

# Hiperkalcijemija uzrokuje proupalni fenotip leukocita i endotelnih stanica štakora

---

**Režić Mužinić, Nikolina**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2015**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:465535>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-18**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET SPLIT**

**NIKOLINA REŽIĆ MUŽINIĆ**

**HIPERKALCIJEMIJA UZROKUJE PROUPALNI FENOTIP LEUKOCITA I  
ENDOTELNIH STANICA ŠTAKORA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split 2015.**

Doktorska disertacije je izrađena u:

- Laboratoriju za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku KBC Split
- Laboratoriju za medicinsku kemiju i biokemiju, MEFST

Voditelj rada:

doc. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

## ZAHVALA

*Veliku zahvalnost dugujem svojoj prijateljici, kolegici i mentorici doc. dr. sc Vedrani Čikeš Čulić koja mi s puno strpljenja nesebično pomaže svojim savjetima i znanjem u znanstvenom radu i životu.*

*Posebno hvala mojoj obitelji na neizmjernoj podršci i razumijevanju, na ovom putu mog napretka.*

## SADRŽAJ:

1. UVOD .....	5
1.1. Metabolizam kalcija .....	6
1.1.1. Prednosti povećanog unosa kalcija .....	7
1.1.2. Dodatci kalcija kao mogući uzrok povećanja rizika za razvoj kardiovaskularne bolesti .....	8
1.2. Lipidne splavi .....	9
1.2.1. Regulacija koncentracije kalcija putem kanala u lipidnim splavima .....	11
1.2.2. Uloga endotelnih kaveola u vaskularnoj propustljivosti .....	12
1.3. Glikosfingolipidi .....	12
1.3.1. Neutralni glikosfingolipid CD77 .....	13
1.4. Transmembranski fosfolipoprotein: CD34.....	15
1.4.1. Struktura i organizacija CD34.....	15
1.4.2. Funkcija CD34 .....	16
1.5. Molekule na staničnoj površini leukocita.....	17
1.5.1. Uloga neutrofila u imunološkom sustavu.....	18
1.5.2. Biomarkeri na staničnoj površini leukocita: CD11b .....	21
1.5.3. Biomarker na staničnoj površini leukocita: CD15s.....	22
2. CILJEVI I HIPOTEZE.....	26
3. METODE I MATERIJALI .....	27
3.1. Ustroj istraživanja .....	27
3.2. Ishod istraživanja.....	27
3.3. Etička načela .....	27
3.4. Metode istraživanja: .....	28
3.4.1. Određivanje koncentracije kalcija u plazmi .....	29
3.4.2. Određivanje CD34 i CD77 na staničnoj površini stanica tkiva bubrega, srca i vene kave .....	29
3.4.3. Određivanje CD11b i CD15s na staničnoj površini neutrofila .....	30
3.5. Hodogram istraživanja .....	31
3.6. Statistički postupci .....	31
4. REZULTATI.....	33
5. RASPRAVA.....	36

6. ZAKLJUČAK .....	40
7. SAŽETAK.....	41
7.1. Abstract .....	42
8. LITERATURA.....	43
9. ŽIVOTOPIS .....	58

## POPIS OZNAKA I KRATICA

ATP – adenozin trifosfat

CaSR – receptor osjetljiv na kalcij (eng. *calcium-sensing receptor*)

CD – klaster diferencijacije (eng. *Cluster of Differentiation*)

CXCR 1 – receptor za kemokin IL-8 tip 1

DAG – diacilglicerol

EBV – Epstein-Barrov virus

ELAM-1 – endotelna leukocitna adhezijska molekula (eng. *Endothelial Cell Leukocyte Adhesion Molecule*)

eNOS – endotelna sintetaza dušikovog monoksida (eng. *endothelial nitric oxide synthase*)

E-selektin – endotelni selektin

ESL-1 – E-selektin ligand tip 1

fMLP – formil-metionil-leucil-fenilalanin

Gb3Cer/CD77 – globotriaosilceramid

GSL – glikosfingolipid

HCDM – Humane stanične diferencijacijske molekule (eng. *Human Cell Differentiation Molecules*)

HDL – lipoprotein velike gustoće (eng. *High-density lipoprotein*)

HIV – virus humane imunodeficijencije (eng. *Human Immunodeficiency Virus*)

HL – Hodgkinov limfom

HLDA – humani leukocitni diferencijacijski antigeni (eng. *Human Leukocyte Differentiation Antigens*)

HUS – hemolitičko – uremički sindrom (eng. *Hemolytic uremic syndrome*)

HUVEC – endotelne stanice humane pupčane vrpce

ICAM-1 – međustanična adhezijska molekula tipa 1

IFN- $\gamma$  – interferon- $\gamma$

IL-1 – interleukin-1

IP3 – inozitol-3-fosfat

IU – internacionalna jedinica (eng. *International unit*)

LDL – lipoprotein male gustoće (eng. *Low-density lipoprotein*)

LPS – lipopolisaharid

L-selektin – limfocitni selektin

PBS – otopina fosfatnog pufera (eng. *phosphate buffer solution*)

PDGF – trombocitni faktor rasta (eng. *platelet-derived growth factor*)  
PODXL – (eng. *podocalyxin-like protein*)  
PIP<sub>2</sub> – fosfatidil - inozitol 4,5-bifosfat  
PKC – protein kinaza C  
PTH – paratireoidni hormon  
PTLD – post-transplantacijski limfoproliferativni poremećaj  
PSGL-1 – P-selektin glikoproteinski ligand tip1 (eng. *P-selectin glycoprotein ligand-1*)  
sLe<sup>x</sup> – sijalil Lewis x  
STEC – Shiga toksin proizveden u *Escherichia coli* (eng. *Shiga toxin - producing Escherichia coli*)  
TNF- $\alpha$  – tumor nekrotizirajući čimbenik- $\alpha$   
TRPC– (eng. *Transient receptor potential channels*)  
VT – verotoksin  
VLDL – lipoprotein vrlo male gustoće (eng. *Very low-density lipoprotein*)

## 1. UVOD

Rezultati istraživanja ukazali su na obrnuto proporcionalni odnos između unosa kalcija i razvoja kardiovaskularnih bolesti, tako što smanjuje krvni tlak, tjelesnu težinu i koncentraciju serumskih lipida. Ipak, novija istraživanja upućuju na mogući štetni učinak uzimanja nadomjestaka kalcija za razvoj kardiovaskularnih bolesti (1).

Unos kalcija u stanice postiže se aktivacijom nekoliko kalcijevih kanala u staničnoj membrani (2). Istraživanja nekoliko laboratorija pokazala su da proteini TRPC (eng. *Transient receptor potential channels*), G-protein receptor i fosfolipaza C (PLC), koji zajednički koordiniraju staničnu signalizaciju  $Ca^{2+}$ , mogu biti lokalizirani na specijaliziranim mikrodomenama stanične membrane, takozvanim lipidnim splavima (2, 3). Lipidne splavi endotelnih stanica humanog bubrega i organa kardiovaskularnog sustava bogate su neutralnim glikosfingolipidima (GSL), posebice globotriaolilceramidom, Gb3Cer ili CD77 (4, 5). Zbog uloge CD77 u disfunkciji kalij-kalcij kanala, koja je povezana s razvojem srčanih, bubrežnih i cerebrovaskularnih bolesti (6, 7), očekuje se promjena u izražaju ovog biljega kod hiperkalcijemije. Tijekom razvoja upalnog procesa, bakterijski produkti potiču oslobađanje protuupalnih citokina koji aktiviraju neutrofile. Aktivacijom imunološkog sustava na površini neutrofila dolazi do značajnog izražaja CD11b. Humani leukocitni CD11b je veliki membranski protein koji na sebi sadrži CD15s i CD15s srodne strukture koje posreduju u vezanju CD11b i E-selektina (8).

Povećani unos  $Ca^{2+}$  mogao bi uzrokovati narušavanje funkcije endotelne barijere i razvoj proupalnog endotelnog fenotipa. Uzimajući u obzir studiju koja je dokazala povećan izražaj CD11b tijekom infekcije (9), te studiju iz 2013. godine (10) koja je dokazala da biljeg CD15s ima važnu dijagnostičku vrijednost u predviđanju ozbiljne bakterijske infekcije, odlučili smo ispitati izražaj ovih biljega kao proupalnog fenotipa pri hiperkalcijemiji.



## 1.1. Metabolizam kalcija

Kalcij je vrlo važan za mnoge fiziološke procese kao što su kontrakcija skeletnog, srčanog i glatkog mišića, zgrušavanje krvi i prijenos živčanih signala. Podražljive stanice, poput neurona, osjetljive su na promjene u koncentraciji kalcija. Porast koncentracije kalcijevih iona iznad normalne razine (hiperkalcijemija) sve više potiskuje aktivnost živčanog sustava. Obrnuto, kad se koncentracija kalcija smanji (hipokalcijemija), živčani sustav postaje pobuđeniji. U plazmi i u međustaničnoj tekućini normalna koncentracija kalcijevih iona iznosi približno 1,2 mmol/L. Upravo je taj ionski oblik kalcija važan za većinu kalcijevih učinaka u organizmu, primjerice na srce, živčani sustav i na kosti (11).

Divalentni se kalcijev kation slabo apsorbira iz crijeva, ali vitamin D potiče tu apsorpciju, te se obično apsorbira oko 35% unesene količine. Vitamin D ima važne učinke na odlaganje kalcija u kostima (kalcifikacija) i na resorpciju kalcija i fosfata iz kosti, no sam po sebi nije djelatna tvar koja izaziva sve te učinke, nego se najprije nizom reakcija u jetri i bubrezima mora pretvoriti u konačni aktivni produkt 1,25-dihidroksikolekalciferol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ili kalcitriol) (11). Paratireoidni hormon (PTH) snažno utječe na funkcionalne učinke vitamina D u organizmu jer pri smanjenoj koncentraciji PTH stvaranje  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  gotovo potpuno prestaje. Koncentracija kalcija u plazmi obrnuto proporcionalno utječe na koncentraciju  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u plazmi, tako što inhibira lučenje PTH (12).

PTH djeluje kao snažan regulator izvanstanične koncentracije kalcija i fosfata regulirajući njihovu apsorpciju u crijevima i izlučivanje bubregom. Pojačano djelovanje paratireoidnih žlijezda izaziva brzu resorpciju kalcijevih soli iz kostiju, zbog čega u izvanstaničnoj tekućini nastaje hiperkalcijemija (11).

Promjene koncentracije kalcijevih iona u izvanstaničnoj tekućini utječu na receptor osjetljiv na kalcij (CaSR, prema eng. *calcium-sensing receptor*) u membrani paratireoidnih stanica, koji je povezan s G-proteinom. Potaknut kalcijevim ionima, receptor aktivira fosfolipazu C i povećava unutarstanično stvaranje inozitol-1,4,5-trifosfata (IP3) i diacilglicerola (DAG). To potiče oslobađanje kalcija iz unutarstaničnih zaliha, što pak smanjuje izlučivanje PTH (13).

### 1.1.1. Prednosti povećanog unosa kalcija

Smanjeni unos kalcija i nedostatak vitamina D uzrokuje negativnu ravnotežu kalcija, stimulira izlučivanje PTH i uzrokuje sekundarni hiperparatireoidizam uzrokovan starenjem (14). Dovoljan unos kalcija i vitamina D, ishranom i/ili dodatcima, može spriječiti sekundarni hiperparatireoidizam te je preporučen u prevenciji prijeloma nastalih zbog osteoporoze (15). Osteoporoza je vrlo čest problem starije populacije, apsolutni broj oboljelih se povećava kao odgovor na demografsku evoluciju. Veliki napredak je učinjen povećanjem svijesti o posljedicama i teretu za javno zdravstvo zbog prijeloma nastalih kao posljedica osteoporoze (26). NIH (eng. *National Institutes of Health*) u Sjedinjenim Američkim Državama predlaže subvencioniranu primjenu 1000 mg kalcija za muškarce stare od 50 do 70 godina, 1200 mg za starije od 70 godina i žene starije od 50 godina. U kombinaciji s vitaminom D, nadomjestak kalcija ima dokazano pozitivan učinak na smanjenje lomova kostiju kod ljudi koji imaju manjak kalcija i/ili vitamina D, uključujući starije hospitalizirane osobe, pacijente s osteoporozom na antiresorptivnim ili anaboličkim lijekovima i ljudi koji uzimaju glukokortikoide (16, 17). Avanel i suradnici dokazali su prednosti unosa doze od 1000-1200 mg kalcija s 800 IU (eng. *International unit*) vitamina D (17).

Bostic i suradnici su u studiji na 34486 žena u postmenopauzi između 55 i 69 godina utvrdili da je uzimanje kalcija >1,425 mg/danu povezano sa 33% manjom smrtnošću kod pacijentica sa krvožilnom bolesti srca (18). Sličnu negativnu korelaciju u svojoj studiji dokazao je i Knox (19). Ovo možemo pripisati blagotvornom odnosu kalcij-kolesterol; kalcij se veže za žučne kiseline stvarajući netopljive sapune te vjerojatno time smanjuje koncentraciju kolesterola prenoseći ga u žuč (20). Chung i suradnici u svom istraživanju pripisuju blagotvorni učinak nadomjestaka kalcija smanjenju krvnog tlaka, koncentracije serumskih lipida i tjelesne težine (21).

Dickinson i suradnici u svom Cochrane sistematskom istraživanju zaključuju da je svaka povezanost uzimanja nadomjestaka kalcija i smanjenja krvnog tlaka nepouzdana, loša je kvaliteta individualnih pokusa i heterogenost između pokusa, te se protive donošenju ikakvih čvrstih zaključaka (22). Nekoliko velikih epidemioloških studija ukazuju da prehrambeni kalcij i nadomjesci kalcija mogu biti povezani sa gubitkom tjelesne težine (23), no drugi sistemski randomizirani kontrolirani pokusi imaju jake argumente protiv takvog obrnuto recipročnog odnosa, što sve ukazuje na nejasan zaključak utjecaja kalcija na gubitak težine.

### 1.1.2. Dodatci kalcija kao mogući uzrok povećanja rizika za razvoj kardiovaskularne bolesti

Zbog povećane svijesti o posljedicama osteoporoze došlo je do velikog i stalnog povećanja broja pacijenata izloženih produljenom periodu liječenja. Zbog toga se nekoliko velikih studija suprotstavlja kliničkom liječenju nadomjescima kalcija u prevenciji osteoporoze, te stavljaju veliki naglasak na sigurnosna pitanja za zdravlje (1).

Iako uzimanje 800 mg kalcija na dan nije povezano s nikakvim štetnim učinkom, zdravstveni utjecaj na kardiovaskularni sustav je upitan. Meta analiza na 12000 ljudi pokazala je 30%-no povećanje učestalosti miokardijalnog infarkta u osoba koje su uzimale nadomjeske kalcija, u usporedbi s onima koji su bili u placebo skupini (24).

Unatoč pozitivnom utjecaju nadomjestaka kalcija na značajan porast koncentracije lipoprotein velike gustoće (HDL, eng. *High-density lipoprotein*) u krvi, dokazan je povećan rizik od miokardijalnog infarkta (25). Neki autori pretpostavljaju da nadomjesci kalcija povišuju razinu serumskog kalcija, što može izazvati povećanu vaskularnu kalcifikaciju, povećan rizik krvožilnih poremećaja, uključujući miokardijalni infarkt, moždani udar i smrt (26).

U zadnjem desetljeću 21. stoljeća postalo je potpuno jasno da su kardiovaskularni i bubrežni sustav međuzavisni, odnosno poremećaj jednog sustava negativno utječe na drugi. Gubitak funkcije bubrega u pacijenata s kardiorrenalnim sindromom vodi prema smanjenoj proizvodnji kalцитriola, poremećaju koncentracije kalcija i fosfata, što je povezano s povećanim kardiovaskularnim komplikacijama i smrtnošću (27). Dokazano je da kalцитriol sprječava imunološku reakciju snižavanjem izražaja NF- $\kappa$ B i TNF- $\alpha$ , citokina koji sudjeluju u upalnom imunološkom odgovoru (28).

Nadalje, kalcifikacija koronarnih arterija je brzo progresivna u pacijenata na hemodijalizi. Retrospektivna analiza pokazuje da je poremećaj homeostaze kalcija u korelaciji s povećanom stopom poremećaja kardiovaskularnih događaja i smrtnošću, u pacijenata s oštećenom funkcijom bubrega i pacijenata na hemodijalizi (29). Unošenje nadomjestaka kalcija ima ulogu i u nastanku karcinoma prostate pri čemu dolazi do poremećaja stvaranja kalцитriola koji može povećati proliferaciju stanica prostate te nastajanje bubrežnih kamenaca budući da su oni sastavljeni od kalcijevog oksalata (30).

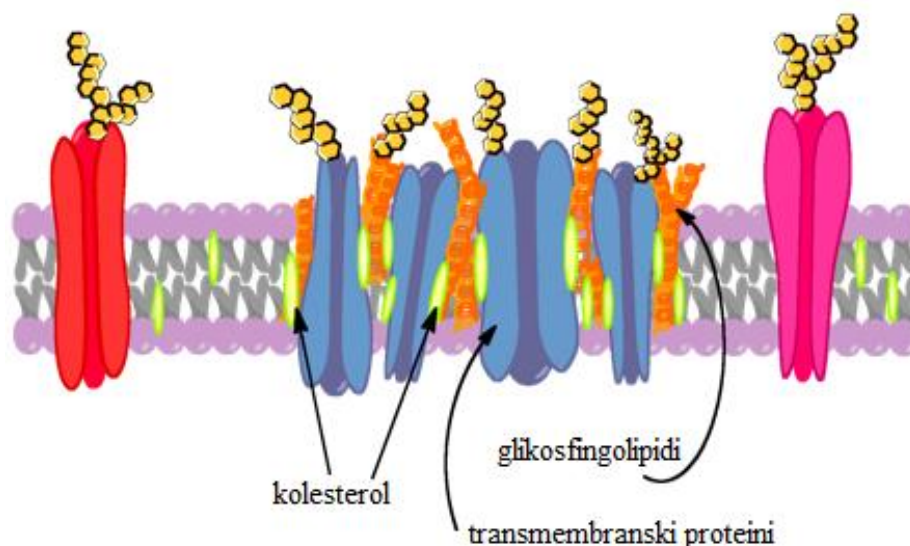
Novije studije upućuju na povezanost smanjenja vitamina D u organizmu i razvoja kardiovaskularnih bolesti. Različite studije, od animalnih do klinički kontroliranih pokusa, dokazale su da farmakološka doza vitamina D značajno reducira upalu (sprječava proupalne

citokine) i poboljšava endotelnu funkciju (31). Receptori vitamina D su prisutni u gotovo svim imunim stanicama, uključujući B i T limfocite koji izražavaju enzime za pretvaranje inaktivnog vitamina D u kalcitriol. Koncentracija kalcija u plazmi obrnuto proporcionalno utječe na koncentraciju kalcitriola u plazmi, što bi moglo značiti da hiperkalcijemija sprječava stvaranje aktivnog oblika vitamina D i njegovu pohranu te time uzrokuje proupalni fenotip.

## 1.2. Lipidne splavi

Mnogi znanstvenici dokazali su postojanje organiziranog mikrokoliša na površini stanice obogaćenog kolesterolima i sfingolipidima, poznatima kao lipidne splavi, koji membranu čini bolje uređenom i manje fluidnom (32).

Kaveole su podvrsta lipidnih splavi na staničnoj površini, invaginacije membrane veličine 50-100 nm opisane još prije 60 godina. Lipidne splavi su lipidno-proteinske mikrodomene bogate kolesterolom i glikosfingolipidima (Slika 1.) (33). Ime lipidne splavi zamijenjeno je 2006. godine u membranske splavi, a definirane su kao male (20-100 nm), heterogene, visokodinamične domene koje obiluju sterolom i glikosfingolipidima. Membranske splavi ponekad mogu tvoriti veću platformu stvaranjem protein-protein i protein-lipid interakcija (34). To ukazuje da proteini i lipidi jednako doprinose strukturi splavi, te da ovakve domene mogu postojati u unutarstaničnim membranama kao i u plazma membranama. Kaveolin posjeduje domenu CSD (eng. *caveolin scaffolding domain*) za koju se vežu signalne molekule u inaktivnom stanju, aktivacija vodi do konformacijskih promjena koje uzrokuju otpuštanje i aktivaciju signalnih proteina. Kaveolin funkcionira kao CSD protein da bi organizirao i koncentrirao vezujuće proteine kao što su signalne molekule G-protein, Src-kinaza, Ras i e-NOS s kaveolarnom membranom. Ova interakcija direktno je ovisna o prisustvu aromatskih aminokiselina tirozinu, triptofanu i fenilalaninu (35, 36). Potporu hipotezi o korelaciji kaveola, kaveolina i transmembranskog signala daje i izolacija proteina kaveolina iz kaveola koji postoji kao hetero-oligomerni kompleks s integralnim membranskim proteinom i signalnim citoplazmatskim molekulama (37).



**Slika 1.** Prikaz građe lipidne splavi

Početni koncept lipidnih splavi bio je da predstavljaju male, diskretne platforme membrane u kojima funkcioniraju kao signalizacijski organizatori (38). No danas ih povezujemo s mnogim važnim ulogama u biološkim procesima: apoptozom, prijenosom signala, virusnim infekcijama, staničnom adhezijom i migracijom. Lipidne splavi imaju i važnu ulogu tijekom egzocitoze i endocitoze. Za mnoge od ovih fizioloških procesa zna se da zahtijevaju  $\text{Ca}^{2+}$ , pa se pretpostavilo da lipidne splavi reguliraju ove procese manipuliranjem stanične signalizacije  $\text{Ca}^{2+}$  (2). Nekoliko staničnih tipova imaju visoki nivo izražaja kaveolina-1, a uključuju endotelne stanice, pneumocite tipa 1 i adipocite (39). Zbog toga ne iznenađuje da rezultati istraživanja promatrani u miševa koji imaju nedostatak kaveolina-1 pokazuju abnormalnosti unutar pluća, masnog tkiva i vaskularnog sustava (40, 41).

Jedna od prvih pronađenih uloga kaveola je transcitoza koja može biti tekuće-fazni prijenos ili posredovana receptorom u kaveolama. Kaveole prenose makromolekule kao što su albumini, inzulin i LDL s luminalne strane krvne žile u subendotelni dio (42, 43). Kolesterolem bogate mikrodomene sadrže različite tipove transmembranskih molekula kao što je trombocitni faktor rasta (PDGF, eng. *platelet-derived growth factor*), epidermalni faktor rasta (EGF, eng. *epidermal growth factor*), međustanična adhezijska molekula tipa 1 (ICAM-1, eng. *intercellular adhesion molecule*) i neki integrini (44, 45).

Endotelne stanice su tip stanica koje imaju najvišu razinu izražaja kaveolina-1 (46). Klasični tip kaveole ( $\Omega$ -oblik invaginacije stanične površine) jedan je od najčešćih oblika, međutim i druge strukture koje sadrže kaveolin-1 nađene su u endotelnim stanicama (39),

gdje sudjeluju u mnogim fiziološkim i patološkim procesima, kao što su ateroskleroza, hemostaza i tromboza (42).

### 1.2.1. Regulacija koncentracije kalcija putem kanala u lipidnim splavima

Unos kalcija u stanice postiže se aktivacijom nekoliko kalcijevih kanala u staničnoj membrani (2). Istraživanja nekoliko skupina znanstvenika pokazala su da protein koji zajednički koordiniraju staničnu signalizaciju  $Ca^{2+}$ , mogu biti lokalizirani na specijaliziranim mikrodomenama stanične membrane, takozvanim lipidnim splavima (2, 3), dok su Anderson i suradnici dokazali da u kaveolama endotelnih stanica dolazi do izljeva  $Ca^{2+}$  (47).

Kalcij je jedan od najjednostavnijih, ali i najpromjenjivijih (prilagodljivijih) staničnih glasnika. Stimulacijom površinskih staničnih receptora koji povećavaju hidrolizu fosfatidil - inozitol 4,5-bifosfata ( $PIP_2$ , eng. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) započinje povećanje koncentracije  $Ca^{2+}$  u citosolu. Kalcij u različitim odjeljcima regulira mnoštvo kompleksnih procesa kao što su transkripcija gena, metabolizam, mišićne kontrakcije, živčani prijenos, sekrecija hormona, upala, stanična proliferacija i stanična smrt (48). Stimuliranje stanice različitim farmakološkim agensima koji rezultiraju otpuštanjem kalcija iz unutarstaničnog skladišta, kao i kalcijev izljev preko plazma membrane, doprinose kontroli fizioloških funkcija (49). U većini staničnih tipova, inozitol-3-fosfat ( $IP_3$ ) posreduje otpuštanju kalcija preko velikog mehanizma  $IP_3$  receptora, koji aktivira plazma membranske SOCE (eng. *store operated  $Ca^{2+}$  entry*) kanale (50). Većina fundamentalnih procesa traži otpuštanje kalcija iz unutarstaničnog skladišta kalcija, no samo kalcij u ionskom obliku može difundirati kroz kapilarnu membranu, pa je upravo taj oblik kalcija esencijalan za fiziološke odgovore (51).

Lipidne splavi/kaveole su mjesta gdje se nalaze visoko organizirane signalne molekule, kao i mnogi regulatori ionskih kanala, ukazujući da te mikrodomene imaju vrlo važnu ulogu u staničnoj signalizaciji kalcija (56, 57). Smještaj ionskih kanala i pumpi ima kritičnu ulogu za njihovu regulaciju i utjecaj na staničnu funkciju, osobito kanali kalcija, klora, kalija i natrija koji su nađeni u kaveolama i usko povezani sa kaveolinom (52). Cabral i suradnici 2007. godine dokazali su da je  $Ca^{2+}$ -ATPaza smještena i aktivna u kaveolin-kolesterol bogatim membranskim mikrodomenama bazolateralnih membrana bubrega (53).

Isshiki i suradnici dokazali su ne samo da kaveole sadrže signalni mehanizam (heterotrimerna podjedinica G proteina  $G_{\alpha q}$ ) potreban za ATP-om stimulirano otpuštanje  $Ca^{2+}$

iz endoplazmatskog retikuluma, već i predlažu da kaveole služe kao kontejneri koji taj mehanizam prenose u različite stanične odjeljke (47).

Nakupljanje ceramidnih molekula vodi prema drastičnim promjenama u plazma membranama formiranjem malih ceramidom bogatih mikrodomena, koje se spontano spajaju u velike domene nazvane platforme (54, 55).

Sfingolipidi sudjeluju u diferencijacijskom sortiranju membranskih komponenata i staničnoj signalizaciji (56). Moguće je da male promjene u membranskim sfingolipidima kao što je ceramid, za koji se vjeruje da je sekundarni glasnik (57), mogu imati važnu ulogu pri stvaranju bubrežnih prijenosnih molekula. Zbog visokog utjecaja ceramida na aktivnost  $\text{Ca}^{2+}$  kanala, izgleda da čak i kod samo umjerenog povećanja sadržaja ceramida u bubrežnim stanicama nakon aktivacije sfingomijelina može doći do nekontroliranog povećanja  $\text{Ca}^{2+}$  u citosolu (58).

### **1.2.2. Uloga endotelnih kaveola u vaskularnoj propustljivosti**

Studija na lipoproteinima ukazuje da se molekule HDL kroz endotelne stanice prenose učinkovitije nego lipoproteini male gustoće (LDL eng. *Low-density lipoprotein*), dok se lipoproteini vrlo male gustoće (VLDL, eng. *Very low-density lipoprotein*) uopće ne prenose (59). Endotelna propustljivost je pogotovo važna u slučaju infektivne bolesti, aterosklerozi i funkcioniranju krvno-moždane barijere. Selektivna propustljivost endotelnih stanica za specifične molekule je kontrolirana ne samo veličinom kaveolnih zadebljanja, već i postotkom specifičnih receptora u kaveolama (42). Sposobnost kaveolina-1 da inhibira eNOS također doprinosi regulaciji krvožilne preosjetljivosti (60).

### **1.3. Glikosfingolipidi**

Glikosfingolipidi (GSL) su sastavni dijelovi stanične membrane svih stanica u sisavaca, ali se nalaze i u unutarstaničnim organelama (61). Građeni su od oligosaharidnog lanca vezanog za lipidnu strukturu nazvanu ceramid, za razliku od fosfolipida koji nastaju iz diacilglicerola. Diacilglicerol sadrži glicerol i alkoholnu skupinu dok ceramid sadrži amino-alkohol sfingozin (62). Prava funkcija mnogih GSL zagonetna je i do danas iako je u

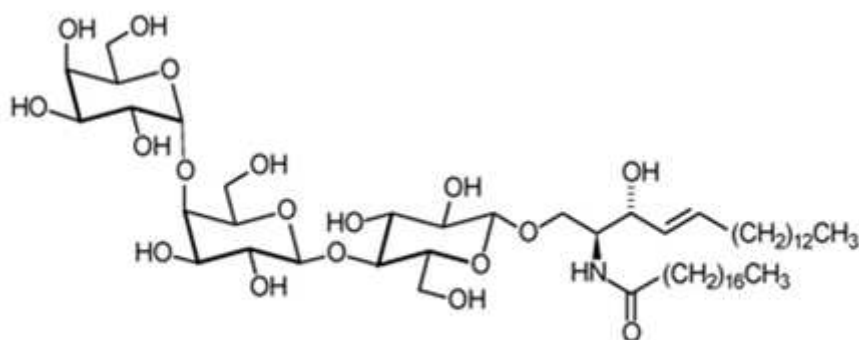
međuvremenu otkriveno više od 400 molekula GSL. Kemijska građa u kojoj se u svakoj molekuli GSL jasno razlikuje hidrofobni ceramidni dio i hidrofilni oligosaharidni lanac upućivala je na moguću lokalizaciju tih spojeva unutar staničnih membrana, pri čemu bi ceramidni dio molekule bio uklopljen u membranu, a oligosaharidni bi se pružao u izvanstanični prostor. Ta pretpostavka se ubrzo pokazala točnom, a upravo takav položaj uvjetuje i njihovu biološku ulogu (63). Njihovi lanci oligosaharida nalaze se na površini stanice u vodenom okolišu i zbog toga su odlične kandidatne molekule za stanično prepoznavanje (64). Sukladno tome, glikosfingolipidi su uključeni u patofiziologiju mnogih infekcija te služe kao receptori za viruse (65), bakterije i bakterijske toksine.

Brojni GSL identificirani su kao antigeni krvnih grupa, kao CD (eng. *cluster of differentiation*) molekule, kao specifični stanični površinski biljezi (66). Nakon desetljeća istraživanja funkcije GSL, može se zaključiti da je njihova opća funkcija upravo modulacija proteina. Taj zaključak temelji se na otkriću čitavog niza proteina koji za optimalnu funkciju trebaju baš prisutnost jednog specifičnog GSL. Upravo stoga ne čudi velika raznolikost GSL struktura s obzirom da postoji golem broj proteina membranske površine sa kojima GSL mogu stupati u interakcije (63, 66).

### **1.3.1. Neutralni glikosfingolipid CD77**

Kaveole endotelnih plazma membrana, pa tako i humanog bubrega i organa kardiovaskularnog sustava bogate su neutralnim GSL, posebice globotriaozilceramidom, Gb3Cer ili CD77 (4, 5). Prilikom sinteze Gb3Cer na glukozilceramid veže se galaktoza djelovanjem  $\beta$ 1,4-galaktoziltransferaze i nastaje laktozilceramid, na koji  $\alpha$ 1,4-galaktoziltransferaza dodaje galaktozu i nastaje globotriaozilceramid (Slika 1.).





Globotriaosylceramid (Gb3Cer)

**Slika 2.** Globotriaosylceramid

Gb3Cer/CD77 sudjeluje u patogenezi infekcija *Escherichia coli* 0157: H7 i *Shigella dysenteriae* tip 1, koje uzrokuju gastrointestinalne bolesti, uključujući i hemoragični kolitis i još ozbiljniji hemolitičko uremički sindrom (HUS, eng. *Hemolytic uremic syndrome*), glavni uzrok akutnog zatajenja bubrega kod djece (67). Stanice domaćina se oštećuju inhibicijom sinteze proteina, stimuliranjem protrombotskih poruka/impulsa ili induciranjem apoptoze. Oštećenje krvnih žila tijekom HUS-a rezultat je djelovanja Shiga toksina (Stx) na endotelne stanice krvnih žila (68). Stx su trenutno najvažniji i najbolje okarakterizirani STEC (eng. *Shiga toxin-producing Escherichia coli*) virulentni čimbenici koji mogu uzrokovati mikrovaskularno endotelno oštećenje (69).

Stx je član obitelji AB5 porodice proteinskih holotoksina koji se sastoje od enzimske podjedinice (A) nekovalentnom vezom vezan za podjedinicu (B) koja se veže za njegov receptor Gb3Cer/CD77 na površini prijemljivih endotelnih stanica (70). Stx, također poznati kao verotoksini, nazvani su prema svom selektivnom citotoksičnom djelovanju na Vero-stanice, stanične loze epitela bubrežnih tubula afričkog zelenog majmuna (70). Podjedinica B je pentamer odgovoran za stanično obilježavanje i unutarstanični prijenos holotoksina te može vezati od 10 do 15 molekula Gb3Cer (71).

Već je neko vrijeme poznato da se nakon unutarstaničnog usmjeravanja Stx u jezgrinu membranu pokreću signalne kaskade za programiranu smrt stanice (72), te su također Taga i suradnici dokazali da vezanjem na receptor CD77 započinje unutarstanična signalna kaskada koja uključuje porast koncentracije  $Ca^{2+}$  u citosolu, što je kritični korak u procesu apoptoze (73).

Kalij-kalcij kanali u endotelnim stanicama reguliraju izljev  $\text{Ca}^{2+}$  (74) te time doprinose relaksaciji endotelnih stanica ukazujući da disfunkcija kanala može uzrokovati endotelnu disfunkciju, a time i krvožilne bolesti (75). Kalij-kalcij 3.1 kanal ima važnu ulogu u proliferaciji i funkciji endotelnih stanica, te aterosklerozi i angiogenezi krvožilnih stanica. Danas je poznato da CD77 uzrokuje disfunkciju kalij-kalcij 3.1 kanala smanjujući aktivnost vanstanične kinaze regulirane signalom (ERK) i aktivatora proteina-1, te smanjuje aktivnost kanala smanjenjem unutarstaničnih koncentracija fosfatidil inozitol 3-fosfata (PI3P) (7).

## **1.4. Transmembranski fosfolipoprotein: CD34**

### **1.4.1. Struktura i organizacija CD34**

Obitelj CD34 površinskih staničnih transmembranskih proteina obuhvaća CD34 stanični antigen hematopoetskih prekursorskih stanica, podokalaksin (poznat i kao *podocalyxin-like protein 1*, PODXL) i endoglikan (poznat i kao *podocalyxin-like protein 2*, PODXL2) (76). Rezultat istraživanja izražaja CD34 i podokaliksina dokazao je povećanje osjetljivosti pri imunofenotipizaciji leukemijskih blasta u usporedbi s određivanjem samog CD34. Zbog toga se čini da je podokalaksin, uz CD34, koristan biljeg hematopoetskih blasta (64).

CD34 je transmembranski fosfolipoprotein izražen na pretečama hematopoetskih stanica i stanicama endotela krvnih žila otkriven 1984. godine (77), široko je korišten kao biljeg u izolaciji i identifikaciji hematopoetskih matičnih stanica i prastanica u procesu pripreme za transplantaciju koštane srži. Analiza sekvence humanih hematopoetskih CD34 stanica je otkrila najveći izražaj myc i myb protoonkogeno obitelji transkripcijskih proteina, koji imaju važnu ulogu u normalnom hematopoetskom razvoju (78, 79) što također ukazuje na važnost CD34 u identifikaciji hematopoetskih stanica. U novije vrijeme koristi se i kao biljeg u identifikaciji drugih tkivno-specifičnih matičnih stanica, poput mišićnih satelitskih stanica i preteča epidermalnih stanica. Članovi CD34 obitelji iskazuju značajna preklapanja u izražaju, ali svaki od ovih proteina pokazuje i jedinstveni izražaj u određenim tkivima. Izražaj CD34 gotovo je svugdje usko povezan s hematopoetskim stanicama te je pogrešno shvaćeno da CD34 pozitivne (CD34+) stanice u nehematopoetskom uzorku predstavljaju hematopoetsku kontaminaciju. Danas jaki dokazi upućuju da stanice kao što su mišićne

satelitske stanice, intersticijske stanice, keratociti rožnice, epitelne progenitorne i endotelne stanice krvnih žila izražavaju CD34 (80).

#### 1.4.2. Funkcija CD34

Funkcije CD34 obitelji proteina još uvijek nisu u potpunosti razjašnjene iako im se pripisuje čitav niz različitih uloga. Smatra se da CD34 potiče staničnu proliferaciju i/ili blokira diferencijaciju prastanica, a podokaliksin i CD34 potiču migraciju hematopoetskih stanica. Podokaliksin igra ulogu u staničnoj morfogenezi. Zanimljivo je istaknuti da članovi CD34 obitelji ujedno potiču i blokiraju staničnu adheziju (81).

Najbolje istražena funkcija CD34 obitelji proteina jest limfocitna adhezija na krvožilni endotel i limfatička tkiva (82). Usprkos ovoj jasno istraženom ulozi u poticanju adhezije, druge studije ukazuju da CD34 proteini u većini slučajeva djeluju blokirajući adheziju, kao što je kod adhezije mastocita (83). Objašnjenje za ovakvo razilaženje vjerojatno se nalazi u jačini izražaja i učinku koje različite razine ovih proteina imaju na druge molekule. CD34 je vrlo dobro poznat po svom izražaju na stanicama hematopoetskog sustava i pretpostavlja se da je, u fiziološkim uvjetima, potreban za njihovu migraciju. Utvrđeno je da ima sličnu ulogu u poticanju i olakšavanju prometa mastocita i eozinofila u periferna tkiva (84). CD34 se smatra biljegom endotelno progenitornih stanica koje cirkuliraju u perifernoj krvi te tako obnavljaju stjenku krvnih žila (85). Postoji skupina necirkulirajućih zrelih endotelnih stanica koje su također CD34+, smještenih u malim krvnim žilama, dok je većina endotelnih stanica u velikim venama i arterijama CD34- (86). Rezultati istraživanja Beauchamp i suradnika pokazuju da CD34 ima važnu ulogu u regulaciji diferencijacije mišićnih progenitornih stanica (87).

Podokaliksin je neophodan za razvoj i održavanje strukture bubrežnih podocita. Ove epitelne stanice građene su od staničnog tijela s brojnim nastavcima te malih, interdigitalnih "nožica" koje se šire iz većih nastavaka. Apikalne površine staničnih tijela i nastavaka podocita prekrivene su podokaliksinom, a *Podxl* *-/-* miševi uopće nemaju razvijene "nožice" podocita (12). U glomerularnoj strukturi podokaliksin potiče adheziju, dok na stanicama endotela krvnih žila blokira adheziju i pomaže imunostaničnu migraciju u limfne čvorove interakcijom sa L - selektinima cirkulirajućih limfocita, slično kao CD34 (88).

Fieger i suradnici 2003. godine objavili su da endoglikan, kao i druga dva člana CD34 obitelji, može funkcionirati kao L-selektin ligand (nakon posttranslacijske modifikacije), no on koristi drugačiji mehanizam vezanja, koji jako slični onome kod glikoproteinski ligand P-selektina tipa 1 (PSGL-1, eng. *P-selectin glycoprotein ligand-1*) (89).

Zbog svega navedenog, važno je istaknuti nužnost daljnjeg istraživanja koje će rasvijetliti točne uloge članova CD34 obitelji u različitim tkivima (90).

### **1.5. Molekule na staničnoj površini leukocita**

Leukociti su stanice imunološkog sustava koje sudjeluju u obrani od infekcija u autoimunim bolestima, alergijama i upalama. Interakcija leukocita s njihovom okolinom događa se posredovanjem stanične membrane, posebice preko specifičnih membranskih proteina (glikoproteina) i glikolipida. Specijalizirana funkcija stanica očituje se u prilagođenoj građi stanične površine (91). Molekule na staničnoj površini leukocita su posrednici u mnogim interakcijama između imunološkog sustava i antigena, između različitih komponenti imunološkog sustava, te između imunološkog sustava i drugih sustava u organizmu, npr. živčanog sustava.

Devedesetih godina prošlog stoljeća Erber i suradnici procjenili su da postoji ukupno 2500 molekula na staničnoj površini (92). Zola i suradnici 2005. godine ukazali su na postojanje više od 4000 različitih molekula na membrani leukocita (93). Karakterizacija i nazivlje leukocitnih površinskih molekula je u djelokrugu rada organizacije koja se ranije zvala Humani leukocitni diferencijacijski antigeni (HLDA, eng. *Human Leukocyte Differentiation Antigens*), a zatim je preimenovana u Humane stanične diferencijacijske molekule (HCDM, eng. *Human Cell Differentiation Molecules*). Za označavanje i imenovanje molekula koje su prisutne na staničnoj površini leukocita koristi se *The Cluster of Differentiation* (CD) protokol. HCDM izdaje CD nazivlje i objavljuje povremene izvještaje o novoutvrđenim molekulama na površini humanih stanica (94, 95).

### 1.5.1. Uloga neutrofila u imunološkom sustavu

Neutrofilni leukociti čine veliki udio u broju leukocita te imaju iznimno važnu ulogu u obrani organizma od bakterijske infekcije (96). Proces morfološkog sazrijevanja neutrofila uključuje različite oblike: mijeloblaste, promijelocite, mijelocite, metamijelocite, štapičaste i konačno segmentirane neutrofile, a dozrijevanje se dovršava u koštanoj srži (96, 97). Dio ih se tu i pohranjuje, a veći dio prelazi u krvotok (98). Na površini neutrofila nalaze se antigeni koji imaju ulogu bioloških senzora, a tijekom procesa sazrijevanja neutrofila dolazi do promjena u zastupljenosti tih antigena. Neutrofilni u tkivu proizvode agense koji dodatno privlače neutrofile, makrofage i T limfocite te reguliraju njihovu aktivnost (96).

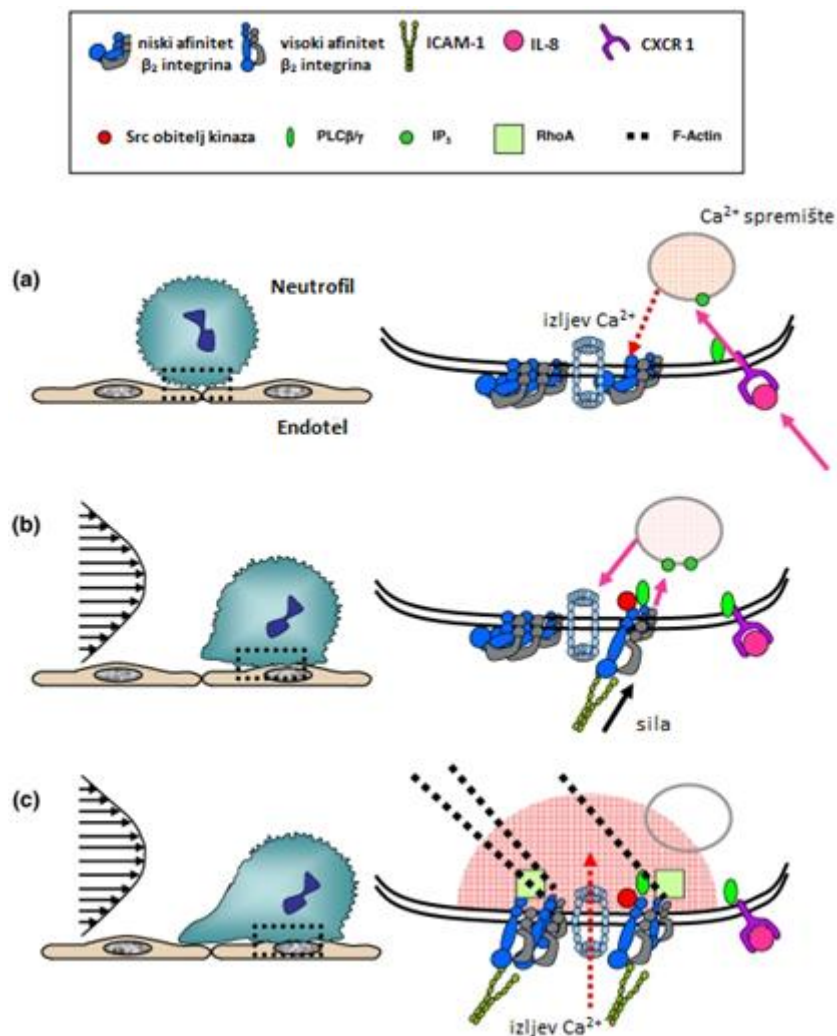
Neutrofilni postoje u tri oblika: mirujući (eng. *resting, unstimulated*), podraženi (eng. *primed*) i aktivirani (eng. *activated*). U stanjima bez upale, leukociti cirkuliraju krvožiljem u mirnom stanju. Podraženi neutrofilni su oni koji su došli u doticaj s proupalnim čimbenikom ili proizvodom patološkog mikroorganizma što dovodi do sniženja praga potrebnog za aktivaciju neutrofila, a aktivirani neutrofilni su oni koji su preuzeli ključnu ulogu u patogenezi širokog raspona bolesti, uključujući upale uzrokovane unutarstaničnim patogenima, kronične upale i tumore (99).

Dijapedeza neutrofila, uključuje cijeli niz adhezivnih interakcija i međusobnih signalnih zbivanja. Kao posljedica kemijskog podražaja i kao reakcija na njega, neutrofilni se priljubljuju i moraju adherirati na zid krvne žile prije nego započnu aktivni prolazak kroz krvožilnu stjenku (100, 101). Nakon toga započinje migracija neutrofilnih leukocita u prostor oko krvne žile i u okolno tkivo (ekstravazacija). Kemotaksija je potaknuta čimbenicima koji se otpuštaju na mjestu infekcije, poput ulomaka komplementa (posebice C5a), leukotriena, čimbenika aktivacije trombocita, bakterijskog peptida (fMLP) i interleukina 8 (102). Nakon posredovanja fMLP-a u aktivaciji G proteina i odvajanju  $\beta\gamma$  podjedinica, slobodna  $G\alpha$  podjedinica aktivira fosfatidil inozitol fosfolipazu C (PLC) čime nastaje DAG i IP3 koji uzrokuje otpuštanje unutarstaničnog  $Ca^{2+}$  iz endoplazmatskog retikuluma. DAG i  $Ca^{2+}$  zajedno aktiviraju protein kinazu C. Aktivacija protein kinaze C uzrokuje aktivaciju mnogih staničnih signalnih puteva koji reguliraju adheziju neutrofila, dok prolazno povećanje koncentracije  $Ca^{2+}$  vodi reorganizaciji citoskeleta i aktinskih filamenata gurajući plazma membranu naprijed uzrokujući njeno nabiranje (103).

U procesu zaustavljanja neutrofila na endotel krve žile iznimno važno mjesto imaju dvije vrste adhezijskih molekula: selektini i integrini. Selektini posreduju u inicijalnom priljubljuvanju leukocita za endotelne stanice venula što zatim dovodi do njihovog kotrljanja

(eng. *rolling*) po endotelu krvne žile, a integrini imaju ulogu u adheziji leukocita (104, 105). Postoje dvije podobitelji integrina:  $\beta_1$  i  $\beta_2$ . Oni su heterodimeri s različitim  $\alpha$  lancem, a zajedničkim  $\beta$  lancem koji definira obitelj.

Specijalno u lipidnim splavima, vezanje E-selektina za ligand na staničnoj površini povećava unutarstaničnu koncentraciju slobodnog  $\text{Ca}^{2+}$  koji je potreban neutrofilima za transendotelnu migraciju (106). Budući da je poznato da E-selektin postoji u lipidnim splavima ili je tamo regrutiran, moguće je da vezanje liganda utječe na unutarstaničnu razinu  $\text{Ca}^{2+}$  (107). Schaff i suradnici potvrdili su da unutarstanični  $\text{Ca}^{2+}$  direktno aktivira  $\beta_2$  integrine. Rezultati njihova istraživanja dokazuju da povećanje unutarstanične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  ima važnu ulogu u korelaciji kemotaksije i adhezije, tako što  $\text{Ca}^{2+}$  sinkronizira neutrofilno zaustavljanje i migraciju (Slika 3.) (108). Integrini i kanali  $\text{Ca}^{2+}$  smješteni su u nanometarskim razmacima plazma membrane, što objašnjava mogućnost izljeva kalcija u olakšavanju neutrofilne aktivacije kao odgovor na kemokin (IL-8) (108).



### Slika 3. Sinkronizacija neutrofilne regrutacije

(a)  $\beta_2$  integrini u mirujućim neutrofilima izraženi su u niskoj afinitetnoj konformaciji, grupirani oko kalcijevih kanala u blizini kemokinskog receptora CXCR 1. Prepoznavanjem IL-8, aktivira se PLC što uzrokuje otpuštanje unutarstaničnog kalcija iz spremišta, a on pokreće konformacijsku promjenu u  $\beta_2$  integrin visokog afiniteta. (b) Pod utjecajem sile,  $\beta_2$  integrin visokog afiniteta stabilizira se vezanjem za ICAM-1 i postaje napet, što rezultira povezivanjem kinaze iz Src obitelji s citoplazmatskom domenom integrina i PLC $\gamma$ . (c) Trošenje perifernog kalcija brzo aktivira lokalne kalcijeve kanale, pokrećući izljev  $\text{Ca}^{2+}$ . Visoka koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  aktivira RhoA, uzrokujući izmjenu okolnih  $\beta_2$  integrina u integrine visokog afiniteta. Oni, stabilizirani ICAM-1 molekulom, uzrokuju neutrofilno usporavanje i zaustavljanje (108).

(CXCR 1 – receptor za kemokin IL-8 tip 1; IL-8 – interleukin 8; PLC – fosfolipaza C; ICAM-1 – međustanična adhezijska molekula tipa 1))

Obitelj selektina čine tri srodne molekule: L-selektin, E-selektin i P-selektin (109). Za razliku od drugih adhezijskih molekula, funkcija selektina je ograničena na međudjelovanje leukocita i stanica endotela krvnih žila (110). Na površini neutrofila, L-selektin dolazi u interakciju sa specifičnim oligosaharidnim strukturama na glikoproteinima stanične površine endotela. Na endotelu E-selektin i P-selektin slično prepoznaju specifične neutrofilne ugljikohidratne strukture (102).

L-selektin je izražen na mikrovilima većine leukocita, uključujući sve mijeloidne stanice, mirujuće T i B stanice te neke memorijske i efektorske T stanice (111). L-selektin ima ulogu u adheziji neutrofila, eozinofila i monocita za endotel krvne žile. L-selektini humanih neutrofila imaju na sebi izražene sijalil fukozilirane glikane (glikane tipa sijalil Lewis x ili sLe<sup>x</sup>), koji pomažu u interakciji sa E-selektinima (112).

Zbog brzog izražaja P-selektina na staničnoj površini koja se mjeri u minutama, P-selektin je idealni kandidat za posredovanje u interakcijama između leukocita i endotela i najvjerojatnije je uključen u ranu fazu kotrljanja. Blokiranje funkcije P-selektina *in vivo* značajno smanjuje inicijalno kotrljanje leukocita u venulama (113).

E-selektin je značajno izražen na endotelu krvnih žila u područjima upale, a smješten je u lipidnim splavima (107). U vezanju neutrofila i njihovom kotrljanju niz endotel krvne žile, a posredovano E-selektinom, važnu ulogu imaju ligandi na neutrofilima, a među kojima su P-selektin glikoproteinski ligand-1 (PSGL-1), L-selektin, E-selektin ligand-1 (ESL-1), CD44 te CD43. Sličnost svih ovih liganada je u tome da svi imaju na sebi izražene glikane tipa sLe<sup>x</sup>, a za koje se smatra da su uključeni u prepoznavanje E-selektina (114).

Poremećaj lipidnih splavi remeti kotrljanje neutrofila na E-selektinima bez mijenjanja membranskog izražaja PSGL-1, L-selektina ili sLe<sup>x</sup> (115). Izražaj E-selektina snažno potiču

različiti upalni medijatori uključujući IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i LPS (116). U *in vitro* istraživanjima, izražaj E-selektina započinje oko 2 sata nakon poticaja citokinima, a njegov najveći izražaj nađen je nakon 4 sata. Nakon 12 do 24 sata dolazi do vraćanja razine izražaja E-selektina na početne razine, ali na mjestima upale u *in vivo* okružju njegov izražaj može biti kroničan (117). Još devedesetih godina 20. stoljeća rezultati istraživanja Steegmaier i suradnika dokazali su da je fukozilacija ESL-1 esencijalna za vezanje E-selektina (118).

### 1.5.2. Biomarkeri na staničnoj površini leukocita: CD11b

Integrini su velika obitelj staničnih površinskih  $\alpha\beta$  heterodimera koji su uključeni u interakcije koje se zbivaju između stanica te stanice i njenog okružja.  $\beta_2$  integrini, koji imaju zajedničku  $\beta$ -podjedinicu ( $\beta_2$ , CD18), ali različite  $\alpha$ -podjedinice (CD11a, CD11b, CD11c i CD11d), važni su leukocitni receptori ne samo za funkciju leukocita već i za razvoj upalnog odgovora *in vivo* (119). Geni koji kodiraju četiri  $\alpha$ -podjedinice nalaze se na kraćem kraku kromosoma 16 (120).

Integrin CD11b/CD18 ( $\alpha M\beta_2$ ) poznat je i pod nazivima Mac-1 i komplementni receptor tipa 3 (CR3). On je dominantni  $\beta_2$  integrinski receptor na neutrofilima, makrofagima i monocitima (121). Mac-1 ima važnu ulogu u regulaciji funkcije  $\beta_2$  integrina tijekom neutrofilne migracije i degranulacije (8). Nije izražen na blastima i promijelocitima. Istraživanja u CD11b<sup>-/-</sup> miševa pokazala su da ovaj integrin ima posebnu ulogu u upalnom procesu, dijelom zajedno s integrinom CD11a (122). Njegovu biološku važnost za normalno funkcioniranje imunološkog procesa dodatno potvrđuje činjenica da postoje različita patološka stanja gdje su integrini defektni ili nedostaju i u tih osoba nedostatak funkcijskih  $\beta_2$  integrina uzrokuje životno ugrožavajuće infekcije. Slično tome, neprikladno pojačana aktivacija leukocitnih integrina također dovodi do štetnih posljedica po zdravlje jer pojačana aktivacija  $\beta_2$  integrina doprinosi održavanju i stalnom poticanju upale i razvoju različitih autoimunih bolesti (123).

Molekularna težina CD11b je otprilike 170 kDa. Unutarstanične zalihe CD11b nađene su u membranama sekretornih i specifičnih granula (124). U mirujućim neutrofilima odraslih osoba, 95% ukupnog staničnog sadržaja CD11b/CD18 kompleksa pohranjeno je i nalazi se uklopljeno u membrane specifičnih granula i sekretornih vezikula, a samo 5% izraženo je na samoj staničnoj površini (125). Sekretorne vezikule se formiraju tijekom kasnog stadija



neutrofilnog sazrijevanja (124). Nakon što proupalni podražaj dovede do stimulacije neutrofila, dolazi do pojačanog izražaja CD11b na njihovoj površini (125). Upravo stoga, uočavanje pojačanog izražaja CD11b može poslužiti kao pokazatelj da je nastupila aktivacija neutrofila (126, 127).

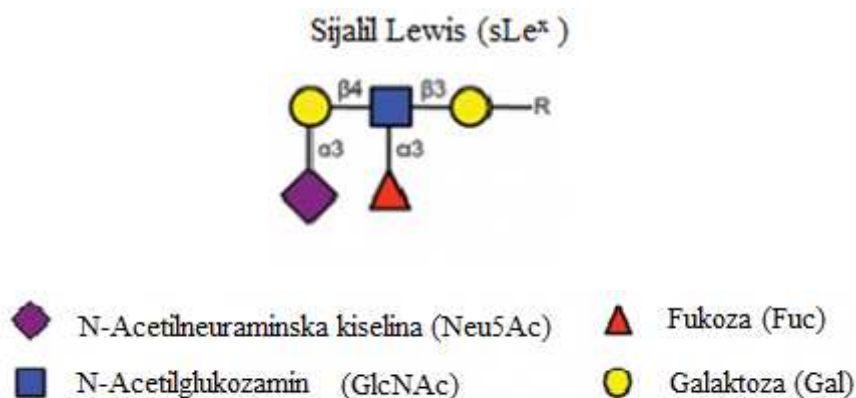
Kotrljanje pomaže neutrofilima uspostaviti kontakt s upalnim čimbenicima koji su izraženi na površini endotela. Ova interakcija stimulira neutrofile na brzo povećanje izražaja i dostupnosti  $\beta$ 2 integrina (CD11a i CD11b) na površini neutrofila za ligand s endotela – međustaničnu adhezijsku molekulu tipa 1 (ICAM-1).

Za razliku od neutrofilne transendotelne migracije, molekule na površini epitelne stanice i molekularni mehanizam pomoću kojeg neutrofil prolazi kroz epitelne stanice je manje poznat. Ipak, poznat je velik broj sličnosti i razlika između neutrofilne transepitelne i transendotelne migracije. Važna sličnost između ova dva procesa je ovisnost o  $\beta$ 2 integrinu. Dok neutrofilna migracija kroz krvožilni endotel koristi i CD11a/CD18 i CD11b/CD18, transepitelna migracija neutrofila zahtijeva samo CD11b/CD18 (128).

Više dosadašnjih istraživanja u svojim rezultatima iznijelo je dokaze da je izražaj CD11b/CD18 na površini neutrofila povećan nakon što dođe do aktivacije neutrofila te da se ovi biljezi na staničnoj površini neutrofila ponašaju kao aktivacijski antigeni (129, 130). Humani leukocitni CD11b je veliki membranski protein koji na sebi sadrži CD15s i CD15s srodne strukture koje posreduju u vezanju CD11b i E-selektina (8).

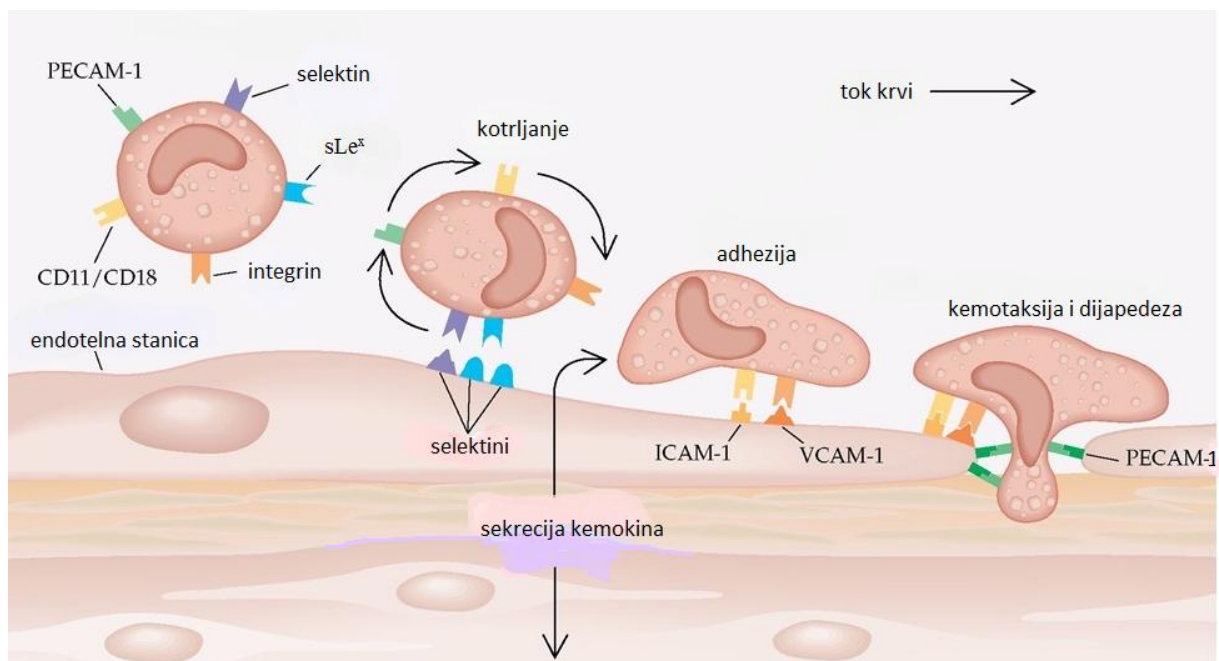
### **1.5.3. Biomarker na staničnoj površini leukocita: CD15s**

CD15s protutijela prepoznaju antigen 3-fukozil-*N*-acetillaktozamin (Lewis x, Le<sup>x</sup>) (131). Kod ljudi je CD15s izražen na monocitima, zrelim neutrofilima i mijeloidnim stanicama od promijelocita prema zrelijim, što ga čini korisnim staničnim površinskim biljekom (132). CD15s nastaje sijalinizacijom distalne laktozaminske jedinice prije njene fukozilacije (133) (Slika 4.).



**Slika 4.** Sijalil Lewis X

Već je prije spomenuto da je prvi korak u nakupljanju leukocita u područje upale njihovo priljublivanje uz zid krvne žile te kotrljanje niz njega. Tijekom kotrljanja, adhezivna kontaktna zona između stanice i endotela krvne žile brzo se prenosi niz zid krvne žile. Ovo zahtijeva brzo razaranje i stvaranje novih adhezivnih veza, a da bi proces tekao neometano neophodno je da brzina stvaranja tih veza bude jednaka brzini njihova razaranja. Selektini i neki integrini aktivno sudjeluju u ovim procesima (134). Za potpuno razumijevanje uloge selektina u reguliranju ekstravazacije leukocita u upalna područja, potrebno je točno utvrditi za koju se kemijsku strukturu na staničnoj površini leukocita veže E-selektin. Dakle, sLe<sup>x</sup> i srodne skupine imaju veliku i važnu ulogu u inicijalnim zbivanjima koja prethode ekstravazaciji leukocita u upalno tkivo i smatra se da one služe kao ugljikohidratni ligandi za E i P-selektin (Slika 5.) (135, 136).



**Slika 5.** Neutrofil se kotrlja niz zid krvne žile gdje se njegovi površinski ugljikohidrati vezuju na selektine endotelne stanice. Nakon aktivacije kemokinom, neutrofil mijenjaju oblik i afinitet svojih integrina za endotelnu međustaničnu adhezijsku molekulu. Neutrofil tada dijapedezom u interakciji s PECAM-1 i otpuštanjem hidrolaza prolaze kroz kapilarnu membranu. (PECAM-1- trombocitno adhezijska endotelna molekula -1; sLe<sup>x</sup>- sijalil-Lewis x ugljikohidrat; ICAM-1-međustanična adhezijska molekula-1; VCAM-1-krvožilna adhezijska molekula-1).

Sijalil Lewis x (sLe<sup>x</sup>, CD15s) je najmanje poznati ligand za selektine. On je prvo identificiran kao humani tumor-vezujući antigen i nađen je na svim malignim tipovima stanica raka. CD15s je izražen na staničnoj površini cirkulirajućih granulocita i monocita te, nakon što ih prepoznaju endotelni selektini, posreduju u inicijalnim interakcijama između leukocita i endotelnih stanica. U normalnom stanju 90% granulocita izražava CD15 i CD15s (137). Berg i suradnici još devedesetih godina 20. stoljeća na temelju istraživanja dokazali su da Le<sup>x</sup> i sLe<sup>x</sup> koji sadrže mucine te sLe<sup>x</sup> koji sadrži i glikolipid mogu prepoznati endotelnu leukocitnu adhezijsku molekulu (ELAM-1). Više istraživača je dokazalo da je ELAM-1 adhezijska molekula (NeuAca<sub>2,3</sub>-Galβ<sub>1-4</sub>(Fuca<sub>1,3</sub>)-GlcNAc) sLe<sup>x</sup> antigena (138, 139). Interakcijom s ELAM-1 molekulom u akutno i kronično upalnom tkivu sLe<sup>x</sup> omogućava regrutaciju leukocita, no u pacijenata s gastrointestinalnim, pankreasnim i karcinomom dojke u serumu je nađeno povišenje mucina koji bi mogli blokirati ovo vezanje te pridonijeti patološkom stanju (135, 140).

Chen i suradnici (141) identificirali su monoklonska protutijela, koja su sva bila IgM klase, na ugljikohidratne lance antigena CD15 i CD15s. Protu-CD15 protutijela reagirat će s CD15s samo onda kada se s njega odstrani sijalinska kiselina (131). Rezultati istraživanja dokazuju da su blasti bili negativni za CD15 i slabo pozitivni za CD15s te da je izražaj obaju formi značajno porastao s nastavkom procesa sazrijevanja od promijelocita do segmentiranih neutrofila, s tim da je u fazi segmentacije došlo do laganog smanjenja izražaja (142). Slično istraživanje normalne koštane srži potvrdilo je izražaj CD15s na CD34+ stanicama (143).

$\beta 2$  integrini su visoko glikozilirani proteini, a ugljikohidratne skupine na obje podjedinice CD11b/CD18 nađene su iznimno bitnima za njihovu urednu funkciju uključujući vezanje liganda (144). Zen i sur. su također u svom radu iznijeli direktne dokaze da su obje podjedinice, a nakon što su izdvojene s normalnih humanih neutrofila obložene sa sLe<sup>x</sup> (8). Naime, i CD11b i CD18 prepoznaju protu-sLe<sup>x</sup> protutijela što je dokaz da oba na sebi imaju izražene sLe<sup>x</sup> skupine. Dodatni dokaz je dobiven i nakon što su isti autori izveli imunofluorescentno označavanje te fluorescentno-aktivirano stanično skeniranje s ciljem utvrđivanja dijele li sLe<sup>x</sup> skupine i CD11b/CD18 isti lokalizacijski obrazac na neutrofilima i imaju li sličan sekrecijski put nakon stimulacije. I jedno i drugo je potvrđeno, odnosno nađena je podudarnost u njihovom položaju na staničnoj površini leukocita i u sekundarnim granulama neutrofila (8). Iznimno je važna činjenica da je povećan izražaj sLe<sup>x</sup> na staničnoj površini neutrofila istodobno pratio i povećani izražaj CD11b/CD18. Zaključak istraživanja Zen i suradnika bio je da je integrin CD11b/CD18 važan glikoprotein čije je vezanje za E-selektin posredovano sLe<sup>x</sup> skupinama i da su one iznimno bitne za normalno funkcioniranje ovih procesa (8).

## **2. CILJEVI I HIPOTEZE:**

Zbog prekomjernog nakupljanja CD77 na CD34+ stanicama, te uloge CD77 u disfunkciji kalij-kalcij kanala, a koja je povezana s endotelnom disfunkcijom (7), odlučili smo ispitati mogućnost nastanka proupalnog fenotipa kod hiperkalcijemije.

Cilj predložene doktorske teme je određivanje proupalnog fenotipa hiperkalcijemije u štakora određivanjem postotka CD77+CD34+ endotelnih stanica srca, bubrega i vene kave, te postotak leukocita koji izražavaju biljege CD11b i CD15s.

Hipoteza:

Postotak leukocita koji izražavaju proupalne biljege CD15s i CD11b značajno će porasti u hiperkalcijemijskoj skupini štakora.

Povećani unos kalcija dovesti će do promjene u postotku CD34+ stanica bubrega, srca i vene kave s izraženim biljekom CD77.

### **3. METODE I MATERIJALI**

#### **3.1. Ustroj istraživanja**

Istraživanje je obzirom na pristup eksperimentalno, a s obzirom na namjenu temeljno. Što se tiče načina dobivanja podataka, riječ je o eksperimentalnom istraživanju, dok je vremenska orijentacija prospektivna jer se podaci skupljaju od početka istraživanja i akumuliraju u budućnosti.

#### **3.2. Ishod istraživanja**

Primarni ishod istraživanja je izražaj pojedinih proupalnih staničnih biljega pri hiperkalcijemiji. Protočnom citometrijom odredio se izražaj biljega CD34 i CD77 na stanicama srca, bubrega i vene kave, te leukocitnih biljega CD11b i CD15s. Mjerna jedinica ishoda je razlika u postotku pozitivnih stanica na istraživane biljege između kontrolne i hiperkalcijemične skupine. Cilj analize je utvrditi da li hiperkalcijemija uzrokuje nastanak proupalnog fenotipa.

#### **3.3. Etička načela**

Zbog obavljanja pokusa na životinjama dobiveno je odobrenje od Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (Uprava za veterinarstvo), te je dobivena potvrda Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Istraživanje se provelo u okviru znanstveno istraživačkog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske „Patobiokemija glikosfingolipidnih antigena“ voditeljice izv. prof. dr. sc. Anite Markotić.

### 3.4. Metode istraživanja:

#### a) Pokusne životinje

Uzorak predstavljaju mužjaci Spraque-Dawley štakora, stari 6 tjedana s koncentracijom ioniziranog kalcija u plazmi većom od 1,22 mM. Mužjaci štakora soja Spraque-Dawley uzgojeni su pod kontroliranim uvjetima (temperatura  $22\pm 1^\circ\text{C}$ ; uz dnevne izmjene 14 sati svjetla i 10 h mraka), životinje su bile hranjene *ad libitum* s 4RF21 GLP, Mucedola (Settimo Milanese, Italija), koja sadrži vitamin D3 1260 U.I./kg, kalcij 9,163 g/kg i fosfat 7,589 g/kg. Gornja granica starosti bila je 8 tjedana, a maksimalna težina 210 grama u kontrolnoj i hiperkalcijemičnoj skupini. Svaka skupina sadržavala je deset pokusnih životinja. Kontrolna skupina je pila normalnu prirodnu vodu. Da bi se uzrokovala hiperkalcijemija, ispitivana skupina štakora pila je prirodnu vodu s dodatkom  $\text{CaCl}_2$  (elementarni kalcij 1,5%) tijekom 14 dana prema studiji Miguel Puerro Vincente i suradnika (145). U dobi od 8 tjedna štakorima se izvadila krv, te su se uzela tkiva bubrega, srca i vene kave.

Sve životinje su žrtvovane produženom anestezijom dietileterom.

#### b) Postupci

##### Protočna citometrija

Iako postoje mnogi testovi koji koriste protočnu citometriju za analizu staničnih obilježja i/ili funkcija, protočna citometrija se ponajviše rabi u cilju imunofenotipizacije, tj. obilježavanja specifičnih staničnih biljega. Protočni citometar se sastoji od 3 međusobno povezana sustava: protočnog, optičkog i elektronskog. Protočni sustav čine pokretačka tekućina, koja je nosač suspenzije stanica, suspenzija stanica i zračni potisak. On omogućuje da stanice iz suspenzije pojedinačno laminarnom protokom kroz sustav uske kapilare dolaze do snopa laserskog svjetla. Lasersko svjetlo, leće, filtri i osjetnici čine optički sustav. Nakon što se stanice obasjaju svjetlom, stupanj raspršenja svjetlosti iste valne duljine pokazatelj je fizičkih osobina stanica - veličine i zrnatosti. Dodatno obilježavanje stanica slobodnim ili za monoklonska protutijela vezanim fluorescentnim bojama (fluorokromima) rabi se za dodatno obilježavanje specifičnih staničnih struktura. Fluorokromi obasjani laserskom svjetlošću emitiraju svjetlost veće valne duljine od ulazne svjetlosti, a hvataju je specifični osjetnici

protočnog citometra. Elektronski sustav pretvara svjetlosne signale u digitalne signale koji se prenose u elektroničko računalo i služe za analizu.

Za definiciju staničnih populacija najčešće se koristi točkasti dijagram veličine i zrnitosti stanica (FSC×SSC) na kojem se postavlja regija (R) analize oko ciljnih stanica iz kojih će se analizirati specifični fluorescentni signali.

### **3.4.1. Određivanje koncentracije kalcija u plazmi**

Biokemijska analiza: prije žrtvovanja uzorak krvi iz jugularne vene potreban za analizu kalcija i biljega izvadio se u vakuum epruvete sa antikoagulansima litij heparinom i K-EDTA u laboratoriju za Medicinsku kemiju i biokemiju. Epruveta za određivanje kalcija se otpremila u Laboratorij za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku KBC Split gdje je koncentracija ioniziranog kalcija u plazmi mjerena ion selektivnom elektrodom na analizatoru Blood Gas Analyzer Rapid Lab Model 348, dok se koncentracija ukupnog kalcija mjerila s autoanalizatorom AU 2700.

### **3.4.2. Određivanje CD34 i CD77 na staničnoj površini stanica tkiva bubrega, srca i vene kave**

U Laboratoriju za medicinsku kemiju i biokemiju, nakon žrtvovanja uzelo se tkivo bubrega, srca i vene kave kontrolne i skupine štakora sa hiperkalcijemijom, te se usitnilo skalpelom u otopini 0,1 M PBS (eng. *phosphate buffer solution*). Zatim je tkivo inkubirano 30 min na 37°C uz miješanje u otopini kolagenaze tip IA iz *Clostridium histolyticum* (SIGMA, Saint Louis, Missouri, SAD) koncentracije 0,1% za bubreg i 0,2% za srce i venu kavu. Suspenzija stanica je filtrirana pomoću najlonske mrežice širine pora 40 μm te se razrijeđena do  $1,0 \times 10^6$  stanica /ml PBS-a.  $10^6$  stanica se inkubiralo 30 minuta na ledu u mraku s protu-CD77 protutijelom konjugiranim s fluorescein-izotiocijanatom (FITC) proizvedenim u mišu (Pharmingen, San Diego, Kalifornija, SAD) i protu-humano CD34 protutijelo konjugirano s fikoeritrin-cijanin-5 (PC5) proizvedenim u mišu (Beckman Coulter, Brea, Kalifornija, SAD).

Nakon dva ispiranja u 0,1 M PBS-u, stanice su resuspendirane u 1 ml 0,1 M PBS-a te se analizirao postotak stanica koje izražavaju biljege CD34 i CD77.

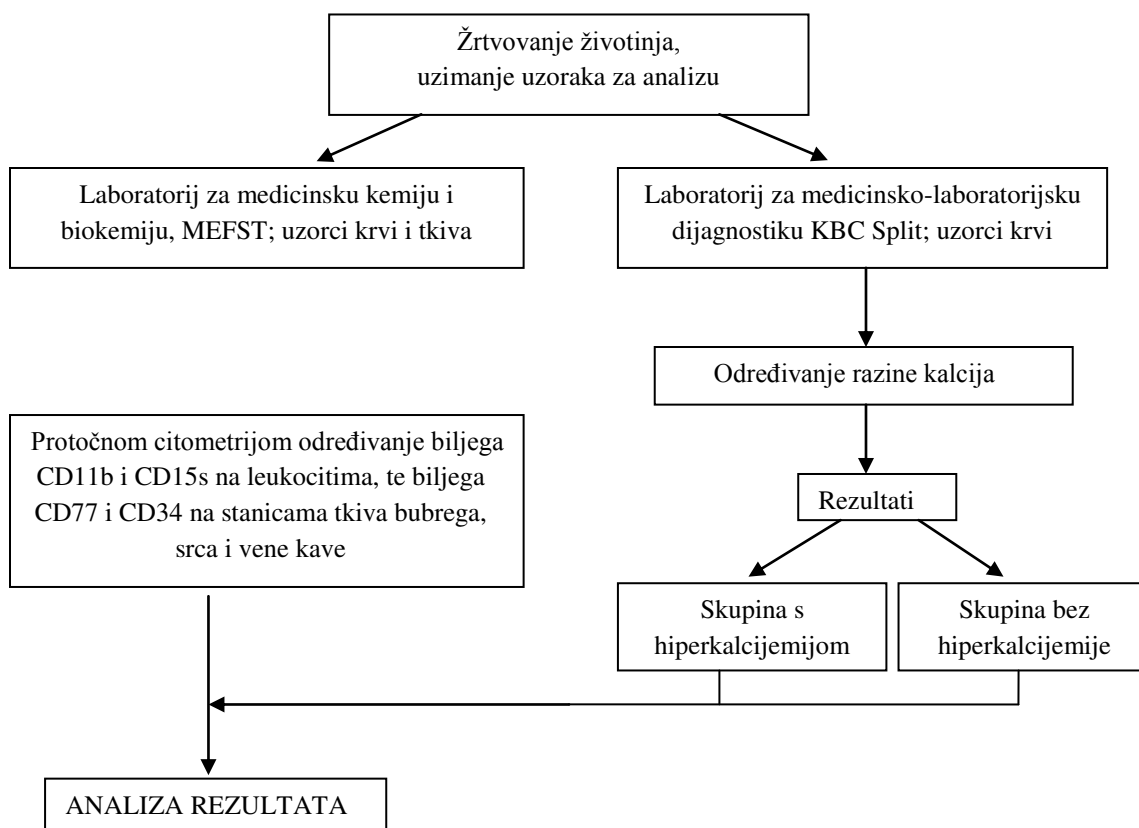


Mjerenja su izvedena na protočnom citometru Epics XL (Beckman Coulter, Kalifornija, SAD).

### **3.4.3. Određivanje CD11b i CD15s na staničnoj površini neutrofila**

Puna krv (100  $\mu$ L) je tretirana s FcR reagensom za blokiranje nespecifičnog vezanja (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka), a zatim inkubirana 30 minuta na ledu u mraku s primarnim protu-CD15s protutijelom proizvedenim u mišu (PharMingen, San Diego, Kalifornija, SAD). Nakon ispiranja u 0,1 M PBS, dodano je sekundarno protu-mišje protutijelo konjugirano s FITC-om i protutijelo reaktivno na humani CD11b konjugiran s fikoeritriinom (PE) (Immunotech, Marseille, Francuska) i inkubirano 30 minuta na ledu u mraku. Nakon hemolize eritrocita dodatkom otopine za hemolizu (Red Blood Cell Lysis Solution, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka), dvostruka fluorescencija je mjerena na protočnom citometru Epics XL (Beckman Coulter, Kalifornija, SAD). Podaci su analizirani pomoću računalnog programa WinMDI, a rezultat izražavan kao postotak pozitivno obilježenih stanica.

### 3.5. Hodogram istraživanja



Životinje su razvrstane u skupinu s hiperkalcijemijom kad je nalaz potvrdio koncentraciju ioniziranog kalcija u plazmi veću od 1.22 mM. Ispitivanje je provedeno do zadovoljenja uvjeta minimalne veličine uzorka hiperkalcijemijske skupine.

### 3.6. Statistički postupci

Ukupni postotak CD34+ stanica je definiran kao zbroj postotaka CD34+CD77- i CD34+ CD77+ stanica, ukupni postotak CD77+ stanica kao zbroj postotaka CD34-CD77+ i CD34+CD77+ stanica. Ukupni postotak CD15s+ leukocita je definiran kao zbroj postotaka CD11b-CD15s+ i CD11b+CD15s+ leukocita, te ukupni postotak CD11b+ leukocita kao zbroj postotaka CD11b+CD15s+ i CD11b+CD15s- leukocita.

Razlike svih parametara (težine štakora, koncentracije ioniziranog i ukupnog kalcija, %CD11b+ leukocita, %CD15s+ leukocita, %CD34+ stanica i %CD77+ stanica) između

kontrolne i skupine sa hiperkalcijemijom određene su pomoću Mann Whitney U testa. Rezultati su interpretirani na razini značajnosti  $P < 0,05$ .

Korelacija između postotka leukocita koji izražavaju proupalne biljege CD11b i CD15s i postotka CD77+CD34+ stanica je procijenjena Pearsonovim koeficijentom korelacije. Statistički program koji se koristio za analizu bio je MedCalc verzija 11.5.1.0.

#### **4. REZULTATI**

Koncentracija ioniziranog kalcija je bila  $1.37 \pm 0,01$  mM u hiperkalcijemičnoj skupini nasuprot  $1,19 \pm 0,03$  mM u kontrolnoj skupini štakora ( $P < 0,001$ ). Koncentracija ukupnog kalcija je bila  $2,91 \pm 0,05$  mM u hiperkalcijemičnoj skupini a u kontrolnoj skupini  $2,79 \pm 0,06$  mM ( $P = 0,125$ ). Postotak ioniziranog kalcija bio je  $48 \pm 0,3$  % u hiperkalcijemičnoj, a u kontrolnoj skupini štakora  $44 \pm 0,96$  % ( $P = 0,013$ ).

U uzorcima srca hiperkalcijemijskih štakora postotak CD34+CD77- stanica bio je neznatno niži u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P = 0,13$ , Tablica 1.). Skupina s hiperkalcijemičnim štakorima je imala dvostruko niži postotak CD34+CD77- stanica u bubregu i sedam puta manji u veni kavi u usporedbi sa skupinom kontrolnih štakora. Postotci ukupnih CD77+ i ukupnih CD34+ stanica su se razlikovali između hiperkalcijemijske i kontrolne skupine, ali bez statističke značajnosti.

**Tablica 1.** Različite stanične subpopulacije u suspenziji stanica srca, bubrega i vene kave kontrolnih i hiperkalcijemijskih štakora

TKIVO	Stanične subpopulacije	Kontrola (%)	Hiperkalcijemija (%)
SRCE	CD34+CD77-	$1.11 \pm 0.34$	$0.31 \pm 0.16$
	CD34+CD77+	$0.81 \pm 0.32$	$0.19 \pm 0.08$
	CD34-CD77+	$0.16 \pm 0.06$	$0.12 \pm 0.04$
	Ukupni CD34+	$1.92 \pm 0.63$	$0.50 \pm 0.22$
	Ukupni CD77+	$0.97 \pm 0.34$	$0.31 \pm 0.11$
BUBREG	CD34+CD77-	$0.88 \pm 0.13$	$0.39 \pm 0.17$ *
	CD34+CD77+	$1.16 \pm 0.29$	$1.22 \pm 0.29$
	CD34-CD77+	$1.90 \pm 0.44$	$1.56 \pm 0.66$
	Ukupni CD34+	$2.04 \pm 0.51$	$1.61 \pm 0.44$

	Ukupni CD77+	3.07 ± 0.39	2.78 ± 0.66
<b>VENA KAVA</b>	CD34+CD77-	3.27 ± 0.86	0.42 ± 0.20 **
	CD34+CD77+	2.90 ± 0.86	1.37 ± 0.68
	CD34-CD77+	1.15 ± 0.34	3.03 ± 1.51
	Ukupni CD34+	6.17 ± 1.68	1.79 ± 0.80
	Ukupni CD77+	4.05 ± 1.13	4.4 ± 2.00

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška

\*  $P = 0.043$

\*\*  $P = 0.010$

Postotci CD11b+CD15s+ i ukupnih CD15s+ leukocita bili su značajno povećani u hiperkalcijemijskoj skupini (Tablica 2.). Postotak ukupnih CD15s+ leukocita bio je 14 puta veći nego % ukupnih CD11b+ leukocita u kontrolnoj skupini (25,74 naspram 1,79) i 8 puta veći (28,82 naspram 3,36) u hiperkalcijemijskoj skupini.

**Tablica 2.** Različite leukocitne CD11b+ i CD15+ subpopulacije u kontrolnim i hiperkalcijemijskim štakorima.

Leukocitne subpopulacije	Kontrola (%)	Hiperkalcijemija (%)
CD11b+CD15s-	1.00 ± 0.29	1.50 ± 0.37
CD11b+CD15s+	0.79 ± 0.16	1.86 ± 0.36 *
CD11b-CD15s+	24.95 ± 0.79	27.87 ± 0.76
Ukupni CD11b+	1.79 ± 0.47	3.36 ± 0.75
Ukupni CD15s+	25.74 ± 0.86	28.82 ± 1.01 **

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška

\*  $P = 0.009$

\*\*  $P = 0.039$

Nije postojala značajna statistička korelacija između postotka CD11b+CD15s+ leukocita i CD34+ CD77- stanica u vene kave i bubrega, kao ni između postotka ukupnih CD15+ leukocita i CD34+ CD77- stanica vene kave i bubrega (Tablica 3.) Korelacija između svih drugih staničnih subpopulacija (svi bez statističke značajnosti) su također prikazani u Tablici 3.

**Table 3.** Korelacija između različitih staničnih subpopulacija srca, bubrega i vene kave.

	Tkivne stanične subpopulacije	Leukocitne populacije					
		CD11b+CD15s+		Ukupni CD11b+		Ukupni CD15s+	
		r	P	r	P	r	P
<b>Srce</b>	CD34+ CD77-	-0.42	0.28	-0.52	0.17	-0.46	0.24
	CD34+ CD77+	-0.28	0.49	-0.23	0.58	-0.10	0.80
	Ukupni CD34+	-0.44	0.26	-0.51	0.18	-0.40	0.32
<b>Bubreg</b>	CD34+CD77-	-0.41	0.31	-0.19	0.65	-0.41	0.30
	CD34+CD77+	-0.29	0.47	-0.38	0.35	-0.28	0.48
	Ukupni CD34+	-0.41	0.30	-0.47	0.23	-0.41	0.30
<b>Vena kava</b>	CD34+CD77-	-0.49	0.22	-0.58	0.13	-0.58	0.12
	CD34+CD77+	-0.45	0.25	-0.40	0.31	-0.25	0.54
	Ukupni CD34+	-0.50	0.20	-0.60	0.11	-0.35	0.38

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška

## **5. RASPRAVA**

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti proupalni učinak hiperkalcijemije pomoću CD15s i CD11b biljega na leukocitima te biljega CD77 na CD34+ endotelnim stanicama u suspenziji stanica tkiva srca, bubrega i vene kave. Hiperkalcijemija je uzrokovala smanjenje postotka CD34+CD77- endotelnih stanica u bubregu i veni kavi istodobno s povećanjem postotka leukocita koji izražavaju biljege CD11b i CD15s.

Kalcij je vrlo važan za mnoge fiziološke procese kao što su kontrakcija skeletnog, srčanog i glatkog mišića, zgrušavanje krvi i prijenos živčanih signala. Podražljive stanice, poput neurona, osjetljive su na promjene u koncentraciji kalcija, te porast koncentracije kalcijevih iona iznad normalne razine (hiperkalcijemija) sve više potiskuje aktivnost živčanog sustava. Paratireoidni hormon (PTH) snažno utječe na funkcionalne učinke vitamina D u organizmu jer pri smanjenoj koncentraciji PTH, stvaranje 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> gotovo potpuno prestaje. Nadalje koncentracija kalcija u plazmi obrnuto proporcionalno utječe na koncentraciju 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u plazmi, tako što inhibira lučenje PTH (12). Pacijenti s blagim primarnim hiperparatireoidizmom i normalnom renalnom funkcijom pokazuju znakove upale i endotelne disfunkcije (146). *In vitro*, PTH u normalnim koncentracijama regulira endotelni stanični izražaj proupalnog i arteriosklerotskog medijatora interleukina-6 (147), rezultati istraživanja Kosch i suradnika također pokazuju poboljšanje endotelne funkcije nakon paratireoidektomije pri primarnom hiperparatireoidizmu (148).

Istraživanja iz 2012. godine ukazuju na mogućnost povećanja kardiovaskularnih bolesti i smrti pri stalnom povećanju koncentracije fosfata (149). *In vitro*, kultura endotelnih stanica u koncentraciji fosfata od 2,5 mM u bubrezima pokazuje smanjenu aktivnost sintaze NO (150) i povećanu apoptozu (151). Direktni utjecaj fosfata na oksidativnu fosforilaciju i stanični metabolizam mogao bi doprinijeti oksidativnom stresu i disfunkciji endotelnih stanica (152, 153). Iako postoji mogućnost da hiperkalcijemija utječe na koncentraciju fosfata, vrijednosti PTH i fosfata nismo određivali u ovoj studiji.

U ovoj studiji, hiperkalcijemija na modelu štakora je izazvana prema radu Puerto Vicente i suradnika (145). U tom modelu, hiperkalcijemija se pojavljuje 2 dana nakon početka pijenja vode s kalcijem dok koncentracija ukupnog i ionskog kalcija u plazmi ostaje visoka 14 dana, ali ipak nešto niža nego nakon 2 dana. Blago smanjenje Ca<sup>2+</sup> od drugog prema četrnaestom danu je mogući odgovor na promjenu koncentracije kalcija hormonima uključujući PTH. To izlučivanje PTH se pojavljuje kao odgovor na smanjeni serumski kalcij, pa u ovoj studiji možemo pretpostaviti niži PTH kod hiperkalcijemijske skupine a niža

koncentracija PTH znači i manje oslobađanje fosfata iz kosti, ali i manju bubrežno izlučivanje fosfata. Zbog toga je naša pretpostavka da je promatrani proupalni fenotip leukocita i stanica endotela štakora u ovoj studiji uzrokovan direktno hiperkalcijemijom, no utjecaj mogućeg fosfatnog izljeva ne može biti isključen.

Rasprava je dodatno ograničena smanjenim volumenom otopine koju su životinje pile i vrijednostima pH u krvi. Postoji sklonost nižoj tjelesnoj težini u hiperkalcijemičnoj skupini štakora u usporedbi s životinjama u kontrolnoj skupini u ovoj, ali i u studiji Puro Vincente i suradnika (145). Možemo pretpostaviti da nema značajne razlike u volumenu otopine koju su životinje pile u odnosu na gore spomenutu studiju. Također je dokazano da vanstanična acidoza povećava kemotaksiju neutrofila (154) i izražaj endotelnog E-selektina (155) koji reagira kao receptor za CD11b i CD15s leukocitne antigene. Povećan pozitivni naboj na proteinima u acidemiji uzrokuje smanjeno vezanje  $Ca^{2+}$  na protein i povećanje koncentracije ioniziranog kalcija (kao frakcije ukupnog kalcija). Dobiveni rezultati većeg postotka ioniziranog kalcija u hiperkalcijemijskim životinjama u ovoj studiji pokazuju da acidemija može povećati postotak leukocita koji izražavaju proupalne biljege CD11b i CD15s.

Drugo stanje slično kroničnoj i akutnoj upali je vaskularna kalcifikacija (156). Vaskularna kalcifikacija uzrokuje programirane procese osteogeneze i aktivnost proupalnih citokina na endotelu (157). Buduće studije su potrebne da bi se moglo zaključiti da li je povećanje ukupnog postotka CD15s+ leukocita samo okidač kalcifikacije ili su one posljedica kalcifikacije u ovoj studiji.

Početni koncept lipidnih splavi bio je da predstavljaju male, diskretne platforme membrane koje funkcioniraju kao signalizacijski organizatori (38). No, danas ih povezujemo s mnogim važnim ulogama u biološkim procesima: apoptozom, prijenosom signala, virusnim infekcijama, staničnom adhezijom i migracijom. Lipidne splavi imaju i važnu ulogu tijekom egzocitoze i endocitoze. Za mnoge od ovih fizioloških procesa zna se da zahtijevaju  $Ca^{2+}$ , pa se pretpostavilo da lipidne splavi reguliraju ove procese manipuliranjem signalizacije kalcija (2).

Kaveole endotelne plazma membrana, pa tako i humanog bubrega i organa kardiovaskularnog sustava bogate su neutralnim glikosfingolipidima (GSL), posebice globotriaosilceramidom, Gb3Cer ili CD77 (158, 159). Brojni GSL su identificirani kao antigeni krvnih grupa, kao CD molekule, kao specifični stanični površinski biljezi (66). Danas je poznato da CD77 uzrokuje disfunkciju kalij-kalcij kanala smanjujući aktivnost vanstanične kinaze regulirane signalom (ERK) i aktivatora proteina-1, te smanjuje aktivnost kanala smanjenjem unutarstaničnih koncentracija PI3P (7). Kalij-kalcij kanali u endotelnim



stanicama reguliraju izljev  $Ca^{2+}$  (74) čime doprinose relaksaciji endotelnih stanica te tako ukazuju da disfunkcija kanala može uzrokovati endotelnu disfunkciju, a time i krvožilne bolesti (75). Poremećaj u razgradnji CD77 dovodi do njegovog nakupljanja, a ono posljedično srčane, bubrežne i cerebrovaskularne bolesti (6). Zbog toga su tkiva od interesa za određivanje izražaja CD77 u ovoj studiji bubreg, srce i krvna žila. Prijašnje analize biljega CD77 u krvnim žilama pokazala su veći izražaj u venama nego u arterijama. Endotelne stanice humane umbilikalne vene izražavaju veći sadržaj CD77 nego humane mikrovaskularne endotelne stanice mozga (160). U svježe smrznutoj humanoj mišićnoj sekciji (presjeku) postojala je reakcija na protu-CD77 protutijelo u kapilarama, venama i venulama, ali ne i u arteriolama i arterijama (161). CD77 je specifični bubrežni endotelni receptor za Shiga toxin iz *Escherichia coli*, što dokazuje i istraživanje na endotelnim stanicama humane pupčane vene (162).

Endotelne lipidne splavi su klasificirane ovisno o svojoj funkciji na: splavi za međuendotelnu komunikaciju, splavi koje sudjeluju u imunološkoj adheziji i migraciji stanica preko endotela i splavi povezane s transendotelnim transportom hranjivih tvari i iona (163). Kalcijev signal može biti koordiniran organizacijom specifičnih kanala, pumpi, pufera, izmjenjivača i proteina u zajedničkim mikrodomenama (2, 3). Membranske splavi omogućavaju ovakve mikrodomene u kojima specifični signalni događaji mogu biti efikasno zaustavljeni. S druge strane prekomjerno nakupljanje CD77 uzrokuje disfunkciju kalij-kalcij kanala (7).

Postotak CD34+ CD77- stanica bubrega i vene kave u ovoj studiji pokazuju visoku osjetljivost na izljev kalcija. Skupina s hiperkalcijemičnim štakorima je imala dvostruko niži postotak CD34+ CD77- stanica u bubregu i sedam puta manji u veni kavi u usporedbi sa skupinom kontrolnih štakora. Postotci ukupnih CD77+ i ukupnih CD34+ stanica su se razlikovali između hiperkalcijemijske i kontrolne skupine, ali bez statističke značajnosti. (Tablica 1.). Ovi rezultati su značajni obzirom da je istraživanje iz 2008. godine dokazalo da se unosom kalcija glikoprotein kadherin na endotelu krvnih žila raspada što doprinosi pucanju adherentnih veza tijekom endotelne stanične aktivacije i apoptoze (164). To nas navodi na pretpostavku da CD34+ CD77- stanice, zbog svog siromašnijeg sadržaja lipidnih splavi, podliježu većem obujmu razdvajanja adherentnih veza tijekom aktivacije endotelnih stanica i apoptoze uzrokovane izljevom  $Ca^{2+}$ .

Leukocitni fenotip se mijenja tijekom blage hiperkalcijemije u ovoj studiji, povišenjem postotka leukocitna koji imaju CD11b i CD15s glikoantigene. Rezultati istraživanja kojima je u centru pozornosti bio proces kotrljanja leukocita niz zid krvne žile i

njihova adhezija, pokazali su da CD15s i njemu slične strukture koje su izražene na staničnoj površini leukocita imaju važnu ulogu u inicijalnim zbivanjima ekstravazacije leukocita u tkivo (165). Humani leukocitni CD11b je veliki membranski protein koji na sebi sadrži CD15s i CD15s srodne strukture koje posreduju u vezanju CD11b i E-selektina (8). Nakon što proupalni podražaj dovede do stimulacije neutrofila, dolazi do pojačanog izražaja CD11b na njihovoj površini (125). Upravo stoga, uočavanje pojačanog izražaja CD11b može poslužiti kao pokazatelj da je nastupila aktivacija neutrofila (126, 127). Njegovu biološku važnost za normalno funkcioniranje imunološkog procesa dodatno potvrđuje činjenica da postoje različita patološka stanja gdje su integrini defektni ili nedostaju i u tih osoba nedostatak funkcijskih  $\beta 2$  integrina uzrokuje životno ugrožavajuće infekcije. U vezanju neutrofila i njegovom kotrljanju niz endotel krvne žile, a posredovan E-selektinom, važnu ulogu imaju ligandi na neutrofilima a među kojima su PSGL-1 (166), L-selektin (CD62L), E-selektin ligand 1 (167), CD43 (168) i CD44 (169). Svi ovi ligandi su slični jer svi izražavaju sLe<sup>x</sup> ili CD15s koji sudjeluje u prepoznavanju E-selektina (112, 167, 170). Postotci CD11b+ CD15s+ i ukupnih CD15s+ leukocita bili su značajno povećani u hiperkalcijemijskoj skupini (Tablica 2.). Postotak ukupnih CD15s+ bio je 14 puta veći nego % ukupnih CD11b+ leukocita u kontrolnoj skupini (25,74 naspram 1,79) i 8 puta veći (28,82 naspram 3,36) u hiperkalcijemijskoj skupini. Nekoliko puta veći postotak ukupnih CD15s+ leukocita nego što je % ukupnih CD11b+ leukocita u hiperkalcijemijskoj i kontrolnoj skupini mogao bi biti posljedica većeg afiniteta protu-CD15s protutijela na sLe<sup>x</sup>-tip glikoepitopa CD11b glikoproteina nego što je afinitet protu-CD11b protutijela na peptidni epitop Mac-1 glikoproteina CD11b.

U dijelu ranijih istraživanja preporučeno je da se analiza i određivanje izražaja biljega na staničnoj površini neutrofila učini neposredno nakon uzimanja uzorka krvi, a s ciljem izbjegavanja apoptoze (171). Nestabilni izražaj CD11b je nađen u nekim istraživanjima (172). Upravo zbog toga, a s ciljem izbjegavanja stanične apoptoze što je više moguće, analiza svih uzoraka krvi u ovom istraživanju urađena je unutar 4 sata od uzimanja uzorka krvi. Svi postupci bili su u skladu s ranije objavljenim protokolom iz istraživanja koje je pokazalo da je određivanje izražaja CD11b unutar 24 sata od uzimanja uzorka krvi pouzdana metoda čiji su rezultati reproducibilni (173).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da postotak leukocita koji izražavaju biljege CD11b i CD15s može biti pokazatelj proupale u štakora uzrokovane hiperkalcijemijom.

## **6. ZAKLJUČAK**

1. Postotak leukocita koji izražavaju proupalne biljege CD15s i CD11b je porastao u hiperkalcijemičnih štakora u odnosu na kontrolnu skupinu.
2. Povećani unos kalcija doveo je do smanjenja postotka CD34+ stanica bubrega, srca i vene kave s izraženim biljegom CD77.
3. Postotak CD11b+ CD15s+ leukocita mogao bi biti mjera proupalnog učinka kod blage hiperkalcijemije.
4. Rezultati ovog istraživanja ukazali su da povećani unos kalcija uzrokuje proupalni fenotip leukocita i endotelnih stanica tkiva.

## 7. SAŽETAK

Mikrodomene endotelnih plazma membrana, takozvane lipidne splavi/kaveole, bogate su neutralnim glikosfingolipidima, globotriozilceramidom Gb3Cer ili CD77. Nekoliko membranskih  $\text{Ca}^{2+}$  kanala i pumpi nađeni su u lipidnim splavima/kaveolama. Povećani unos  $\text{Ca}^{2+}$  mogao bi uzrokovati endotelni proupalni fenotip. Zbog toga je cilj ove studije odrediti utjecaj hiperkalcijemije u štakora određivanjem izražaja CD77 na CD34+ endotelnim stanicama srca, bubrega i vene kave. Potencijalni proupalni fenotip uzrokovan kalcijem određen je izražajem CD11b i CD15s na leukocitima. Da bi se uzrokovala hiperkalcijemija, Sprague-Dawley mužjacima štakora davana je 1,5% otopina  $\text{CaCl}_2$  tijekom 14 dana. Izražaj CD77 na CD34+ endotelnim stanicama stanične suspenzije srca, bubrega i vene kave, te izražaj leukocitnih CD11b i CD15s u hiperkalcijemijskoj i kontrolnoj skupini štakora određeni su protočnim citometrom. Koncentracija ioniziranog kalcija u plazmi je bila  $1,37 \pm 0,01$  mM u hiperkalcijemijskoj naspram  $1,19 \pm 0,03$  mM u kontrolnoj skupini štakora. Skupina s hiperkalcijemičnim štakorima pokazala je statistički značajno niži postotak CD34+CD77- stanica u bubregu i veni kavi uz istodobno povećanje postotka leukocita koji imaju izražene proupalne biljege CD11b i CD15s.

Pretpostavlja se da su plazma membrane CD77- endotelnih stanica siromašnije u lipidnim mikrodomenama, a time slabije u kontroli  $\text{Ca}^{2+}$  izljeva. Postotak CD11b+CD15s+ leukocita mogao bi biti mjera proupalnog učinka kod blage hiperkalcijemije.

## **HYPERCALCEMIA INDUCES A PROINFLAMMATORY PHENOTYPE IN RAT LEUKOCYTES AND ENDOTHELIAL CELLS**

### **7.1. Abstract**

Endothelial plasma membrane lipid microdomains, so called lipid rafts/caveolae, are rich in neutral glycosphingolipid, globotriaosylceramide, Gb3Cer or CD77. Several plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  channels and pumps are located in lipid rafts/caveolae. Increased  $\text{Ca}^{2+}$  influx could cause the development of an endothelial proinflammatory phenotype. Therefore, the aim of this study was to estimate effects of hypercalcemia in rats by determination of CD77 expression on CD34+ endothelial cells in heart, kidney and vena cava. In addition, potential proinflammatory calcium effect was estimated by CD11b and CD15s expression on leukocytes. To achieve hypercalcemia, Sprague-Dawley male rats were drinking  $\text{CaCl}_2$  solution with a concentration of 1.5% elemental calcium during 14 days. CD77 expression on CD34+ endothelial cells in cell suspensions of heart, kidney and vena cava, as well as leukocyte expression of CD11b and CD15s in hypercalcemic and control rats were determined by flow cytometry. Ionized calcium concentration in plasma was  $1.37 \pm 0.01$  mM in hypercalcemic vs.  $1.19 \pm 0.03$  mM in control rats. Hypercalcemic group showed statistically significantly decreased proportion of endothelial CD34+CD77- cells in the kidney and vena cava in parallel with increase of percentage of leukocytes expressing proinflammatory markers CD11b and CD15s.

In conclusion, it is tempting to speculate that plasma membranes of glycosphingolipid CD77- endothelial cells are poorer in caveolae lipid microdomains and therefore weaker in controlling of  $\text{Ca}^{2+}$  influx. The percentage of CD11b+CD15s+ leukocytes could be a measure of proinflammatory effects of mild hypercalcemia.

## **8. LITERATURA**

1. Body JJ, Bergmann P, Boonen S, Devogelaer JP, Gielen E, Goemaere S, et al. Extraskelital benefits and risks of calcium, vitamin D and anti-osteoporosis medications. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2012;23 Suppl 1:S1-23.
2. Pani B, Singh BB. Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling. *Cell calcium*. 2009;45(6):625-33.
3. Xiong Y, Antalffy G, Enyedi A, Strehler EE. Apical localization of PMCA2w/b is lipid raft-dependent. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;384(1):32-6.
4. Betz J, Bielaszewska M, Thies A, Humpf HU, Dreisewerd K, Karch H, et al. Shiga toxin glycosphingolipid receptors in microvascular and macrovascular endothelial cells: differential association with membrane lipid raft microdomains. *Journal of lipid research*. 2011;52(4):618-34.
5. Bauwens A, Bielaszewska M, Kemper B, Langehanenberg P, von Bally G, Reichelt R, et al. Differential cytotoxic actions of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2 on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Thrombosis and haemostasis*. 2011;105(3):515-28.
6. Higuchi K, Yoshimitsu M, Fan X, Guo X, Rasaiah VI, Yen J, et al. Alpha-galactosidase A-Tat fusion enhances storage reduction in hearts and kidneys of Fabry mice. *Mol Med*. 2010;16(5-6):216-21.
7. Park S, Kim JA, Joo KY, Choi S, Choi EN, Shin JA, et al. Globotriaosylceramide leads to K(Ca)3.1 channel dysfunction: a new insight into endothelial dysfunction in Fabry disease. *Cardiovascular research*. 2011;89(2):290-9.
8. Zen K, Cui LB, Zhang CY, Liu Y. Critical role of mac-1 sialyl lewis x moieties in regulating neutrophil degranulation and transmigration. *J Mol Biol*. 2007;374(1):54-63.
9. Weirich E, Rabin RL, Maldonado Y, Benitz W, Modler S, Herzenberg LA. Neutrophil CD11b expression as a diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *The Journal of pediatrics*. 1998;132(3 Pt 1):445-51.
10. Markic J, Jeroncic A, Polancec D, Bosnjak N, Markotic A, Mestrovic J, et al. CD15s is a potential biomarker of serious bacterial infection in infants admitted to hospital. *European journal of pediatrics*. 2013;172(10):1363-9.

11. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. Calcium absorption across epithelia. *Physiological reviews*. 2005;85(1):373-422.
12. de Brito Galvao JF, Nagode LA, Schenck PA, Chew DJ. Calcitriol, calcidiol, parathyroid hormone, and fibroblast growth factor-23 interactions in chronic kidney disease. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2013;23(2):134-62.
13. Riccardi D, Brown EM. Physiology and pathophysiology of the calcium-sensing receptor in the kidney. *American journal of physiology Renal physiology*. 2010;298(3):F485-99.
14. Boonen S, Vanderschueren D, Geusens P, Bouillon R. Age-associated endocrine deficiencies as potential determinants of femoral neck (type II) osteoporotic fracture occurrence in elderly men. *International journal of andrology*. 1997;20(3):134-43.
15. Boonen S, Bischoff-Ferrari HA, Cooper C, Lips P, Ljunggren O, Meunier PJ, et al. Addressing the musculoskeletal components of fracture risk with calcium and vitamin D: a review of the evidence. *Calcified tissue international*. 2006;78(5):257-70.
16. Patient level pooled analysis of 68 500 patients from seven major vitamin D fracture trials in US and Europe. *BMJ*. 2010;340:b5463.
17. Avenell A, Mak JC, O'Connell D. Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures in post-menopausal women and older men. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2014;4:CD000227.
18. Bostick RM, Kushi LH, Wu Y, Meyer KA, Sellers TA, Folsom AR. Relation of calcium, vitamin D, and dairy food intake to ischemic heart disease mortality among postmenopausal women. *American journal of epidemiology*. 1999;149(2):151-61.
19. Knox EG. Ischaemic-heart-disease mortality and dietary intake of calcium. *Lancet*. 1973;1(7818):1465-7.
20. Fleischman AI, Bierenbaum ML, Lenz PH. The hypolipidemic effect of calcium-containing compounds and vitamin D<sub>2</sub> in the rat. *Lipids*. 1972;7(4):263-6.
21. Chung M, Balk EM, Brendel M, Ip S, Lau J, Lee J, et al. Vitamin D and calcium: a systematic review of health outcomes. *Evidence report/technology assessment*. 2009(183):1-420.
22. Dickinson HO, Nicolson DJ, Cook JV, Campbell F, Beyer FR, Ford GA, et al. Calcium supplementation for the management of primary hypertension in adults. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2006(2):CD004639.
23. Barr SI. Increased dairy product or calcium intake: is body weight or composition affected in humans? *The Journal of nutrition*. 2003;133(1):245S-8S.

24. Bolland MJ, Avenell A, Baron JA, Grey A, MacLennan GS, Gamble GD, et al. Effect of calcium supplements on risk of myocardial infarction and cardiovascular events: meta-analysis. *BMJ*. 2010;341:c3691.
25. Bolland MJ, Barber PA, Doughty RN, Mason B, Horne A, Ames R, et al. Vascular events in healthy older women receiving calcium supplementation: randomised controlled trial. *BMJ*. 2008;336(7638):262-6.
26. Foley RN, Collins AJ, Ishani A, Kalra PA. Calcium-phosphate levels and cardiovascular disease in community-dwelling adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *American heart journal*. 2008;156(3):556-63.
27. Ronco C, Cozzolino M. Mineral metabolism abnormalities and vitamin D receptor activation in cardiorenal syndromes. *Heart failure reviews*. 2012;17(2):211-20.
28. Tian J, Liu Y, Williams LA, de Zeeuw D. Potential role of active vitamin D in retarding the progression of chronic kidney disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2007;22(2):321-8.
29. Slinin Y, Foley RN, Collins AJ. Calcium, phosphorus, parathyroid hormone, and cardiovascular disease in hemodialysis patients: the USRDS waves 1, 3, and 4 study. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(6):1788-93.
30. Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Spiegelman D, Stampfer MJ. Comparison of dietary calcium with supplemental calcium and other nutrients as factors affecting the risk for kidney stones in women. *Annals of internal medicine*. 1997;126(7):497-504.
31. Sugden JA, Davies JJ, Witham MD, Morris AD, Struthers AD. Vitamin D improves endothelial function in patients with Type 2 diabetes mellitus and low vitamin D levels. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2008;25(3):320-5.
32. Gaus K, Gratton E, Kable EP, Jones AS, Gelissen I, Kritharides L, et al. Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(26):15554-9.
33. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2000;1(1):31-9.
34. Pike LJ. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of lipid research*. 2006;47(7):1597-8.
35. Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(10):5419-22.



36. Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(10):6525-33.
37. Lisanti MP, Scherer PE, Tang Z, Sargiacomo M. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends in cell biology*. 1994;4(7):231-5.
38. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 1997;387(6633):569-72.
39. Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacological reviews*. 2002;54(3):431-67.
40. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*. 2001;293(5539):2449-52.
41. Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, et al. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(41):38121-38.
42. Frank PG, Woodman SE, Park DS, Lisanti MP. Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23(7):1161-8.
43. Vasile E, Simionescu M, Simionescu N. Visualization of the binding, endocytosis, and transcytosis of low-density lipoprotein in the arterial endothelium in situ. *The Journal of cell biology*. 1983;96(6):1677-89.
44. Anderson RG. The caveolae membrane system. *Annual review of biochemistry*. 1998;67:199-225.
45. Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, et al. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(11):7289-304.
46. Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, et al. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *The Journal of cell biology*. 1994;126(1):111-26.
47. Isshiki M, Ando J, Yamamoto K, Fujita T, Ying Y, Anderson RG. Sites of Ca<sup>2+</sup> wave initiation move with caveolae to the trailing edge of migrating cells. *Journal of cell science*. 2002;115(Pt 3):475-84.
48. Ambudkar IS. Cellular domains that contribute to Ca<sup>2+</sup> entry events. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2004;2004(243):pe32.

49. Putney JW, Jr. Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. *The Journal of cell biology*. 2005;169(3):381-2.
50. Beech DJ. TRPC1: store-operated channel and more. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2005;451(1):53-60.
51. Parekh AB, Putney JW, Jr. Store-operated calcium channels. *Physiological reviews*. 2005;85(2):757-810.
52. Li T, Sotgia F, Vuolo MA, Li M, Yang WC, Pestell RG, et al. Caveolin-1 mutations in human breast cancer: functional association with estrogen receptor alpha-positive status. *The American journal of pathology*. 2006;168(6):1998-2013.
53. Tortelote GG, Valverde RH, Lemos T, Guilherme A, Einicker-Lamas M, Vieyra A. The plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump from proximal kidney tubules is exclusively localized and active in caveolae. *FEBS letters*. 2004;576(1-2):31-5.
54. Nurminen TA, Holopainen JM, Zhao H, Kinnunen PK. Observation of topical catalysis by sphingomyelinase coupled to microspheres. *Journal of the American Chemical Society*. 2002;124(41):12129-34.
55. Kolesnick RN, Kronke M. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annual review of physiology*. 1998;60:643-65.
56. Ruvolo PP. Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2003;47(5):383-92.
57. Venkataraman K, Futerman AH. Ceramide as a second messenger: sticky solutions to sticky problems. *Trends in cell biology*. 2000;10(10):408-12.
58. Zager RA, Burkhart KM, Johnson A. Sphingomyelinase and membrane sphingomyelin content: determinants of proximal tubule cell susceptibility to injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2000;11(5):894-902.
59. Robinson CS, Wagner RC. Differential endocytosis of lipoproteins by capillary endothelial vesicles. *Microcirculation, endothelium, and lymphatics*. 1985;2(3):313-29.
60. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(5):2604-9.
61. Shayman JA, Radin NS. Structure and function of renal glycosphingolipids. *The American journal of physiology*. 1991;260(3 Pt 2):F291-302.

62. Stults CL, Sweeley CC, Macher BA. Glycosphingolipids: structure, biological source, and properties. *Methods in enzymology*. 1989;179:167-214.
63. Hakomori S. Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(31):18713-6.
64. Feizi T. Carbohydrate-mediated recognition systems in innate immunity. *Immunological reviews*. 2000;173:79-88.
65. Russell RJ, Stevens DJ, Haire LF, Gamblin SJ, Skehel JJ. Avian and human receptor binding by hemagglutinins of influenza A viruses. *Glycoconjugate journal*. 2006;23(1-2):85-92.
66. Zeller CB, Marchase RB. Gangliosides as modulators of cell function. *The American journal of physiology*. 1992;262(6 Pt 1):C1341-55.
67. Lingwood CA. Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends in microbiology*. 1996;4(4):147-53.
68. Bielaszewska M, Karch H. Consequences of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection for the vascular endothelium. *Thrombosis and haemostasis*. 2005;94(2):312-8.
69. Brigotti M, Alfieri R, Sestili P, Bonelli M, Petronini PG, Guidarelli A, et al. Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002;16(3):365-72.
70. Muthing J, Schweppe CH, Karch H, Friedrich AW. Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. *Thrombosis and haemostasis*. 2009;101(2):252-64.
71. Ling H, Boodhoo A, Hazes B, Cummings MD, Armstrong GD, Brunton JL, et al. Structure of the shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3. *Biochemistry*. 1998;37(7):1777-88.
72. Cherla RP, Lee SY, Tesh VL. Shiga toxins and apoptosis. *FEMS microbiology letters*. 2003;228(2):159-66.
73. Taga S, Carlier K, Mishal Z, Capoulade C, Mangeney M, Lecluse Y, et al. Intracellular signaling events in CD77-mediated apoptosis of Burkitt's lymphoma cells. *Blood*. 1997;90(7):2757-67.
74. Tharp DL, Bowles DK. The intermediate-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channel (KCa3.1) in vascular disease. *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry*. 2009;7(1):1-11.

75. Ahn SC, Seol GH, Kim JA, Suh SH. Characteristics and a functional implication of Ca(2+)-activated K(+) current in mouse aortic endothelial cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2004;447(4):426-35.
76. Hilkens J, Ligtenberg MJ, Vos HL, Litvinov SV. Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. *Trends in biochemical sciences*. 1992;17(9):359-63.
77. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol*. 1984;133(1):157-65.
78. Holt JT, Redner RL, Nienhuis AW. An oligomer complementary to c-myc mRNA inhibits proliferation of HL-60 promyelocytic cells and induces differentiation. *Molecular and cellular biology*. 1988;8(2):963-73.
79. Kastan MB, Stone KD, Civin CI. Nuclear oncoprotein expression as a function of lineage, differentiation stage, and proliferative status of normal human hematopoietic cells. *Blood*. 1989;74(5):1517-24.
80. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*. 2014;32(6):1380-9.
81. Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. *Journal of cell science*. 2008;121(Pt 22):3683-92.
82. Krause DS, Ito T, Fackler MJ, Smith OM, Collector MI, Sharkis SJ, et al. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*. 1994;84(3):691-701.
83. Drew E, Merzaban JS, Seo W, Ziltener HJ, McNagny KM. CD34 and CD43 inhibit mast cell adhesion and are required for optimal mast cell reconstitution. *Immunity*. 2005;22(1):43-57.
84. Kelley TW, Huntsman D, McNagny KM, Roskelley CD, Hsi ED. Podocalyxin: a marker of blasts in acute leukemia. *American journal of clinical pathology*. 2005;124(1):134-42.
85. Brenes RA, Bear M, Jadowiec C, Goodwin M, Hashim P, Protack CD, et al. Cell-based interventions for therapeutic angiogenesis: review of potential cell sources. *Vascular*. 2012;20(6):360-8.
86. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*. 1990;75(12):2417-26.

87. Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, et al. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *The Journal of cell biology*. 2000;151(6):1221-34.
88. Sassetti C, Tangemann K, Singer MS, Kershaw DB, Rosen SD. Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD34. *The Journal of experimental medicine*. 1998;187(12):1965-75.
89. Fieger CB, Sassetti CM, Rosen SD. Endoglycan, a member of the CD34 family, functions as an L-selectin ligand through modification with tyrosine sulfation and sialyl Lewis x. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(30):27390-8.
90. He XY, Antao VP, Basila D, Marx JC, Davis BR. Isolation and molecular characterization of the human CD34 gene. *Blood*. 1992;79(9):2296-302.
91. Zola H. Medical applications of leukocyte surface molecules--the CD molecules. *Mol Med*. 2006;12(11-12):312-6.
92. Erber WN. Human leucocyte differentiation antigens: review of the CD nomenclature. *Pathology*. 1990;22(2):61-9.
93. Zola H, Swart B. The human leucocyte differentiation antigens (HLDA) workshops: the evolving role of antibodies in research, diagnosis and therapy. *Cell research*. 2005;15(9):691-4.
94. Bernard A, Boumsell L. The clusters of differentiation (CD) defined by the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens. *Human immunology*. 1984;11(1):1-10.
95. Zola H, Swart B, Nicholson I, Aasted B, Bensussan A, Boumsell L, et al. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood*. 2005;106(9):3123-6.
96. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657-70.
97. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annual review of immunology*. 2003;21:759-806.
98. Simon RA, Wenzel SE. Introduction. The immunobiology of leukotriene inhibitors. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 1999;17(1-2):1-2.
99. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(8):519-31.
100. Liu Y, Shaw SK, Ma S, Yang L, Luscinskas FW, Parkos CA. Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interactions and signaling events. *J Immunol*. 2004;172(1):7-13.

101. Zen K, Parkos CA. Leukocyte-epithelial interactions. *Current opinion in cell biology*. 2003;15(5):557-64.
102. Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet*. 2006;368(9530):157-69.
103. Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka AV, Wu D. Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science*. 2000;287(5455):1046-9.
104. Gonzalez-Amaro R, Sanchez-Madrid F. Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Critical reviews in immunology*. 1999;19(5-6):389-429.
105. Lasky LA. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science*. 1992;258(5084):964-9.
106. Huang AJ, Manning JE, Bandak TM, Rataou MC, Hanser KR, Silverstein SC. Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. *The Journal of cell biology*. 1993;120(6):1371-80.
107. Kiely JM, Hu Y, Garcia-Cardena G, Gimbrone MA, Jr. Lipid raft localization of cell surface E-selectin is required for ligation-induced activation of phospholipase C gamma. *J Immunol*. 2003;171(6):3216-24.
108. Schaff UY, Yamayoshi I, Tse T, Griffin D, Kibathi L, Simon SI. Calcium flux in neutrophils synchronizes beta2 integrin adhesive and signaling events that guide inflammatory recruitment. *Annals of biomedical engineering*. 2008;36(4):632-46.
109. Sela BA. [Selectins: vascular adhesion molecules]. *Harefuah*. 2000;138(12):1046-50.
110. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1995;9(10):866-73.
111. Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature*. 1983;304(5921):30-4.
112. Picker LJ, Warnock RA, Burns AR, Doerschuk CM, Berg EL, Butcher EC. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell*. 1991;66(5):921-33.
113. Dore M, Korthuis RJ, Granger DN, Entman ML, Smith CW. P-selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo. *Blood*. 1993;82(4):1308-16.

114. Crutchfield KL, Shinde Patil VR, Campbell CJ, Parkos CA, Allport JR, Goetz DJ. CD11b/CD18-coated microspheres attach to E-selectin under flow. *Journal of leukocyte biology*. 2000;67(2):196-205.
115. Abbal C, Lambelet M, Bertaggia D, Gerbex C, Martinez M, Arcaro A, et al. Lipid raft adhesion receptors and Syk regulate selectin-dependent rolling under flow conditions. *Blood*. 2006;108(10):3352-9.
116. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(24):9238-42.
117. Johnson RC, Mayadas TN, Frenette PS, Mebius RE, Subramaniam M, Lacasce A, et al. Blood cell dynamics in P-selectin-deficient mice. *Blood*. 1995;86(3):1106-14.
118. Steegmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, Borges E, Lenter M, Kocher HP, et al. The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature*. 1995;373(6515):615-20.
119. Simon DI, Dhen Z, Seifert P, Edelman ER, Ballantyne CM, Rogers C. Decreased neointimal formation in Mac-1(-/-) mice reveals a role for inflammation in vascular repair after angioplasty. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(3):293-300.
120. Wong DA, Davis EM, LeBeau M, Springer TA. Cloning and chromosomal localization of a novel gene-encoding a human beta 2-integrin alpha subunit. *Gene*. 1996;171(2):291-4.
121. ARNAOUT M, TODD R, DANA N, MELAMED J, SCHLOSSMAN S, COLTEN H. INHIBITION OF PHAGOCYTOSIS OF COMPLEMENT-C3-COATED OR IMMUNOGLOBULIN-G-COATED PARTICLES AND OF C3BI BINDING BY MONOCLONAL-ANTIBODIES TO A MONOCYTE-GRANULOCYTE MEMBRANE GLYCOPROTEIN (MOL). *Journal of Clinical Investigation*. 1983;72(1):171-9.
122. Dunne JL, Collins RG, Beaudet AL, Ballantyne CM, Ley K. Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF-alpha-induced inflammation. *J Immunol*. 2003;171(11):6105-11.
123. Tang T, Rosenkranz A, Assmann KJ, Goodman MJ, Gutierrez-Ramos JC, Carroll MC, et al. A role for Mac-1 (CD11b/CD18) in immune complex-stimulated neutrophil function in vivo: Mac-1 deficiency abrogates sustained Fc gamma receptor-dependent neutrophil adhesion and complement-dependent proteinuria in acute glomerulonephritis. *The Journal of experimental medicine*. 1997;186(11):1853-63.

124. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 1997;89(10):3503-21.
125. Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA, Borregaard N. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *The Journal of clinical investigation*. 1993;92(3):1467-76.
126. Repo H, Rochon YP, Schwartz BR, Sharar SR, Winn RK, Harlan JM. Binding of human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes to E-selectin (CD62E) does not promote their activation. *J Immunol*. 1997;159(2):943-51.
127. Vuorte J, Lindsberg PJ, Kaste M, Meri S, Jansson SE, Rothlein R, et al. Anti-ICAM-1 monoclonal antibody R6.5 (Enlimomab) promotes activation of neutrophils in whole blood. *J Immunol*. 1999;162(4):2353-7.
128. Parkos CA, Delp C, Arnaout MA, Madara JL. Neutrophil migration across a cultured intestinal epithelium. Dependence on a CD11b/CD18-mediated event and enhanced efficiency in physiological direction. *The Journal of clinical investigation*. 1991;88(5):1605-12.
129. Gonzalez-Amaro R, Diaz-Gonzalez F, Sanchez-Madrid F. Adhesion molecules in inflammatory diseases. *Drugs*. 1998;56(6):977-88.
130. Ravetch JV, Kinet JP. Fc receptors. *Annual review of immunology*. 1991;9:457-92.
131. Kerr MA, Stocks SC. The role of CD15-(Le(X))-related carbohydrates in neutrophil adhesion. *The Histochemical journal*. 1992;24(11):811-26.
132. Oriol R, Le Pendu J, Mollicone R. Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. *Vox sanguinis*. 1986;51(3):161-71.
133. Nakayama F, Nishihara S, Iwasaki H, Kudo T, Okubo R, Kaneko M, et al. CD15 expression in mature granulocytes is determined by alpha 1,3-fucosyltransferase IX, but in promyelocytes and monocytes by alpha 1,3-fucosyltransferase IV. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(19):16100-6.
134. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annual review of physiology*. 1995;57:827-72.
135. Berg EL, Robinson MK, Mansson O, Butcher EC, Magnani JL. A carbohydrate domain common to both sialyl Le(a) and sialyl Le(X) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(23):14869-72.
136. Abbassi O, Kishimoto TK, McIntire LV, Anderson DC, Smith CW. E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *The Journal of clinical investigation*. 1993;92(6):2719-30.



137. Glavas D, Markotic A, Valic Z, Kovacic N, Palada I, Martinic R, et al. Expression of endothelial selectin ligands on human leukocytes following dive. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008;233(9):1181-8.
138. Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FC, Perez M, Singhal AK, Hakomori S, et al. ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science*. 1990;250(4984):1130-2.
139. Lowe JB, Stoolman LM, Nair RP, Larsen RD, Berhend TL, Marks RM. ELAM-1--dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA. *Cell*. 1990;63(3):475-84.
140. Kannagi R, Fukushi Y, Hakomori S. [Cancer-associated mucin detected by monoclonal anti-carbohydrate antibodies]. *Gan to kagaku ryoho Cancer & chemotherapy*. 1986;13(3 Pt 2):812-25.
141. Chen S, Alon R, Fuhlbrigge RC, Springer TA. Rolling and transient tethering of leukocytes on antibodies reveal specializations of selectins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(7):3172-7.
142. Terstappen LW, Safford M, Loken MR. Flow cytometric analysis of human bone marrow. III. Neutrophil maturation. *Leukemia*. 1990;4(9):657-63.
143. Lund-Johansen F, Terstappen LW. Differential surface expression of cell adhesion molecules during granulocyte maturation. *Journal of leukocyte biology*. 1993;54(1):47-55.
144. Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell*. 1991;65(6):961-71.
145. Puerro Vicente M, Hernandez Garcia R, Amaya Aleixandre de Artinano M. Comparative study of different methods of inducing acute and chronic hypercalcemia in rats. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*. 1993;15(5):281-90.
146. Almqvist EG, Bondeson AG, Bondeson L, Svensson J. Increased markers of inflammation and endothelial dysfunction in patients with mild primary hyperparathyroidism. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2011;71(2):139-44.
147. Rashid G, Bernheim J, Green J, Benchetrit S. Parathyroid hormone stimulates endothelial expression of atherosclerotic parameters through protein kinase pathways. *American journal of physiology Renal physiology*. 2007;292(4):F1215-8.
148. Kosch M, Hausberg M, Vormbrock K, Kisters K, Gabriels G, Rahn KH, et al. Impaired flow-mediated vasodilation of the brachial artery in patients with primary

hyperparathyroidism improves after parathyroidectomy. *Cardiovascular research*. 2000;47(4):813-8.

149. Ellam TJ, Chico TJ. Phosphate: the new cholesterol? The role of the phosphate axis in non-uremic vascular disease. *Atherosclerosis*. 2012;220(2):310-8.

150. Shuto E, Taketani Y, Tanaka R, Harada N, Isshiki M, Sato M, et al. Dietary phosphorus acutely impairs endothelial function. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2009;20(7):1504-12.

151. Di Marco GS, Hausberg M, Hillebrand U, Rustemeyer P, Wittkowski W, Lang D, et al. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. *American journal of physiology Renal physiology*. 2008;294(6):F1381-7.

152. Bose S, French S, Evans FJ, Joubert F, Balaban RS. Metabolic network control of oxidative phosphorylation: multiple roles of inorganic phosphate. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(40):39155-65.

153. Kuro-o M. A potential link between phosphate and aging--lessons from Klotho-deficient mice. *Mechanisms of ageing and development*. 2010;131(4):270-5.

154. Etulain J, Negrotto S, Carestia A, Pozner RG, Romaniuk MA, D'Atri LP, et al. Acidosis downregulates platelet haemostatic functions and promotes neutrophil proinflammatory responses mediated by platelets. *Thrombosis and haemostasis*. 2012;107(1):99-110.

155. Chen A, Dong L, Leffler NR, Asch AS, Witte ON, Yang LV. Activation of GPR4 by acidosis increases endothelial cell adhesion through the cAMP/Epac pathway. *PloS one*. 2011;6(11):e27586.

156. Cho HJ, Kim HS. Osteopontin: a multifunctional protein at the crossroads of inflammation, atherosclerosis, and vascular calcification. *Current atherosclerosis reports*. 2009;11(3):206-13.

157. Dellegrottaglie S, Sanz J, Rajagopalan S. Molecular determinants of vascular calcification: a bench to bedside view. *Current molecular medicine*. 2006;6(5):515-24.

158. Caballero L, Climent V, Hernandez-Romero D, Quintanilla MA, de la Morena G, Marin F. Enzyme replacement therapy in Fabry disease: influence on cardiac manifestations. *Current medicinal chemistry*. 2010;17(16):1679-89.

159. Liu F, Huang J, Sadler JE. Shiga toxin (Stx)1B and Stx2B induce von Willebrand factor secretion from human umbilical vein endothelial cells through different signaling pathways. *Blood*. 2011;118(12):3392-8.

160. Schweppe CH, Bielaszewska M, Pohlentz G, Friedrich AW, Bunttemeyer H, Schmidt MA, et al. Glycosphingolipids in vascular endothelial cells: relationship of heterogeneity in Gb3Cer/CD77 receptor expression with differential Shiga toxin 1 cytotoxicity. *Glycoconjugate journal*. 2008;25(4):291-304.
161. Kirkeby S, Moe D, Claesson MH. Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4Gal-glycans are expressed on myofibrillar associated proteins. *Cell and tissue research*. 1998;293(2):285-91.
162. Ohmi K, Kiyokawa N, Takeda T, Fujimoto J. Human microvascular endothelial cells are strongly sensitive to Shiga toxins. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;251(1):137-41.
163. Dodelet-Devillers A, Cayrol R, van Horssen J, Haqqani AS, de Vries HE, Engelhardt B, et al. Functions of lipid raft membrane microdomains at the blood-brain barrier. *J Mol Med (Berl)*. 2009;87(8):765-74.
164. Schulz B, Pruessmeyer J, Maretzky T, Ludwig A, Blobel CP, Saftig P, et al. ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circulation research*. 2008;102(10):1192-201.
165. Mulligan MS, Warner RL, Rittershaus CW, Thomas LJ, Ryan US, Foreman KE, et al. Endothelial targeting and enhanced antiinflammatory effects of complement inhibitors possessing sialyl Lewisx moieties. *J Immunol*. 1999;162(8):4952-9.
166. Patel KD, Moore KL, Nollert MU, McEver RP. Neutrophils use both shared and distinct mechanisms to adhere to selectins under static and flow conditions. *The Journal of clinical investigation*. 1995;96(4):1887-96.
167. Levinovitz A, Muhlhoff J, Isenmann S, Vestweber D. Identification of a glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells. *The Journal of cell biology*. 1993;121(2):449-59.
168. Maemura K, Fukuda M. Poly-N-acetyllactosaminyl O-glycans attached to leukosialin. The presence of sialyl Le(x) structures in O-glycans. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(34):24379-86.
169. Katayama Y, Hidalgo A, Chang J, Peired A, Frenette PS. CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(8):1183-9.
170. Kuijpers TW, Hoogerwerf M, van der Laan LJ, Nagel G, van der Schoot CE, Grunert F, et al. CD66 nonspecific cross-reacting antigens are involved in neutrophil adherence to cytokine-activated endothelial cells. *The Journal of cell biology*. 1992;118(2):457-66.
171. Ng PC, Lam HS. Diagnostic markers for neonatal sepsis. *Current opinion in pediatrics*. 2006;18(2):125-31.

172. Elghetany MT, Lacombe F. Physiologic variations in granulocytic surface antigen expression: impact of age, gender, pregnancy, race, and stress. *Journal of leukocyte biology*. 2004;75(2):157-62.
173. Turunen R, Andersson S, Nupponen I, Kautiainen H, Siitonen S, Repo H. Increased CD11b-density on circulating phagocytes as an early sign of late-onset sepsis in extremely low-birth-weight infants. *Pediatric research*. 2005;57(2):270-5.

## 9. ŽIVOTOPIS

### **Nikolina Režić Mužinić**

**Adresa:** Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet  
Katedra za Medicinsku kemiju i biokemiju  
Šoltanska 2, HR-21000 Split

**Datum rođenja:** 14.11.1984.

**Mjesto rođenja:** Split, Hrvatska

**Telefon:** +385 21 557 939

**email:** [nikolina.rezic@mefst.hr](mailto:nikolina.rezic@mefst.hr)

**Matični broj iz Upisa znansvenika:** 320753

#### **Obrazovanje:**

1999– 2003 Medicinska škola, Zdravstveno laboratorijski tehničar

2003–2009 Prirodoslovno - matematički fakultet, Sveučilište Split

2009– Asistent, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

2011– Student doktorskog studija, Biologija novotvorina

#### **Zaposlenje:**

2009– Asistent na Katedri za medicinsku kemiju i biokemiju , Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

#### **Sudjelovanje na projektu:**

- Znanstveno istraživačkog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske „Patobiokemija glikosfingolipidnih antigena“ voditeljice izv. prof. dr. sc. Anite Markotić (216-2160133-0066).

- Znanstveni projekt „Kardiovaskularni učinci vina i njegovih sastojaka“ voditelja prof. dr. sc. Mladena Bobana (216-2160547-0537).

### **Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:**

1. Novak A, **Režić Mužinić N**, Cikeš Čulić V, Božić J, Tičinović Kurir T, Ferhatović L, Puljak L, Markotić A. Renal distribution of ganglioside GM3 in rat models of types 1 and 2 diabetes. *J Physiol Biochem* 2013;69:727-35.
2. **Režić-Mužinić N**, Cikeš-Čulić V, Božić J, Tičinović-Kurir T, Salamunić I, Markotić A. Hypercalcemia induces a proinflammatory phenotype in rat leukocytes and endothelial cells. *J Physiol Biochem*. 2013;69(2):199-205.
3. Cikes Culic V, Van Craenenbroeck E, **Rezić Muzinic N**, Ljubkovic M, Marinovic J, Conraads V, Dujic Z. Effects of SCUBA diving on vascular repair mechanisms. *Undersea Hyperb Med* 2014;41(2):97-104.

### **Recenzirani radovi u zbornicima inozemnih i međunarodnih znanstvenih skupova:**

1. Režić Mužinić, Nikolina; Čikeš Čulić, Vedrana; Radan, Mila; Mastelić, Angela; Delić, Hrvoje; Ferhatović, Lejla; Puljak, Livia; Markotić, Anita. Renal globotetraosylceramide expression in rat model of diabetes type 1 //. (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
2. Đevenica, Danka; Čikeš Čulić, Vedrana; Režić, Nikolina; Zemunik, Tatijana; Dujčić-Bilušić, Sandra; Markotić, Anita. Hyperbaric environment downregulates renal CD77 expression in rat (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
3. Režić-Mužinić, Nikolina; Mastelić, Angela; Markotić, Anita; Čikeš Čulić, Vedrana; Vuica-Ross, Milena; Ross, Ashley; Barker, David; Reynisson, Jóhannes. The effect of a phospholipase C gamma inhibitor on the proliferation and phenotype of Du145 prostate cancer cells // *FEBS J*. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
4. Režić, Nikolina; Čikeš Čulić, Vedrana; Tičinović Kurir, Tina; Salamunić, Ilza; Božić, Joško; Markotić, Anita. Hypercalcemia and aortic CD77 expression in rat //. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

5. Režić Mužinić, Nikolina; Čikeš Čulić, Vedrana; Puljak, Livia; Ferhatović, Lejla; Tičinović Kurir, Tina; Markotić, Anita. Renal glycosphingolipid Gb3Cer/CD77 expression in rat models of type 1 and type 2 diabetes // *FEBS Journal* 280 (Suppl. 1).528-528  
(poster, međunarodna recenzija, sažetak)