative to petroplastics and their role in national sustainability: A review. *Adv. Biosci. Bioeng.* **2017**, *5*, 63–70. [[CrossRef](#)]
5. Rosenboom, J.G.; Langer, R.; Traverso, G. Bioplastics for a circular economy. *Nat. Rev. Mater.* **2022**, *7*, 117–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Hassan, M.M.; Le Guen, M.J.; Tucker, N.; Parker, K. Thermo-mechanical, morphological and water absorption properties of thermoplastic starch/cellulose composite foams reinforced with PLA. *Cellulose* **2019**, *26*, 4463–4478. [[CrossRef](#)]
7. Souza, C.R.; Andrade, C.T. Processing and properties of thermoplastic starch and its blends with sodium alginate. *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, *81*, 412–420. [[CrossRef](#)]
8. Abe, M.M.; Martins, J.R.; Sanvezzo, P.B.; Macedo, J.V.; Branciforti, M.C.; Halley, P.; Botaro, V.R.; Brienza, M. Advantages and disadvantages of bioplastics production from starch and lignocellulosic components. *Polymers* **2021**, *13*, 2484. [[CrossRef](#)]
9. Rivadeneira-Velasco, K.E.; Utreras-Silva, C.A.; Díaz-Barrios, A.; Sommer-Márquez, A.E.; Tafur, J.P.; Michell, R.M. Green nanocomposites based on thermoplastic starch: A review. *Polymers* **2021**, *13*, 3227. [[CrossRef](#)]
10. Onyeaka, H.; Obileke, K.; Makaka, G.; Nwokolo, N. Current research and applications of starch based biodegradable films for food packaging. *Polymers* **2022**, *14*, 1126. [[CrossRef](#)]
11. Jiang, T.; Duan, Q.; Zhu, J.; Liu, H.; Yu, L. Starch-based biodegradable materials: Challenges and opportunities. *Adv. Ind. Eng. Polym. Res.* **2020**, *3*, 8–18. [[CrossRef](#)]
12. Estrada-Monje, A.; Alonso-Romero, S.; Zitzumbo-Guzmán, R.; Estrada-Moreno, I.A.; Zaragoza-Contreras, E.A. Thermoplastic starch-based blends with improved thermal and thermomechanical properties. *Polymers* **2021**, *13*, 4263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Chauhan, S.; Bansal, M.; Khan, G.; Yadav, S.K.; Singh, A.K.; Prakash, P.; Mishra, B. Development, optimization and evaluation of curcumin loaded biodegradable crosslinked gelatin film for the effective treatment of periodontitis. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2018**, *44*, 1212–1221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Yang, J.; Sun, X.; Kang, Q.; Zhu, L.; Qin, G.; Chen, Q. Freezing-tolerant and robust gelatin-based supramolecular conductive hydrogels with double-network structure for wearable sensors. *Polym. Test.* **2021**, *93*, 106879. [[CrossRef](#)]
15. Liu, J.; Li, Y.; Hu, D.; Chao, X.; Zhou, Y.; Wang, J. An essential role of gelatin in the formation process of curling in long historical photos. *Polymers* **2021**, *13*, 3894. [[CrossRef](#)]
16. Lu, Y.; Luo, Q.; Chu, Y.; Tao, N.; Deng, S.; Wang, L.; Li, L. Application of gelatin in food packaging: A review. *Polymers* **2022**, *14*, 436. [[CrossRef](#)]
17. Maiti, S.; Khillar, P.S.; Mishra, D.; Nambiraj, N.A.; Jaiswal, A.K. Physical and self-crosslinking mechanism and characterization of chitosan-gelatin-oxidized guar gum hydrogel. *Polym. Test.* **2021**, *97*, 107155. [[CrossRef](#)]
18. Farris, S.; Song, J.; Huang, Q. Alternative reaction mechanism for the cross-linking of gelatin with glutaraldehyde. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 998–1003. [[CrossRef](#)]

19. Bigi, A.; Cojazzi, G.; Panzavolta, S.; Roveri, N.; Rubini, K. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials* **2002**, *23*, 4827–4832. [[CrossRef](#)]
20. Zhao, Y.; Sun, Z. Effects of gelatin-polyphenol and gelatin–genipin cross-linking on the structure of gelatin hydrogels. *Int. J. Food Prop.* **2017**, *20*, S2822–S2832. [[CrossRef](#)]
21. Savić, S.; Pantelić, D.; Jakovljević, D. Real-time and postprocessing holographic effects in dichromated pullulan. *Appl. Opt.* **2002**, *41*, 4484–4488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Haniffa, M.A.C.M.; Ching, Y., C.; Abdullah, L.C.; Poh, S.C.; Chuah, C.H. Review of Bionanocomposite Coating Films and Their Applications. *Polymers* **2016**, *8*, 246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Salahuddin, B.; Wang, S.; Sangian, D.; Aziz, S.; Gu, Q. Hybrid gelatin hydrogels in nanomedicine applications. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, *4*, 2886–2906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Rakhshaei, R.; Namazi, H.; Hamishehkar, H.; Kafil, H.S.; Salehi, R. In situ synthesized chitosan–gelatin/ZnO nanocomposite scaffold with drug delivery properties: Higher antibacterial and lower cytotoxicity effects. *J. Appl. Polym. Sci.* **2019**, *136*, 47590. [[CrossRef](#)]
25. Afnas, V.M.; Unnikrishnan, G.; Budhe, S.; Manaf, O.; Ameen, J. PVA/gelatin/chitin ternary blend as a humidity sensing material. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* **2022**, *33*, 2031–2043. [[CrossRef](#)]
26. Nawroth, J.C.; Scudder, L.L.; Halvorson, R.T.; Tresback, J.; Ferrier, J.P.; Sheehy, S.P.; Cho, A.; Kannan, S.; Sunyovszki, I.; Goss, J.A.; et al. Automated fabrication of photopatterned gelatin hydrogels for organ-on-chips applications. *Biofabrication* **2018**, *10*, 25004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Liu, J.; Su, C.; Chen, Y.; Tian, S.; Lu, C.; Huang, W.; Lv, Q. Current understanding of the Applications of photocrosslinked hydrogels in biomedical engineering. *Gels* **2022**, *8*, 216. [[CrossRef](#)]
28. Pinto-Iguanero, B.; Olivares-Perez, A.; Mendez-Alvarado, A.W.; Fuentes-Tapia, I.; Trevino-Palacios, C.G. Non-hydroscopic vanilla doped dichromated gelatin holographic material. *Opt. Mater.* **2003**, *22*, 397–404. [[CrossRef](#)]
29. Pantelić, D.; Murić, B. Improving the holographic sensitivity of dichromated gelatin in the blue–green part of the spectrum by sensitization with xanthene dyes. *Appl. Opt.* **2001**, *40*, 2871–2875. [[CrossRef](#)]
30. Yao, J.; Cui, Z.; Gao, F.; Zhang, Y.; Guo, Y.; Du, C.; Zeng, H.; Qiu, C. Refractive micro lens array made of dichromate gelatin with gray-tone photolithography. *Microelect. Eng.* **2001**, *57–58*, 729–735. [[CrossRef](#)]
31. Calixto, S.; Scholl, M.S. Relief optical microelements fabricated with dichromated gelatin. *Appl. Opt.* **1997**, *36*, 2101–2106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Pan, A.; Gao, B.; Chen, T.; Si, J.; Li, C.; Chen, F.; Hou, X. Fabrication of concave spherical microlenses on silicon by femtosecond laser irradiation and mixed acid etching. *Opt. Express* **2014**, *22*, 15245–15250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Marcinkevičius, A.; Juodkazis, S.; Watanabe, M.; Miwa, M.; Matsuo, S.; Misawa, H.; Nishii, J. Femtosecond laser-assisted three-dimensional microfabrication in silica. *Opt. Lett.* **2001**, *26*, 277–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Calixto, S.; Ganzherli, N.; Gulyaev, S.; Figueroa-Gerstenmaier, S. Gelatin as a photosensitive material. *Molecules* **2018**, *23*, 2064. [[CrossRef](#)]
35. Minakshi, M.; Higley, S.; Baur, C.; Mitchell, D.R.G.; Jones, R.T.; Fichtner, M. Calcined chicken eggshell electrode for battery and supercapacitor applications. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 26981–26995. [[CrossRef](#)]
36. Wickramaarachchi, K.; Minakshi Sundaram, M.; Henry, D.J.; Gao, X. Alginate Biopolymer Effect on the Electrodeposition of Manganese Dioxide on Electrodes for Supercapacitors. *ACS Appl. Energy Mater.* **2021**, *4*, 7040–7051. [[CrossRef](#)]
37. Murić, B.D.; Pantelić, D.V.; Vasiljević, D.M.; Panić, B.M. Properties of microlenses produced on a layer of tot’hema and eosin sensitized gelatin. *Appl. Opt.* **2007**, *46*, 8527–8532. [[CrossRef](#)]
38. Murić, B.; Pantelić, D.; Vasiljević, D.; Panić, B. Microlens fabrication on tot’hema sensitized gelatin. *Opt. Mater.* **2008**, *30*, 1217–1220. [[CrossRef](#)]
39. Murić, B.D.; Pantelić, D.V.; Vasiljević, D.M.; Savić-Šević, S.N.; Jelenković, B.M. Application of tot’hema eosin sensitized gelatin as a potential eye protection filter against direct laser radiation. *Curr. Appl. Phys.* **2016**, *16*, 57–62. [[CrossRef](#)]
40. Murić, B.; Pantelić, D.; Vasiljević, D.; Zarkov, B.; Jelenković, B.; Pantović, S.; Rosić, M. Sensitized gelatin as a versatile biomaterial with tunable mechanical and optical properties. *Phys. Scr.* **2013**, *T157*, 14018. [[CrossRef](#)]
41. Krmpot, A.J.; Tserevelakis, G.J.; Murić, B.D.; Filippidis, G.; Pantelić, D.V. 3D imaging and characterization of microlenses and microlens arrays using nonlinear microscopy. *J. Phys. D Appl. Phys.* **2013**, *46*, 195101. [[CrossRef](#)]
42. Wu, Z.-L.; Qi, Y.-N.; Yin, X.-J.; Yang, X.; Chen, C.-M.; Yu, J.-Y.; Yu, J.-C.; Lin, Y.-M.; Hui, F.; Liu, P.-L.; et al. Polymer-Based Device Fabrication and Applications Using Direct Laser Writing Technology. *Polymers* **2019**, *11*, 553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Available online: www.vidal.fr/medicaments/tot-hema-sol-buv-en-ampoule-16626.html (accessed on 10 February 2022).
44. Keinonen, T.; Riihola, P.; Huttu, K.; Parkkonen, S. Dye films for optical demonstrations in the undergraduate laboratory. *Opt. Mater.* **1998**, *11*, 79–86. [[CrossRef](#)]
45. ISO 527–3:2018; Plastics—Determination of Tensile Properties—Part 3: Test Conditions for Films and Sheets. ISO: Geneva, Switzerland, 2018. Available online: <https://www.iso.org/standard/70307.html> (accessed on 12 March 2022).
46. Radmilović, M.D.; Murić, B.D.; Grujić, D.; Zarkov, B.; Nenadić, M.Z.; Pantelić, D.V. Rapid direct laser writing of microoptical components on a meltable biocompatible gel. *Opt. Quantum Electron.* **2022**, *54*, 361. [[CrossRef](#)]
47. Tabatabaei, S.D.; Ghiasi, F.; Gahruie, H.H.; Hosseini, S.M.H. Effect of emulsified oil droplets and glycerol content on the physicochemical properties of Persian gum-based edible films. *Polym. Test.* **2022**, *106*, 107427. [[CrossRef](#)]

48. Gahruie, H.H.; Eskandari, M.H.; Meeren, P.V.; Osseini, S.M.H. Study on hydrophobic modification of basil seed gum-based (BSG) films by octenyl succinate anhydride. *Carbohydr.Polym.* **2019**, *219*, 155–161. [[CrossRef](#)]
49. Rivero, S.; García, M.A.; Pinotti, A. Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2010**, *11*, 369–375. [[CrossRef](#)]
50. Blanco-Pascual, N.; Fernández-Martín, F.; Montero, M.P. Effect of different protein extracts from *Drosophila melanogaster* muscle co-products on edible films development. *Food Hydrocoll.* **2013**, *33*, 118–131. [[CrossRef](#)]
51. Siepmann, J.; Streubel, A.; Peppas, N.A. Understanding and predicting drug delivery from hydrophilic matrix tablets using the “Sequential layer” model. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 306–314. [[CrossRef](#)]
52. Queiroz, M.F.; Rachel, K.; Melo, T.; Sabry, D.A.; Sasaki, G.L.; Alexandre, H.; Rocha, O. Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation. *Mar. Drugs* **2014**, *13*, 141–158. [[CrossRef](#)]
53. Farahnaky, A.; Dadfar, S.M.M.; Shahbazi, M. Physical and mechanical properties of gelatin–clay nanocomposite. *J. Food Eng.* **2014**, *122*, 78–83. [[CrossRef](#)]
54. Coates, J. Interpretation of infrared spectra, A practical approach. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2006; pp. 1–23. [[CrossRef](#)]
55. Lin, S.-Y.; Wang, S.-L. Advances in simultaneous DSC–FTIR microspectroscopy for rapid solid-state chemical stability studies: Some dipeptide drugs as examples. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 461–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Liu, F.; Majeed, H.; Antoniou, J.; Li, Y.; Ma, Y.; Yokoyama, W.; Zhong, F. Tailoring physical properties of transglutaminase-modified gelatin films by varying drying temperature. *Food Hydrocoll.* **2016**, *58*, 20–28. [[CrossRef](#)]
57. Dai, C.A.; Chen, Y.-F.; Liu, M.-W. Thermal properties measurements of renaturated gelatin using conventional and temperature modulated differential scanning calorimetry. *Appl. Polym. Sci.* **2006**, *99*, 1795–1801. [[CrossRef](#)]
58. Mendieta-Taboada, O.; Sobral, P.J.A.; Carvalho, R.A.; Habitate, A.M.B.Q. Thermomechanical properties of biodegradable films based on blends of gelatin and poly(vinyl alcohol). *Food Hydrocoll.* **2008**, *22*, 1485–1492. [[CrossRef](#)]
59. Skopinska-Wisniewska, J.; Tuszyńska, M.; Olewnik-Kruszkowska, E. Comparative Study of Gelatin Hydrogels Modified by Various Cross-Linking Agents. *Materials* **2021**, *14*, 396. [[CrossRef](#)]
60. Murić, B.; Pantelić, D.; Vasiljević, D.; Panić, B.; Jelenković, B. Thermal analysis of microlens formation on a sensitized gelatin layer. *Appl. Opt.* **2009**, *48*, 3854–3859. [[CrossRef](#)]
61. Hong, C.-C.; Choi, J.-W.; Ahn, C.H. A novel in-plane microfluidic mixer with modified Tesla structures. *Lab Chip* **2004**, *4*, 109–113. [[CrossRef](#)]
62. Tesla, N. Valvular Conduit. U.S. Patent 1329559, 3 February 1920. Available online: <https://www.freepatentsonline.com/1329559.html> (accessed on 12 March 2022).
63. Murić, B.D.; Panić, B.M. Microlenses with focal length controlled by chemical processes. *Phys. Scr.* **2012**, *T 149*, 14071. [[CrossRef](#)]



Rapid direct laser writing of microoptical components on a meltable biocompatible gel

Mihajlo D. Radmilović¹ · Branka D. Murić¹ · Dušan Grujić¹ · Boban Zarkov² · Marija Z. Nenadić³ · Dejan V. Pantelić¹

Received: 15 November 2021 / Accepted: 20 March 2022 / Published online: 17 May 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2022

Abstract

Microoptical components are coming of age in a wide range of applications: lab-on-a-chip, imaging, detection... There are a large number of fabrication technologies capable of producing high quality individual components and their arrays. However, most of them require high-end and costly equipment, complex and time-consuming fabrication, harmful chemicals, resulting in expensive final products. Here we present a technology capable of producing high quality microoptical components, using low-end direct laser writing on a biocompatible, environmentally friendly hydrogel, without any waste substances. The gel is locally and controllably melted while surface tension forces shape the optical component, following the laser beam profile. The process is so quick that a single microlens is fabricated in less than a second, and can be used instantly without any further processing. The technology is neither subtractive nor additive, and the base material is simply displaced producing a smooth surface. We have been able to fabricate individual microlenses and their arrays (positive, negative, aspheric), gratings and diffractive components. The technology is tested by generating unique, difficult to counterfeit QR-codes. Turnaround time is fast and makes the technology suitable both for rapid prototyping and serial production.

Keywords Laser writing · Microoptics · Hydrogels · Biocompatibility · Security

This article is part of the Topical Collection on Photonics: Current Challenges and Emerging Applications.

Guest edited by Jelena Radovanovic, Dragan Indjin, Maja Nestic, Nikola Vukovic and Milena Milosevic.

✉ Dejan V. Pantelić
pantelic@ipb.ac.rs

¹ Institute of Physics Belgrade, University of Belgrade, Pregrevica 118, 11080 Belgrade, Serbia

² Directorate for Measure and Precious Metals, Mike Alasa 14, 11000 Belgrade, Serbia

³ Institute for Biological Research Siniša Stanković, National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade, Bulevar despota Stefana 142, 11060 Belgrade, Serbia

1 Introduction

There is a growing need for complex microoptical devices (Kempe 2009) and their use for micro-optoelectromechanical (MOEMS) and lab-on-a-chip applications. However, their fabrication is usually a complex, time consuming, multistep process, requiring several high-end technologies: microlithography (Grigaliūnas et al. 2016), embossing (Moore et al. 2016), femtosecond direct laser writing (Deng et al. 2019), diamond turning (Zhou et al. 2011; Zhang et al. 2020). These are the reasons why prevailing micro-fabrication methods are not suitable for individualized production or rapid prototyping. Also, materials used for microfabrication are complex and usually toxic. A huge volume of fabricated devices enhances the problem of safe and environmentally friendly disposal of microfabricated devices.

Among other materials, gels have attracted attention as a candidate material for MOEMS. There is a wide variety of gels with characteristic solid–liquid transition induced by coil to helix transformation (Taylor et al. 2017). The transition can be induced by temperature, chemicals or electric field. Not so many of them have good optical properties and only a few appropriate ones are easy to fabricate, nontoxic and environmentally friendly. Optical gels (Duarte-Quiroga and Calixto. 2000; Li et al. 2019) have been used to manufacture dynamical and responsive microlenses. However, their response is slow and chemistry complex (Guan and Zhang 2011).

Microlenses have found application niches for illumination (Lee et al. 2013), imaging (Zhang et al. 2020) and, in particular, security (Walger et al. 2020). Applied technologies are advanced and complex favoring mass production and precluding individualization of security features (Jiang et al. 2019).

Previously (Krmopot et al. 2013), we have analyzed optical properties of negative microlenses using NLM. Here we present a technology based on nontoxic, environmentally friendly gels which are locally melted by direct laser writing. Our aim was to develop a material that is optically transparent, easily and instantly meltable by localized irradiation, durable and made from ordinary “kitchen” chemicals (by E number classification of food additives). We describe material properties, its biocompatibility, analyze the process of local laser-induced melting, demonstrate its capabilities for security purposes and envision their further use for microfluidic and lab-on-a-chip applications.

2 Materials and methods

2.1 Preparation of photo-meltable gel

Previously we have used gelatin plasticized with tot’hema (an oral solution for anemia treatment) and sensitized with eosin Y (a red fluorescent dye with absorption maximum at 530 nm) to produce microoptical components (Murić et al. 2007, 2008). We were able to manufacture negative (concave) microlenses, but the problem was gradual darkening of the material. That is why we replaced a commercial tot’hema with a water solution composed of several ingredients acting as plasticizers, humectants, and preservatives. This solution (designated PS for brevity) consists of: 0.2 ml of glycerol, 0.3 g of sucrose, 8 mg of glucose, 2 μ l of polysorbate 80.6 mg of citric acid, and 2 mg of sodium benzoate (everything

is expressed per 1 ml of solution). The addition of PS improves mechanical and optical properties of the gelatin layer (elasticity, durability and stability, optical transparency...).

After swelling of gelatin in deionized water for one hour, and heating at 50 °C in the water bath (Vela™, Cole Parmer), 5% aqueous gelatin solution was prepared. Following, 0.01 g of sodium chloride and 0.16 ml of PS were further added (with stirring) to prevent gelatin layer crystallization and breaking. The preparation of photo-melttable gel (PMG) is concluded by adding 20 µl of eosin (2% aq. sol.). Quantity of all added components is expressed per 1 ml of gelatin solution. Finally, the PMG solution was centrifuged (Cole Parmer 17250–10 at 3400 rpm/min) to remove all particulates and impurities.

A PMG layer was prepared by the gravity settling method i.e., by pouring a constant volume of the prepared solution onto precisely leveled and well cleaned microscope glass slide bounded by a Plexiglas frame. After gelation, layers were left in the dark overnight, under ordinary environmental conditions ($T=25$ °C, $RH=50$ – 60%). During that time, a certain amount of water evaporated from the layer, as verified gravimetrically. After reaching the equilibrium value, the water content remains constant. The thickness of the dried layer depends on the amount of poured solution and can be chosen anywhere between several tens of microns up to several millimeters or even centimeters. In our experiments, layer thickness was kept at 100 µm.

2.2 Direct laser writing system

We used a home-made laser writing device (Zarkov et al. 2012) operating at 488 nm laser (Toptica iBEAM SMART with a maximum power of 100 mW). The laser beam is focused by the long working distance objective (Mitutoyo, 20×0.42 NA). Compact, color scientific CMOS camera (Thorlabs CS505CU5 Megapixel), was used to position the PMG layer at the desired position with respect to the focal point. A coordinate stage (Ludl BioPoint2, resolution 50 nm, repeatability 2 µm) with G-code enabled Arduino microcontroller was used to move the layer with respect to the laser beam. G-code (a standard programming language for CNC machines (Walger et al. 2020) was used to control movement with adjustable speed. Appropriate software was written to coordinate and synchronize the layer movement with laser switching and intensity adjustment.

2.3 Nonlinear microscopy of microoptical surfaces

To characterize the structure of microoptical components, we used a home-made nonlinear microscope (NLM) (Rabasović et al. 2015) equipped with a femtosecond Ti: Sapphire laser (Coherent, Mira, 900F). The pulse duration is 160 fs with a 76 MHz repetition rate and average power of 100 mW. A galvo-mirror scanning system was used for raster-scanning of the samples in a commercial microscope (Leica). In order to fill the entrance pupil of microscopic objective (Carl Zeiss, 20×0.8 air) the laser beam was expanded. A tube lens produces an image on the photomultiplier tube (PMT). Images were acquired and processed using dedicated software. The spatial resolution of scanning system was 0.6–0.9 µm in lateral direction, while the axial resolution was 2.1 µm. The device turned out to be particularly suitable for analysis of generated microstructures due to its ability to “see” internal structure of the material. Here we used two-photon excited fluorescence (TPEF) modality of NLM, which was particularly suitable due to the large penetration depth of infrared excitation beam and reduced laser damage. We were interested primarily in the surface shape of microoptical components when refraction effects do not introduce significant distortion.

2.4 Thermal analysis of micro-component manufacturing process

Throughout the research we used a thermal imaging to monitor thermal effects of the laser radiation during micro-component manufacturing. A commercial thermal camera (FLIR A65) with 640×512 pixels spatial resolution, 30 fps speed, thermal resolution/NETD 50 mK and 7.5–13 μm spectral range was utilized to record temperature and its spatial distribution. We used an additional IR (ZnS) lens, placed in front of the germanium camera lens, to further magnify the thermal image of a laser-melted zone.

2.5 In vitro biocompatibility testing

Cytotoxicity of tested PMG was determined on spontaneously immortalized keratinocyte cell line (commonly referred as HaCaT) using crystal violet assay as described previously (Stojković et al. 2020) with some modifications. A high capacity to differentiate and proliferate in vitro makes HaCaT cell lines extremely useful for the purpose (Schürer et al. 1993)). HaCaT cells were grown in high-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and 1% penicillin and streptomycin (Invitrogen), at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. Forty-eight hours before treatment, cells were seeded in a 96-well microtiter adhesive plate at a seeding density of 4×10^3 cells per well. PMG was dissolved in 0.01 mM PBS to a final concentration of 8 mg mL⁻¹. After 48 h, the medium was removed and the cells were treated for next 24 h with various concentrations of the dissolved gel in triplicate wells. Subsequently, the medium was removed; the cells were washed twice with PBS and stained with 0.4% crystal violet staining solution for 20 min at room temperature. Afterwards, crystal violet staining solution was removed; the cells were washed in a stream of tap water and left to air dry at room temperature. The absorbance of dye dissolved in methanol was measured in a plate reader at 570 nm (OD₅₇₀). The results were expressed as relative growth inhibition (GI₅₀) rate (%) indicating 50% inhibition of proliferation of HaCaT cells when compared with untreated control. Experiments were performed in triplicate for each concentration of the samples and three independent experiments were performed. The criterion used to categorize the antiproliferative activity of PMG to HaCaT cell line was as follows: IC₅₀ ≤ 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ = highly cytotoxic, IC₅₀ ranged between 31 and 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ = moderately cytotoxic, IC₅₀ ranged between 201 and 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ = weakly cytotoxic, and IC₅₀ > 401 $\mu\text{g mL}^{-1}$ = no cytotoxicity (Stojković et al. 2020).

3 Results

3.1 Material characterisation

PMG is designed to be sensitive to the wavelength of the laser used in this research (488 nm) in order to enable photo-induced melting. The focused laser beam locally heated the PMG above its melting temperature and surface tension produced a concave dip. The process was observed using a thermal camera. Temperature field is localized to the vicinity of a laser beam. Within 1/5 s, the temperature reaches a maximum and decays in spite of the material being still irradiated. This is due to the bleaching of eosin and the

corresponding reduced absorption. This is associated with the layer turning transparent instead of red.

As can be seen in Fig. 1a (recorded using TPEF), the laser-produced shape is a concave sphere, while its diameter and optical characteristics depend on the laser power, irradiation time and the laser beam size (Fig. 1b). The surface of the dip is quite smooth (roughness is of the order of few nanometers) and can be faithfully approximated with a cubic polynomial, as verified by atomic force microscopy. As a result, the dip acts as a high-quality negative-power microlens (Krmopot et al. 2013).

The sensitivity threshold for a 100 μm thick PMG layer is 10^4 W/cm^2 , which we achieved with only 7.5 mW of laser power. This limit depends on the layer thickness, PS and dye concentrations, focus depth. It is important to mention that layer is also sensitive below 7.5 mW, but the material is only bleached (without lens formation).

As can be seen, exposure and bleaching are intertwined. We have observed the process by measuring the decrease of PMG fluorescence during irradiation i.e., energy absorbed by the material is dissipated through fluorescence (see Fig. 2). As a consequence, after a certain irradiation time, the layer bleaches so much to drop the temperature below the melting point. In that case, material cannot remain liquid and “freezes” its lens-like shape.

We have developed a simplified thermal model which describes temperature T and its dependence on initial temperature T_0 :

$$T = T_0 + \frac{A}{Kmc} + \frac{B}{C-A} \cdot \exp(-At) - \left(\frac{B}{C-A} + \frac{A}{Kmc} \right) \exp(-Ct) \quad (1)$$

The model includes constants A , B and C which depend on PMG layer properties: conductivity, specific heat and thickness. Additional constant K describes bleaching speed, while m is mass of the irradiated gel and c is specific heat (see Appendix).

Calculations have shown close correspondence with experimentally recorded temperature variation (compare Fig. 3a and b) and correctly describe initial temperature rise with subsequent exponential temperature drop (Eq. 1).

It is important to note that if the laser radiation is too intense it might occur that material can be bleached too fast so that melting temperature cannot be reached. We have experimentally observed this particular behaviour, which leaves material bleached without microlens being produced.

Fig. 1 a 3D image of a microlens shape recorded by NLM, b Optical microscope image showing how the size of a microlens strongly depends on the size of the laser beam.

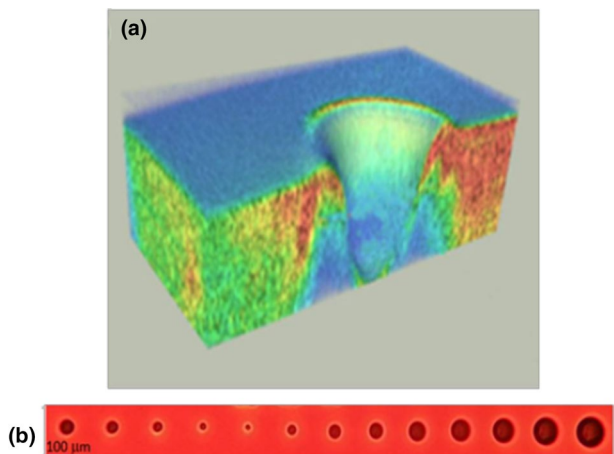


Fig. 2 Bleaching of material observed as a decrease of fluorescence intensity under irradiation with 0.05 mW focused laser beam. Fluorescence decay is represented on the linear scale. The same graph, presented on a logarithmic scale, is shown in the inset

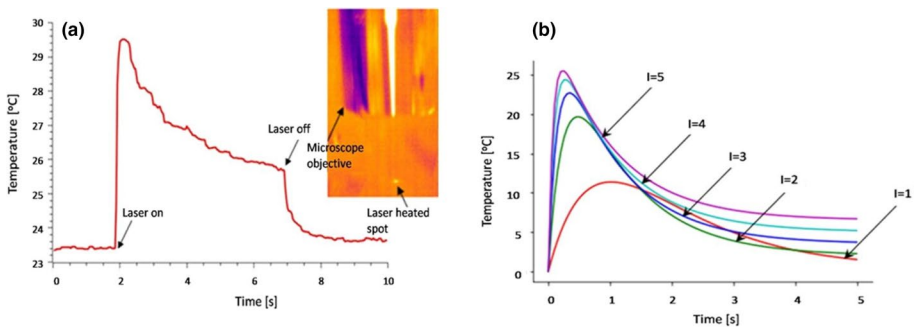
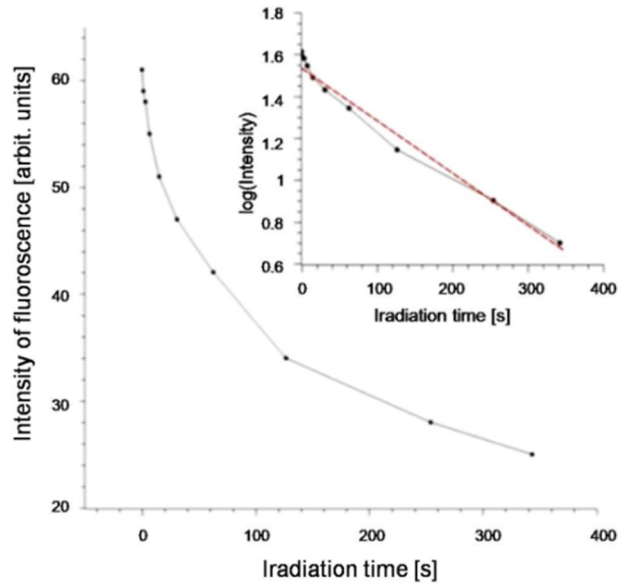


Fig. 3 **a** A temperature profile during constant-power irradiation (5 s, 15 mW laser power) of PMG layer, recorded by a thermal camera. Temperature decreases due to bleaching of eosin. After turning the laser off, temperature quickly drops to that of the environment. **b** Theoretically calculated temperature variation (using Eq. 1).

That is why we were forced to closely control the exposure in order to preclude this kind of memory effect. The effect is important if optical micro-components are too close, because the first one bleaches a certain space in its vicinity. If we try to write the next micro-component, exposure must be increased to compensate for a significant drop of absorption due to bleaching.

However, in the following we describe how more complex surface shapes can be manufactured by carefully controlling the laser focal position, beam pattern and exposure. We have manufactured good quality positive microlenses by making an arrangement six polygonally positioned spots. The material left in the center of a polygon acquires spherical surface which acts as a positive (convex) microlens. This can be seen in a NLM image of a material (Fig. 4).

Fig. 4 A NLM image of a positive microlens produced by irradiating the PMG layer at the vertices of an octagon. 3D view together with its orthogonal cross section (inset) is shown

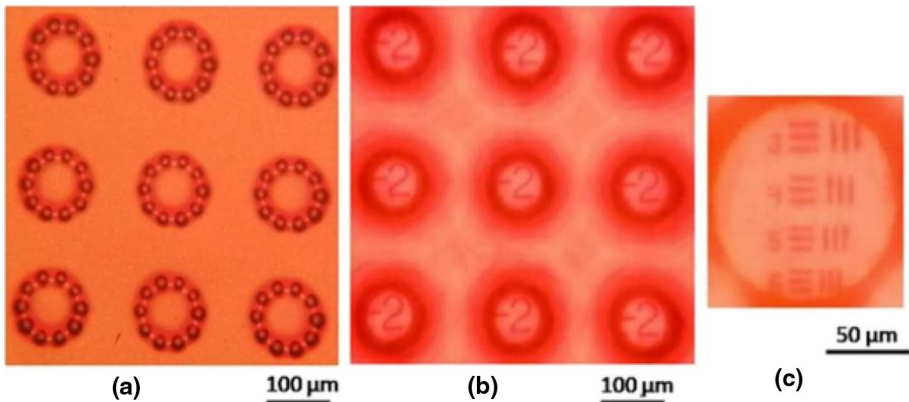
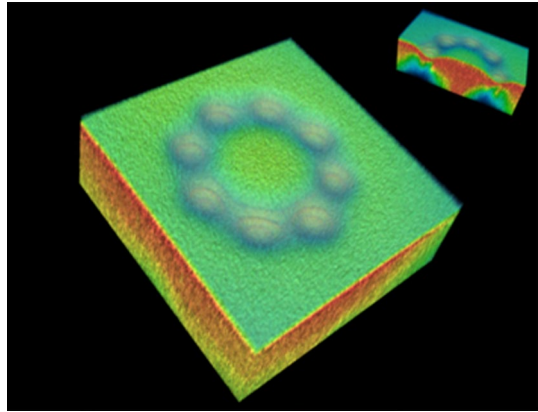


Fig. 5 **a** Reflection image of an array of 3×3 positive power microlenses produced by irradiating PMG layer at the vertices of an octagon, **b** Transmission images produced by the array, **c** A resolution chart as seen through the microlens

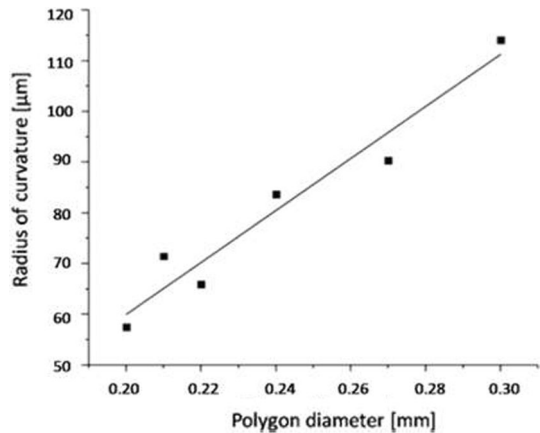
We were able to efficiently manufacture arrays of microlenses (Fig. 5a) with rather good imaging properties (Fig. 5b and c).

The best results were obtained with the octagonal arrangement of dots. Their radius of curvature and the corresponding focal length can be controlled by the diameter of a polygon (Fig. 6). We have measured the spatial resolution of the PMG layer by writing a series of gratings and found that we can manufacture up to 120 lp/mm.

3.2 Positive and negative microlenses for security

Microlenses have significant security applications for document protection (Walger et al. 2019, 2020; Seidler et al. 2014). In standard implementation, their effectiveness is based on Moiré effect between a microlens array and a, suitably designed, micro-pattern or another microlens array. Superposition of two overlaid arrays produces dynamic effects similar to holograms – i.e., the resulting image varies with respect to observation direction.

Fig. 6 A linear relation between the microlens radius of curvature and the diameter of a polygonal arrangement of dots



Difficulty of counterfeiting such a pair of arrays stems from tight tolerances of microlens parameters and the necessity of their strict alignment. While this seems to be an attractive security feature it is technologically complex to achieve in practice. That is why the corresponding technologies are economically viable only through mass production (usually by printing or embossing). Production of individualized, unique, hard-to-copy security elements is thus difficult and impractical.

Here we show that the technology presented here offers another way to produce unique security elements quickly and easily (on the fly) by changing microlens parameters (position, sag, diameter, focal length, mutual position). We demonstrate the principle by producing a microlens-based QR-code (see Fig. 7(a) and (b)).

Each dot of a standard 21×21 QR-code is a negative microlens, except for one or several selected, which are a positive. Security features are focal lengths of individual microlenses (either positive or negative) of a QR-code.

Focal length of each microlens is revealed by placing a closely positioned micro-sized object while detecting the size of its image. Here we used a butterfly wing scale as such object, positioned on the other side of a microlens substrate. Due to the wide view field of negative microlenses, image of an object is seen across several microlenses in shifted positions – yet another, difficult to copy, feature (Fig. 7(c) and (d)).

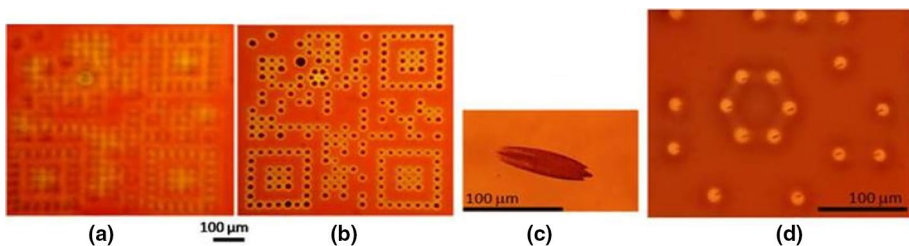


Fig. 7 **a, b** A microlens-based QR-code in two focal positions. **c** An image of butterfly wing scale observed through one of a QR-code lenses. **d** Multiple images of butterfly wing scale from Fig. (c) produced by QR code microlenses.

3.3 In vitro cytotoxicity of hydrogel samples towards HaCaT cells

Cytotoxic effects of PMG were investigated using HaCaT cell culture. To evaluate the cytotoxic effect of the PMG dissolved in 0.01 mM PBS on HaCaT cells, the crystal violet assay was performed. Relative growth rate of HaCaT cells in the presence of different concentrations of tested sample compared to untreated control is presented in Fig. 8. Tested sample was evaluated as non-toxic to the HaCaT cell line with respective IC_{50} values of ≈ 400 mg/mL, a concentration which is considered as the limit of toxicity (Stojković et al. 2020).

4 Discussion

Microlens fabrication enables efficient control of each individual microlens by controlling a number of process parameters: laser beam size, shape, power, angle, speed and exposure, as well as physical/chemical properties of the PMG layer. There are certain limitations, drawbacks and possibilities which will be discussed in this section.

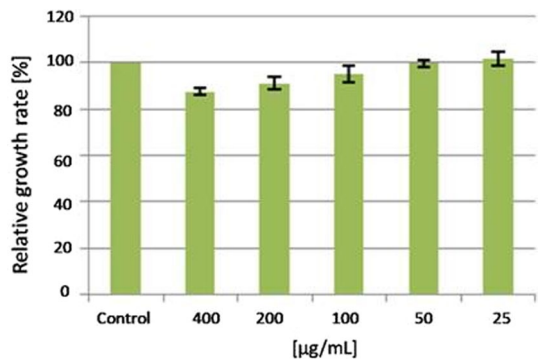
Manufacturing speed of microlenses is limited by the laser energy density (determined by the laser power and focal point size), absorbance, viscosity and surface tension of melted gel. This is a complex process difficult to model in a simple way. However, we were able to find appropriate conditions experimentally. Laser powers above 7.5 mW and exposure times longer than 100 ms gave us complete control of the process and production of predictable lens size and profile.

The material is soft and elastic due to the presence of a plasticizer. Its stress–strain behavior depends on the PS concentration, as shown earlier in the case of commercial tot'hema, when the corresponding Young's moduli were between 1 and 10 MPa (Murić et al. 2013). Also, for high-concentration (30%) of tot'hema, more than 200% elongation was achieved. In the case of PMG, the above properties are retained. Elasticity and stretchability can be utilized to manufacture tunable optical components.

On the other hand, the softness makes material sensitive to mechanical scratching and damaging. That is why it must be protected by an additional mechanically resistant layer. Alternatively, the material can be hardened by simply placing in water to let plasticizer diffuse out.

We observed the layer's surface under the polarizing microscope and noticed that there were no internal, residual stresses (material is homogeneous).

Fig. 8 Relative growth rate of HaCaT cells in the presence of different concentrations of PMG



The material remains photosensitive for a long time even if exposed to normal laboratory conditions. Its shelf life is mainly determined by slow evaporation of water and photo-bleaching of sensitizer. If the atmosphere is too dry, concentration of water diminishes and constituent chemicals start crystallizing and the layer attains a milky appearance. In that sense, it is preferable to keep material in a humid and light-tight container. From the practical experience, material processing can be performed under normal lighting without special precautions or dimmed light. However, we have a few years old gelatine layers, stored under normal laboratory conditions, which are still photosensitive and we were able to produce good quality microlenses. They are very stable, too, and the image quality remains constant during many months and even years under normal conditions. Of course, material has to be protected from scratches and dust as in the case of all the other optical surfaces.

The material presented here is not unique. Instead of eosin, we have tried gelatin sensitization with several natural fluorophores: anthocyanin, betanin and several other food dyes with excellent results. Additionally, we have tried other gels based on chitosan and pectin with very promising results. That is why we can claim that many other gels, humectants and sensitizers can further enhance microlens production speed and surface quality.

Depending on how material is prepared, buckling induced by evaporation of solvent produces unpredictable surface pattern. Even then, re-melting of material by the laser beam flattens the surface and produces good optical components. As a result, a combination of random buckling surface structure and regular optical components produce uniquely and nonreproducibly complex security features.

Yet another possibility stems from photo damage of the material, which occurs above certain power density threshold. In that case, material carbonizes, producing strongly localized damage zone in a center of the laser spot. Interestingly, this does not preclude microlens imaging, but adds a new feature to a security component.

Here we emphasize that the technology described here is neither additive nor subtractive because no material is added or removed. It is important to note that all the substances used are not volatile and the melting temperature of the material is below 50 °C, so that water evaporation is negligible. However, do to the melting, surface tension compresses and densifies the material. This is witnessed by the increased intensity of fluorescence at the circumference of the cavity. That is why the volume of the laser-induced dip is larger than the volume on the edge (Murić et al. 2009).

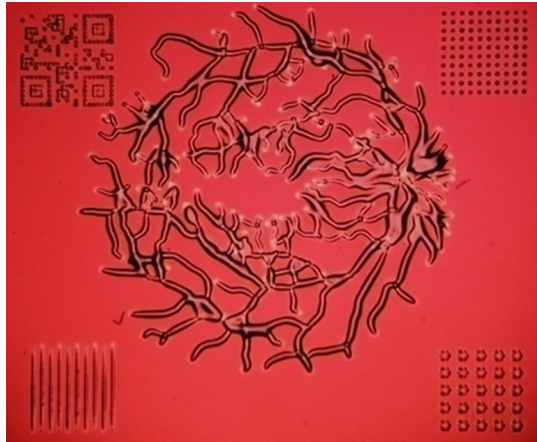
The material is complex mixture of nontoxic chemical aiming to fulfill several requirements: preventing crystallization, retention of constant amount of water, reducing the melting point of the gel, to enable efficient flow during laser melting, retaining plastic and elastic properties of the material, increasing the laser energy absorption. Proper composition was found experimentally and found to be stable before and after microlens fabrication.

Material has certain drawbacks too. It is soft, and can be easily damaged if unprotected. On the other hand, this property can be used to detect tampering and produce tamper sensitive tags. Material surface is sticky and dust particles easily adhere to its surface. Therefore, cleanliness is important factor in practical usage of the material.

We used gelatin as a base material, but the working principle is universal and can be applied to any material which can be locally melted, without damage on a sufficiently low temperature (preferably below 100 °C). In that respect we tested chitosan, too with quite good results which will be presented in the future publications.

Applications are not limited to microlenses and arbitrary structures can be manufactured such as microchannels, diffraction gratings, holograms (see Fig. 9).

Fig. 9 A range of microoptical structures which can be fabricated on the PMG layer – retinal vessel model (center), QR-code (top left), negative microlens array (top right), positive microlens (bottom right) array, grating (bottom left)



5 Conclusions

We have presented a new, gel-based, material suitable for the fast and efficient generation of a wide range of microoptical and micromechanical components.

There are several advantages of the proposed method:

- Cheap lasers can be used as long as they have a circular laser beam profile and 2% power stability within the millisecond time interval.
- Chemicals used to produce the PMG are non-poisonous at the stated concentrations, as verified by biocompatibility tests.
- Fabrication time is fast enough to enable rapid prototyping of on-demand components.
- A variety of optical and micromechanical components can be fabricated within a single manufacturing operation.
- Components require no further processing and can be used immediately following fabrication.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11082-022-03681-0>.

Acknowledgements The authors acknowledge funding provided by the Institute of Physics Belgrade, University of Belgrade, through the grant by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia.

Author Contributions BM synthesized a photo-meltable material. DG, BZ and DP constructed a laser writing device used through this research. DP DG and MR wrote control software. BM DP and MR tested material properties. MZN. tested in vitro biocompatibility and microbial susceptibility toward synthesized gel material. DP Developed a thermal model of material bleaching. DP BM and MR jointly wrote the manuscript.

Funding This research was partially funded by the NATO Science for Peace and Security programme, project SPS G5618, Biological and bioinspired structures for multispectral surveillance.

Declarations

Conflict of interest There are no conflicts to declare.

References

- Deng, C., Kim, H., Ki, H.: Fabrication of a compound infrared microlens array with ultrashort focal length using femtosecond laser-assisted wet etching and dual-beam pulsed laser deposition. *Opt. Exp.* **27**, 28679–28691 (2019)
- Duarte-Quiroga, R.A., Calixto, S.: Dynamical optical microelements on dye-sensitized gels. *Appl. Opt.* **39**, 3948–3954 (2000)
- Grigaliūnas, V., Lazauskas, A., Jucius, D., Viržonis, D., Abakevičienė, B., Smetona, S., Tamulevičius, S.: Microlens fabrication by 3D electron beam lithography combined with thermal reflow technique. *Microelectron. Eng.* **164**, 23–29 (2016)
- Guan, Y., Zhang, Y.: PNIPAM microgels for biomedical applications: from dispersed particles to 3D assemblies. *Soft Matter* **7**, 6375–6384 (2011)
- ISO 6983-1:2009(en) Automation systems and integration — Numerical control of machines — Program format and definitions of address words — Part 1: Data format for positioning, line motion and contouring control systems
- Jiang, H., Kaminska, B., Porras, H., Raymond, M., Kapus, T.: Microlens arrays above interlaced plasmonic pixels for optical security devices with high-resolution multicolor motion effects. *Adv. Opt. Mater.* **7**, 1–10 (2019)
- Kemme, S.A.: *Microoptics and nanooptics fabrication*. CRC Press (2009)
- Krmpot, A.J., Tsevelakis, G.J., Murić, B.D., Filippidis, G., Pantelić, D.V.: 3D imaging and characterization of microlenses and microlens arrays using nonlinear microscopy. *J. Phys. d: Appl. Phys.* **46**, 195101 (2013)
- Lee, X.-H., Moreno, I., Sun, C.-C.: High-performance LED street lighting using microlens arrays. *Opt. Exp.* **21**, 10612–10621 (2013)
- Li, Y., Guo, M., Li, Y.: Recent advances in plasticized PVC gels for soft actuators and devices: a review. *J. Mater. Chem. c* **7**, 2991–3009 (2019)
- Moore, S., Gomez, J., Lek, D., You, B.H., Kim, N., Song, I.H.: Experimental study of polymer microlens fabrication using partial-filling hot embossing technique. *Microelectron. Eng.* **162**, 57–62 (2016)
- Murić, B., Pantelić, D., Vasiljević, D., Panić, B.: Microlens fabrication on top of hema sensitized gelatin. *Opt. Mater.* **30**, 1217–1220 (2008)
- Murić, B., Pantelić, D., Vasiljević, D., Panić, B., Jelenković, B.: Thermal analysis of microlens formation on a sensitized gelatin layer. *Appl. Opt.* **48**, 3854–3859 (2009)
- Murić, B., Pantelić, D., Vasiljević, D., Zarkov, B., Jelenković, B., Pantović, S., Rosić, M.: Sensitized gelatin as a versatile biomaterial with tailored mechanical and optical properties. *Phys. Scr.* **T157**, 014018 (2013)
- Murić, B.D., Pantelić, D.V., Vasiljević, D.M., Panić, B.M.: Properties of microlenses produced on a layer of top of hema and eosin sensitized gelatin. *Appl. Opt.* **46**, 8527–8532 (2007)
- Rabasović, M.D., Pantelić, D.V., Jelenković, B.M., Čurčić, S.B., Rabasović, M.S., Vrbica, M.D., Lazović, V.M., Čurčić, B.P.M., Krmpot, A.J.: Nonlinear microscopy of chitin and chitinous structures: a case study of two cave-dwelling insects. *J. Biomed. Opt.* **20**, 16010 (2015)
- Schürer, N., Köhne, A., Schliep, V., Barlag, K., Goerz, G.: Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **2**, 179–185 (1993)
- Seidler, R., Heim, M., Wiedner, B., Rahm, M.: Method for manufacturing security paper and microlens thread. US 2014/0238628 A1 (2014)
- Stojković, D., Drakulić, D., Gašić, U., Zengin, G., Stevanović, M., Rajčević, N., Soković, M.: *Ononis spinosa* L. an edible and medicinal plant: UHPLC-LTQ-Orbitrap/MS chemical profiling and biological activities of the herbal extract. *Food & Func.* **11**, 7138–7151 (2020)
- Taylor, M., Tomlins, P., Sahota, T.: Thermoresponsive gels. *Gels* **3**, 1–31 (2017)
- Walger, T., Besson, T., Flauraud, V., Hersch, R.D., Brugger, J.: 1D moiré shapes by superposed layers of micro-lenses. *Opt. Express* **27**, 37419–37434 (2019)
- Walger, T., Besson, T., Flauraud, V., Hersch, R.D., Brugger, J.: Level-line moirés by superposition of cylindrical microlens gratings. *J. Opt. Soc. Am. a* **37**, 209–218 (2020)

- Zarkov, B., Grujić, D., Pantelić, D.: High-resolution dot-matrix hologram generation. *Phys. Scr.* **T149**, 014021 (2012)
- Zhang, T., Li, P., Yu, H., Wang, F., Wang, X., Yang, T., Yang, W., Li, W.J., Wang, Y., Liu, L.: Fabrication of flexible microlens arrays for parallel super-resolution imaging. *Appl. Surf. Sci.* **504**, 144375 (2020)
- Zhou, J., Sun, T., Zong, W.: A new approach to fabricate micro lens array using fast tool servo. *Int. J. Nanomanuf.* **7**, 475–487 (2011)

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
МУЛТИДИСЦИПЛИНАРНЕ ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ

Михајло Д. Радмиловић

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

докторска дисертација

Београд, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE
MULTIDISCIPLINARY DOCTORAL STUDIES

Mihajlo D. Radmilović

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

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ ЗА ОДБРАНУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Ментори:

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

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

Чланови комисије:

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

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

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

Датум одбране: _____

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

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

Захвалница

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Резиме

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

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

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

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

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

Научна област: Биофизика

Ужа научна област: Биофотоника

УДК број:

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

Summary

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

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

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

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

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

Scientific field: Biophysics

Scientific discipline: Biophotonics

UDC number:

САДРЖАЈ

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

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

1. Увод

1.1. Еритроцити: функције и физиолошки/патофизиолошки значај

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

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

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

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

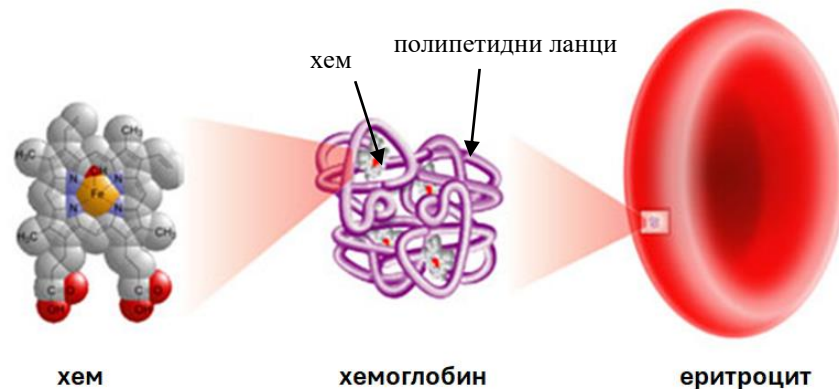
У смислу очувања функционалности еритроцита током животног века, намећу се три главна биолошка „изазова“ : а) еритроцити садрже бројне изворе оксиданата (укључујући високе нивое молекулског кисеоника везаног за хемоглобин); б) еритроцити имају високе нивое гвожђа у оквиру хемоглобина, које у слободном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

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

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

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

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



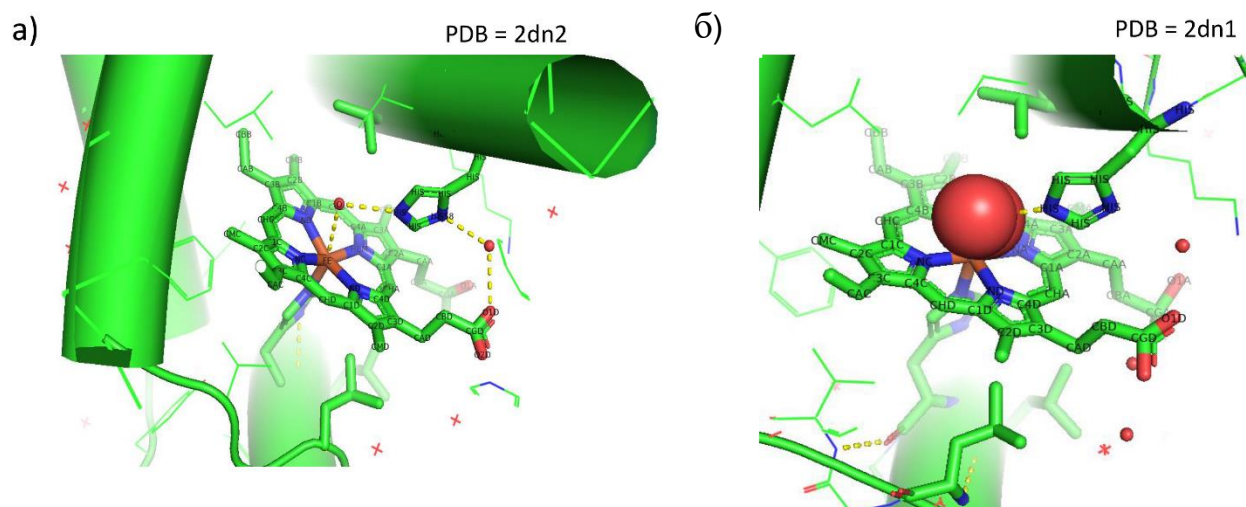
Слика 1. Схематски приказ структуре хемоглобина и хема.

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

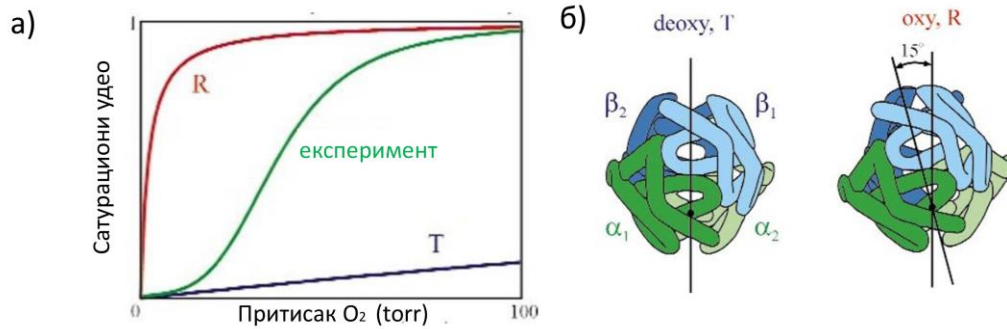
кинетичке процесе. Модел који објашњава алостеричке промене мултисубјединичних протеина је Monod–Wyman–Changeux (MWC) модел. Овај модел се заснива на хемијској равнотежи између различитих аранжмана субјединица протеина. Прелазак из једне конформационе форме у другу је стохастички и не зависи од већ везаних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

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

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



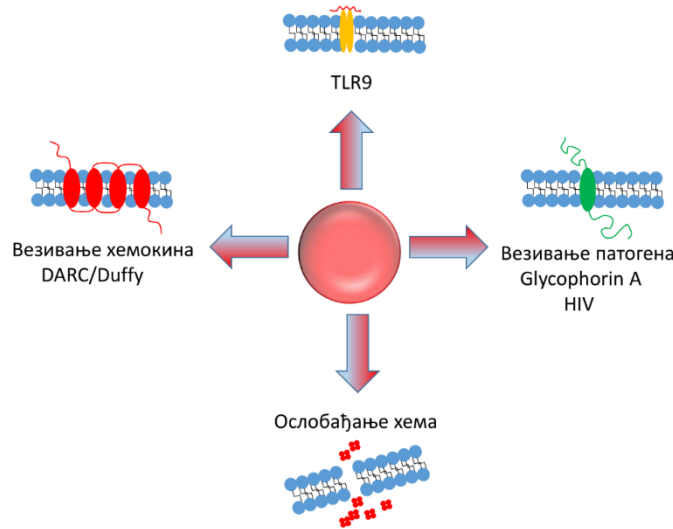
Слика 2. Просторни приказ хема–функционалне групе хемоглобина а) деокси-хемоглобин, б) окси-хемоглобин. Водоничне везе су представљене жутом испрекиданом линијом. Зелене цилиндричне структуре- α и β субјединице глобинских ланаца. За израду слике коришћен је PyMOL софтвер.



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

1.3. Значај молекула хемоглобина за имунолошку улогу еритроцита

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



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

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

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

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

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

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

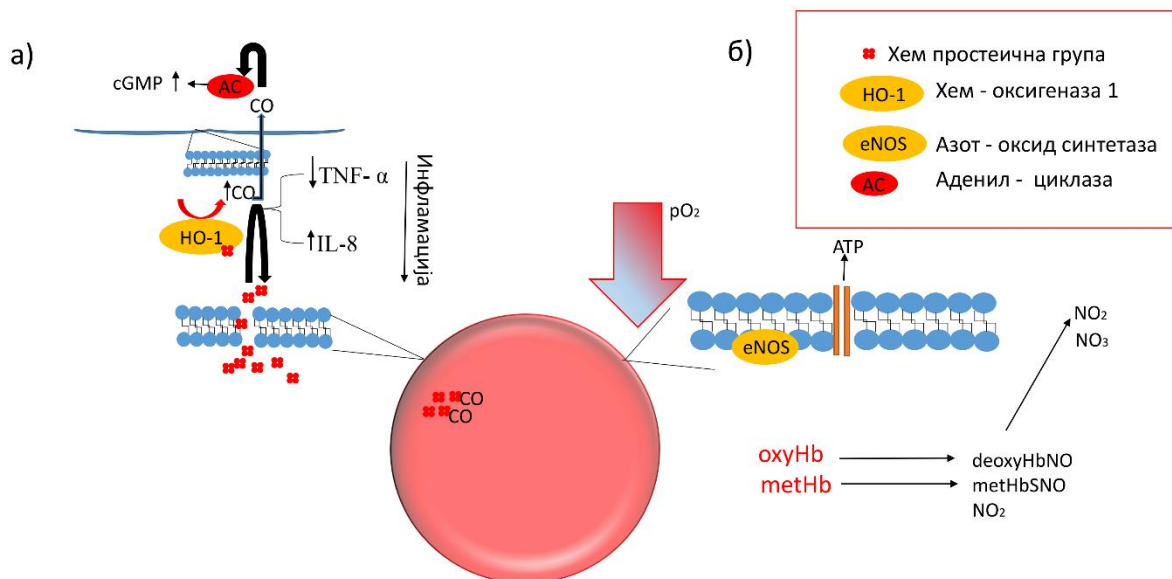
1.4. Метаболичке улоге еритроцита посредоване хемоглобином

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

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

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

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



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

1.5. Антиоксидативна улога хемоглобина

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

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

1.6. Дистрибуција и изоформе хемоглобина у еритроцитима

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

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

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

1.7. Маркери оксидативног стреса код еритроцита

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

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

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

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

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

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

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

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

1.7.1. Деформабилност еритроцита

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

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

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

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

1.8. Осликовање еритроцита и хемоглобина

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

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

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

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

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

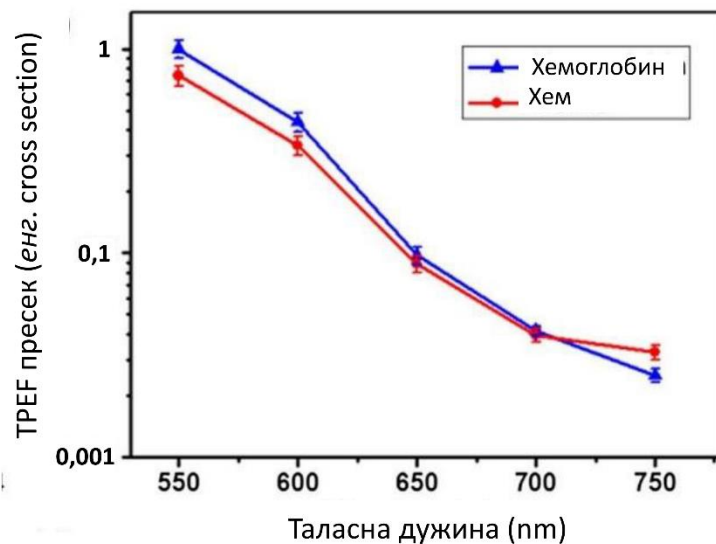
Иако је могућност примене TPEF микроскопије за анализу хемоглобина и еритроцита потврђена, ипак порекло генерисане флуоресценције приликом интеракције узорака који садрже хемоглобин са ултракратким ласерским импулсима није објашњено. Показано је да је флуоресцентно време полуживота (*енгл.* Decay time)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

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

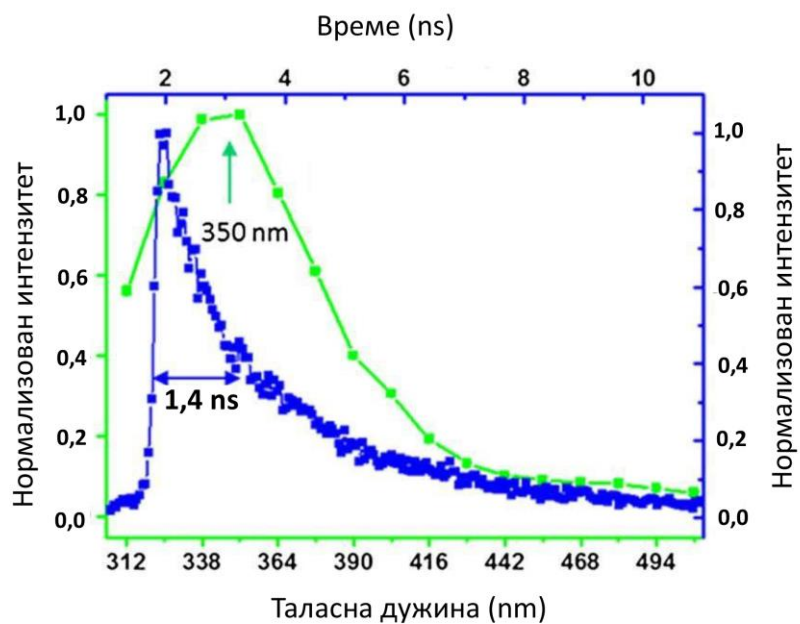
Показано је да фото-оштећење молекула приликом мултифотонске екситације може довести до појаве флуоресценције (Ladner и сар., 2014, Sun и сар., 2015), али веза са хемоглобином још увек није објашњена.

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

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



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



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

2. Циљеви и хипотезе

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

Непосредни циљеви ове дисертације:

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

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

У оквиру ове докторске дисертације постављене су следеће хипотезе:

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

3. Материјал и методе

3.1. Материјал

3.1.1 Сакупљање и обрада узорака крви здравих донора

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

3.1.2. Узорковање крви дијабетичара и контролне групе

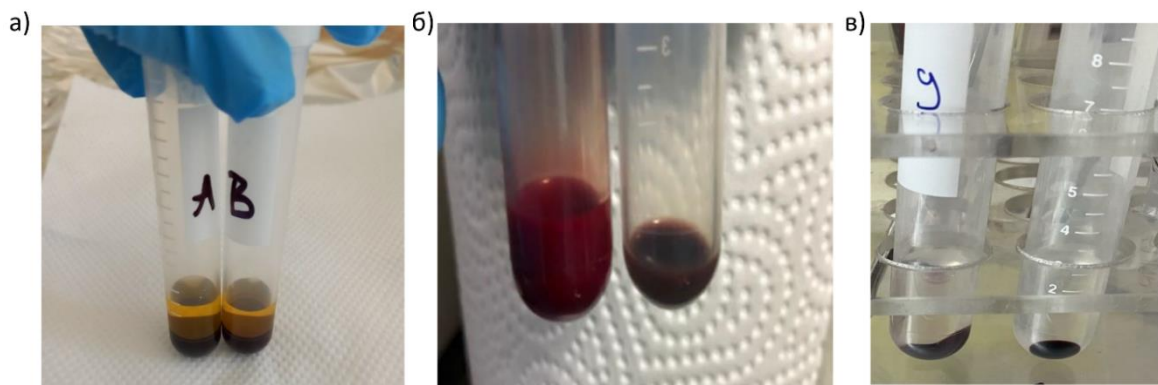
Венска крв од пацијената оболелих од DMТ1 ($n=7$) и типа II (DMТ2) ($n=6$) је узета користећи вакутејнер епрувете запремине 10 mL (BD Vacutainer® EDTA Тубе) са BD Hemogard™ која садржи 18 mg K₂EDTA). Пацијенти су били на редовним контролним прегледима у Клиници за ендокринологију, дијабетес и метаболичке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

3.1.3. Изоловање пакованих еритроцита

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

3.1.4. *In vitro* оксидација пакованих еритроцита здравих донора

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

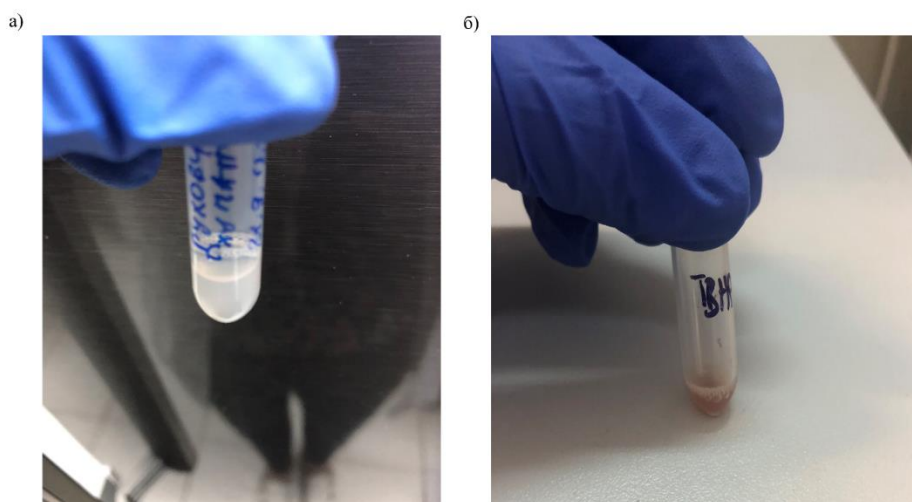


Слика 8. а) пуна крв након првог центрифугирања где се види плазма (тамно жути супернатант) и еритроцити (тамно црвени талог), б) контролни паковани еритроцити (лево) и еритроцити оксидовани 0,5 mM ТВНР (десно), в) исталожени испрани еритроцити оксидовани 0,5 mM ТВНР (тамни талог на дну епрувета).

3.1.5. Добијање еритроцитних мембрана осмотском лизом

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

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



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

3.1.6. Изоловање хемоглобина

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

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

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

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

3.2. Експериментални дизајн

3.2.1. Изолација и припрема хемоглобина за фотофизичка испитивања

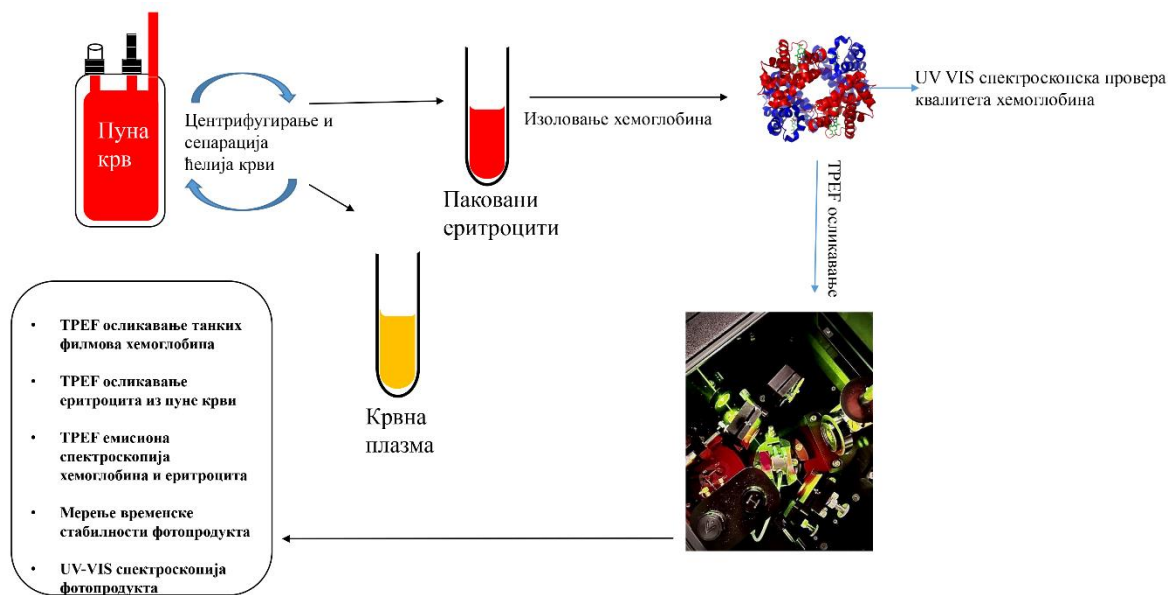
Хемоглобин пореклом од здравих донора је изолован хемоллизом пакованих еритроцита на начин описан у секцији 3.1.6. Цијанометхемоглобинском методом одређена је концентрација изолованог хемоглобина. Изоловани хемоглобин је затим нанет (развучен) на микроскопско стакло у танком слоју и осушен на ваздуху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

Изоловани хемоглобин је коришћен за:

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

Еритроцити из пуне крви су коришћени за:

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

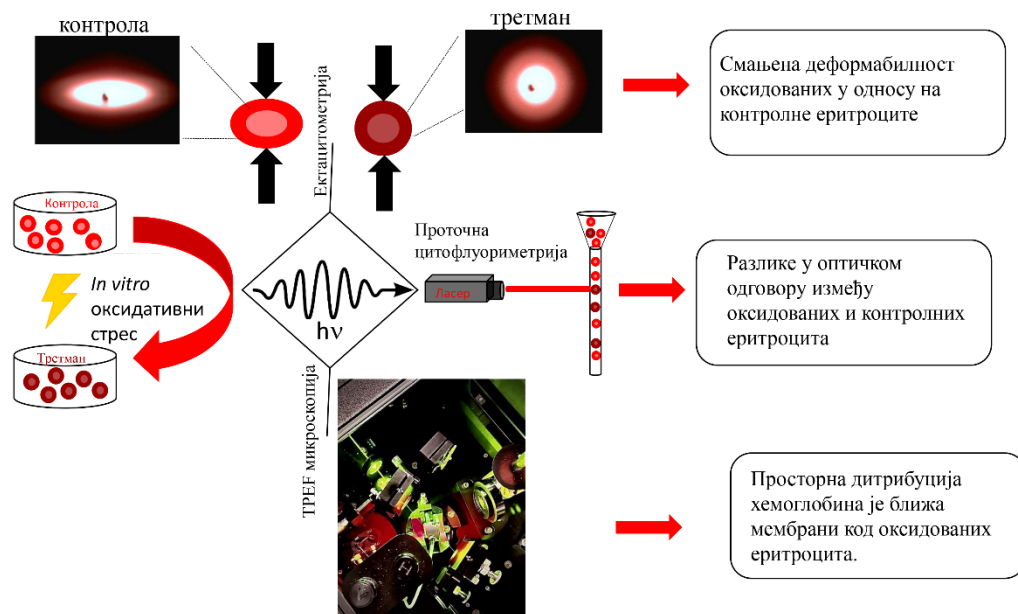


Слика 10. Експериментална поставка ТРЕФ осликовања еритроцита и хемоглобина.

3.2.2 Одређивање оптичких карактеристика *in vitro* оксидованих еритроцита

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

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



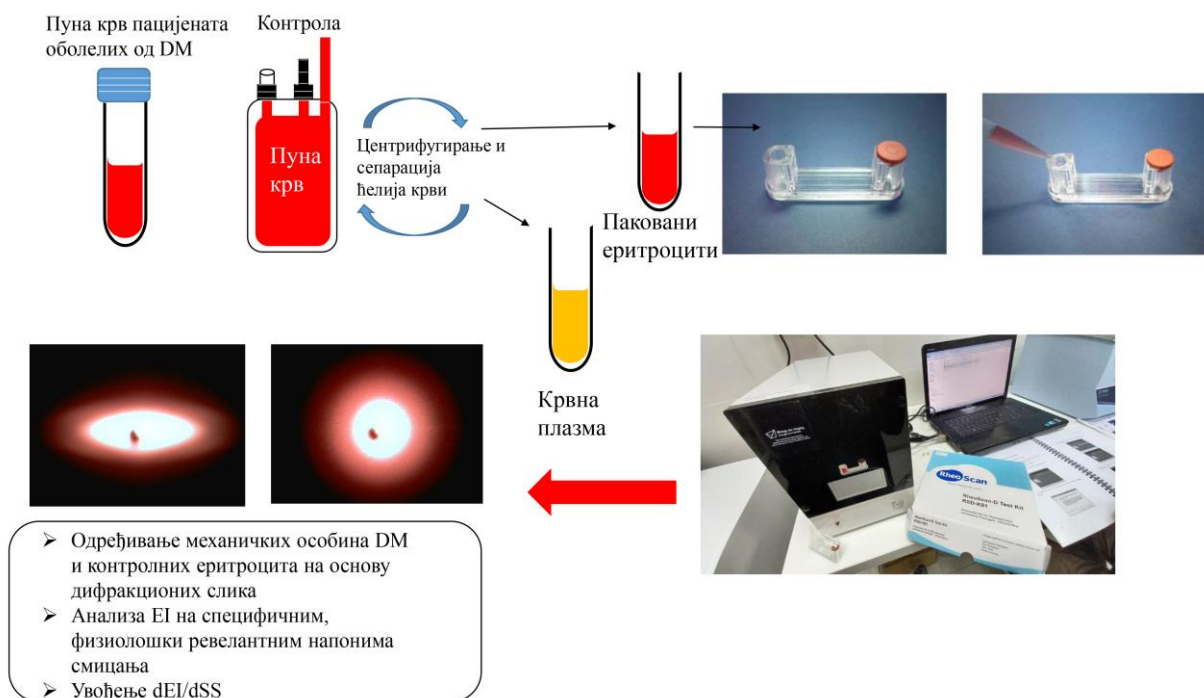
Слика 11. Експериментална поставка оптичких техника коришћених за проучавање оксидативног стреса еритроцита.

3.2.3. Одређивање механичких особина еритроцита

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

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

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



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

3.3. Методе

3.3.1 Одређивање концентрације хемоглобина цијанометхемоглобинаском методом

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

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

3.3.2. Припрема танких филмова хемоглобина за ТРЕФ микроскопско осликавање

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

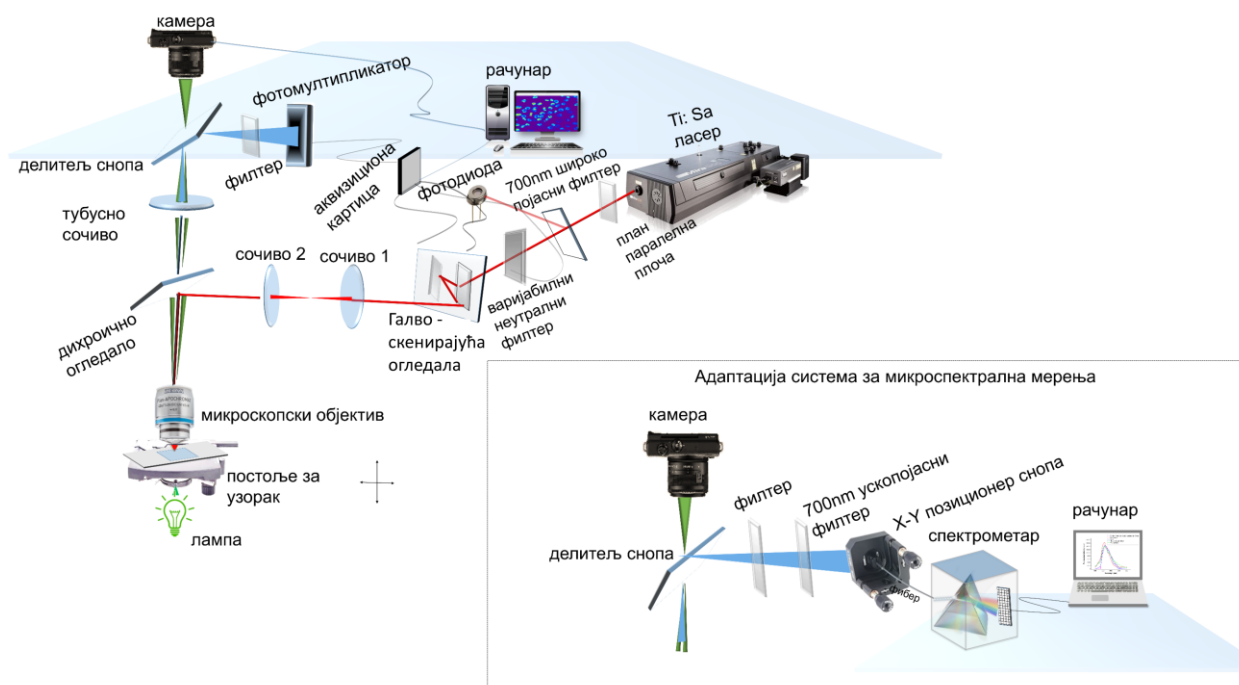
3.3.3. Припрема танких филмова протопорфина IX за ТРЕФ микроскопију

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

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

3.3.4. TPEF микроскопију еритроцита и ласерско гравирање хемоглобина

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



Слика 13. Схематски приказ TPEF скенирајућег система.

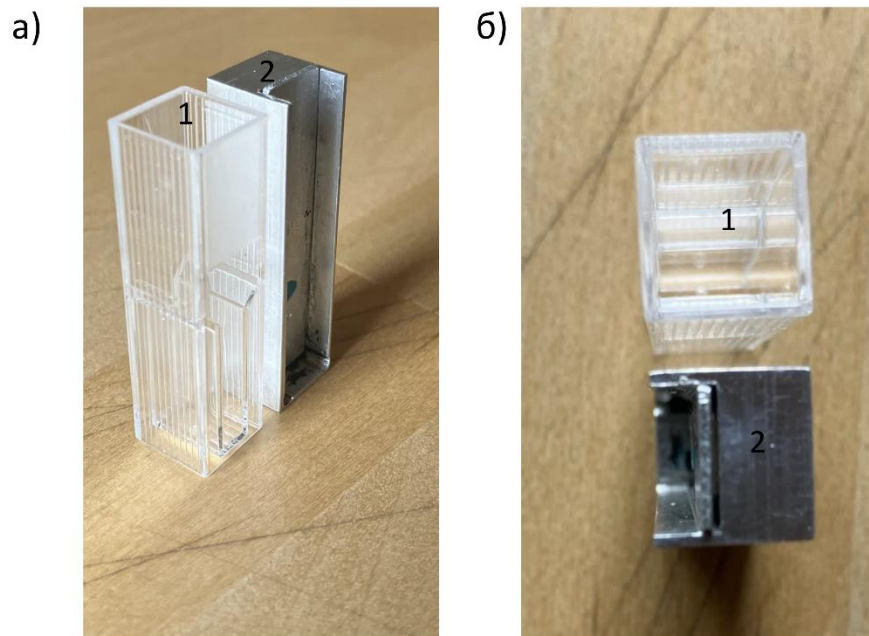
3.3.5. Једнофотонско осликавање фотопродукта хемоглобина

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

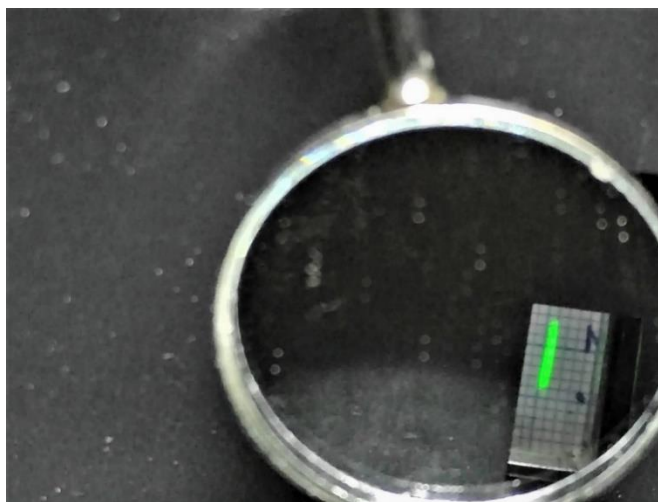
3.3.6. Мерење апсорпционих спектра фотопродукта хемоглобина

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

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



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



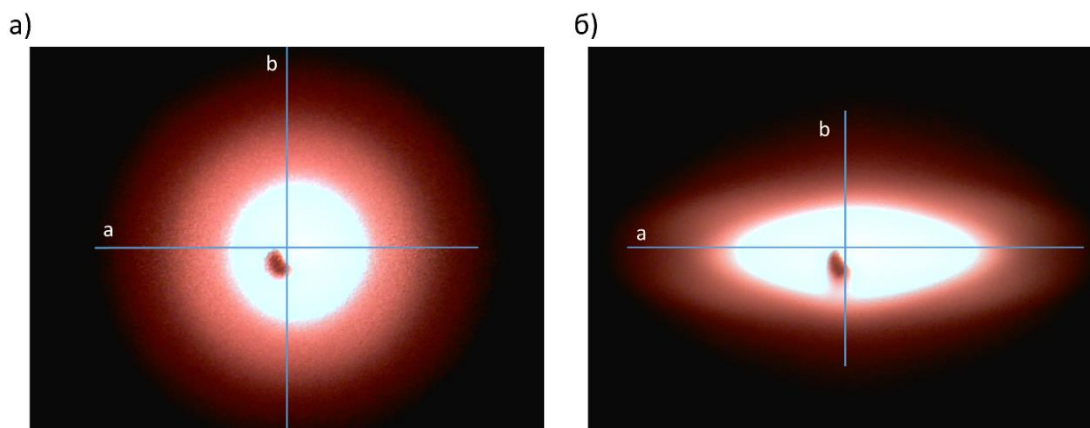
Слика 15. Одређивање положаја снопа светлости на спектрофотометру помоћу обележеног милиметарског папира. Милиметарски папир је убачен у носач у облику кивете, уместо покровног стакла са узорком. Тачка на милиметарском папиру представља вредност од 5 mm. Слика је направљена камером на мобилном телефону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

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

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

3.3.8. Одређивање деформабилности еритроцита

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



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

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

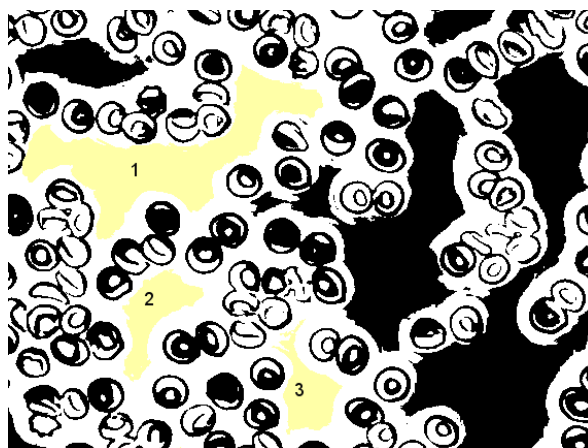
3.3.9. Проточна цитометрија еритроцита без примене обележивача

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

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

3.3.10. Фазно-контрасна микроскопија еритроцита

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

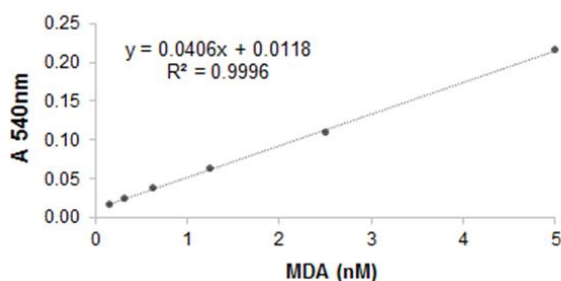


Слика 17. Одређивање степена агрегабилности ћелија, мерењем површине региона који не садржи ћелије (жути региони означени 1,2,3).

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

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

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



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

3.3.12. Тест осмотске фрагилности

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

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

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

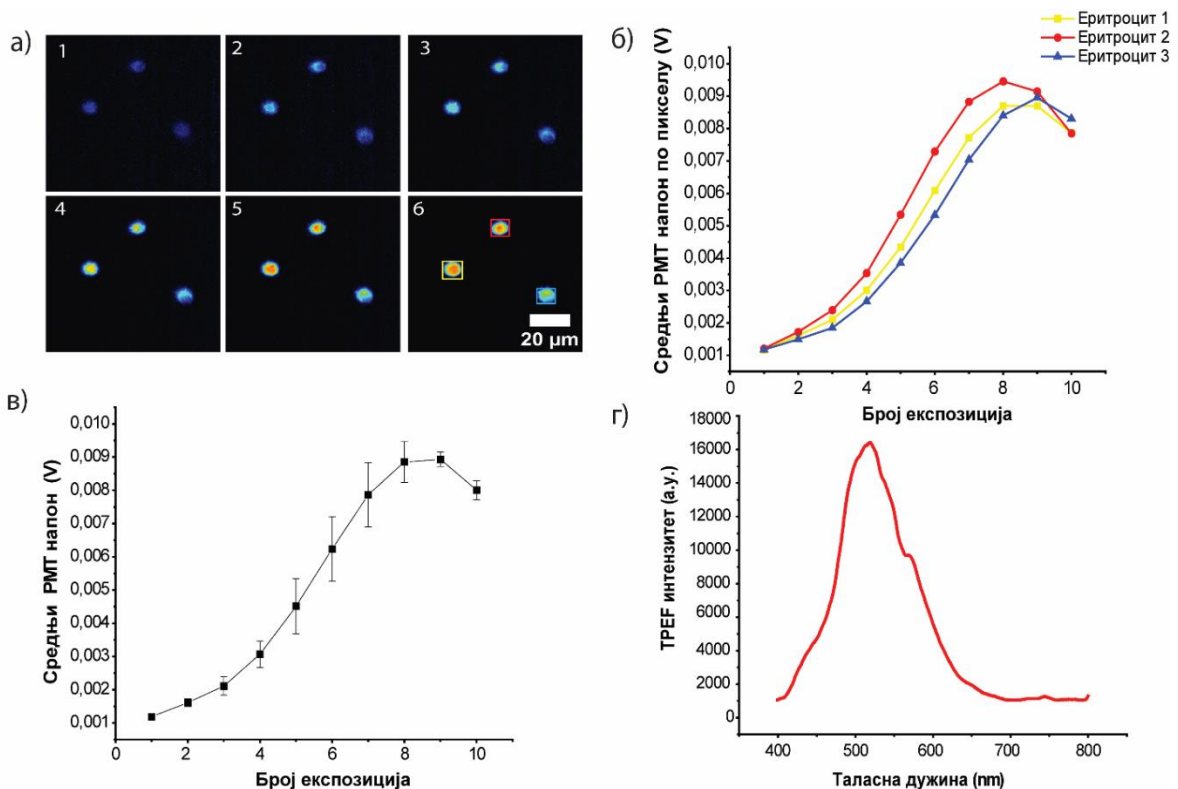
3.3.13. Статистичка анализа резултата

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

4. Резултати

4.1. Осликавање еритроцита и мерење емисионих спектра применом ТРЕФ микроскопије

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



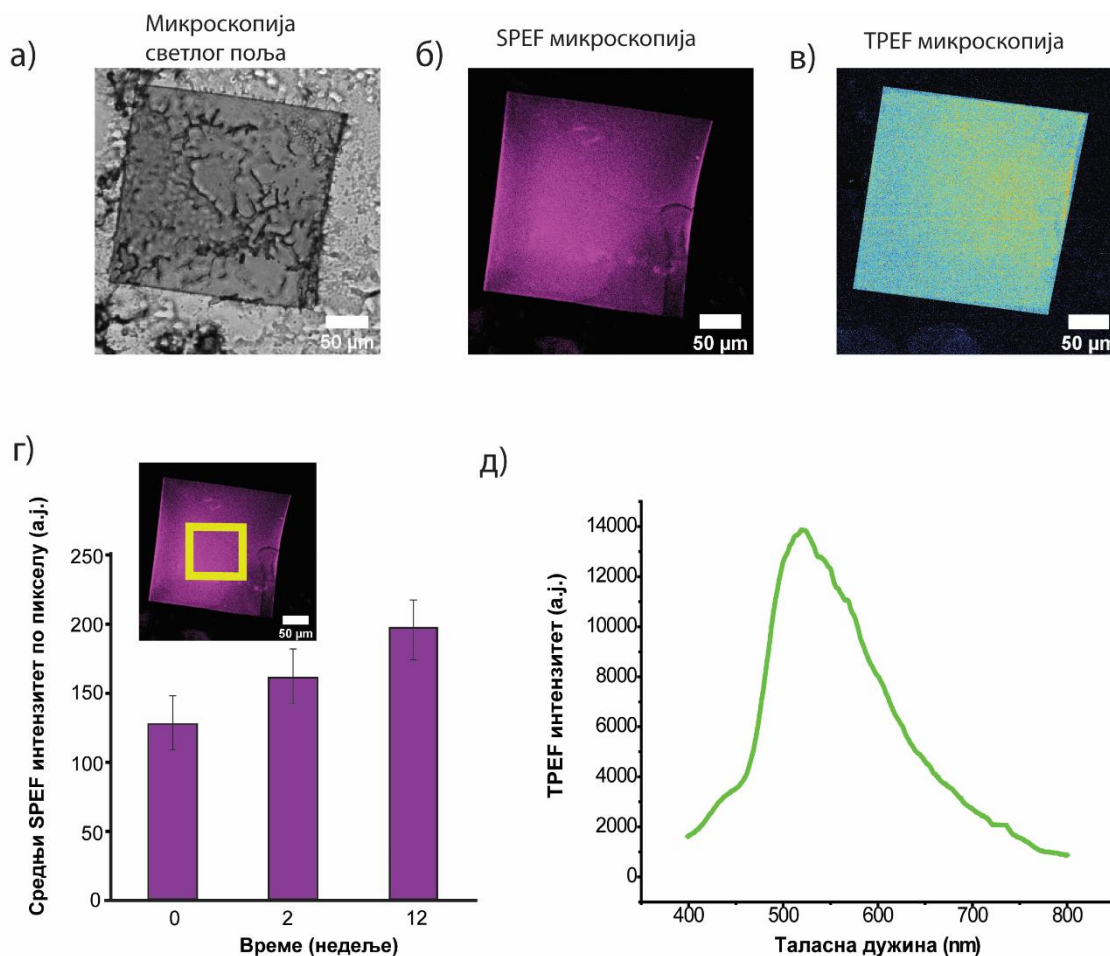
Слика 19. ТРЕФ микроскопија еритроцита. а) Сlike еритроцита (1 до 6) добијене ТРЕФ микроскопијом. Резолуција слика је 1024×1024 пиксела, настала је из 30 усредњавања са временом задржавања ласера у сваком пикселу од $8,53 \times 10^{-4}$ s. Укупно време за снимање сваке слике било је 26,1 s, што представља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

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

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

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

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



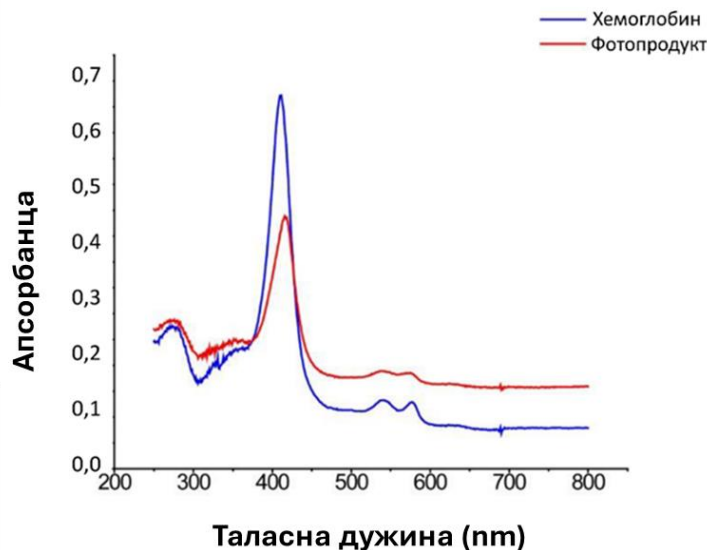
Слика 20. Формирање фотопродукта на танким филмовима хемоглобина. а) Микроскопија у режиму светлог поља приказује да је фотопродукт формиран нелинеарном микроскопијом (тамно сиви квадрат) мање оптички транспарентан од хемоглобина (светло сива околина), б) Једнофотонска емисија SPEF фотопродукта показује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

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

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

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

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



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

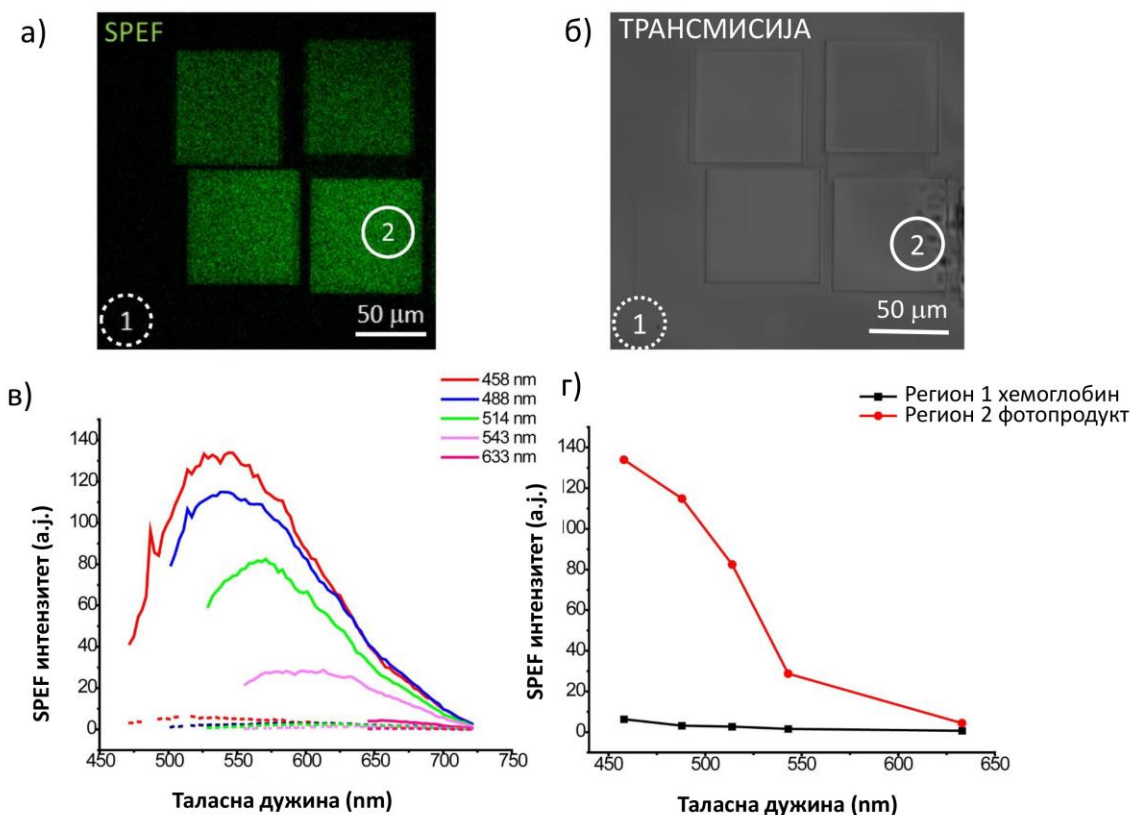
Како је и очекивано, UV/VIS апсорпциони спектар хемоглобина у танком филму је имао спектралне карактеристике оксихемоглобина (о_{ху}Н_б): апсорпциони максимуми у UV региону са максимумом на ≈ 275 nm због $\pi \rightarrow \pi^*$ прелаза и неколико апсорпционих максимума, као што је максимум на 350 nm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

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

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

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

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



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

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

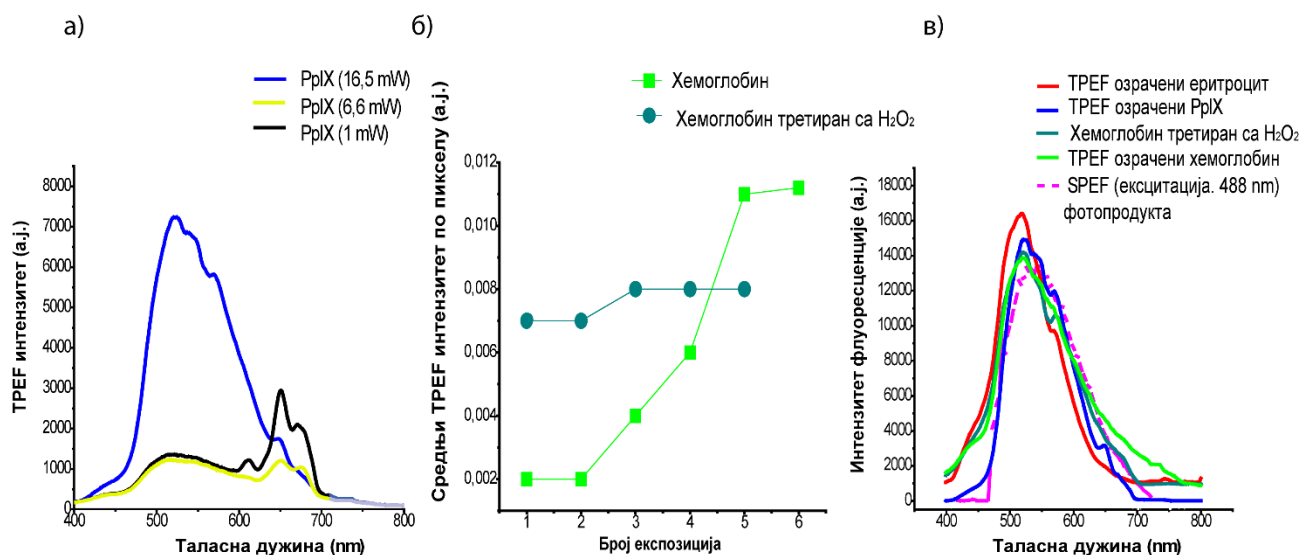
4.5. TPEF спектроскопија протопорфина IX (енгл. Protoporphyrin IX, PPIX)

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

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

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

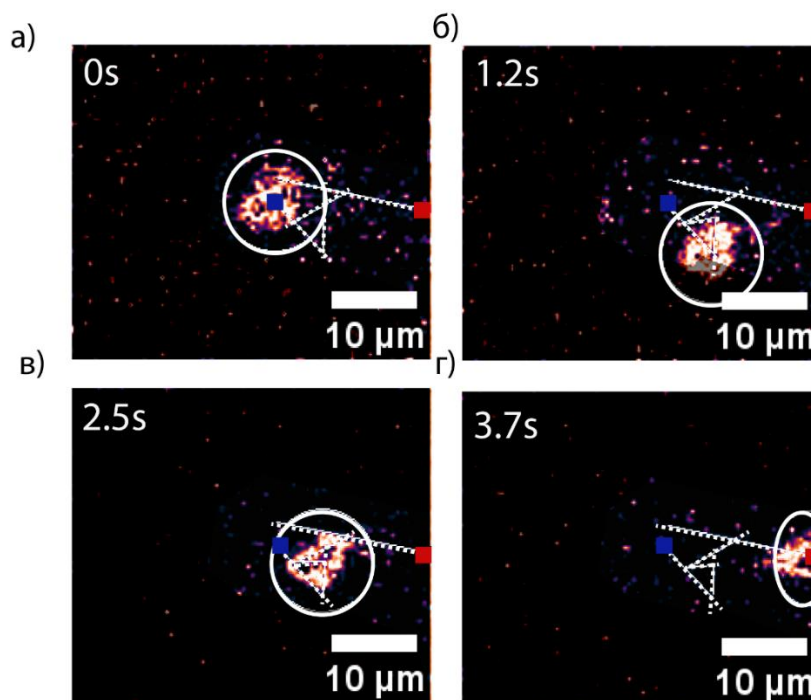
хемоглобинском филму. Уочени ТРЕФ интензитет хемоглобина третираног H_2O_2 није показивао зависност од броја експозиција, односно од апсорбоване дозе ултракратких ласерских импулса. Ово потврђује хипотезу о фотодеградацији хемоглобина, укљученој у формирање фотопродукта, јер интеракција између хемоглобина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



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

4.7. Просторно праћење фото-обележених еритроцита у пуној крви

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

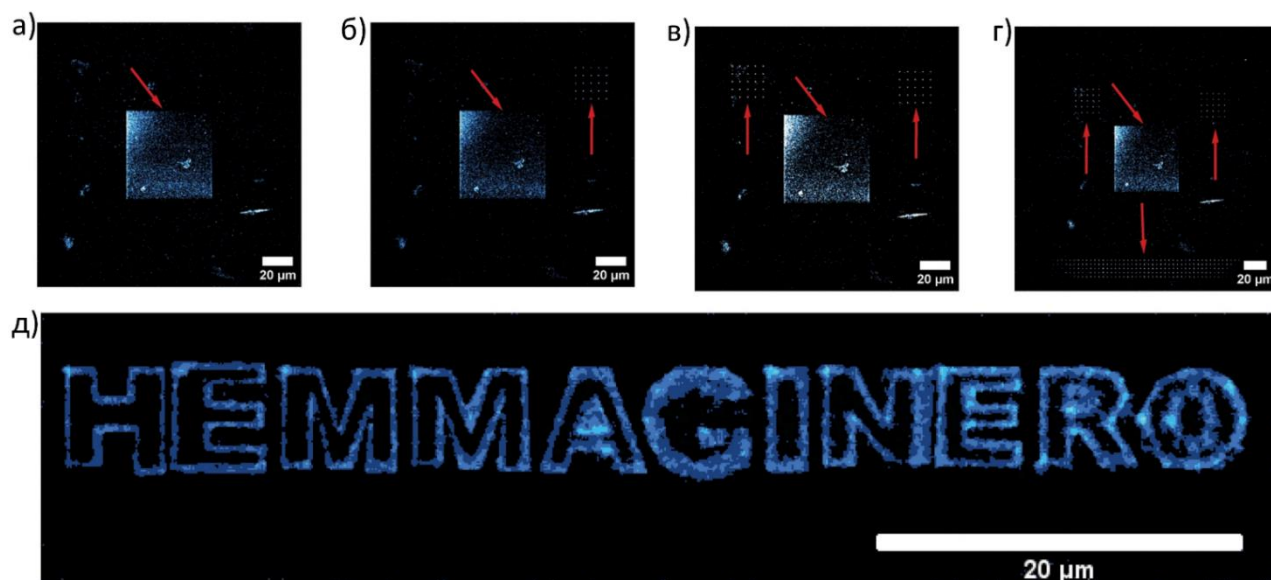


Слика 24. Временско праћење једног еритроцита у пуној крви (обележено белим кругом) (а-г). Беле испрекидане линије представљају путању еритроцита са почетном позицијом (плави квадрат) и коначном позицијом (црвени квадрат).

4.8. Уцртавање образаца микронских димензија у танке филмове хемоглобина

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

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



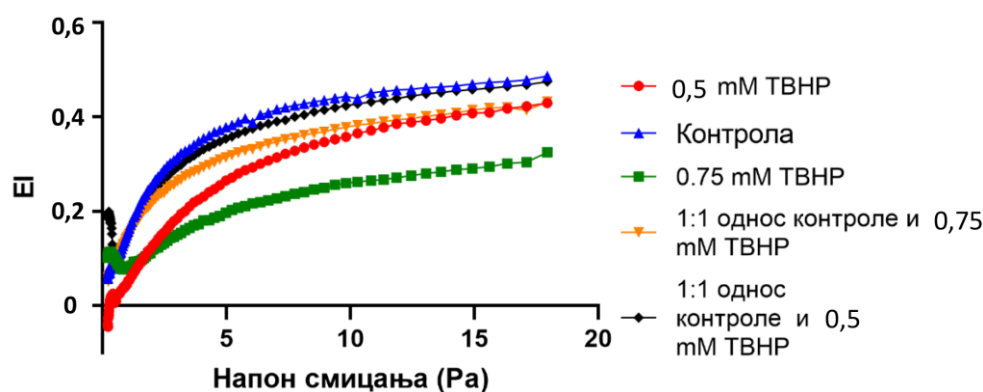
Слика 25. Микро-гравирање у танком слоју хемоглобина помоћу ултракратких ласерских импулса. (а-д) Произвољни униформни и тачкасти патерни (означени црвеном стрелицом) уписани у танак слој хемоглобина. Патерни показују повећан ТРЕФ сигнал (означен црвеним стрелицама). е) Флуоресцентни фотопродукт у облику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

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

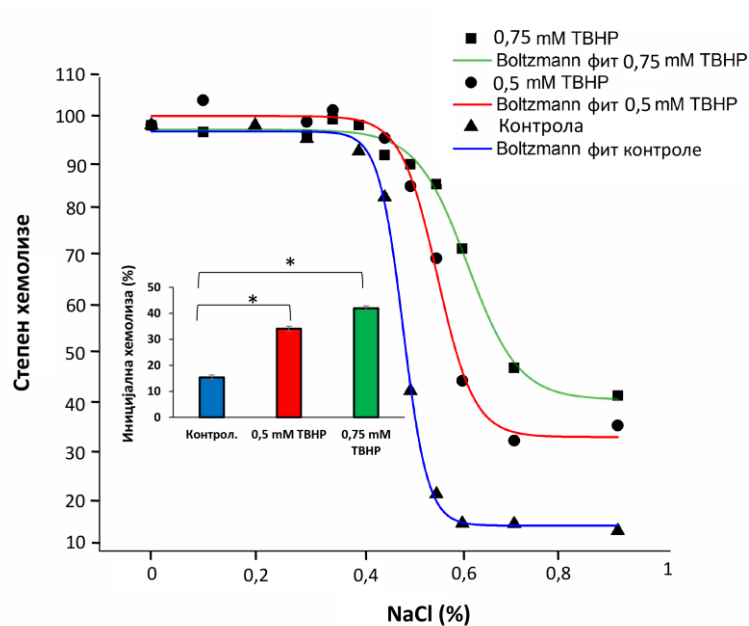
У циљу испитивања постојања везе између оксидације хемоглобина и деформабилности мембране еритроцита, извршена је *in vitro* оксидација еритроцита применом оксиданса ТВНР. Као последица оксидације хемоглобина настаје метхемоглобин и долази до интрамолекуларног умрежавања између метхемоглобина и спектрина,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

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

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



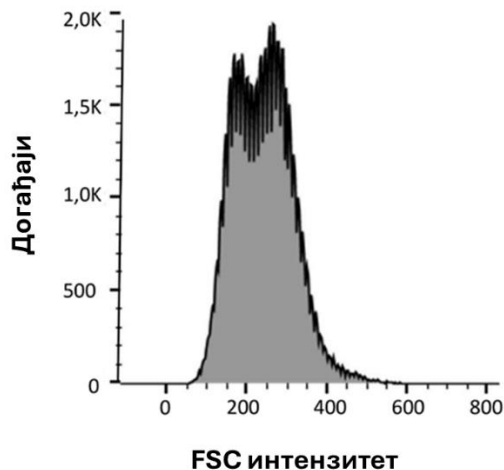
Слика 26. Криве деформабилности мембране нетретираних еритроцита (контрола) и *in vitro* оксидованих еритроцита 0,5 mM ТВНР и 1 mM ТВНР, и узорака који садрже нетретиране и оксидоване еритроците у односу 1:1.



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

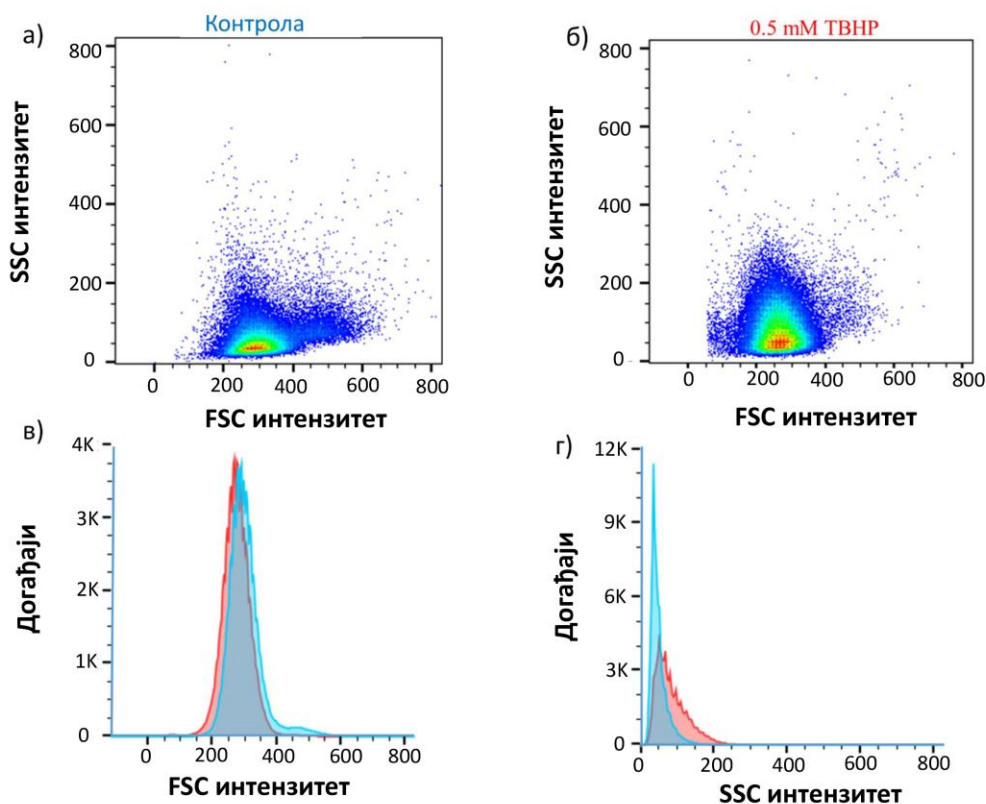
4.10. Проточна цитометрија – анализа FSC и SSC дистрибуције оксидованих еритроцита

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



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

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



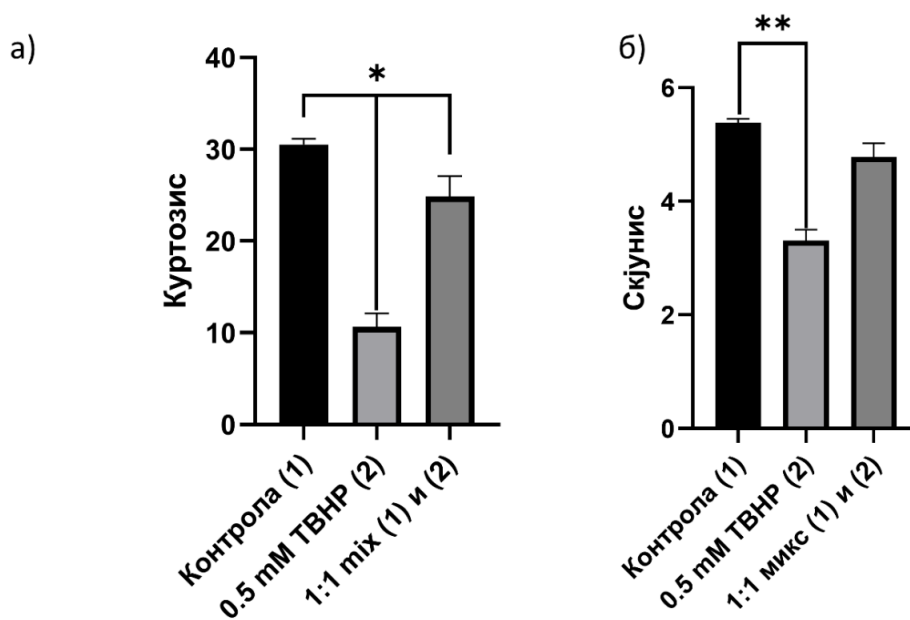
Слика 29. Оптичка својства *in vitro* оксидованих еритроцита мерена проточном цитометријом. а) Scatter plot приказ SSC/FSC дистрибуције контролних еритроцита ($n = 100000$ ћелија, б) Scatter plot приказ SSC/FSC дистрибуције третираних еритроцита 0,5 mM TBHP ($n = 100000$ ћелија), в) Унимодална FSC дистрибуција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

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

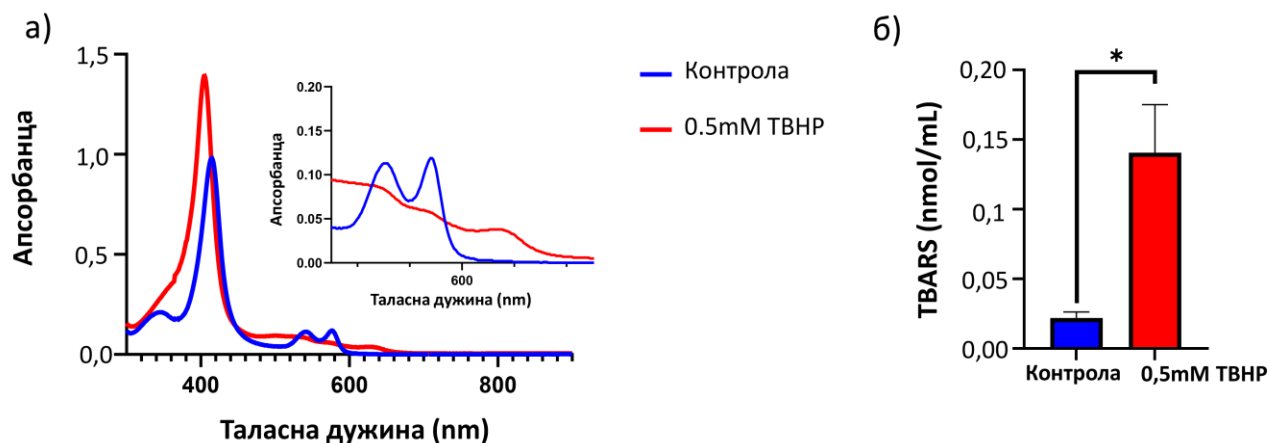
података који показују да расејање светлости под правим углом, карактеристично за SSC сигнал, зависи од облика ћелија и унутрашњих својстава ћелија о које се светлост расејава (De Grooth и сар., 1987).

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

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



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

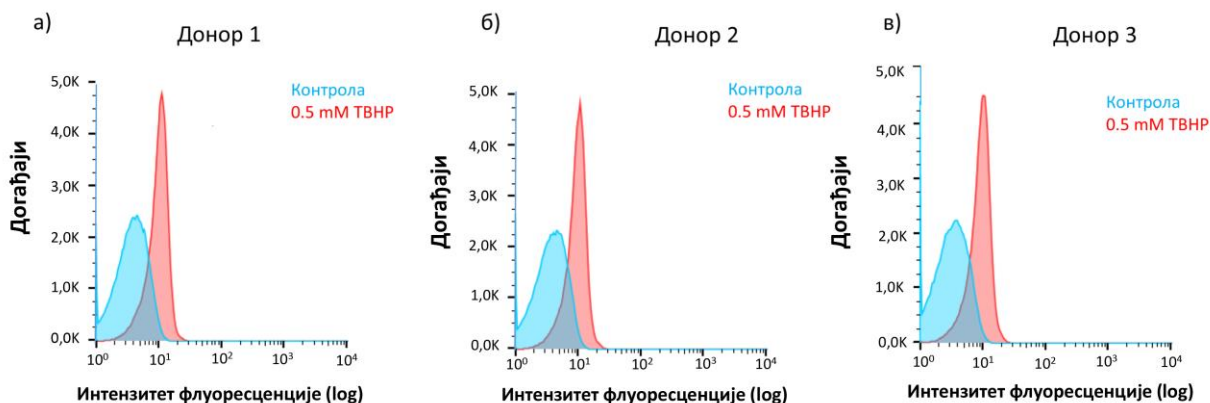


Слика 31. Оксидативни статус еритроцита третираних са 0,5 mM ТВНП. а) UV/VIS апсорпциони спектри хемоглобина изолованог из контролних и третираних еритроцита, б) концентрација TBARS молекула у контролним и оксидованим еритроцитима.

4.11. Аутофлуоресцентна својства оксидованих еритроцита

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

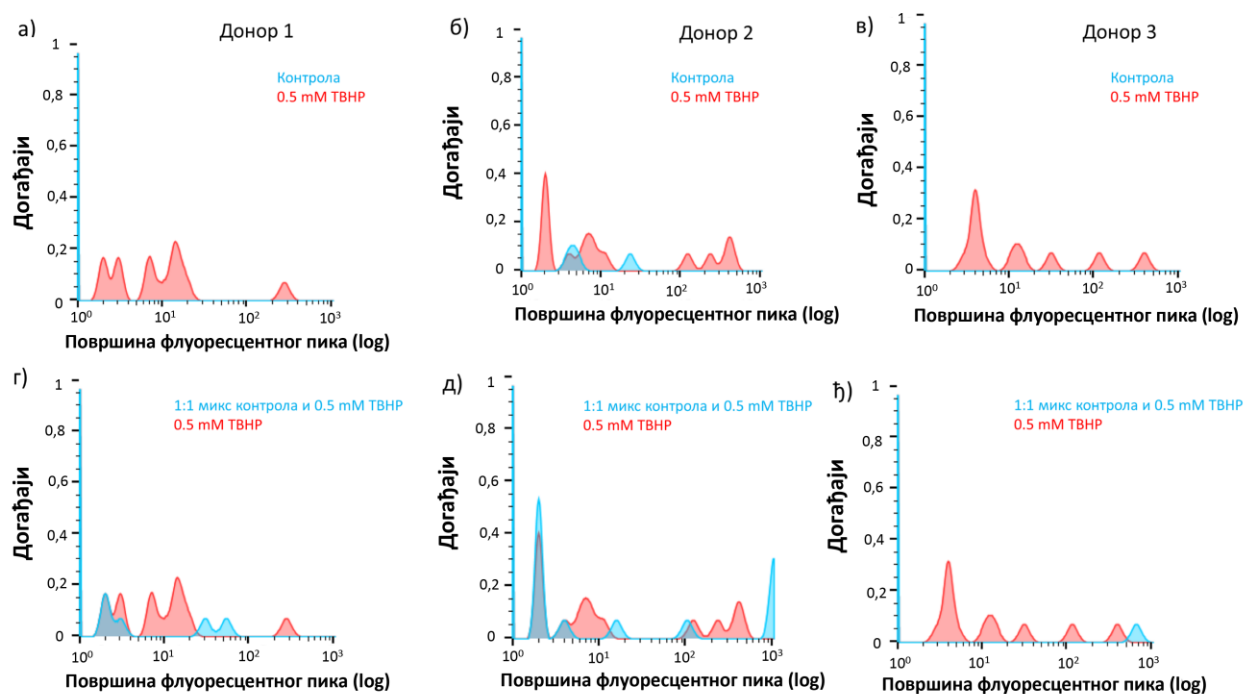
Сигнал који смо детектовали (слика 32) може такође потицати од продуката деградације хемоглобина, присутних у ниској концентрацији у еритроцитима здравих донора. Интензивирани формација хемских флуоресцентних продуката може бити индукована оксидацијом (Nagababu и сар., 2002) или присутна у неким патофизиолошким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



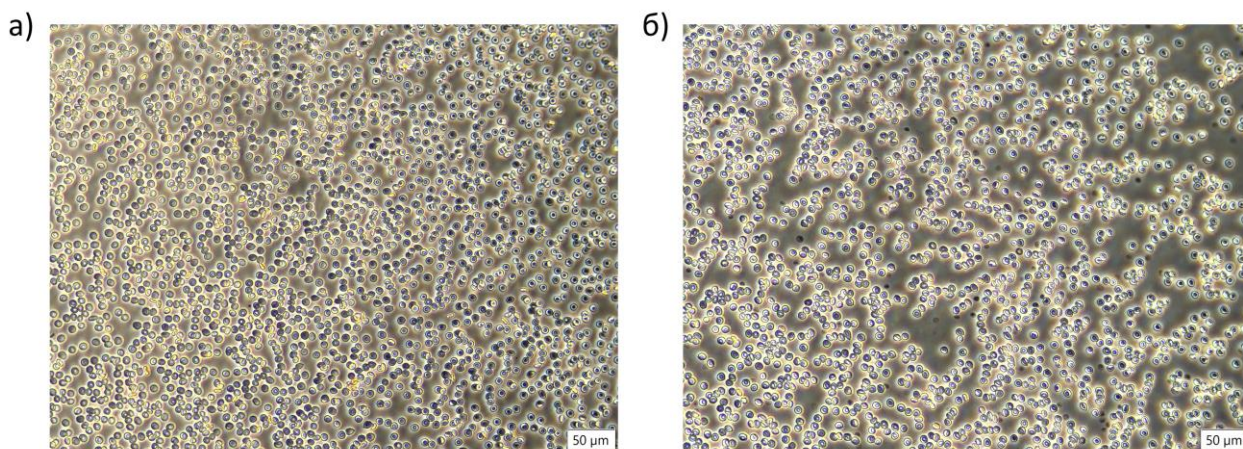
Слика 32. Аутофлуоресцентна својства контролних и оксидованих еритроцита за три независна донора (а,б,в).

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

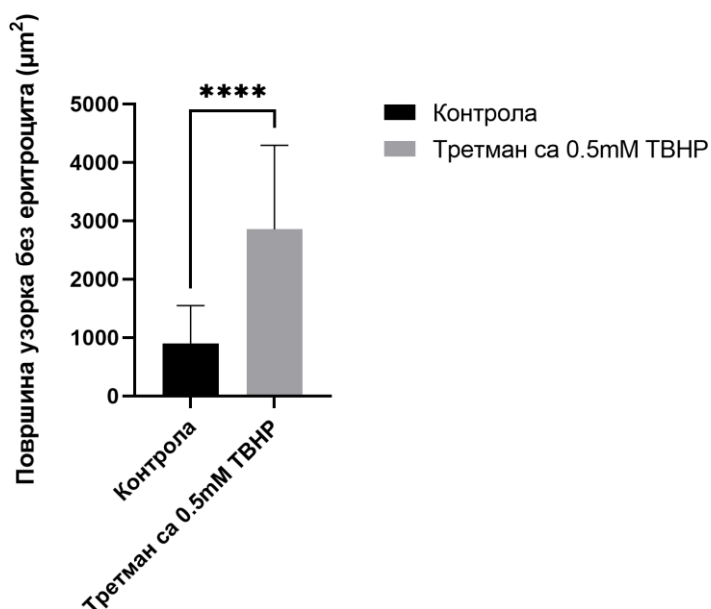
На тај начин, иако индиректно, смо потврдила да анализа проточном цитометријом, уз обавезно увођење и анализе FLW2 параметра дозвољава да се јасно уочи разлика између узорка нетретираних еритроцита, узорка оксидованих еритроцита и узорка који садржи једнак удео оксидованих и контролних еритроцита (Слика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



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



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



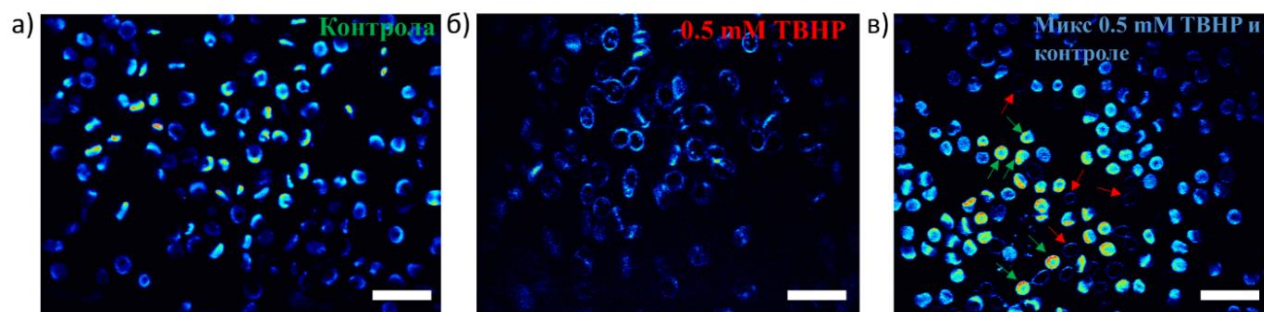
Слика 35. Статистички значајне разлике у површини региона без еритроцита између контроле и третмана ($p < 0.001$), као потенцијална индиректна мера нивоа агрегабилности

4.12. Двофотонска микроскопија оксидованих еритроцита

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

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

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



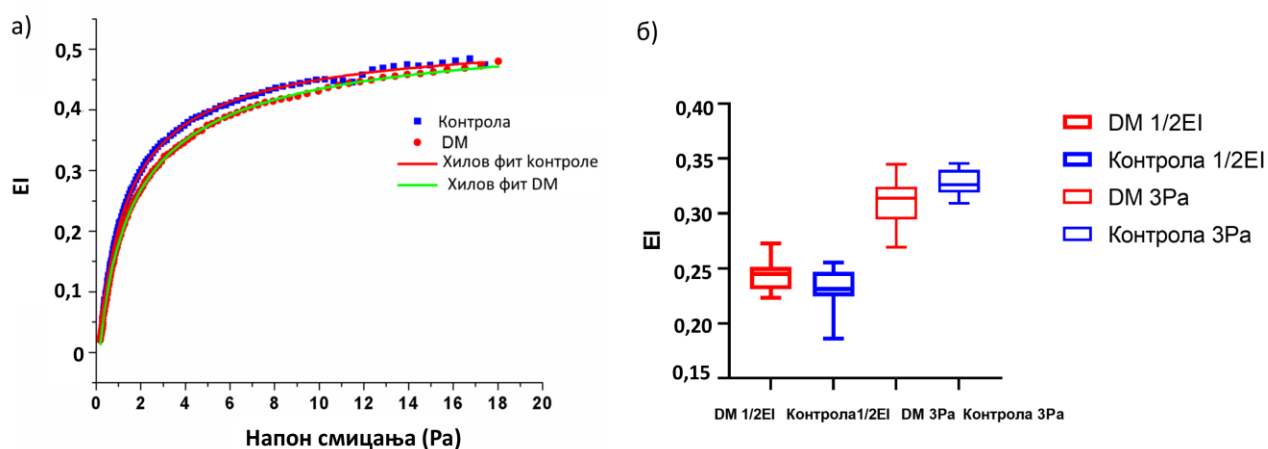
Слика 36. ТРЕФ осликавање оксидованих еритроцита. а) нетретирани еритроцити здравог донора, б) еритроцити здравог донора оксидовани 0,5 mM ТВНР, в) узорак који садржи оксидоване и нетретиране еритроците у односу 1:1.

4.13. Деформабилност еритроцита особа оболелих од DM

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

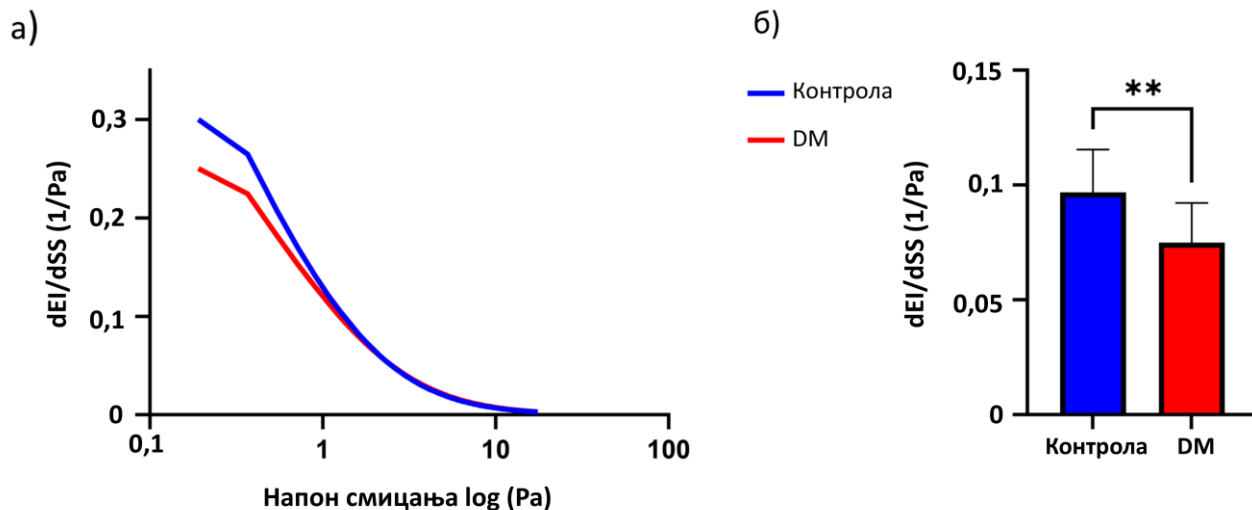
метаболизам еритроцита и добро је познато да због дуготрајне хипергликемије код DM пацијената, морфологија, метаболизам и функција еритроцита неизбежно подлежу серији сукцесивних промена које даље утичу на хемореологију еритроцита и микроциркулацију уопште (Zhou и сар., 2018; Sprague и сар., 2006). Ипак,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

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



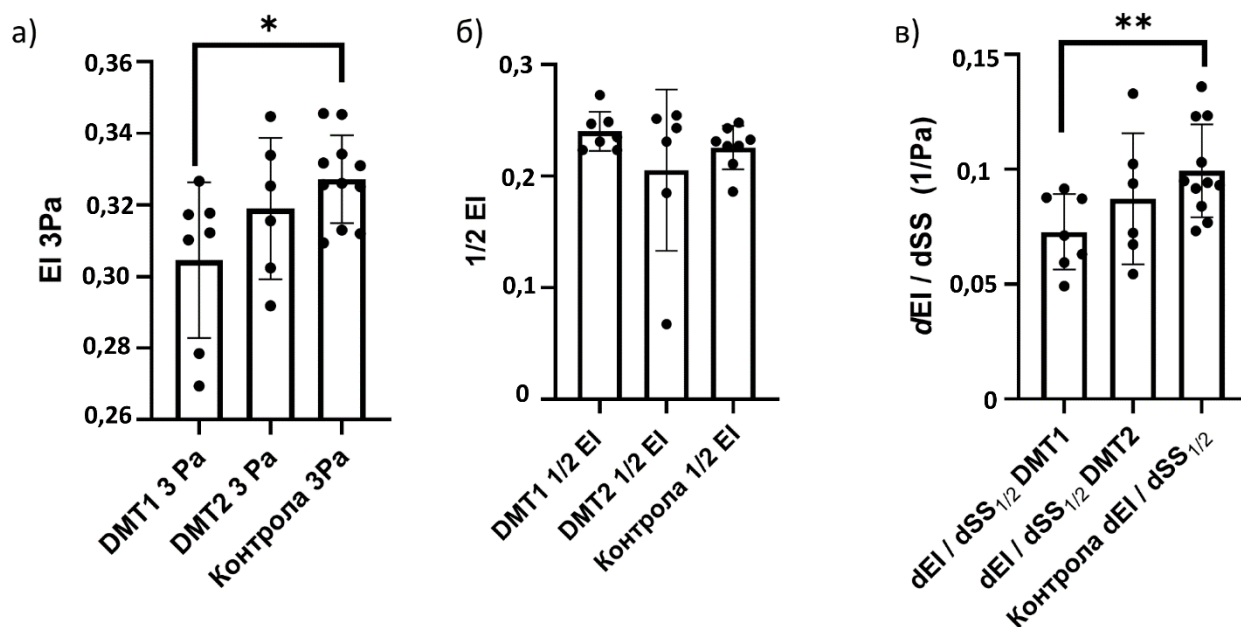
Слика 37. Параметри деформабилности еритроцита здравих особа (контрола) и еритроцита особа са DM. а) крива деформабилности контролних (плава) и еритроцита особа са DM (црвена), где су обе криве фитоване Хиловом функцијом, б) Средње вредности са стандардним грешкама измерених елонгационих индекса представљених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

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



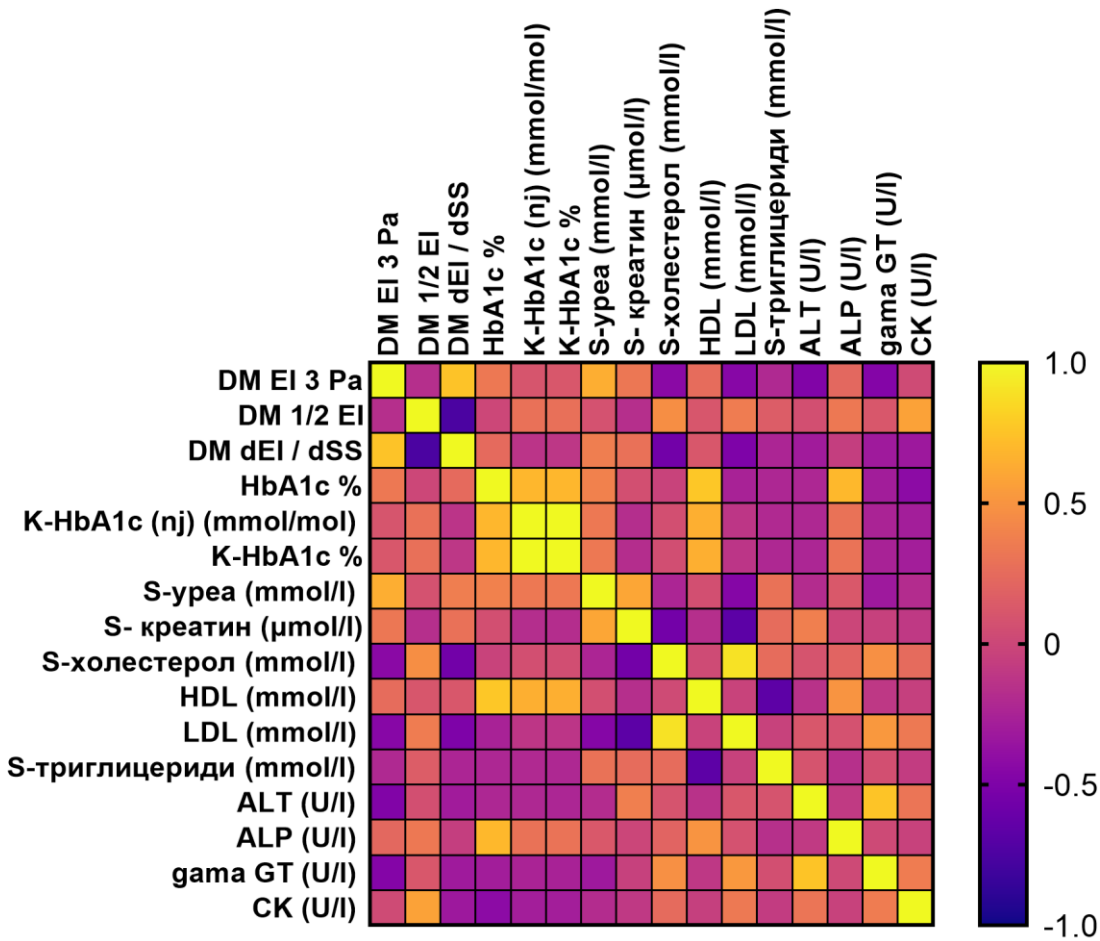
Слика 38. Први извод зависности EI од напона смицања еритроцита здравих особа (контрола) и еритроцита особа са DM. а) Приказ првог извода EI (dEI/dSS) у функцији напона смицања, б) статистички значајне разлике у средњим вредностима између dEI/dSS контролних (плава боја) и DM еритроцита (црвена боја).

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

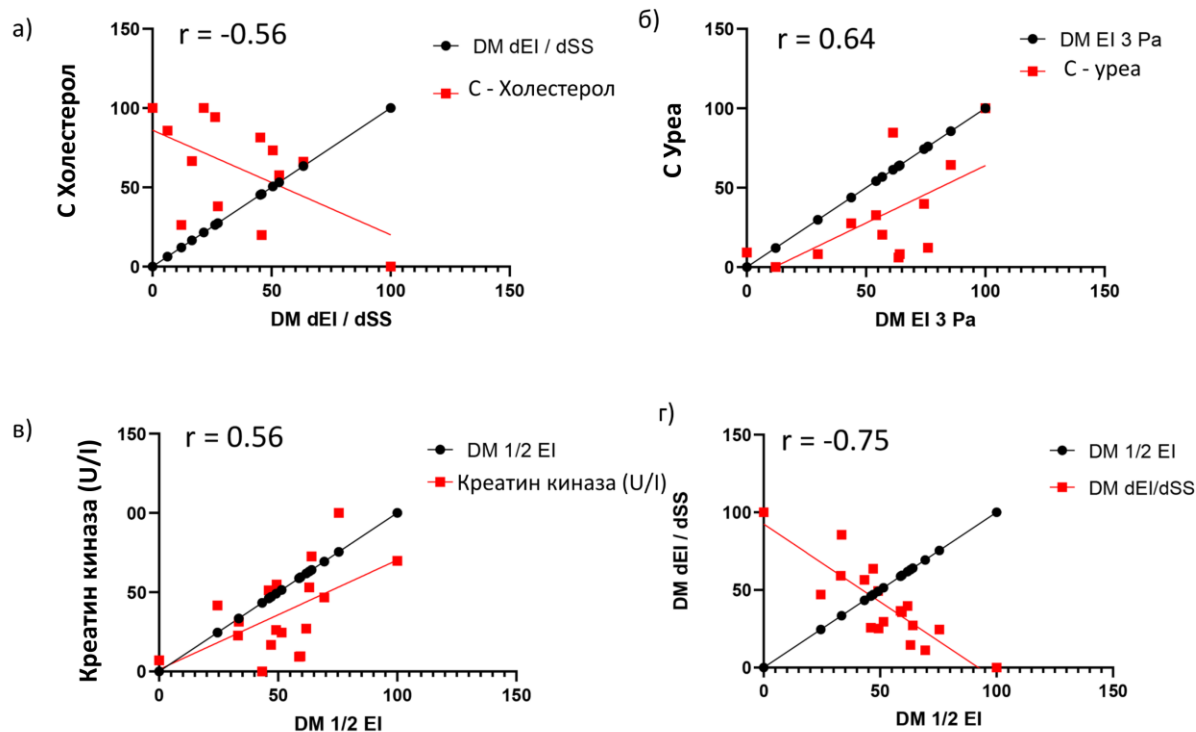


Слика 39. Приказ одвојених вредности параметара деформабилности за еритроците здравих особа (контрол) и еритроците особа са DMT1 или DMT2. а) статистички значајна ($p < 0,05$) промена елонгационог индекса на 3Pa (EI 3Pa) између контролних и еритроцита особа са DMT1, б) промена елонгационог индекса на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

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



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

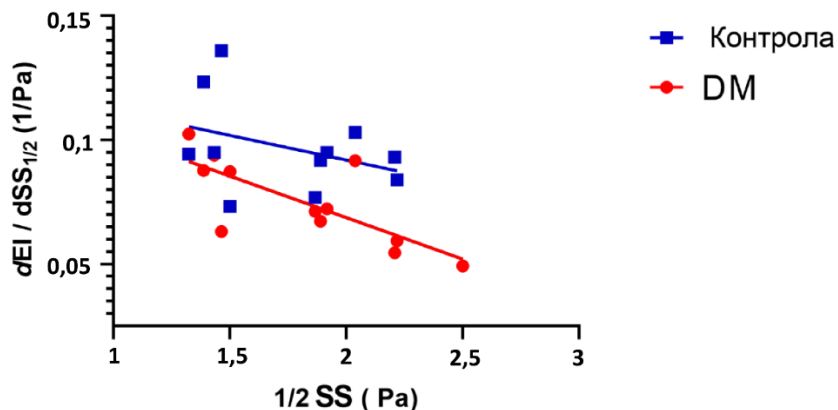


Слика 41. Значајне корелације механичких и клиничких параметара еритроцита особа са DM. а) Негативна корелација концентрације серумског холестерола (C-холестерол) и dEI/dS, б) позитивна корелација серумске уреје и EI 3Pa, в) позитивна корелација креатин киназе и $\frac{1}{2}$ EI, негативна корелација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

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

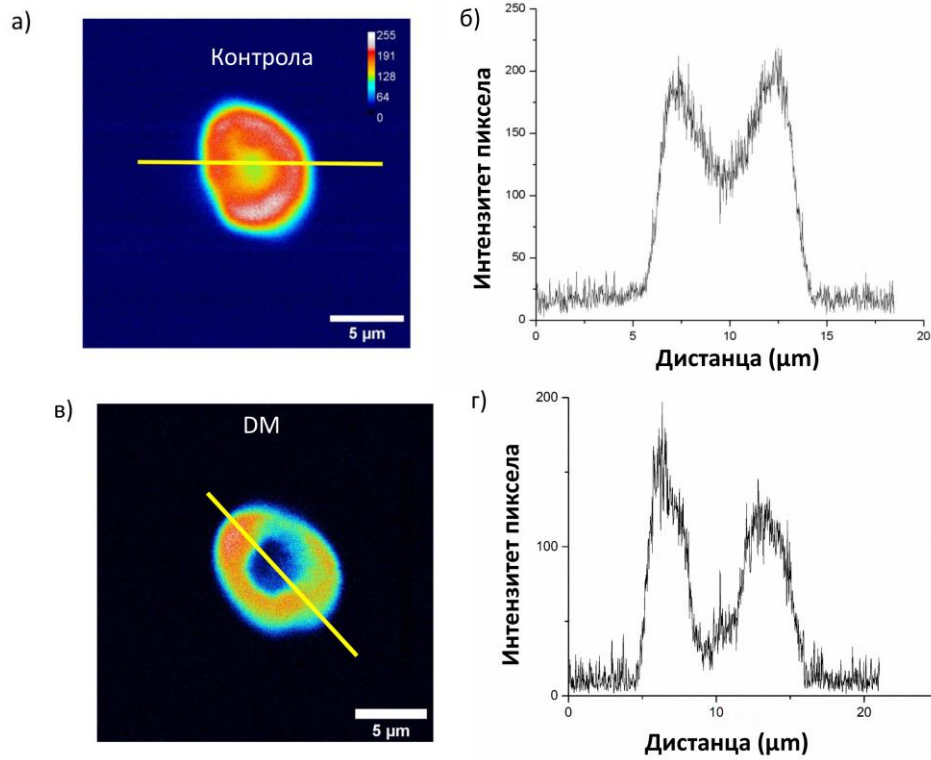
Међутим, важно је нагласити да при нижим вредностим напона смицања, флукуација EI у обе групе подлеже насумичним варијацијама у вредностима EI. Ово се приписује одсуству успостављеног ламинарног протока еритроцита у микроканалу под таквим условима (Shin и сар., 2005, McNamee и сар., 2020). Резултати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

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



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

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



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

5. Дискусија

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

засновану на спектрофотометријском мерењу концентрације малонилдиалдехида (MDA). Добијени резултати су потврдили да и оксидација еритроцита 0,5 mM ТВНР доводи до оксидације хемоглобина и појаве метхемоглобина као и липидне пероксидације (Слика 31 а и б), уз повећање степена иницијалне хемоллизе, али генерално очување осмотске фрагилности (EH_{50} оксидованих еритроцита се није разликовао од контролних еритроцита).

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

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

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

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

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

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

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

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

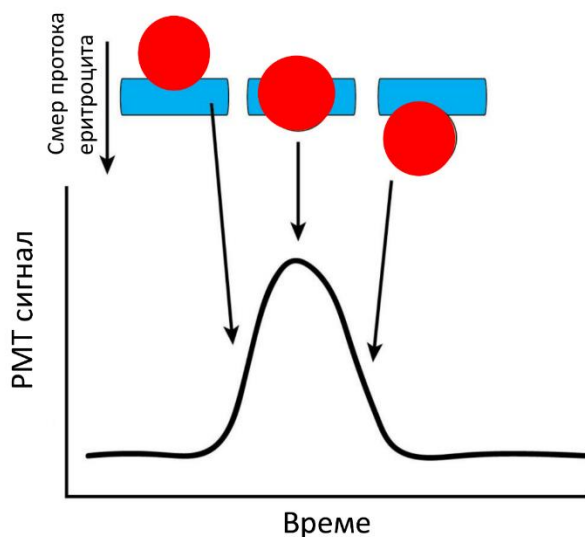
Утврђено је да везивање хемоглобина за унутрашњу страну ћелијске мембране еритроцита, са физиолошког аспекта представља сигнал за елиминацију тих еритроцита из циркулације фагоцитозом од стране макрофага (Кау 1975, Kannan и сар., 1988, Low 1986). На основу различитих модела показано је да се оксидоване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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. Закључци

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

- Интеракцијом хемоглобина са ултракратким ласерским импулсима, формира се флуоресцентни фотопродукт, што је праћено фотодеградацијом ТРЕФ озраченог хемоглобина
- PpIX има исти ТРЕФ емисиони спектар као и фотопродукт након дужег озрачивања, што потврђује да за формирање хемоглобинског фотопродукта није неопходан Fe^{2+} јон.
- Третирање хемоглобина водоник пероксидом доводи до формирања флуоресцентних молекулских врста чији спектар одговара ТРЕФ емисионом спектру хемоглобина озраченог ултракратким ласерским импулсима.
- Могуће је извршити просторно локализовано формирање фотопродукта (ласерско уписивање флуоресцентних образаца) на танком филму хемоглобина ТРЕФ микроскопијом.
- Флуоресцентни фотопродукт карактерише фотостабилност која се може детектовати и коришћењем једнофотонског извора побуде. Фотостабилност фотопродукта је временски одређена на период од неколико недеља.
- Могуће је селективно ласерско обележавање и осликавање еритроцита услед флуоресценције формираног фотопродукта у њима.
- На основу флуоресценције еритроцита могуће је одредити просторну расподелу хемоглобина у еритроцитима. Дистрибуција хемоглобина се разликује између еритроцита који су оксидовани *in vitro* и неоксидованих еритроцита (тј. еритроцита

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

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

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

7. Лумепамыпа

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Shroff, U. N., Schiessl, I. M., Gyarmati, G., Riquier-Brison, A., & Peti-Peterdi, J. (2019). Novel fluorescence techniques to quantitate renal cell biology. In *Methods in cell biology* **154**, 85-107. Academic Press.

Signorini, C., Ferrali, M., Ciccoli, L., Sugherini, L., Magnani, A., & Comporti, M. (1995). Iron release, membrane protein oxidation and erythrocyte ageing. *FEBS letters*, **362**(2), 165-170.

Silverman, B. W. (2018). *Density estimation for statistics and data analysis*. Routledge.

Snyder, L. M., Fortier, N. L., Trainor, J., Jacobs, J., Leb, L., Lubin, B., Chiu, D., Shohet, S., & Mohandas, N. (1985). Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking. *The Journal of Clinical Investigation*, **76**(5), 1971-1977.

So, P. T., Dong, C. Y., Masters, B. R., & Berland, K. M. (2000). Two-photon excitation fluorescence microscopy. *Annual review of biomedical engineering*, **2**(1), 399-429.

Sokolova, I., Kachalova, A., Fabrichnova, A., Kovaleva, Y., Shahnazarov, A., & Koshelev, V. (2017). Hemorheological properties in patients with type-1 and type-2 diabetes mellitus. *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*, **3**(3), 030402.

Sprague, R. S., Stephenson, A. H., Bowles, E. A., Stumpf, M. S., & Lonigro, A. J. (2006). Reduced expression of Gi in erythrocytes of humans with type 2 diabetes is associated with impairment of both cAMP generation and ATP release. *Diabetes*, **55**(12), 3588-3593.

Squier, T. C. (2001). Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Experimental gerontology*, **36**(9), 1539-1550.

Stančić, A. Z., Drvenica, I. T., Obradović, H. N., Bugarski, B. M., Ilić, V. L., & Bugarski, D. S. (2020). Native bovine hemoglobin reduces differentiation capacity of mesenchymal stromal cells in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, **144**, 909-920.

Steinberg, M. H., & Rodgers, G. P. (2015). HbA2: biology, clinical relevance and a possible target for ameliorating sickle cell disease. *British journal of haematology*, **170**(6), 781-787.

Steinberg, M. H., Forget, B. G., Higgs, D. R., & Weatherall, D. J. (2009). *Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management*. Cambridge University Press.

Streekstra, G. J., Hoekstra, A. G., & Heethaar, R. M. (1994). Anomalous diffraction by arbitrarily oriented ellipsoids: applications in ektacytometry. *Applied optics*, **33**(31), 7288-7296.

Su, H., Liu, X., Du, J., Deng, X., & Fan, Y. (2020). The role of hemoglobin in nitric oxide transport in vascular system. *Medicine in Novel Technology and Devices*, **5**, 100034.

Subczynski, W. K., Pasenkiewicz-Gierula, M., Widomska, J., Mainali, L., & Raguz, M. (2017). High cholesterol/low cholesterol: effects in biological membranes: a review. *Cell biochemistry and biophysics*, **75**, 369-385.

Sun, Q., Zheng, W., Wang, J., Luo, Y., & Qu, J. Y. (2015). Mechanism of two-photon excited hemoglobin fluorescence emission. *Journal of Biomedical Optics*, **20**(10), 105014-105014.

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

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

8. Прилози

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

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

БИОГРАФИЈА АУТОРА

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

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

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Михајло Д. Радмиловић

број индекса 48/2018

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Михајло Д. Радмиловић

Број индекса 48/2018

Студијски програм Биофотоника

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

Ментори Др Александар Крмпот

Др Ивана Дрвеница

Потписани/а _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

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

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - 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.

