

# Analiza leukocitnih biljega CD15s i CD11b u krvi štakora, te glikosfingolipida CD77 i glikofosfoproteina CD34 u bubrezima, srcu i plućima štakora u hiperbaričnim uvjetima

---

Đevenica, Danka

Doctoral thesis / Disertacija

2017

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:303336>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-30**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



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

**DANKA ĐEVENICA**

**ANALIZA LEUKOCITNIH BILJEGA CD15s I CD11b U KRVI  
ŠTAKORA, TE GLIKOSFINGOLIPIDA CD77 I  
GLIKOFOSFOPROTEINA CD34 U BUBREZIMA, SRCU I  
PLUĆIMA ŠTAKORA U HIPERBARIČNIM UVJETIMA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, 2017.**

Doktorska disertacija je izrađena u:

- Laboratoriju za biokemiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu.
- Institutu pomorske medicine Hrvatske ratne mornarice, Ministarstvo obrane Republike Hrvatske

Voditelj rada:

Izv. prof.dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić

## ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici Izv. prof. dr. sc. Vedrani Čikeš Čulić.

Zahvaljujem Prof. dr. sc. Merici Glavini Durdov.

Zahvaljujem svojoj obitelji.

Doktorsku disertaciju posvećujem sinovima Jerki i Viktoru Đevenici.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	7
Hiperbarična medicina .....	7
Glikosfingolipidi .....	8
Globotriaozilceramid CD77 .....	9
Glikofosfoprotein CD34.....	15
Biljezi na staničnoj površini leukocita .....	17
Biljeg CD15s .....	18
Biljeg CD11b.....	21
2. CILJEVI I HIPOTEZE .....	23
Ciljevi istraživanja.....	23
Hipoteze istraživanja .....	23
3. METODE I MATERIJALI.....	24
Ustroj istraživanja.....	24
Etička načela.....	25
Metode istraživanja .....	25
Pokusne životinje .....	25
Određivanje izražaja CD11b i CD15s na leukocitima.....	27
Određivanje CD34 i CD77 na stanicama tkiva bubrega, pluća i srca .....	27
Protočna citometrija .....	28
Korištene kemikalije i protutijela .....	29
Statistički postupci .....	30
4. REZULTATI.....	31
Rezultati hiperbaričnog tretmana na izražaj leukocitnih biljega CD11b i CD15s.....	31
Rezultati hiperbaričnog tretmana na izražaj biljega CD77 i CD34 na bubrežnim stanicama .....	33
Rezultati hiperbaričnog tretmana na izražaj biljega CD77 i CD34 na stanicama pluća.....	35
Rezultati hiperbaričnog tretmana na izražaj biljega CD77 i CD34 na srčanim stanicama.....	37
Rezultati analize korelacije leukocitnih biljega s biljezima tkiva .....	39
5. RASPRAVA.....	40
6. ZAKLJUČAK.....	45
7. SAŽETAK.....	46
8. ABSTRACT .....	47
9. LITERATURA.....	48
10. ŽIVOTOPIS.....	65

11. DODATAK..... 68

## POPIS OZNAKA I KRATICA

AQP-1 – akvaporin-1

AQP-2 – akvaporin-2

ATA = 1 atmosfera; normalni atmosferski tlak na morskoj površini, 760 mmHg

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

CSD – domena kaveolinske skele (eng. *Caveolin scaffolding domain*)

ESL-1 – E-selektin ligand-1

Gb3Cer/CD77 – globotriaosilceramid

GSL – glikosfingolipid

HB – hiperbarični tretman

HBO – hiperbarična oksigenacija

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

ICAM-1 – međustanična adhezijska molekula tipa 1 (eng. *Intercellular adhesion molecule 1*)

ICAM-2 – međustanična adhezijska molekula tipa 2 (eng. *Intercellular adhesion molecule 2*)

IL-1 – interleukin-1

LPS – lipopolisaharid

PSGL-1 – P-selektin glikoproteinski ligand-1

RNS – reaktivni spojevi dušika (eng. *Reactive nitrogen species*)

ROS – reaktivni spojevi kisika (eng. *Reactive oxygen species*)

SCUBA – autonomni ronilački aparat (eng. *Self Contained Underwater Breathing Apparatus*)

sLe<sup>x</sup> – sijalil Lewis x

Stx – Shiga toksin

TNF-alfa – čimbenik nekroze tumora (eng. *Tumor necrosis factor*)-alfa

## 1. UVOD

### Hiperbarična medicina

Hiperbarična medicina je relativno nova klinička grana medicine. Udisanjem hiperbaričnog kisika dobijamo do 20 puta više kisika otopljenog u krvi nego udisanjem normalnog zraka, što olakšava difuziju u tkivu i ispravlja nedostatak kisika. Nedostatak kisika u tkivima, hipoksija, jedan je od najvažnijih uzroka ili posljedica brojnih bolesti. Ta činjenica dovela je do razvoja primjene hiperbaričnog kisika u terapijske svrhe, a od kraja pedesetih godina hiperbarična medicina je postala nova klinička grana koja se temelji na povećanju udjela kisika fizički otopljenog u tjelesnim tekućinama: krv, limfa, tkivne tekućine (1).

Farmaceutska industrija dosad nije uspjela stvoriti učinkovit pripravak koji povećava količinu raspoloživog kisika u krvi. Hiperbarična oksigenacija (HBO) je metoda liječenja potpomognutim ili spontanom udisanjem čistog (100 %) medicinskog kisika, pri tlaku okoline većem od 1 atmosfere (ATA), što je normalni tlak na razini mora. U hipoksičnim stanjima, zasićenost krvi kisikom je znatno manja nego u normalnim stanjima, pa odatle i svakodnevna primjena udisanja čistog kisika pri normalnom tlaku okoline u liječenju hitnih stanja (astmatski napad, teška trauma, moždani udar, srčani infarkt). Čisti kisik je potencijalno otrovan plin ako su mu pluća predugo izložena. HBO provodi se u posebnom uređaju – barokomori, koji omogućava boravak na povećanom tlaku, zbog čega je ujedno simulator ronjenja. U podvodnoj i hiperbaričnoj medicini do izražaja dolaze fizički i matematički precizni zakoni o plinovima, čime je bitno smanjen rizik oštećenja pluća kisikom (2).

Hiperbarična oksigenacija danas ima višestruku primjenu jer potiče stvaranje novih krvnih žila, ubrzano cijeljenje rana (kod gangrena, komplikacija dijabetesa), ubrzava cijeljenje kosti, koristi se u oslabljenoj imunološkoj obrani, kod trovanja ugljičnim monoksidom itd. Korist od primjene HBO kao pomoćne metode u modernoj medicini danas je nepobitna (3).



Povećani tlak kisika u tkivima tijekom HBO povećava proizvodnju reaktivnih spojeva kisika (ROS) kao i reaktivnih spojeva dušika - (RNS). Enzimi poput superoksid dismutaze, glutation reduktaze i glutation katalaze, neutraliziraju neke visokoreaktivne spojeve (poput superoksida, hidroksilnih radikala i vodikovog peroksida), ali kad dotok kisika premaši njihov maksimum djelovanja, dolazi do toksičnog učinka kisika, oštećenja staničnih membrana, bjelančevina i enzima (4). Brojne kontrolirane studije su potvrdile da klinička učinkovitost HBO proizlazi iz modulacije unutarstaničnih transdukcijskih kaskada, koje vode ka sintezi čimbenika rasta i promoviraju zacjelivanje rana u post-ishemičkim i post-upalnim ozljedama (5).

Tretman hiperbaričnim zrakom (HB) povećava otopljenost kisika u krvi udisanjem kisika pod tlakom koji je veći od atmosferskog. Hiperbarični tretman u našem istraživanju odnosi se na smjesu zraka (21 % kisika, 79 % dušika) pri tlaku od 7,5 ATA, koji odgovara dubini zarona od 65 m, čime se oponašaju zaroni ronioaca pri velikim dubinama. Dakle, razlika između hiperbarične oksigenacije i hiperbaričnog tretmana (HB) bila bi upravo u postotku kisika korištenog u tretmanima, kod HBO je to 100% kisik, a kod HB je smjesa zraka pod povišenim tlakom.

### **Glikosfingolipidi**

Glikosfingolipidi (GSL) predstavljaju sastavni dio staničnih membrana svih sisavaca, a zbog svoje strukturne građe oblikuju membranske mikrodomene, takozvane lipidne splavi. Sinteza GSL se zbiva na luminalnoj strani Golgijevog aparata. Lipidne splavi su bogate transmembranskim signalnim proteinima i kolesterolom u lipidnom hidrofobnom dijelu, dok su na citoplazmatskoj strani vezani s G proteinima (6). Lipidne, ili kasnije nazvane membranske splavi su uvučeni dijelovi membrane u obliku boce. To su male (20 - 100 nm)

heterogene domene bogate sterolom i GSL, koje postoje u unutarstaničnim i plazma membranama, a važne su zbog protein-protein i protein-lipid interakcija (7).

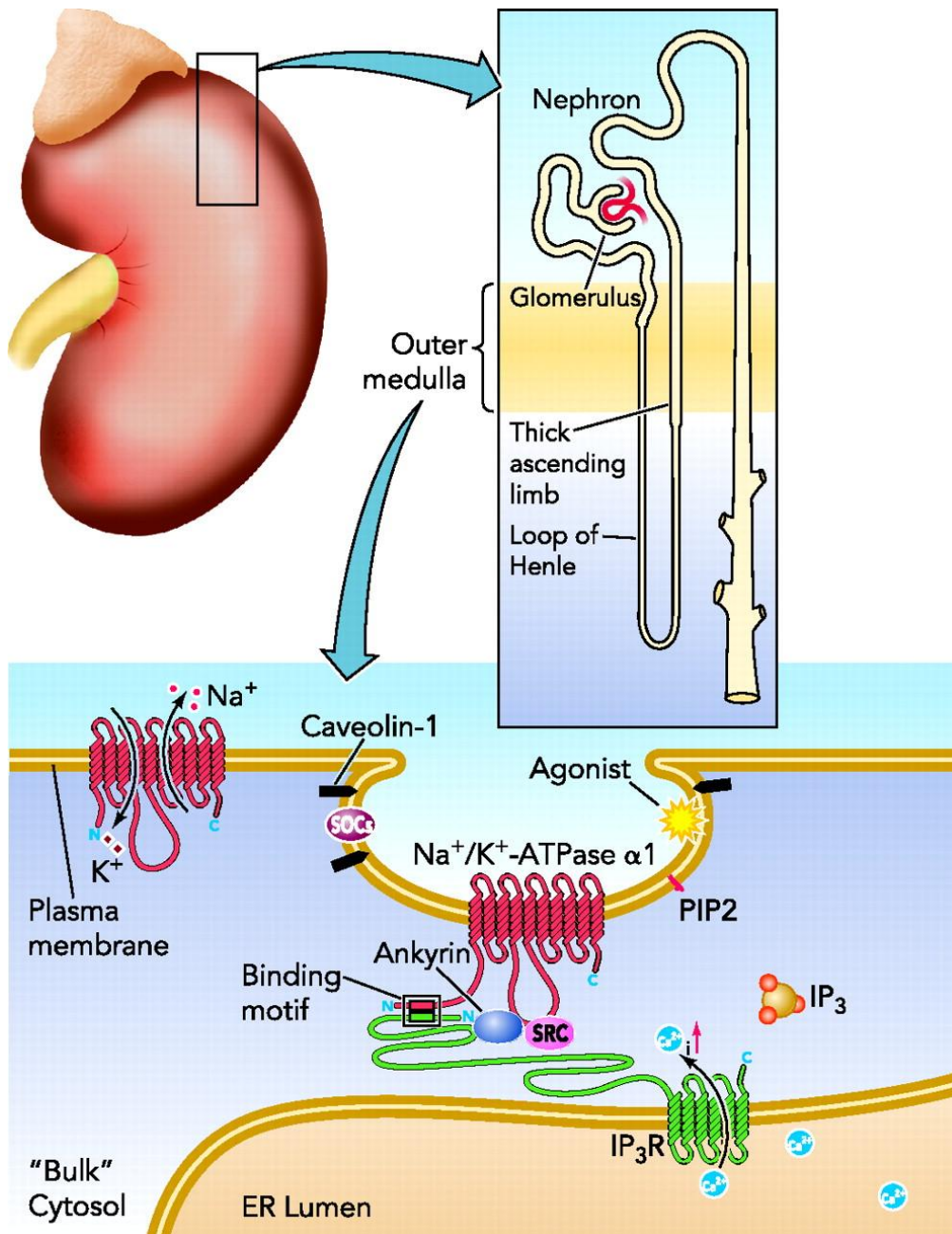
GSL su građeni od oligosaharidnog lanca koji je vezan za lipidnu strukturu zvanu ceramid, za razliku od glikofosfolipida koji nastaju iz diacilglicerola. Ceramid sadrži amino-alkohol sfingozin, dok diacilglicerol sadrži alkohol glicerol. Hidrofilni oligosaharidni dio GSL nalazi se na površini stanica u vodenom okolišu, što ih čini odličnim molekulama za stanično prepoznavanje (8). Poznato je više od 400 molekula GSL, od kojih mnogi služe kao receptori za viruse, bakterije i toksine (9), a mnogi su i antigeni krvnih grupa kao CD (eng. *Cluster of Differentiation*) molekule, tj. stanični površinski biljezi (10). CD nazivlje se temelji na dogovoru iz kongresa o humanim leukocitnim antigenima (eng. *1st International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens*). Taj sustav služi za klasifikaciju monoklonskih protutijela (mAb) koji djeluju na epitope koji se nalaze na površini leukocita.

U ovoj disertaciji ispitali smo utjecaj djelovanja hiperbaričnog zraka na leukocitne biljege CD11b, CD15s te na biljege CD34 i CD77 u stanicama tkiva bubrega, pluća i srca. U našem istraživanju željeli smo hiperbaričnim tretmanom oponašati uvjete s kojima se susreću roniaci pri većim morskim dubinama, u svrhu ispitivanja proupalne reakcije organizma na ekstremne uvjete.

### **Globotriaozilceramid CD77**

Glikosfingolipid globotriaozilceramid (Gb3Cer ili CD77) obilno je prisutan u membranama bubrežnih endotelnih i epitelnih stanica gdje je ukalupljen u kaveole, varijacije lipidnih splavi

bogate proteinom kaveolinom (11). Na Slici 1 prikazana je kaveola u bubrežnim epitelnim stanicama (12).

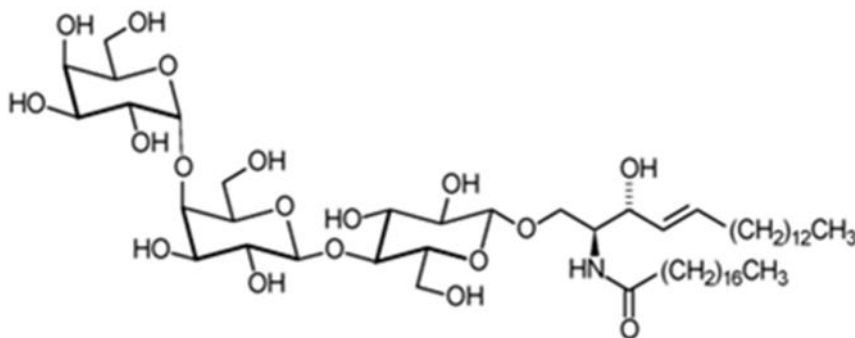


Slika 1. Prikaz kaveole u bubrežnim epitelnim stanicama (12).

Protein kaveolin karakterizira domena CSD (eng. *Caveolin Scaffolding Domain*) koja veže signalne molekule poput G-proteina, Src-kinaze, Ras i e-NOS s kaveolarnom membranom

(13). Osim u signalizacijskim procesima, lipidne splavi imaju važnu ulogu u mnogim biološkim procesima: apoptozi, virusnim infekcijama, staničnoj adheziji, migraciji, kao i u egzocitozi i endocitozi. Miševi koji imaju nedostatak kaveolina-1 pokazuju abnormalnosti u plućnom tkivu, masnom tkivu i vaskularnom sustavu (14).

CD77 je neutralni GSL koji nastaje vezanjem glukozilceramida s galaktozom posredovanjem  $\beta$ 1,4-galaktoziltransferaze pri čemu nastaje laktozilceramid, na koji se veže još jedna galaktoza i nastaje Gb3Cer.



Globotriaosylceramid (Gb3Cer)

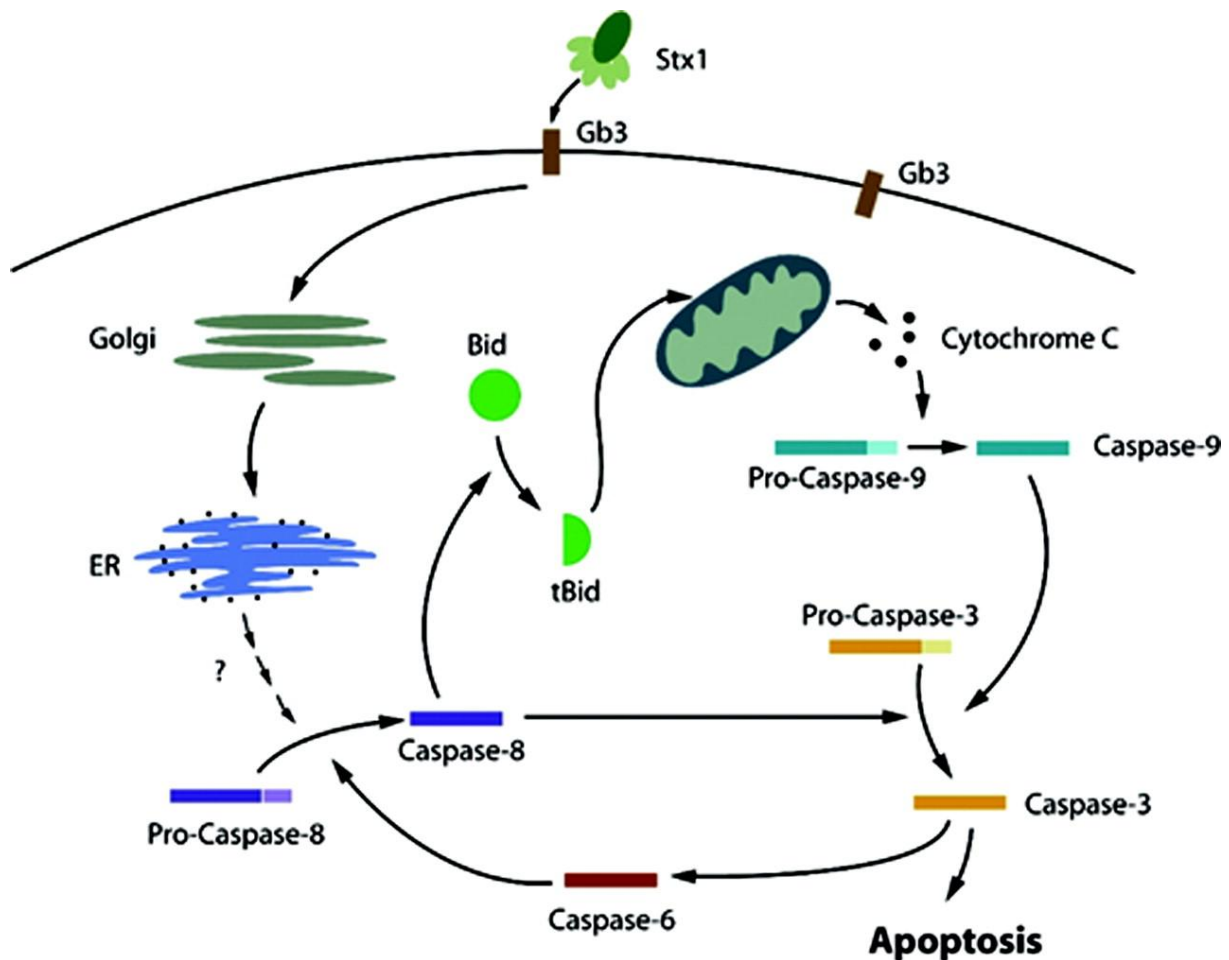
Slika 2. Struktura Gb3Cer

CD77 je receptor za Shiga toksine (Stx) iz *Shigella dysenteriae* tipa 1 i *Escherichiae coli*, koji se smatraju najčešćim uzrokom hemolitičko-uremičkog sindroma (HUS). Shiga toksini su podijeljeni u dvije skupine: Stx-1 i Stx-2, od kojih svaka sadrži nekoliko inačica Stx (15). Stx poznati su i pod imenom verotoksini (Vt - s), budući da su citotoksični za tzv. Vero stanice, staničnu liniju epitelnih stanica bubrežnih tubula kod afričkih zelenih majmuna. Stx spadaju u obitelj holotoksina jer sadrže enzimatsku A podjedinicu nekovalentno vezanu za B podjedinicu (16). B podjedinica je pentamer važan za unutar stanični transport holotoksina, a može na sebi vezati 10 - 15 molekula Gb3Cer (17). Kompleks toksin-receptor prenosi se

preko Golgijevog aparata do endoplazmatskog retikuluma, gdje se proteolitički razdvaja podjedinica A od kompleksa receptor-toksin. Tada podjedinica A ispoljava svoj učinak uzrokujući apoptozu stanice putem inhibicije sinteze proteina (18). Drugi istraživači dokazali su citotoksičnost Stx putem kaspaza i mitohondrijske depolarizacije kao i putem oksidativnog stresa (19, 20).

Humane endotelne stanice glomerula bubrega najviše su pogođene Stx (21). U oko 90 % bolesnika s HUS-om uzrok bolesti je infekcija bakterijom *E.coli*, podvrsta *E.coli* 0157:H7. Do infekcije dolazi putem hrane, nepasteriziranog mlijeka ili termički nedovoljno obrađenog mesa. Samo 5 – 10 % inficiranih razviti će HUS, što je posljedica oštećenja bubrega i poremećaj koji se očituje trombocitopenijom i makrocitnom hemolitičkom anemijom. Obično je potrebno bolničko liječenje, jer veliki broj bolesnika treba dijalizu zbog akutnog zatajenja bubrega (22).

Pokazano je da Stx-2 uzrokuje zatajenje bubrega u miševa. Dokazano je da stanice bubrežnih tubula i u kori i srži imaju veliki izražaj CD77 biljega, a iste stanice tretiranjem sa Stx-2 započinju apoptozu. Na Slici 3. prikazana je apoptoza stanice iz stanične linije leukemije THP-1 koja je inducirana Stx-1 (23). Stx-2 u *in vivo* pokusima inducira gubitak funkcije sabirnih kanala, što rezultira povećanom produkcijom razrijeđenog urina, dehidracijom, te vodi k zatajenju bubrega (24).



Slika 3. Apoptoza inducirana Stx-om-1 u staničnoj liniji leukemije THP-1 (23).

CD77 je antigen na eritrocitima rijetke krvne grupe P, a također je već dugo poznat kao antigen Burkittovog limfoma (24, 25). Izražaj CD77 je povećan u kolorektalnim tumorima i njihovim metastazama (26), tumoru jajnika i raku dojke (27).

Istraživači biologije novotvorina zadnjih godina intenzivno tragaju za novim antitumorskim terapijskim agensima poput bakterijskih toksina. Stx-1 induciraju apoptozu u staničnim linijama bubrežnih tumorskih stanica (28 - 30), raka kolona (31) i raka dojke (32) te se Stx ozbiljno razmatra u terapijskoj upotrebi ili kao onkološki alat u označavanju tumora. Pretklinički modeli na miševima dokazali su da se uzastopno korištenje B podjedinice, oralno

ili intravenski, dobro podnosi i ne izaziva nuspojave niti patološke promjene u bubrežnom sustavu (33).

CD77 je izražen na endotelnim stanicama glomerula i na podocitima, te se oštećenja ovih stanica mogu detektirati u uzorcima urina iz pacijenata koji su oboljeli od HUS-a (34 - 39). Biopsija bubrega u HUS pacijenata pokazala je povećanu stopu apoptoze glomerularnih stanica i stanica tubula (40 - 42). Skupina autora pokazala je da kod miševa endotelne stanice glomerula i podociti nisu osjetljivi na Stx2 *in vitro* i *in vivo*, zato što nemaju izražen biljeg CD77. Nadalje, bubrežni tubuli miševa, uključujući i sabirne kanaliće, imaju izražen biljeg CD77 te Stx2 kod ovih stanica inducira apoptozu, što rezultira disfunkcijom stvaranja urina i dehidracijom (43). Zdravo bubrežno tkivo miševa imunohistokemijskim bojanjem protu-Gb3 protutijelom, dokazalo je prisustvo biljega CD77 samo na stanicama tubula te u kori i srži bubrega, ali ne u glomerularnim stanicama ili na krvnim žilama. Kako bi se otkrilo gdje je biljeg CD77 najzastupljeniji, ista skupina autora je imunofluorescencijskom tehnikom ispitala kolokalizaciju biljega CD77 s akvaporinom-1 (AQP-1) i akvaporinom-2 (AQP-2). Akvaporini su citoplazmatski i membranski proteini koji sudjeluju u reapsorpciji vode iz bubrežnog tubularnog lumena (44). Proksimalni tubuli smješteni u kori bubrega te tanka silazna Henleova petlja u srži bubrega izražavaju AQP-1, dok sabirni kanalići u kori i srži bubrega te papile izražavaju AQP-2 (44). Pronađeno je da je CD77 izražen na istim proksimalnim tubulima u kori bubrega koji izražavaju i AQP-1, ali neki tubuli negativni na AQP-1 u kori bubrega također su pokazali izražaj biljega CD77. Bojanje s protutijelima na AQP-2 i CD77 dokazalo je da se gotovo svi tubuli koji imaju izražaj ova dva biljega odnose na sabirne kanaliće. Zanimljivo je da ista skupina autora nije dokazala prisustvo biljega CD77 na podocitima u glomerulu kod miševa, za razliku od nekih drugih autora, iako su se služili većim dozama protutijela u metodama istraživanja (45, 46). Zbog nekih od prijašnjih studija, smatralo se da Stx pokazuje toksičnost na ljudskim glomerularnim epitelnim stanicama pri

visokim dozama *in vitro* (47), ali ova skupina autora izolirala je podocyte iz smjese glomerularnih stanica koristeći biljeg za podocyte WT-1 (46, 48, 49) i dokazala citotoksičnost Stx2 na glomerularne epitelne stanice i pri nižim dozama Stx2. To podržava ranije dokazane tvrdnje kako je u HUS-u za daljnji tijek bolesti dominantna glomerularna disfunkcija (50, 51). Ova skupina autora dokazala je da je Stx2 toksičniji na ljudske stanice glomerula bubrega nego na stanice tubula (43).

### **Glikofosfoprotein CD34**

CD34 je sijalomucinski tip glikofosfoproteina, tradicionalni biljeg hematopoetskih stanica, ali nađen je i na endotelnim stanicama krvnih žila i fibroblastima (52). U obitelji CD34 površinskih staničnih antigena spadaju i podokaliksini (stanični antigen hematopoetskih prekursorskih stanica) i endoglikan, pa je antigen CD34 iznimno važan u identifikaciji hematopoetskih stanica (53). Pretpostavlja se da je u fiziološkim uvjetima biljeg CD34 potreban za migraciju hematopoetskih stanica, a utvrđeno je da sličnu ulogu ima u poticanju migracije mastocita i eozinofila u periferna tkiva (54). Mišićne satelitske stanice, intersticijske stanice te keratinociti rožnice također imaju izražen CD34 (55). CD34 je biljeg i endotelnih cirkulirajućih stanica koje obnavljaju stjenku krvnih žila (56). Također, važno je reći da postoji skupina necirkulirajućih zrelih endotelnih stanica koje imaju na sebi biljeg CD34 i smještene su u malim krvnim žilama, za razliku od većine endotelnih stanica u velikim venama i arterijama koje su negativne na CD34 (57). Dokazano je da CD34 ima važnu ulogu u regulaciji diferencijacije mišićnih progenitornih stanica (58).

Podokaliksini se smatra važnim za razvoj strukture bubrežnih podocita. Podociti su epitelne bubrežne stanice građene od staničnog tijela s brojnim nastavcima i malih, interdigitalnih „nožica” koje se šire iz većih nastavaka. *Podxl* *-/-* miševi nemaju razvijene „nožice” podocita



dok su apikalne površine staničnih tijela i nastavaka podocita prekrivene podokaliksinom (59). Poznato je kako podokaliksin u glomerularnoj strukturi potiče adheziju slično kao i CD34 (60).

Funkcije CD34 proteina nisu u potpunosti razjašnjene pa su neophodna daljnja istraživanja koja će rasvijetliti točne uloge CD34 antigena u raznim tkivima. Najbolje istražena funkcija CD34 obitelji proteina je limfocitna adhezija na krvožilni endotel i limfatična tkiva (61). Međutim, iako je uloga u poticanju adhezije dobro opisana, neke studije ukazale su da CD34 proteini ponekad djeluju blokirajući adheziju, kao kod adhezije mastocita (62, 63).

Bubreg je organ koji ima mogućnost regeneriranja nakon ozljede. Epitel bubrega područje je velikih ispitivanja. Temeljna pitanja ovog znanstvenog polja jesu: da li bubrežne matične stanice postoje u odraslih, ako da, gdje su locirane (intersticij, tubuli, kora, srž) i koji se biljezi mogu koristiti u svrhu izolacije i određivanja ovih matičnih stanica (64). Ostale matične/progenitorne stanice različitih ljudskih organa izražavaju biljege hematopoetskih matičnih stanica poput CD34, CD117 i CD133. U bubrezima je CD34 imunoflorescencijom nađen na glomerularnim stanicama kao i na peritubularnim kapilarima. Kasnije je tehnikama elektronske mikroskopije nađen na membranama svih glomerularnih stanica, uključujući endotelnu luminalnu i abluminalnu membranu te na podocitima (65). U novijoj studiji opisan je fenomen proliferacije i diferencijacije stanica koji se događa u proksimalnim tubulima bubrega štakora poslije ishemijsko/reperfuzijske ozljede (66). Stanice koje sudjeluju u ovom procesu pokazuju obnavljajuću sposobnost matičnih/progenitornih stanica, te izražavaju CD34 i CD133 antigene u dijelovima srži i spoju kora-srž bubrega, što je dokazano imunohistokemijskim bojanjima. Istraživači smatraju kako se poslije ishemijsko/reperfuzijske ozljede u bubregu, fenomen proliferacije i diferencijacije događa u proksimalnim tubulima bubrega, i isti migrira iz srži do kore bubrega (66).

Tijekom embriogeneze, neuralna molekula stanične adhezije (NCAM) izražena je u ranom stadiju bubrežnog razvoja (67). U odraslom ljudskom bubregu izražaj NCAM-a je ograničen na rijetke intersticijske stanice koje također imaju izražene biljege hematopoetskih matičnih stanica CD34 i CD133, pa se smatra da bi upravo ove stanice mogle biti bubrežne progenitorne stanice. Glomerulogenezu proučava i Takano koji je opisao značajni izražaj biljega CD34 na endotelnim stanicama glomerularnih kapilara u male djece, koja se s godinama gotovo potpuno izgubi (68).

### **Biljezi na staničnoj površini leukocita**

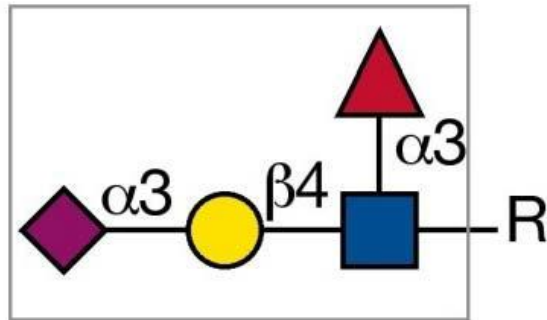
Poznato je više od 4000 različitih molekula na membrani leukocita (69). Neutrofini leukociti imaju važnu ulogu u obrani organizma od bakterijske infekcije (70). Tijekom sazrijevanja neutrofila (proces koji se zbiva u koštanoj srži) dolazi i do promjena u broju i vrsti antigena koji se nalaze na površini neutrofila (71). Neutrofile dijelimo na: mirujuće (eng. *unstimulated*), podraženi (eng. *primed*) i aktivirani (eng. *activated*). Mirujući su oni koji cirkuliraju krvožiljem u stanju bez upale. Podraženi neutrofile dolaze u kontakt s proupalnim čimbenikom ili produktom patološkog mikroorganizma, a aktivirani neutrofile preuzimaju važnu ulogu u patogenezi bolesti, upala i tumora (72).





Tijekom procesa upale dolazi do adhezijskih interakcija između cirkulirajućih neutrofila i proteina iz obitelji selektina na površini endotela krvnih žila, što dovodi do kotrljanja (eng. *rolling*) neutrofila niz endotel (73). Obitelj selektina sadrži tri srodne molekule: L-selektin, E-selektin i P-selektin (74). Interakcija liganda na neutrofilima s endotelnim selektinima, posebno E i P-selektinom, posreduje u procesu vezanja i kotrljanja leukocita niz endotel krvnih žila u procesima upale. P-selektin sudjeluje u interakcijama između leukocita i endotela te se smatra da je najvjerojatnije uključen u ranu fazu kotrljanja (75).

E-selektin se nalazi u lipidnim splavima, a posebno je izražen na endotelu krvnih žila u područjima upale (76). Upalni medijatori koji jako utječu na izražaj E-selektina su: interleukin-1 (IL-1), čimbenik nekroze tumora alfa (TNF-alfa) i lipopolisaharid (LPS) (77). Važnu ulogu u kotrljanju neutrofila niz endotel krvnih žila imaju ligandi na neutrofilima: P-selektin glikoproteinski ligand-1 (PSGL-1), L-selektin, E-selektin ligand-1 (ESL-1), CD44 te CD43. Svi ti ligandi na sebi imaju izražene glikane tipa sLe<sup>X</sup>, koji se smatraju ključnim u prepoznavanju E-selektina (78).

### **Biljeg CD15s**

CD15s ili 3-fukozil-N-acetil-laktozamin Lewis x ili sialilLewis x ili sLe<sup>X</sup> je antigen koji je kod ljudi izražen na monocitima, zrelih neutrofilima i mijeloidnim stanicama (79, 80). Sialil Lewis x i slične skupine imaju važnu ulogu u događanjima koja prethode ekstravazaciji leukocita u upalno tkivo. Smatra se da one služe kao ugljikohidratni ligandi za E i P-selektin (81 - 85). Zen i suradnici su u svom radu, inhibirajući sLe<sup>X</sup> specifičnim monoklonskim protutijelom, poremetili migraciju i indukciju agregacije neutrofila te poremetili indukciju oslobađanja njihovih sekundarnih granula (86).



-  = N-acetilneuraminska ili sijalinska kiselina
-  = Galaktoza (Gal)
-  = N-Acetilglukozamin (GlcNAc)
-  = Fukoza (Fuc)
- R = N- ili O-glikani

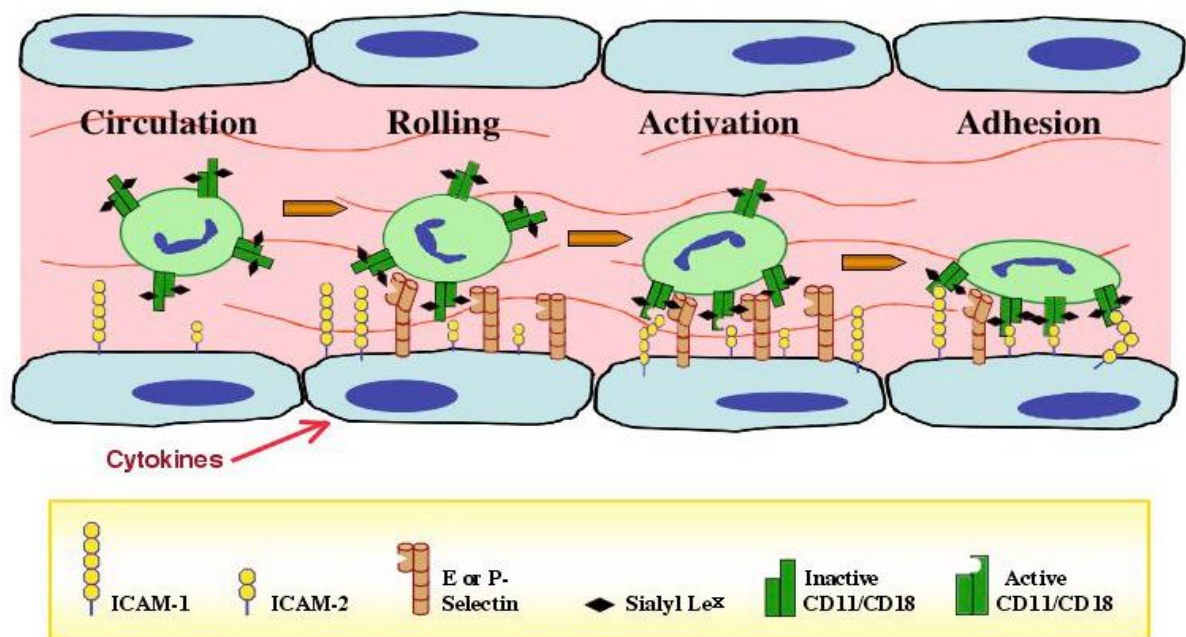
Slika 4. Kemijska struktura sijalil Lewis x (87).

Sijalil Lewis x ( $sLe^x$ , CD15s) je tetrasaharid te je najmanji poznati ligand za selektine, izražen na staničnoj površini cirkulirajućih granulocita i monocita a nastaje sijalizacijom distalne laktozaminske jedinice prije njene fukožilacije (88). Izuzev na leukocitima, CD15s je najučestaliji ligand vezan za N- i O- glikane na zoni pelucidi jajnih stanica i sudjeluje u procesu oplodnje tj. vezanju spermija za jajnu stanicu (89).

Identificiran je ranije kao humani tumor-vezujući antigen i nađen je na svim malignim tipovima stanica raka, te se smatra da ima važnu ulogu u procesima metastaziranja tumora.

Slika 5. prikazuje vezanje tumorskih stanica na endotel posredstvom veza koje se stvaraju između selektina i njihovih ugljikohidratnih liganada na leukocitima ( $sLe^x$ ). Kako ova veza nije dovoljno jaka da se suprostavi sili strujanja krvi, stanice se kotrljaju. Kotrljanje pomaže stanicama tumora uspostaviti kontakt s upalnim čimbenicima koji su izraženi na površini endotela. Ova interakcija stimulira stanice tumora na brzo povećanje izražaja i dostupnosti

beta2 integrina (CD11a i CD11b) na površini tumorskih stanica za ligande s endotela – ICAM-1 (međustanična adhezijska molekula tipa 1) i ICAM-2 (međustanična adhezijska molekula tipa 2) čime dolazi do adhezije tumorskih stanica na endotel (90).



Slika 5. Početno vezanje stanica tumora na endotelne stanice odvija se interakcijom endotelno selektina (E-selektina) s ligandima poput sLe<sup>x</sup> i CD44, koji su izraženi na tumorskim stanicama (90).

Dokazano je da SCUBA ronjenje uzrokuje značajan porast leukocita, posebno neutrofila. Također, SCUBA ronjenje inducira značajan porast broja monocita koji izražavaju CD15s, kao i porast male subpopulacije monocita koja ima jako izražen CD15s (91).

## Biljeg CD11b

Integrini predstavljaju obitelj staničnih površinskih biljega. To su  $\alpha\beta$  heterodimeri koji su uključeni u stanične interakcije.  $\beta 2$  integrini imaju zajedničku  $\beta$  podjedinicu ( $\beta 2$ , CD18), a različite  $\alpha$ -podjedinice: CD11a, CD11b, CD11c i CD11d bitni su leukocitni receptori kako za funkciju leukocita tako i za razvoj upalnog odgovora *in vivo* (92).

Integrin CD11b/CD18 ( $\alpha M\beta 2$ ), poznat i pod nazivom Mac-1, ima posebnu ulogu u upalnom procesu, dijelom zajedno s integrinom CD11a (93), a njegovu biološku važnost za normalno funkcioniranje imunoloških procesa potvrđuju i različita patološka stanja gdje su integrini defektni ili nedostaju. Kod mirujućih neutrofila u odraslih ljudi, velika većina ukupnog sadržaja CD11b/CD18 kompleksa nalazi se ukalupljena u membrane specifičnih granula i sekretornih vezikula, a samo 5 % nalazi se na staničnoj površini (94). Kada proupalni podražaj stimulira neutrofile, dolazi do pojačanog izražaja CD11b na njihovoj površini pa je zaključeno da pojačani izražaj CD11b može ukazati da nastupa aktivacija neutrofila (94 - 96). Tijekom upalnog procesa, kotrljanje neutrofila stimulira neutrofile na brzo povećanje izražaja  $\beta 2$  integrina (CD11a i CD11b) na površini samog neutrofila, koji stupa u interakciju s ligandom s endotela – ICAM-1. Kod pacijenata koji boluju od leukocitne adhezijske deficijencije tipa 1, cirkulirajući neutrofile ne mogu adherirati ili migrirati preko endotela pa su ovi bolesnici podložni učestalim, po život opasnim, bakterijskim infekcijama (97 - 99). Također, kod pojačane aktivacije leukocitnih integrina dolazi do stalnog poticanja i održavanja upale, što utječe na nastanak ishemijsko-reperfuzijske ozljede i može dovesti do štetnih posljedica za zdravlje (99 - 101).

Pokazano je da primjenom HBO dolazi do inhibicije leukocitne adhezije za endotel, a taj mehanizam je povezan sa smanjenim izražajem CD11b/CD18 na neutrofilima (102).

Ugljikohidratne skupine na obje podjedinice CD11b/CD18 su bitne za njihovu urednu funkciju uključujući vezanje liganda (103). I Zen i suradnici su u svom radu, proučavajući ljudske neutrofile, iznijeli direktne dokaze da obje podjedinice  $\beta 2$  integrina, CD11b i CD18, prepoznaju protu-sLe<sup>x</sup> protutijela, što je dokaz da oba na sebi imaju izražene sLe<sup>x</sup> skupine (82). Povećani izražaj sLe<sup>x</sup> na staničnoj površini neutrofila istodobno je pratio i povećani izražaj CD11b/CD18. (104). Kako su Zen i suradnici u svom radu iznijeli dokaze da su CD11b biljezi na ljudskim neutrofilima obloženi s CD15s, pretpostavlja se da tijekom upale dolazi do značajnog povećanja izražaja CD15s biljega. Biljeg CD15s ima važnu dijagnostičku vrijednost u predviđanju ozbiljnih bakterijskih infekcija (105).

Zbog svega navedenog, odlučili smo ispitati izražaj biljega CD11b i CD15s kao proupalnog fenotipa u hiperbaričnom tretmanu.

## **2. CILJEVI I HIPOTEZE**

### **Ciljevi istraživanja**

1. Odrediti postotak leukocita štakora koji imaju izražene CD11b i CD15s biljege u skupini koja je bila izložena hiperbaričnim uvjetima u usporedbi sa skupinom štakora koji su uzgajani pri normalnim okolišnim uvjetima.
2. Odrediti postotak stanica bubrega, srca i pluća štakora koji imaju izražene CD77 i CD34 biljege u skupini koja je bila izložena hiperbaričnim uvjetima u usporedbi sa skupinom štakora koji su uzgajani pri normalnim okolišnim uvjetima.
3. Odrediti postoji li značajna povezanost između izražaja biljega CD77 i CD34 na stanicama tkiva bubrega, srca i pluća štakora s izražajem CD15s i CD11b na leukocitima štakora.

### **Hipoteze istraživanja**

1. Hiperbarični tretman značajno povećava udio ukupnih CD15s+ leukocita u odnosu na kontrolnu skupinu.
2. Hiperbarični tretman značajno smanjuje udio ukupnih CD77+ bubrežnih stanica u odnosu na kontrolnu skupinu.
3. Hiperbarični tretman značajno mijenja ukupni udio CD34+ stanica u srcu i plućima.
4. Postoji statistički značajna povezanost između izražaja CD15s i CD11b biljega na leukocitima i izražaja biljega CD77 i CD34 na endotelnim stanicama srca, bubrega i pluća.



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

#### **Ustroj istraživanja**

Istraživanje je s obzirom na pristup bilo eksperimentalno. Glede načina dobivanja podataka, riječ je o intervencijskom istraživanju, dok je vremenska orijentacija prospektivna budući da se analiza biljega tkiva vršila nakon hiperbaričnog tretmana i nakon žrtvovanja životinja. Ispitivane životinje su podijeljene u grupu „kontrola“ i „životinje podvrgnute hiperbaričnom tretmanu“.

Tijek istraživanja:

- Podvrgavanje životinja hiperbaričnom tretmanu
- Prikupljanje uzoraka krvi kroz tri dana
- Žrtvovanje životinja i prikupljanje tkiva
- Obrada tkiva
- Imunokemijsko bojanje
- Kvantifikacija i statistička obrada dobivenih rezultata
- Tumačenje rezultata u usporedbi s očekivanim rezultatima

#### **Ishod istraživanja**

Primarni ishod istraživanja je određivanje izražaja biljega CD11b i CD15s na leukocitima štakora nakon HB u odnosu na kontrolnu skupinu, te izražaja CD77 i CD34 na stanicama bubrega, srca i pluća u HB životinja u odnosu na kontrolnu skupinu. Izražaj biljega se određivao protočnom citometrijom, a mjerna jedinica za mjeru ishoda je postotak stanica koje imaju izražen biljeg.

Zamjenske (sekundarne) mjere ishoda

Sekundarna mjera ishoda je određivanje povezanosti između izražaja CD15s i CD11b biljega na leukocitima i izražaja biljega CD77 i CD34 na stanicama srca, bubrega i pluća.

### **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.

Disertacija je izrađena u sklopu projekta “Patobiologija glikosfingolipidnih antigena” MZOŠ HR br. 216-2160133-0066200, voditeljice prof.dr.sc. Anite Markotić, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

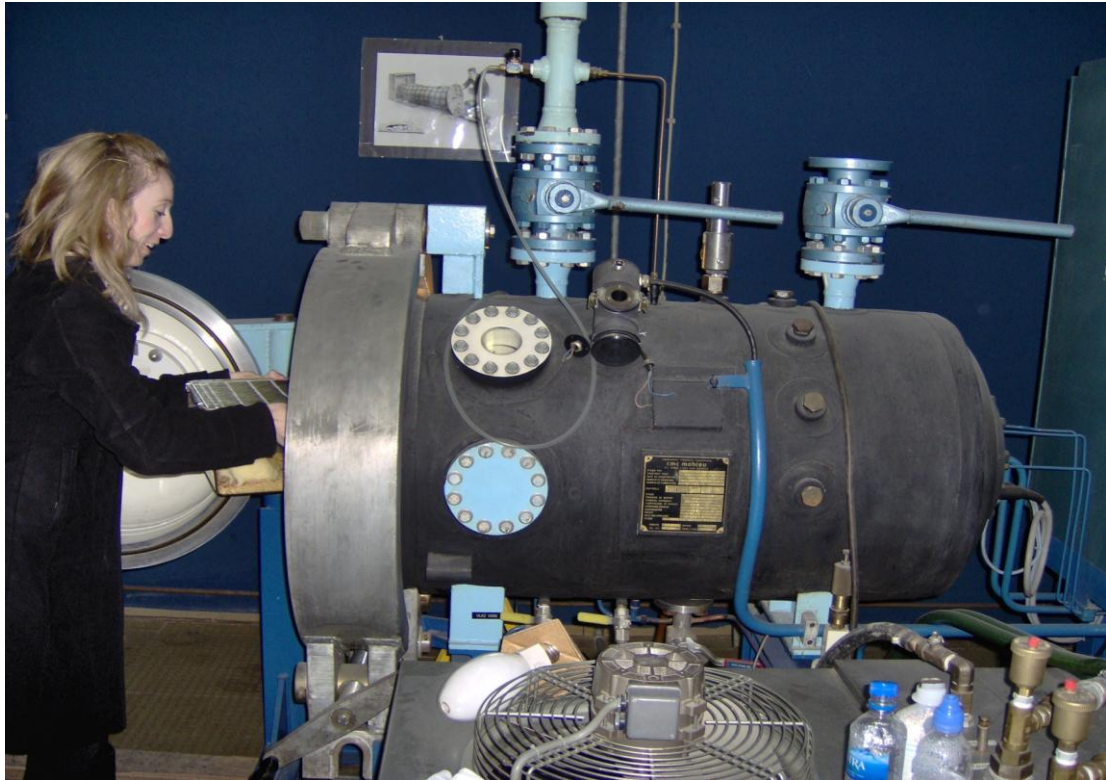
### **Metode istraživanja**

#### **Pokusne životinje**

Istraživanje je provedeno na 4 tjedana starim mužjacima štakorskog soja Sprague – Dawley koji su se uzgajali u kontroliranim uvjetima: temperatura zraka  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$  , 14 sati svjetla, 10 sati mraka. Životinje su uzete iz Sveučilišne nastambe za pokusne životinje Sveučilišta u Splitu te uzgajane i održavane sukladno Vodiču za njegu i korištenje laboratorijskih životinja (NIH, 1996). Hrana i vodovodna voda štakorima je davana *ad libitum*.

Životinje su podijeljene u 2 skupine: ispitivanu skupinu od 9 životinja koja je podvrgnuta hiperbaričnom tretmanu (HB skupina) i netretiranu, kontrolnu skupinu, od 5 životinja. Broj životinja potrebnih za istraživanje određen je pomoću programa G-Power za izračun veličine uzorka. Tretirana skupina štakora podvrgnuta je hiperbaričnom tlaku smjese zraka (21 % kisik i 79 % dušik) koji odgovara dubini zarona od 65 m, u trajanju od 30 min. Isti protokol se ponavljao tijekom 3 sljedeća dana.

Hiperbarična komora koja se koristila u hiperbaričnom tretmanu je Comexova hiperbarična komora (Slika 6) na Odjelu za podvodnu i hiperbaričnu medicinu Instituta pomorske medicine Hrvatske ratne mornarice u Splitu (Comex, Marseilles, Francuska). Koncentracije kisika i ugljikovog dioksida u komori tijekom izlaganja životinja hiperbariji su kontrolirane Servomex 570A analizatorom kisika (Servomex, Houston, TX, SAD) i infracrvenim CO<sub>2</sub> analizatorom (Infrared Industries Inc., Santa Barbara, CA, SAD).



Slika 6. Comexova hiperbarična komora na Odjelu za podvodnu i hiperbaričnu medicinu Instituta pomorske medicine Hrvatske ratne mornarice u Splitu

### **Određivanje izražaja CD11b i CD15s na leukocitima**

Nakon svakog hiperbaričnog tretmana, štakorima je uzeto 1 ml venske krvi iz vene jugularis pod anestezijom dietileterom.

Uzorak krvi je sakupljan u Vacutainer epruvetu s K3EDTA antikoagulansom. Puna krv (100  $\mu$ L) je tretirana s FcR reagensom za blokiranje nespecifičnog vezanja protutijela, a zatim inkubirana s protu-CD15 protutijelom konjugiranim s FITC-om i protu-CD11b protutijelom konjugiranim s PE u jednoj tubici te protu-CD15s protutijelom u drugoj tubici 30 min na +4°C. U drugu tubicu je zatim dodano sekundarno protumišje protutijelo konjugirano s FITC-om i inkubirano 30 min na +4°C. Nakon hemolize eritrocita otopinom za liziranje,  $10^5$  događaja je bilježeno na Epics XL protočnom citometru (Beckman Coulter). Izotipske kontrole, kao i nebojeni uzorci stanica, korišteni su kao negativne kontrole. Nespecifično vezanje sekundarnog protutijela isključeno je koristeći stanice obojene samo sekundarnim protutijelom konjugiranim s FITC-om. Broj stanica analiziran je računalnim programom WinMDI i izražen kao postotak pozitivno obilježenih stanica. U odabiru protokola vodili smo se ranije objavljenim znanstvenim radovima (106).

### **Određivanje CD34 i CD77 na stanicama tkiva bubrega, pluća i srca**

Nakon vađenja krvi posljednjeg trećeg dana, životinje su žrtvovane te su im se izvadila tkiva bubrega, srca i pluća. Tkiva su isprana od viška krvi u fosfatnom puferu (PBS). Tkiva su usitnjena u 0.2 % otopini kolagenaze u omjeru 100 mg tkiva / 5 mL otopine kolagenaze u PBS-u. Stanice su se još dodatno suspendirale provlačenjem kroz špricu. Suspenzija stanica inkubirana je 30 min na 37 °C uz lagano miješanje. Nakon inkubacije suspenzija je filtrirana kroz svilenu mrežicu te filtrat dalje korišten kao otopina izoliranih stanica.

Izolirane stanice tkiva razrijeđene u PBS-u s 0.1 % NaN<sub>3</sub> inkubirane su 30 min u mraku na +4 °C s dva protutijela za dvostruko bojenje stanica: 1 µg protutijela na CD34 konjugirano s fikoeritrin-cijaninom 5 (PC5) i 1 µg protutijela na CD77 konjugirano s FITC-om. Fluorescencija dvije boje mjerila se protočnim citometrom Epics XL (Beckman Coulter) na valnoj duljini ekscitacije 488 nm. Broj stanica je analiziran računalnim programom WinMDI i izražen kao postotak pozitivno obilježenih stanica.

### **Protočna citometrija**

Protočna citometrija je tehnika koju čine tri međusobno povezana sustava: protočni, optički i elektronski, a koristi se već 30-ak godina. Jedna od najvećih prednosti moderne protočne citometrije je to da stanice prije analize nije potrebno prethodno fizički razdvojiti. Od ostalih prednosti valja izdvojiti veliku brzinu mjerenja signala (>10<sup>3</sup> stanica u sekundi) te istodobno mjerenje više parametara (fizičkih parametara i fluorescentnih signala). Iz tog razloga na modernim citometrima se istodobno može analizirati i do desetak parametara (107). Protočni sustav odnosi se na pokretačku tekućinu, staničnu suspenziju i zračni potisak. Stanice iz stanične suspenzije pojedinačno laminarnim protokom dolaze do laserskog svjetla. Lasersko svjetlo, leće i filteri su optički sustav. Stanice se obasjavaju laserskim svjetlom. Stupanj raspršenja svjetlosti iste valne duljine pokazatelj je fizičkih osobina stanica zrnatosti (svjetlost raspršena pod pravim kutom - SSC, prema eng. *side scatter*) i veličine (svjetlost koja se raspršila pod malim kutom 0.5-10°, FSC - prema eng. *forward scatter*). Za dodatno obilježavanje specifičnih staničnih struktura koristi se obilježavanje stanica slobodnim ili (češće) za monoklonska protutijela vezanim fluorescentnim bojama (fluorokromima). Fluorokromi koji se najčešće koriste su fikoeritrin (eng. *phycoerythrin*, PE) i fluorescein izotiocijanat (eng. *fluorescein-isothiocyanate*, FITC). Elektronski sustav sve svjetlosne

signale pretvara u digitalne signale, koji se prenose u računalo i analiziraju. Kako bi se definirale stanične populacije, koristi se citogram veličine i znatosti stanica (FSC×SSC) na kojem se postavlja regija (R) analize oko ciljnih stanica iz kojih će se analizirati specifični fluorescentni signali. Protočna citometrija se danas ponajviše rabi u cilju imunofenotipizacije, tj. obilježavanje specifičnih staničnih biljega; u analizi limfocita periferne krvi u cilju ocjene imunološkog statusa, kod imunofenotipizacija leukemija i limfoma i praćenje ostalih malignih stanica (minimalne rezidualne bolesti), za mjerenje broja CD34+ krvotvornih matičnih stanica u perifernoj krvi i leukocitnom koncentratu za potrebe transplantacije krvotvornih matičnih stanica. Protočna citometrija je svoju primjenu našla i u drugim granama medicine, kao što su patologija, biokemija, mikrobiologija i interna medicina, ali još uvijek se najčešće koristi u hematologiji i imunologiji (108).

### **Korištene kemikalije i protutijela**

- PBS (fosfatni pufer u fiziološkoj otopini, od eng. *Phosphate saline buffer*)
- Vacutainer epruvete s antikoagulansom (litij heparin, K3EDTA)
- Kolagenaza tip IA (iz *Clostridium histolyticum*, SIGMA, Saint Louis, Missouri, SAD)
- FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka)
- Primarno protu-CD15s protutijelo (Pharmingen, San Diego, CA, SAD)
- Sekundarno protu-mišje protutijelo konjugirano s fluorescein-izotiocijanatom (FITC) (Pharmingen, San Diego, CA, SAD)
- Protu-štakorsko CD11b protutijelo, konjugirano s fikoeritriinom (PE) (Immunotech, Marseille, Francuska)

- Protu-CD77 protutijelo konjugirano s FITC-om (Pharmingen, San Diego, CA, SAD) i protu-CD34 protutijelo konjugirano s fikoeritrin-cijanin 5 (PC5) (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD).
- Red Blood Cell Lysis Solution (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka)

### **Statistički postupci**

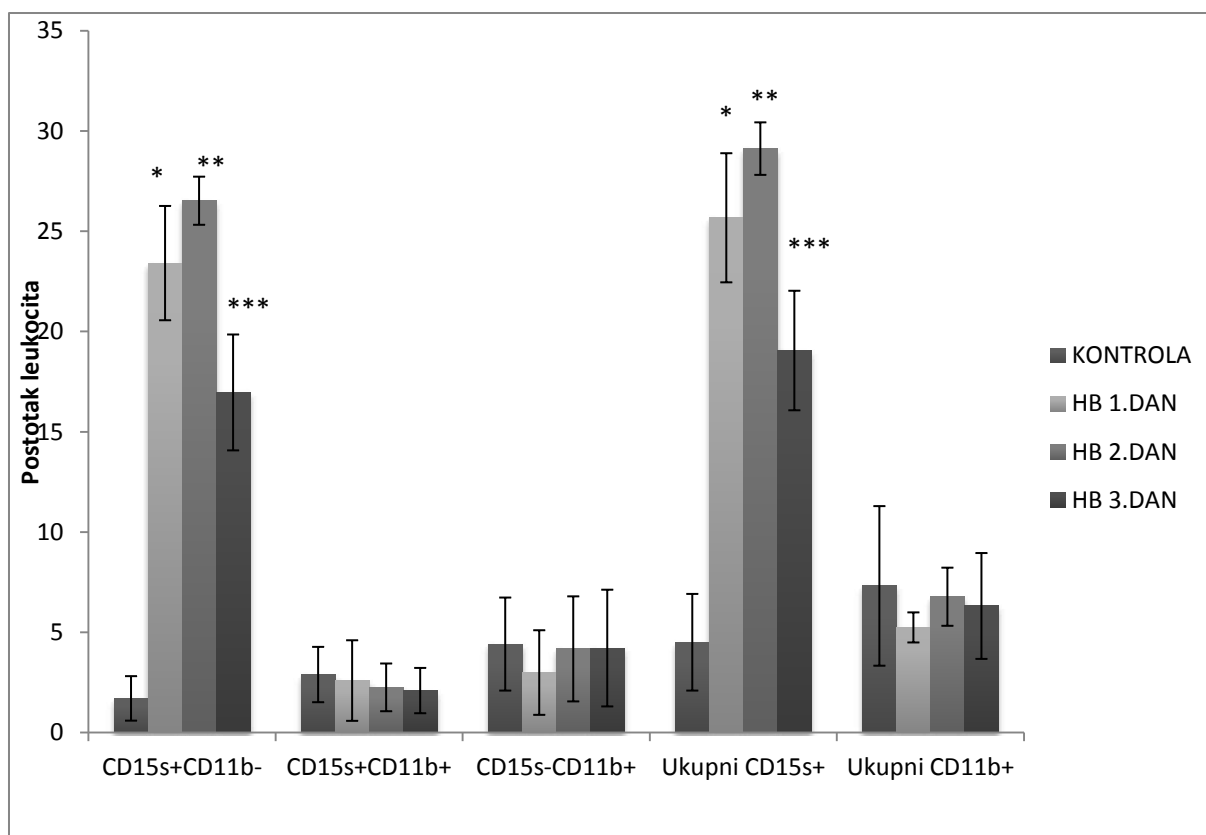
Podaci su prikazani tablično i grafički te statistički obrađeni uz pomoć računalnog programa Statistica 12.0 (Statsoft, Tulsa, SAD). U analizi rezultata koristio se Mann Whitney U test kako bi se odredilo da li postoji statistički značajna razlika u izražaju biljega između kontrolne i ispitivane skupine. Koeficijent korelacije je izračunat između postotka CD11b+ i CD15s+ leukocita i postotka CD34+ i CD77+ stanica srca, bubrega i pluća, Pearsonovim koeficijentom korelacije. Razina statističke značajnosti postavljena je na 95 % ( $P < 0.05$ ).

#### 4. REZULTATI

##### Rezultati hiperbaričnog tretmana na izražaj leukocitnih biljega CD11b i CD15s

U disertaciji je istraživana učinak tri ponovljena hiperbarična tretmana na izražaj biljega CD11b i CD15s na leukocitima. Hiperbarični tretman je statistički značajno povećao postotak CD15s+CD11b- leukocita u skupini koja je bila izložena HB u odnosu na kontrolnu skupinu (od  $1.71 \pm 1.1$  % u kontrolnoj skupini do  $23.42 \pm 2.85$  % ( $P < 0.001$ ) nakon prvog dana tretmana,  $26.53 \pm 1.20$  % ( $P < 0.001$ ) nakon drugog dana tretmana i  $16.97 \pm 2.89$  % ( $P < 0.001$ ) nakon trećeg dana u HB skupini). Smanjenje postotka CD15s+CD11b- leukocita od drugog do trećeg dana nije bilo statistički značajno. Hiperbarični tretman je statistički značajno povećao postotak ukupnih CD15s+ leukocita u skupini koja je bila izložena HB u odnosu na kontrolnu skupinu (od  $4.51 \pm 2.42$  % u kontrolnoj skupini do  $25.68 \pm 3.22$  % ( $P < 0.001$ ) nakon prvog dana,  $29.13 \pm 1.31$  % ( $P < 0.001$ ) nakon drugog dana te  $19.06 \pm 2.98$  % ( $P < 0.001$ ) nakon trećeg dana u HB skupini). Postotak ukupnih CD15s leukocita smanjio se od drugog do trećeg dana, ali ne statistički značajno ( $s$   $29.13 \pm 1.31$  % na  $19.06 \pm 2.98$  %). Hiperbarični tretman nije promijenio postotak ukupnih CD11b+ leukocita u skupini koja je bila izložena HB u odnosu na kontrolnu skupinu ( $7.32 \pm 3.98$  % u kontrolnoj skupini u odnosu na  $5.25 \pm 0.75$  % nakon prvog dana,  $6.78 \pm 1.45$  % nakon drugog dana te  $6.32 \pm 2.64$  % nakon trećeg dana u HB skupini). Hiperbarični tretman nije promijenio postotak CD15+CD11b- stanica u skupini koja je bila izložena HB tretmanu ( $2.90 \pm 1.38$  % u kontrolnoj skupini u odnosu na  $2.10 \pm 1.13$ % nakon trećeg dana u HB skupini) kao što se nije promijenio ni postotak CD15s-CD11b+ stanica ( $4.42 \pm 2.32$  % u kontrolnoj skupini u odnosu na  $4.22 \pm 2.91$  % nakon trećeg dana u HB skupini).





KONTROLA – skupina netretiranih štakora, HB – skupina tretiranih štakora

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± SD

\*označeni su statistički značajni rezultati ( $P < 0.05$ ) 1. dan u odnosu na kontrolnu skupinu

\*\*označeni su statistički značajni rezultati ( $P < 0.05$ ) 2. dan u odnosu na kontrolnu skupinu

\*\*\*označeni su statistički značajni rezultati ( $P < 0.05$ ) 3. dan u odnosu na kontrolnu skupinu

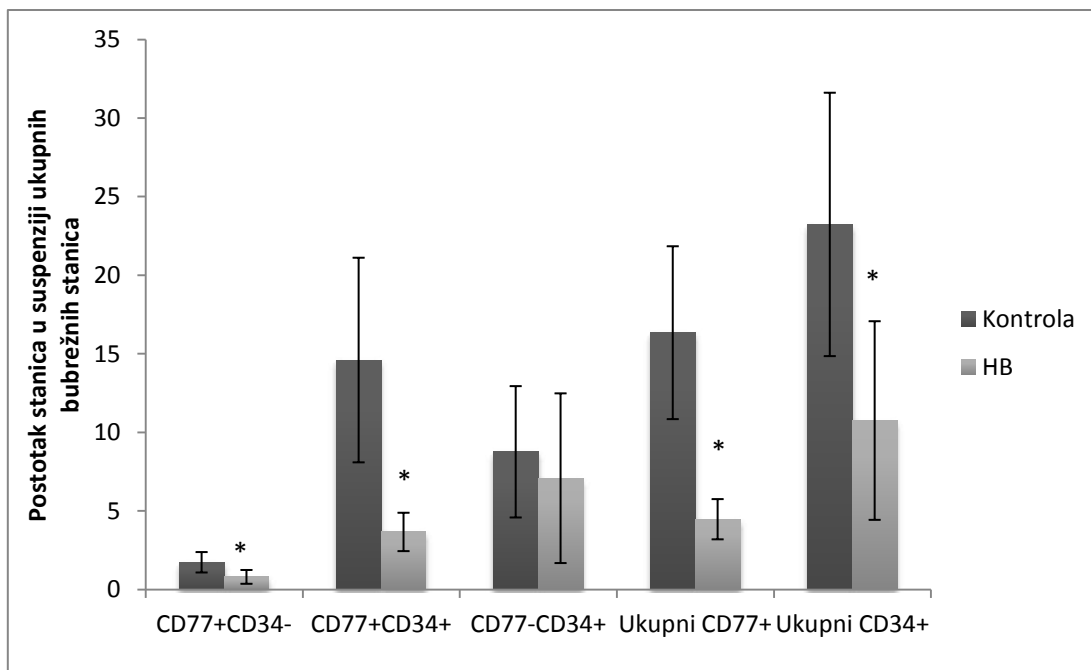
Točne  $P$  vrijednosti su dane u tekstu gore.

Slika 7. Usporedba postotaka različitih CD11b+ i CD15s+ leukocitnih subpopulacija u

kontrolnoj skupini i tretiranoj skupini.

## **Rezultati hiperbaričnog tretmana na izražaj biljega CD77 i CD34 na bubrežnim stanicama**

Hiperbarični tretman je statistički značajno smanjio postotak ukupnih CD77+ stanica bubrežnog tkiva u skupini koja je bila izložena HB u odnosu na kontrolnu skupinu (od  $16.35 \pm 5.5$  % u kontrolnoj skupini do  $4.48 \pm 1.28$  % u HB skupini,  $P < 0.001$ ). Hiperbarični tretman je statistički značajno smanjio postotak ukupnih CD34+ stanica bubrežnog tkiva u skupini koja je bila izložena HB u odnosu na kontrolnu skupinu (od  $23.24 \pm 8.38$  % u kontrolnoj skupini do  $10.76 \pm 6.32$  % u HB skupini,  $P = 0.002$ ). Postotak CD77-CD34+ bubrežnih stanica nije značajno različit u skupini koja je bila izložena HB u odnosu na kontrolnu skupinu ( $8.77 \pm 4.18$  % u kontrolnoj skupini te  $7.09 \pm 5.40$  % u HB skupini,  $P = 0.363$ ). Hiperbarični tretman je statistički značajno smanjio postotak CD77+CD34- bubrežnih stanica u skupini koja je bila izložena HB tretmanu u odnosu na kontrolnu skupinu (od  $1.74 \pm 0.65$  % u kontrolnoj skupini do  $0.81 \pm 0.44$  % u HB skupini,  $P = 0.014$ ) kao i postotak CD77+CD34+ bubrežnih stanica koji je također statistički značajno manji u skupini koja je bila izložena HB (od  $14.61 \pm 6.51$  % u kontrolnoj skupini do  $3.67 \pm 1.22$  % u HB skupini,  $P < 0.001$ ).



KONTROLA – skupina netretiranih štakora, HB – skupina tretiranih štakora

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± SD

\*označeni su statistički značajni rezultati  $P < 0.05$  (vs. kontrolna skupina)

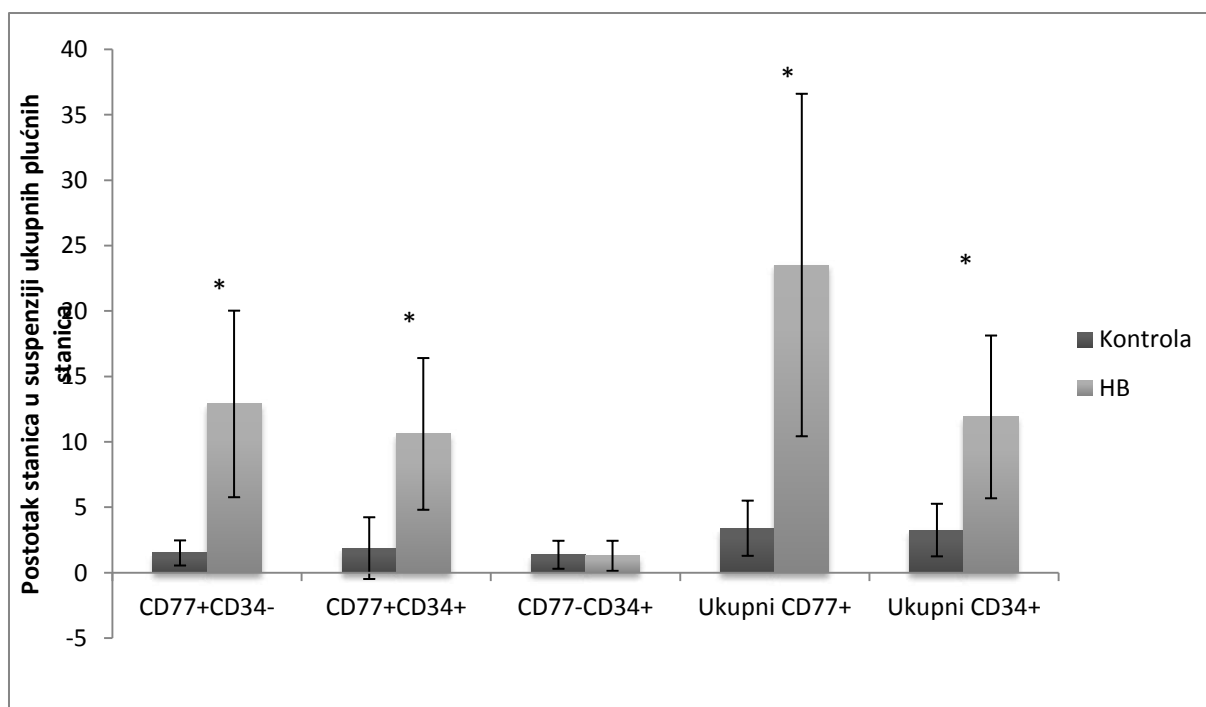
Točne  $P$  vrijednosti su dane u tekstu gore.

Slika 8. Usporedba postotaka CD77+CD34- stanica, CD77+CD34+ stanica, CD77- CD34+ stanica, ukupnih CD77+ te ukupnih CD34+ stanica u suspenziji ukupnih bubrežnih stanica kontrolne skupine i tretirane skupine štakora

## **Rezultati hiperbaričnog tretmana na izražaj biljega CD77 i CD34 na stanicama pluća**

Hiperbarični tretman je statistički značajno povećao postotak ukupnih CD34+ stanica plućnog tkiva u skupini koja je bila izložena HB u odnosu na kontrolnu skupinu (od  $3.27 \pm 2.01$  % u kontrolnoj skupini do  $11.92 \pm 6.22$  % u HB skupini,  $P < 0.001$ ). Hiperbarični tretman je statistički značajno povećao postotak ukupnih CD77+ stanica plućnog tkiva u skupini koja je bila izložena HB u odnosu na kontrolnu skupinu (od  $3.41 \pm 2.11$  % u kontrolnoj do  $23.53 \pm 13.09$  % u HB skupini,  $P < 0.001$ ). Postotak CD77-CD34+ stanica pluća nije se značajno promijenio prije i nakon hiperbaričnog tretmana (kontrola  $1.38 \pm 1.07$  %, HB  $1.30 \pm 1.15$  %).

Hiperbarični tretman je statistički značajno povećao postotak CD77+CD34- stanica u skupini koja je bila izložena hiperbaričnom tretmanu u odnosu na kontrolnu skupinu (od  $1.52 \pm 0.96$  % u kontrolnoj do  $12.91 \pm 7.13$  % u HB skupini,  $P < 0,001$ ). Hiperbarični tretman je statistički značajno povećao postotak CD77+CD34+ stanica u skupini koja je bila izložena HB u odnosu na kontrolnu skupinu (od  $1.89 \pm 2.36$  % u kontrolnoj do  $10.62 \pm 5.80$  % u HB skupini,  $P = 0,002$ ).



KONTROLA – skupina netretiranih štakora, HB – skupina tretiranih štakora

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± SD

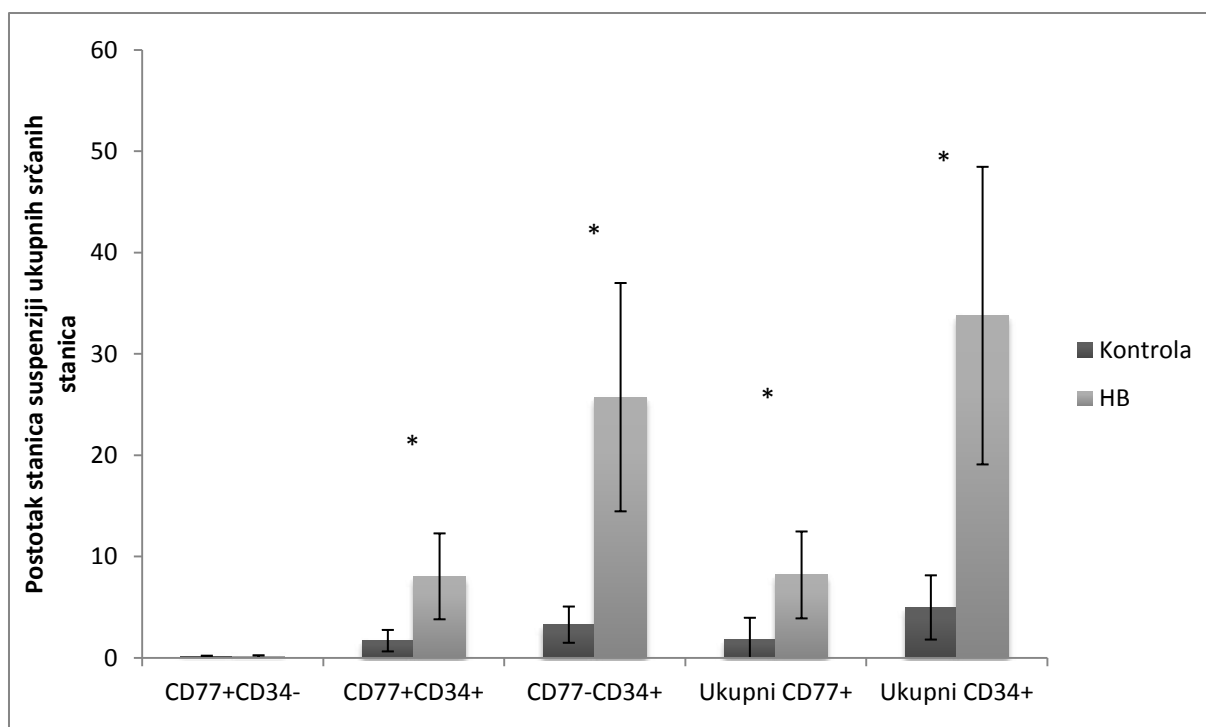
\*označeni su statistički značajni rezultati  $P < 0.05$  (vs. kontrolna skupina)

Točne  $P$  vrijednosti su dane u tekstu gore.

Slika 9. Usporedba postotaka CD77+CD34- stanica, CD77+ CD34+ stanica i CD77-CD34+ stanica, te ukupnih CD77+ i CD34+ stanica u suspenziji ukupnih stanica pluća kontrolne skupine i tretirane skupine štakora

## **Rezultati hiperbaričnog tretmana na izražaj biljega CD77 i CD34 na srčanim stanicama**

Hiperbarični tretman je statistički značajno povećao postotak ukupnih CD34+ stanica u skupini koja je bila izložena HB u odnosu na kontrolnu skupinu (od  $4.98 \pm 3.17$  % u kontrolnoj do  $33.79 \pm 14.69$  % u HB skupini,  $P < 0.001$ ). Hiperbarični tretman je statistički značajno povećao postotak ukupnih CD77+ stanica srčanog tkiva u skupini koja je bila izložena hiperbaričnom tretmanu u odnosu na kontrolnu skupinu (od  $1.81 \pm 2.15$  % u kontrolnoj do  $8.19 \pm 4.29$  % u HB skupini,  $P = 0.007$ ). Postotak CD77+CD34- stanica srca nije se značajno promijenio prije i nakon hiperbaričnog tretmana (kontrola  $0.12 \pm 0.10$  %, HB  $0.14 \pm 0.12$  %). Hiperbarični tretman je statistički značajno povećao postotak CD77+CD34+ stanica u skupini koja je bila izložena HB u odnosu na kontrolnu skupinu (od  $1.70 \pm 1.06$  % u kontrolnoj skupini do  $8.05 \pm 4.24$  % u HB skupini,  $P = 0.009$ ). Hiperbarični tretman je statistički značajno povećao postotak CD77-CD34+ stanica u skupini koja je bila izložena HB u odnosu na kontrolnu skupinu (od  $1.81 \pm 2.15$  % u kontrolnoj do  $8.19 \pm 4.29$  % u HB skupini,  $P = 0.009$ ).



KONTROLA – skupina netretiranih štakora, HB – skupina tretiranih štakora

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost  $\pm$  SD

\*označeni su statistički značajni rezultati  $P < 0.05$  (vs. kontrolna skupina)

Točne  $P$  vrijednosti su dane u tekstu gore.

Slika 10. Usporedba postotaka CD77+CD34- stanica, CD77+CD34+ stanica i CD77-CD34+ stanica, te ukupnih CD77+ i CD34+ stanica u suspenziji ukupnih stanica srčanog mišića kontrolne skupine i tretirane skupine štakora

## Rezultati analize korelacije leukocitnih biljega s biljezima tkiva

Rezultati analize korelacije između leukocitnih biljega CD11b i CD15s s biljezima tkiva bubrega, pluća i srca CD34 i CD77 prikazani su u Tablici 1. Nije pronađena statistički značajna korelacija između leukocitnih biljega i biljega tkiva.

Tablica 1. Korelacija izražaja leukocitnih biljega CD15s i CD11b i srčanih, plućnih i bubrežnih biljega CD34 i CD77

Tkivne stanične subpopulacije		Leukocitne populacije			
		Ukupni CD11b+		Ukupni CD15s+	
		<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>
Srčani	Ukupni CD34+	0.55	0.12	-0.28	0.46
	Ukupni CD77+	0.64	0.06	-0.51	0.16
Bubrežni	Ukupni CD34+	0.46	0.21	-0.30	0.43
	Ukupni CD77+	0.24	0.53	-0.57	0.11
Plućni	Ukupni CD34+	0.26	0.50	0.17	0.67
	Ukupni CD77+	-0.17	0.67	0.29	0.45

*R* = koeficijent korelacije

*P* = statistička značajnost korelacije

Ukupni CD11b+ = CD11b+CD15s- + CD11b+CD15s+

Ukupni CD15s+ = CD11b-CD15s+ + CD11b+CD15s+

Ukupni CD34+ = CD34+CD77- + CD34+CD77+

Ukupni CD77+ = CD34-CD77+ + CD34+CD77+



## 5. RASPRAVA

U ovoj disertaciji je ispitivan učinak 3 ponavljana hiperbarična tretmana na postotak CD11b+ i CD15s+ leukocita. Hiperbarični tretman nije promijenio postotak ukupnih CD11b pozitivnih leukocita.

Izražaj CD11b biljega je snižen nakon napornog i dugog vježbanja (109). Kod ljudi, u mirujućim neutrofilima, većina CD11b/CD18 kompleksa nalazi se uklopljena u membrane specifičnih granula i sekretornih mjehurića dok je samo 5 % izraženo na staničnoj površini. Kada proupalni podražaj dovede do stimulacije neutrofila, dolazi do pojačanog izražaja CD11b na njihovoj površini (94). Zbog toga se smatra kako uočavanje pojačanog izražaja CD11b može poslužiti kao indikator aktivacije neutrofila (110, 111). Novorođenčad, trudnice i starije osobe imaju pojačan izražaj CD11b na staničnoj površini granulocita u perifernoj krvi (112 - 114). Dokazano je da je pojačan izražaj CD11b biljega prisutan u odraslih bolesnika s infekcijom i sepsom (115 - 120), a temeljem vrijednosti izražaja CD11b na staničnoj površini neutrofila može se predvidjeti tijek bolesti u pacijenata s cirozom jetre i septičkim šokom te krajnji ishod liječenja (115, 118, 121). Povećanje izražaja CD11b na neutrofilima je važan biljeg u dijagnostici rano nastale novorođenačke infekcije (122, 123). Dokazano je da je izražaj CD11b na neutrofilima i monocitima značajno veći u novorođenčadi s infekcijom u usporedbi s zdravom novorođenčadi (124). Ranije je pronađeno da se izražaj CD11b, glavnog membranskog proteina koji je obložen sa CD15s, smanjuje nakon HBO (125). Međutim, naši rezultati su pokazali nepromijenjen izražaj CD11b biljega na leukocitima u štakora koji su tretirani HB-om. Različito od očekivanja, taj rezultat našeg istraživanja može se objasniti različitim uvjetima između HBO i HB.

Postotci CD15s+CD11b- i ukupnih CD15s pozitivnih leukocita su značajno povišeni u HB skupini štakora. Rezultat značajno povećanog postotka leukocita koji imaju izražen CD15s biljeg poslije ponavljajućih hiperbaričnih tretmana je u skladu s ranije poznatim rezultatima o jasnoj ulozi ovog proteina u akutnom upalnom procesu (126). Nedavno istraživanje ispitalo je izražaj CD15 i CD15s biljega u punoj krvi na ronocima nakon zaronu od 54 metra i pokazalo dvostruki porast CD15+ monocita nakon ronjenja, kao i porast subpopulacije monocita koji imaju izražen CD15s biljeg. Apsolutni broj monocita bio je povećan, ali ne i statistički značajno povećan nakon ronjenja, dok je apsolutni broj granulocita bio statistički značajno povećan. Studija je dokazala kako zaron na velikoj dubini uzrokuje biokemijske promjene koje primarno aktiviraju postojeće monocite, a ne mijenjaju njihov broj (91). Rezultati ove disertacije rasvjetljavaju ulogu CD15s u proupalnim procesima, a CD15s+ leukocite definiraju kao inteligentne stanice sa sposobnošću prilagodbe ekstremnim uvjetima.

Bubrezi imaju važnu ulogu u održavanju homeostaze krvi. Edremitlioglu i suradnici su u svojem istraživanju pokazali da HBO poboljšava bubrežnu disfunkciju u sepsi i to zahvaljujući povećanim obrambenim antioksidacijskim mehanizmima: povećanjem aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze u bubrežnoj kori, te povećanjem aktivnosti katalaze u bubrežnoj srži (127). Utjecaj HB na zdrave bubrege je nepoznat. Dnevna sekrecija urina se povećava za 500 mL tijekom ronjenja sa smjesom zraka (od 3 do 49 ATA) iako unos tekućine kao i glomerularna filtracija ostaje nepromijenjena (128). Naše istraživanje je pokazalo da je postotak CD77+CD34+, kao i ukupnih CD77+ bubrežnih stanica u štakora u skupini koja je bila podvrgnuta hiperbaričnom tretmanu značajno manji nego u kontrolnoj skupini. S obzirom na činjenicu da su CD77 biljezi locirani u blizini Na/K - ATPaze u kaveolama bubrežnih

epitelnih stanica (129), naši rezultati upućuju na moguću ulogu biljega CD77 u mehanizmima odgovornim za razvoj hiperbarične diureze. Također, temeljem naših rezultata, možemo spekulirati kako su pozitivni učinci hiperbarične oksigenacije na bubrežnu disfunkciju uzrokovanu *E.coli*, što je ranije dokazao Edremitlioglu, posredovani smanjenjem izražaja CD77 na bubrežnim stanicama.

U odraslom ljudskom bubregu protutijela na CD34 vezat će se na gotovo sve endotelne stanice (130). Luminalna membrana podocita sadrži sijalomucine iz obitelji CD34 biljega: podokaliksin i endoglin čija funkcija je slabo objašnjena. Acevedo je dokazao povećan izražaj CD34 na bubrežnim glomerularnim stanicama kod starijih dijabetičnih štakora, što ukazuje na povezanost CD34 i patogeneze glomerularnih promjena povezanih sa starenjem i dijabetesom (131). U ronjaca samo jedan zaron akutno inducira vaskularni oksidativni stres, uzrokujući endotelnu disfunkciju što vodi do toga da endotelne progenitorne stanice i cirkulirajuće angiogenetske stanice utječu na oporavak epitela, ili putem integriranja u oštećeni endotel ili izlučujući angiogenetske čimbenike rasta (132). Naše istraživanje pokazalo je smanjenje postotka CD34+ bubrežnih stanica nakon ponavljajućeg HB. Smatra se da hiperoksijom inducirano stvaranje ROS-a, smanjenje biorasploživosti NO i direktno mehaničko oštećenje endotela tijekom dekompresije, igraju važnu ulogu u disfunkciji endotela (133). Možemo pretpostaviti da ROS inducira apoptozu bubrežnih CD34+ stanica, što utječe na smanjenje njihovog broja nakon HB. Također, ranije je dokazano u štakora da dekompresijska trauma povećava razinu interleukina-6 (134) pa možemo spekulirati kako proupalni citokini u odgovoru na HB mogu povećati stopu apoptoze bubrežnih endotelnih stanica.

Kao što je poznato, plućni epitel je još jedno ciljno mjesto za Stxs, a smatra se da Stx-om povezane ozljede plućnog epitela igraju važnu ulogu u patogenezi plućne upale povezane s

*E.coli*. Temeljem naših rezultata, možemo zaključiti kako HB neće imati pozitivan učinak na rad pluća u uvjetima koji su povezani s plućnom infekcijom uzrokovanom *E.coli*, budući da je ukupni broj CD77+ plućnih stanica porastao u skupini koja je podvrgnuta HB, za razliku od kontrolne skupine.

Postotak ukupnih CD34+ stanica u plućnom tkivu nakon HB je također bio povećan i možemo pretpostaviti da hiperbarični uvjeti uzrokuju plućnu endotelnu angiogenezu. Nedavna istraživanja pokazala su da cirkulirajuće CD34+ endotelne progenitorne stanice doprinose plućnoj angiogenezi. Takve CD34+ stanice okarakterizirane s aktivnom staničnom diobom, prelaze u ostatne endotelne stanice tijekom kompenzatornog plućnog rasta. Ovi autori nagoviještaju terapijsku ulogu ovih stanica u brojnim plućnim bolestima (135). Dakle, i naš rezultat povećanog postotka CD34+ plućnih stanica nakon HB podržava hipotezu kako endotelne progenitorne stanice imaju važnu ulogu u rastu plućnog tkiva u fiziološkim i patofiziološkim uvjetima.

U našem istraživanju analizirali smo izražaj biljega CD34 i CD77 na stanicama srčanog tkiva. Različite stanice, poput mononuklearnih stanica iz koštane srži i mobilnih CD34+ stanica, danas se koriste u istraživanjima za potencijalnu terapiju u smanjivanju srčanih ožiljaka te kako bi se povećala srčana funkcija u pacijenata s ishemičnom kardiomiopatijom (136). Nedavno su studije dokazale direktno *in vivo* reprogramiranje srčanih fibroblasta u kardiomiocyte koji su CD34+, što bi moglo predstavljati novi terapijski pristup u srčanoj regeneraciji (137).

Srčana i periferna ishemija stimuliraju endogenu mobilizaciju CD34+ stanica i one putuju do zone ishemije, gdje promoviraju angiogenezu ili putem direktnog uklapanja u novostvorene krvne žile ili putem izlučivanja angiogenetskih čimbenika rasta, što stimulira lokalni peri-

endotelni razvoj krvnih žila (138). Upotreba CD34+ stanica u tretiranju ishemičnih kardiovaskularnih bolesti je relativno nova. Nedavna istraživanja su dokazala kako jednokratno maksimalno vježbanje povećava broj cirkulirajućih endotelnih progenitornih stanica i kod zdravih osoba, ali i kod kardiovaskularnih pacijenata (139). Visoko vaskularno oksidativno opterećenje koje nastane iz maksimalnog vježbanja uzrokuje trenutno smanjenje vazodilatacije ovisne o endotelu, što se popravlja nakon 12 - 24 sata. Ovakav akutni period vaskularnog stresa stimulira mehanizme oporavka, uključujući mobilizaciju endotelnih progenitornih stanica, što se smatra prikladnim fiziološkim odgovorom na ovakve promjene (140).

U ovom istraživanju izlaganje HB je odgovaralo dubini zarona od 65 metara. Za pretpostaviti je kako mijenjanje hiperbaričnih uvjeta sigurno mijenja i izražaj antigena. Izlaganje specijalnim uvjetima okoline, pa tako i hiperbarični tretman, inducira sistematske fiziološke promjene koje utječu na termalnu homeostazu i mehanizme izmjene tjelesne topline (141).

Unatoč tome što nije pronađena razliku u postotcima CD77-CD34+ bubrežnih stanica, CD77-CD34+ plućnih stanica i CD77+CD34- srčanih stanica u HB skupini u odnosu na kontrolnu skupinu, ove stanice jako su zanimljive za buduća istraživanja jer su to stanice koje imaju visoku sposobnost prilagodbe na ekstremne uvjete.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Postotci CD15s+CD11b- i ukupnih CD15s leukocita su značajno veći u skupini štakora tretiranih hiperbaričnim tretmanom u odnosu na kontrolnu skupinu. Hiperbarični tretman nije značajno promijenio postotak ukupnih CD11b+ leukocita.
2. Postotci CD77+CD34-, CD77+CD34+, ukupnih CD77+ i ukupnih CD34+ bubrežnih stanica štakora u skupini tretiranoj hiperbaričnim tretmanom su značajno niži u usporedbi s kontrolnom skupinom. Hiperbarični tretman nije značajno promijenio postotak CD77-CD34+ bubrežnih stanica.
3. Postotci CD77+CD34-, CD77+CD34+, ukupnih CD77+ i ukupnih CD34+ stanica pluća štakora u skupini tretiranoj hiperbaričnim tretmanom su značajno veći u odnosu na kontrolnu skupinu. Hiperbarični tretman nije značajno promijenio postotak CD77-CD34+ plućnih stanica.
4. Postotci CD77+CD34+, CD77-CD34+, ukupnih CD77+ i ukupnih CD34+ srčanih stanica štakora u skupini tretiranoj hiperbaričnim tretmanom su značajno veći u odnosu na kontrolnu skupinu. Hiperbarični tretman nije značajno promijenio postotak CD77+CD34- srčanih stanica.
5. Ne postoji statistički značajna korelacija između postotka ukupnih CD11b+ i ukupnih CD15s+ na leukocitima i postotka ukupnih CD34+ i ukupnih CD77+ na stanicama tkiva.

## 7. SAŽETAK

**Uvod:** Cilj ovog istraživanja bio je odrediti učinak hiperbaričnog tretmana (HB) na leukocitne proupalne biljege CD15s i CD11b. Dodatno, istraživanje opisuje promjene u izražaju CD77 i CD34 biljega na stanicama bubrežnog, plućnog i srčanog tkiva nakon hiperbaričnog tretmana.

**Materijali i metode:** Izražaj CD11b i CD15s na leukocitima, kao i CD77 i CD34 biljega na suspenziji stanica bubrežnog, plućnog i srčanog tkiva u životinja nakon hiperbaričnog tretmana i u kontrolnim životinjama, određen je protočnom citometrijom.

**Rezultati:** Hiperbarični tretman je statistički značajno povećao postotak leukocitnih CD15s+CD11b- stanica (od  $1.71 \pm 1.11$  do  $23.42 \pm 2.85$ ,  $P < 0.05$ ). Hiperbarični tretman je statistički značajno smanjio postotak CD77+CD34- i CD77+CD34+ stanica u bubrežnom tkivu (od  $16.35 \pm 5.5$  do  $4.48 \pm 1.28$ ,  $P < 0.05$ ). Hiperbarični tretman je statistički značajno povećao postotak CD34+ stanica u plućnom tkivu (od  $3.27 \pm 2.01$  do  $11.92 \pm 6.22$ ,  $P < 0.05$ ). Naše istraživanje je prvo koje je pokazalo utjecaj hiperbaričnog tretmana na CD34+ stanice u srčanom tkivu kod štakora.

**Zaključak:** Naši rezultati povećanog postotka endotelnog liganda CD15s+ na leukocitima, nakon hiperbaričnog tretmana, upućuju na njegovu ulogu u procesima oštećenja endotela. Pronašli smo također značajni porast postotka CD34+ stanica u srčanom tkivu kao i postotka CD34+ stanica u plućnom tkivu nakon hiperbaričnog tretmana, što može biti posljedica mehanizama oporavka oštećenog endotela usljed hiperoksije.

## 8. ABSTRACT

**Objective(s):** The aim of this study was to estimate effects of hyperbaric (HB) treatment by determination of CD15s and CD11b leukocyte proinflammatory markers expression. In addition, this study describes changes in CD77 and CD34 expression on rat endothelial cells in renal, pulmonary and cardiac tissue following exposure to hyperbaric pressure.

**Materials and Methods:** Expression of CD11b and CD15s on leukocytes, as well as CD77 and CD34 expression on endothelial cells in cell suspensions of renal, pulmonary and cardiac tissue in rats after hyperbaric treatment and in control rats were determined by flow cytometry.

**Results:** Hyperbaric treatment significantly increased percentage of leukocytes expressing CD15s+CD11b- (from  $1.71 \pm 1.11$  to  $23.42 \pm 2.85$ ,  $P < 0.05$ ). Hyperbaric treatment significantly decreased sum percentage of CD77+CD34- and CD77+CD34+ renal cells (from  $16.35 \pm 5.5$  to  $4.48 \pm 1.28$ ,  $P < 0.05$ ). Hyperbaric treatment significantly increased percentage of CD34+ pulmonary cells (from  $3.27 \pm 2.01$  to  $11.92 \pm 6.22$ ,  $P < 0.05$ ). Our study is the first reporting the hyperbaric environment influence on CD34+ heart cells in rats.

**Conclusion:** The current findings of increased percentage of leukocytes expressing endothelial selectin ligand CD15s after hyperbaric treatment, point its role in endothelial damage. We found out a significantly increase in percentage of CD34+ cardiac cells as well as CD34+ pulmonary cells in rats after HB treatment which could be a part of repair mechanism of injured endothelium caused by hyperoxia.



## 9. LITERATURA

1. Gottlieb SF. Hyperbaric oxygenation. *Advances in Clinical Chemistry*. 1965; 8: 69 - 139.
2. Surman MW. An introduction to hyperbaric oxygen therapy for the ET nurse. *Journal of Wound Ostomy and Continence Nursing*. 1996; 23: 80 - 89.
3. Kranke P, Bennett MH, Martyn-St James M, Schnabel A, Debus SE, Weibel S. Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015; 24: CD004123. doi: 10.1002/14651858.CD004123.pub4.
4. Tibbles PM, Edelsberg JS. Hyperbaric-oxygen therapy. *The New England journal of medicine*. 1996; 334: 1642 - 1648.
5. Camporesi EM, Bosco G. Mechanisms of action of hyperbaric oxygen therapy. *Undersea Hyperbaric Medicine Journal*. 2014 ;41: 247 - 252.
6. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY) 2009.
7. Pike LJ. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of lipid research*. 2006; 47: 1597 - 1598.
8. Feizi T. Carbohydrate-mediated recognition systems in innate immunity. *Immunological reviews*. 2000; 173: 79 - 88.
9. 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: 85 - 92.
10. Zeller CB, Marchase RB. Gangliosides as modulators of cell function. *The American journal of physiology*. 1992; 262 : 1341 - 1355.
11. 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: 618 - 634.
12. Jiang Tian, Zi-jian Xie. The Na-K-ATPase and Calcium- Signaling Microdomains. *Physiology*. 2008; 23: 205 - 211.
  13. 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: 5419 - 5422.
  14. 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: 2449 - 2452.
  15. 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: 515 - 528.
  16. Lingwood CA. Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends in Microbiology*. 1996; 4: 147 - 153.
  17. 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: 1777 - 1788.
  18. Mangeney M, Lingwood CA, Taga S, Caillou B, Tursz T, Wiels J. Apoptosis induced in Burkitt's lymphoma cells via Gb3/CD77, a glycolipid antigen. *Cancer Research*. 1993; 53: 5314 - 5319.
  19. Ching JC, Jones NL, Ceponis PJ, Karmali MA, Sherman PM. *Escherichia coli* shiga-like toxins induce apoptosis and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase via in vitro activation of caspases. *Infection and Immunity*. 2002; 70: 4669 - 4677.

20. Te'taud C, Falguieres T, Carlier K, Lecluse Y, Garibal J, Coulaud D, et al. Two distinct Gb3/CD77 signaling pathways leading to apoptosis are triggered by anti-Gb3/CD77 mAb and verotoxin-1. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278: 45200 - 45208.
21. Zoja C, Buelli S, Morigi M. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: pathophysiology of endothelial dysfunction. *Pediatric Nephrology*. 2010; 25: 2231 - 2240.
22. Karch H, Friedrich AW, Gerber A, Zimmerhackl LB, Schmidt MA, Bielaszewska M. New aspects in the pathogenesis of enteropathic hemolytic uremic syndrome. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2006; 32: 105 - 112.
23. Lee SY, Cherla RP, Caliskan I, Tesh VL. Shiga toxin 1 induces apoptosis in the human myelogenous leukemia cell line THP-1 by a caspase-8-dependent, tumor necrosis factor receptor-independent mechanism. *Infection and Immunity*. 2005; 73: 5115 - 5126.
24. Chinnapen DJ, Chinnapen H, Saslowsky D, Lencer WI. Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. *FEMS Microbiology Letters*. 2007; 266: 129 - 137.
25. Murray LJ, Habeshaw JA, Wiels J, Greaves MF. Expression of Burkitt lymphoma-associated antigen (defined by the monoclonal antibody 38.13) on both normal and malignant germinalcentre B cells. *International Journal of Cancer*. 1985; 36: 561 - 565.
26. Johansson D, Johansson A, Grankvist K, Andersson U, Henriksson R, Bergstrom T, et al. Verotoxin-1 induction of apoptosis in Gb3-expressing human glioma cell lines. *Cancer Biology and Therapy*. 2006; 5: 1211 - 1217.
27. LaCasse EC, Bray MR, Patterson B, Lim WM, Perampalam S, Radvanyi LG, et al. Shiga-like toxin-1 receptor on human breast cancer, lymphoma, myeloma and absence from CD34(+) hematopoietic stem cells: implications for ex vivo tumor purging and autologous stem cell transplantation. *Blood*. 1999; 94: 2901 - 2910.

28. Ishitoya S, Kurazono H, Nishiyama H, Nakamura E, Kamoto T, Habuchi T, et al. Verotoxin induces rapid elimination of human renal tumor xenografts in SCID mice. *Journal of Urology*. 2004; 171: 1309 - 1313.
29. Arab S, Rutka J, Lingwood C. Verotoxin induces apoptosis and the complete, rapid, long-term elimination of human astrocytoma xenografts in nude mice. *Oncology Research*. 1999; 11: 33 - 39.
30. Heath-Engel HM and Lingwood CA. Verotoxin sensitivity of ECV304 cells in vitro and in vivo in a xenograft tumour model: VT1 as a tumour neovascular marker. *Angiogenesis*. 2003; 6: 129 - 141.
31. Distler U, Souady J, Hulsewig M, Drmić-Hofman I, Haier J, Friedrich AW. Shiga toxin receptor Gb3Cer/CD77: tumor-association and promising therapeutic target in pancreas and colon cancer. *PLoS ONE*. 2009; 4: e6813.
32. Johansson D, Kosovac E, Moharer J, Ljuslinder I, Brannstrom T, Johansson A, et al. Expression of verotoxin-1 receptor Gb3 in breast cancer tissue and verotoxin-1 signal transduction to apoptosis. *BMC Cancer*. 2009; 9: 67 - 76.
33. Janssen KP, Vignjevic D, Boisgard D, Falguieres T, Bousquet G, Decaudin D, et al. In vivo tumor targeting using a novel intestinal pathogen-based delivery approach. *Cancer Research*. 2006; 66: 7230 - 7236.
34. Chandler WL, Jelacic S, Boster DR, Ciol MA, Williams GD, Watkins SL, et al. Prothrombotic coagulation abnormalities preceding the hemolytic-uremic syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 2002; 346: 23 - 32.
35. Chark D, Nutikka A, Trusevych N, Kuzmina J, Lingwood C. Differential carbohydrate epitope recognition of globotriaosyl ceramide by verotoxins and a monoclonal antibody. *European Journal of Biochemistry*. 2004; 271: 405 - 417.

36. De Petris L, Patrick J, Christen E, Trachtman H. Urinary podocyte mRNA excretion in children with D\_HUS: a potential marker of long-term outcome. *Renal Failure* 2006; 28: 475 - 482.
37. Ergonul Z, Clayton F, Fogo AB, Kohan DE. Shiga toxin-1 binding and receptor expression in human kidneys do not change with age. *Pediatric Nephrology*. 2003; 18: 246 - 225.
38. Pijpers AH, van Setten PA, van den Heuvel LP, Assmann KJ, Dijkman HB, Pennings AH, et al. Verocytotoxin-induced apoptosis of human microvascular endothelial cells. *Journal of American Society of Nephrology*. 2001; 12: 767 - 778.
39. Williams JM, Boyd B, Nutikka A, Lingwood CA, Barnett Foster DE, Milford DV, et al. A comparison of the effects of verocytotoxin-1 on primary human renal cell cultures. *Toxicology Letters*. 1999; 105: 47 - 57.
40. Chaisri U, Nagata M, Kurazono H, Horie H, Tongtawe P, Hayashi H, Localization of Shiga toxins of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in kidneys of paediatric and geriatric patients with fatal haemolytic uraemic syndrome. *Microbial Pathogenesis*. 2001; 31: 59 - 67.
41. Kaneko K, Kiyokawa N, Ohtomo Y, Nagaoka R, Yamashiro Y, Taguchi T, et al. Apoptosis of renal tubular cells in Shiga-toxin-mediated hemolytic uremic syndrome. *Nephron* 2001; 87: 182 - 185.
42. Karpman D, Hakansson A, Perez MT, Isaksson C, Carlemalm E, Caprioli A, et al. Apoptosis of renal cortical cells in the hemolytic-uremic syndrome: *in vivo* and *in vitro* studies. *Infection and Immunity*. 1998; 66: 636 - 644.
43. Psocka MA, Obata F, Kolling GL, Gross LK, Saleem MA, Satchell SC, et al. Shiga Toxin 2 Targets the Murine Renal Collecting Duct Epithelium. *Infection and Immunity*. 2009; 77: 959 - 969.

44. Fenton RA and Knepper MA. Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium. *Physiological Reviews*. 2007; 87: 1083 - 1112.
45. Morigi M, Buelli S, Zanchi C, Longaretti L, Macconi D, Benigni A, et al. Shiga toxin-induced endothelin-1 expression in cultured podocytes autocrinally mediates actin remodeling. *American Journal of Pathology*. 2006; 169: 1965 - 1975.
46. Mundel P, Reiser J, Zuniga Mejia Borja A, Pavenstadt H, Davidson GR, Kriz W, et al. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Experimental Cell Research*. 1997; 236: 248 - 258.
47. Hughes AK, Stricklett PK, Schmid D, Kohan DE. Cytotoxic effect of Shiga toxin-1 on human glomerular epithelial cells. *Kidney International*. 2000; 57: 2350 - 2359.
48. Yaoita E, Kurihara H, Sakai T, Ohshiro K, Yamamoto T. Phenotypic modulation of parietal epithelial cells of Bowman's capsule in culture. *Cell Tissue Research*. 2001; 304: 339 - 349.
49. Yaoita E. and Yoshida Y. Polygonal epithelial cells in glomerular cell culture: podocyte or parietal epithelial origin? *Microscopy and Research Technique*. 2002; 57: 212 - 216.
50. Chandler W L, Jelacic S, Boster DR, Ciol MA, Williams GD, Watkins SL, et al. Prothrombotic coagulation abnormalities preceding the hemolytic-uremic syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 2002; 346: 23 - 32.
51. Karpman D, Hakansson A, Perez MT, Isaksson C, Carlemalm E, Caprioli A, et al. Apoptosis of renal cortical cells in the hemolytic-uremic syndrome: in vivo and in vitro studies. *Infection and Immunology*. 1998; 66: 636 - 644.
52. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996; 87: 1 - 13.

53. Hilkens J, Ligtenberg MJ, Vos HL, Litvinov SV. Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. *Trends in biochemical sciences*. 1992; 17: 359 - 363.
54. 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: 134 - 142.
55. 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: 1380 - 1389.
56. 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: 360 - 368.
57. 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: 2417 - 2426.
58. 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: 1221 - 1234.
59. de Brito Galvao JF, Nagode LA, Schenck PA, Chew DJ. Calcitriol, calcidiol, parathyroid hormone, and fibroblast growth factor-23 interactions in chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio)*. 2013; 23: 134 - 162.
60. 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: 1965 - 1975.
61. 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: 691 - 701.

62. 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: 43 - 57.
63. Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. *Journal of cell science*. 2008; 121: 3683 - 3692.
64. Filipović N, Vukojević K, Boćina I, Saraga M, Glavina Durdov M, et al. Immunohistochemical and electronmicroscopic features of mesenchymal-to-epithelial transition in human developing, postnatal and nephrotic podocytes. *Histochemistry and Cell Biology*. 2016; doi:10.1007/s00418-016-1507-7.
65. Humphreys BD, Duffield JS, Bonventre JV. Renal stem cells in recovery from acute kidney injury. *Minerva Urologica e Nefrologica*. 2006; 58: 329 - 337.
66. Chen FM, Jiang Xn, Shi JQ, Yan B, Ren DS, Gu J, et al. Influence and distribution of CD133 and CD34 antigen expression in proximal tubule epithelial cells during ischemia/reperfusion injury in rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2010; 90: 2864 - 2868.
67. Klein G, Langegger M, Goridis C, Ekblom P. Neural cell adhesion molecules during embryonic induction and development of the kidney. *Development*. 1988; 102: 749 - 761.
68. Takano K, Kawasaki Y, Imaizumi T, Matsuura H, Nozawa R, Tannji M, et al. Development of glomerular endothelial cells, podocytes and mesangial cells in the human fetus and infant. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2007; 212: 81 - 90.
69. Zola H and Swart B. The human leukocyte differentiation antigens (HLDA) workshops: the evolving role of antibodies in research, diagnosis and therapy. *Cell research*. 2005; 15: 691 - 694.
70. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010; 33: 657 - 670.
71. Simon RA and Wenzel SE. Introduction. The immunobiology of leukotriene inhibitors. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 1999; 17: 1 - 2.



72. Mantovani A, Casatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature reviews Immunology*. 2011; 11: 519 - 531.
73. Gonzalez-Amaro R and Sanchez-Madrid F. Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Critical reviews in immunology*. 1999; 19: 389 - 429.
74. Sela BA. Selectins: vascular adhesion molecules. *Harefuah*. 2000; 138: 1046 - 1050.
75. Dore M, Korthuis RJ, Granger DN, Entman ML, Smith CW. P-selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo. *Blood*. 1993; 82: 1308 - 1316.
76. Kiely JM, Hu Y, Garcia-Cardena G, Gimbrone MA. Lipid raft localization of cell surface E-selectin is required for ligation-induced activation of phospholipase C gamma. *The Journal of Immunology*. 2003; 171: 3216 - 3224.
77. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987; 84: 9238 - 9242.
78. Crutchfield KL, Shinde Patil VR, Campbell CJ, Parkos CA, Allport JR, Goetz DJ. CD11b/CD18b-coated microspheres attach to E-selectin under flow. *Journal of leukocyte biology*. 2000; 67: 196 - 205.
79. Kerr MA and Stocks SC. The role of CD15-(Le(X))-related carbohydrates in neutrophil adhesion. *The Histochemical journal*. 1992; 24: 811 - 826.
80. Oriol R, Le Pendu J, Mollicone R. Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. *Vox sanguinis*. 1986; 51: 161 - 171.
81. Walz G, Aruffo A, Kolanus W, Bevilacqua M, Seed B. Recognition By ELAM-1 Of The Sialyl-Lex Determinant On Myeloid And Tumor-Cells. *Science*. 1990; 250: 1132 - 1135.
82. Berg E, Robinson M, Mansson O, Butcher E, Magnani J. A Carbohydrate Domain Common To Both Sialyl Le(A) And Sialyl Le(X) Is Recognized By The Endothelial Cell

- Leukocyte Adhesion Molecule ELAM-1. *Journal of Biological Chemistry*. 1991; 266: 14869 - 14872.
83. Lawrence M and Springer T. Neutrophils Roll On E-Selectin. *Journal of Immunology*. 1993; 151: 6338 - 6346.
84. Abbassi O, Kishimoto T, McIntire L, Anderson D, Smith C. E-Selectin Support Neutrophil Rolling In-Vitro Under Conditions Of Flow. *Journal of Clinical Investigation*. 1993; 92: 2719 - 2730.
85. Mulligan M, Warner R, Rittershaus C, Thomas LJ, Ryan US, Foreman KE, et al. Endothelial targeting and enhanced antiinflammatory effects of complement inhibitors possessing Sialyl Lewis x Moieties. *Journal of Immunology*, 1999; 162 : 4952 - 4959.
86. Zen K, Cui LB, Zhang CY, Liu Y. Critical role of mac-1 sialyl lewis x moieties in regulating neutrophil degranulation and transmigration. *Journal of molecular biology*. 2007; 374: 54 - 63.
87. Cummings RD and McEver RP. C-type Lectins. In: Varki A CR, Esko JD, et al., editors.(ed.) *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press 2009.
88. 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. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276: 16100 - 16106.
89. Pang PC, Chiu PC, Lee CL, Chang LY, Panico M, Morris HR, et al. Human sperm binding is mediated by the sialyl-Lewis(x) oligosaccharide on the zona pellucida. *Science*. 2011; 333: 1761 - 1764.
90. Reymond N, d'Água BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature Reviews Cancer*. 2013; 13858 - 13870.

91. Glavaš D, Markotić A, Valić Z, Kovačić N, Palada I, Martinić R, et al. Expression of endothelial selectin ligands on human leukocytes following dive. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood). 2008; 233: 1181 - 1188.
92. 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: 293 - 300.
93. 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. *Journal of Immunology*. 2003; 171: 6105 - 6111.
94. 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: 1467 - 1476.
95. 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. *Journal of Immunology*. 1999; 162: 2353 - 2357.
96. Gonzales-Amaro R, Diaz- Gonzalez F, Sanchez-Madrid F. Adhesion molecules in inflammatory diseases. *Drugs*. 1998; 56: 977 - 988.
97. Horwitz AF. Integrins and health. *Scientific American*. 1997; 276: 68 - 75.
98. McDowall A, Inwald D, Leitinger B, Jones A, Liesner R, Klein N, et al. A novel form of integrin dysfunction involving beta1, beta2, and beta3 integrins. *The Journal of clinical investigation*. 2003; 111: 51 - 60.
99. Arnaout MA. Leukocyte adhesion molecules deficiency: its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response. *Immunological reviews*. 1990; 114: 145 - 180.

100. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002; 110: 673 - 687.
101. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. *The Journal of biological chemistry*. 2000; 275: 21785 - 21788.
102. Kalns J, Lane J, Delgado A, Scruggs J, Ayala E, Gutierrez E, et al. Hyperbaric oxygen exposure temporarily reduces Mac-1 mediated functions of human neutrophils. *Immunology letters*. 2002; 83: 125 - 131.
103. Diamond M, Staunton D, Marlin S, Springer T. Binding Of The Integrin MAC-1 (CD11b/CD18) To The 3rd Immunoglobulin-Like Domain Of ICAM-1 (CD54) And Its Regulation By Glycosylation. *Cell*. 1991; 65: 961 - 971.
104. Misugi E, Kawamura N, Imanishi N, Tojo S, Morooka S. Sialyl-Lewis-X Moiety On Rat Polymorphonuclear Leukocytes Responsible For Binding To Rat E-Selectin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995; 215: 547 - 554.
105. Markić J, Jerončić A, Polančec D, Bošnjak N, Markotić A, Mestrović J, et al. CD15s is a potential biomarker of serious bacterial infection in infants admitted to hospital. *European journal of pediatrics*. 2013; 172 : 1363 - 1369.
106. Režić-Mužinić N, Čikeš-Ćulić V, Božić J, Tičinović-Kurir T, Salamunić I, Markotić A. Hypercalcemia induces a proinflammatory phenotype in rat leukocytes and endothelial cells. *Journal of physiology and biochemistry*. 2013; 69: 199 - 205.
107. Lugli E, Roederer M, Cossarizza A. Data analysis in flow cytometry: the future just started. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2010; 77: 705 - 713.
108. Maecker HT, Nolan GP, Fathman CG. New technologies for autoimmune disease monitoring. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2010; 17: 322 - 328.

109. Peschel T, Sixt S, Beitz F, Sonnabend M, Muth G, Thiele H, et al. High, but not moderate frequency and duration of exercise training induces downregulation of the expression of inflammatory and atherogenic adhesion molecules. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation*. 2007; 14: 476 - 482.
110. 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. *Journal of Immunology*. 1997; 159: 943 - 951.
111. 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. *Journal of Immunology*. 1999; 162: 2353 - 2357.
112. Macgregor R and Shalit M. Neutrophil Function In Healthy Elderly Subjects. *Journals of Gerontology*. 1990; 45: 55 - 60.
113. Rebuck N, Gibson A, Finn A. Neutrophil Adhesion Molecules In Term And Premature Infants - Normal Or Enhanced Leukocyte Integrins But Defective L-Selectin Expression And Shedding. *Clinical and Experimental Immunology*. 1995; 101: 183 - 189.
114. Sacks G, Studena K, Sargent I, Redman C. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1998; 179: 80 - 86.
115. Takala A, Jousela I, Jansson S, Olkkola KT, Takkunen O, Orpana A, et al. Markers of systemic inflammation predicting organ failure in community-acquired septic shock. *Clinical Science*. 1999; 97: 529 - 538.
116. Lin R, Astiz M, Saxon J, Rackow E. Altered Leukocyte Immunophenotypes In Septic Shock - Studies Of HLA-DR, CD11b, CD14, and IL-2R Expression. *Chest*. 1993; 104: 847 - 853.

117. Takala A, Lahdevirta J, Jansson S, Vapalahti O, Orpana A, Karonen SL, et al. Systemic inflammation in hemorrhagic fever with renal syndrome correlates with hypotension and thrombocytopenia but not with renal injury. *Journal of Infectious Diseases*. 2000; 181: 1964 - 1970.
118. Kobold A, Tulleken J, Zijlstra J, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CG, et al. Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Medicine*. 2000; 26: 883 - 892.
119. Russwurm S, Vickers J, Meier-Hellmann A, Spangeberg P, Bredle D, Reinhart K, et al. Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock*. 2002; 17: 263 - 268.
120. Chishti A, Shenton B, Kirby J, Baudouin S. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Medicine*. 2004; 30: 605 - 611.
121. Rosenbloom A, Pinsky M, Bryant J, Shin A, Tran T, Whiteside T. Leukocyte Activation In The Peripheral-Blood Of Patients With Cirrhosis Of The Liver And SIRS – Correlation With Serum Interleukin-6 Levels And Organ Dysfunction. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 1995; 274: 58 - 65.
122. Weirich E, Rabin R, Maldonado Y, Benitz W, Modler S, Herzenberg L. Neutrophil CD11b expression as a diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *Journal of Pediatrics*. 1998; 132: 445 - 451.
123. Nupponen I, Andersson S, Järvenpää AL, Kautiainen H, Repo H. Neutrophil CD11b expression and circulating interleukin-8 as diagnostic markers for early-onset neonatal sepsis. *Pediatrics*. 2001; 108: 12.
124. Genel F, Atlıhan F, Gulez N, Kazancı E, Vergin C, Terek DT, et al. Evaluation of adhesion molecules CD64, CD11b and CD62L in neutrophils and monocytes of

- peripheral blood for early diagnosis of neonatal infection. *World Journal of Pediatrics*. 2012; 8: 72 - 75.
125. Gadd MA, McClellan DS, Neuman TS, Hans-Brough JF. Effect of hyperbaric oxygen on murine neutrophil and T-lymphocyte functions. *Critical Care Medicine*. 1990; 18: 974 - 979.
126. Mellembakken JR, Aukrust P, Hestdal K, Ueland T, Abyholm T, Videm V. Chemokines and leukocyte activation in the fetal circulation during preeclampsia. *Hypertension*. 2001; 38: 394 - 398.
127. Edremitlioglu M, Kilic D, Oter S, Kisa U, Korkmaz A, Coskun O, et al. The effect of hyperbaric oxygen treatment on the renal functions in septic rats: relation to oxidative damage. *Surgery today*. 2005; 35: 653 - 661.
128. Park YS, Claybaugh JR, Shiraki K, Mohri M. Renal function in hyperbaric environment. *Applied human science : journal of physiological anthropology*. 1998; 17: 1 - 8.
129. Liu L, Mohammadi K, Aynafshar B, Wang H, Li D, Liu J, et al. Role of caveolae in signal-transducing function of cardiac Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *American journal of physiology Cell physiology*. 2003; 284: 1550 - 1560.
130. Markovic-Lipkovski J, Muller CA, Klein G, Flad T, Klatt T, Blaschke S, et al. Neural cell adhesion molecule expression on renal interstitial cells. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2007; 22: 1558 - 1566.
131. Acevedo LM, Londono I, Oubaha M, Ghitescu L, Bendayan M. Glomerular CD34 expression in short- and long-term diabetes. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2008; 56: 605 - 614.
132. Čikeš-Čulić V, Van Craenenbroeck E, Režić Mužinić N, Ljubković M, Marinović J, Conraads V, et al. Effects of scuba diving on vascular repair mechanisms. *Undersea &*

- hyperbaric medicine : journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc. 2014; 41: 97 - 104.
133. Madden LA, Christmas BC, Mellor D, Vince RV, Midgley AW, McNaughton LR, et al. Endothelial function and stress response after simulated dives to 18 msw breathing air or oxygen. *Aviation, space, and environmental medicine*. 2010; 81: 41 - 45.
  134. Dujčić Z, Valić Z, Brubakk AO. Beneficial role of exercise on scuba diving. *Exercise and sport sciences reviews*. 2008; 36: 38 - 42.
  135. Chamoto K, Gibney BC, Lee GS, Lin M, Collings-Simpson D, Voswinckel R, et al. CD34+ progenitor to endothelial cell transition in post-pneumonectomy angiogenesis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2012; 46: 283 - 289.
  136. Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood*. 2005; 105: 199 - 206.
  137. Jakob P and Landmesser U. Current status of cell-based therapy for heart failure. *Current heart failure reports*. 2013; 10: 165 - 176.
  138. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia - and cytokine - induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature medicine*. 1999; 5: 434 - 438.
  139. Van Craenenbroeck EM, Vrints CJ, Haine SE, Vermeulen K, Goovaerts I, Van Tendeloo VF, et al. A maximal exercise bout increases the number of circulating CD34+/KDR+ endothelial progenitor cells in healthy subjects. Relation with lipid profile. *Journal of Applied Physiology (1985)*. 2008; 104: 1006 - 1013.
  140. Adams V, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Sandri M, et al. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004; 24: 684 - 690.



141. Blatteis CM. Thermoregulation : Tenth International Symposium on the Pharmacology of Thermoregulation. New York: New York Academy of Sciences; 1997. xvi, 878 p. p.

## 10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Danka Đevenica (rođ. Vukasović)

Datum rođenja: 01.prosinac 1979.

Mjesto rođenja: Split, Hrvatska

Adresa: Pod križem 40, 20207 Mlini

Telefon: 0916020320

E-mail adrese: [dan\\_vukasovic@hotmail.com](mailto:dan_vukasovic@hotmail.com), d.devenica@gmail.com

### Obrazovanje

- Osnovna škola Stobreč
- IV gimnazija „Marko Marulić“ Split (1994-1998)
- Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (1998-2004)
- Diplomski rad „Modifikacija *in vitro* modela glikooksidacije za ispitivanje antioksidativnog učinka mokraćne kiseline i aminoguanidina“ u okviru CEEPUS HR-044 programa, izrađujem na Češkom Farmaceutskom Fakultetu u Hradec Kralove-u
- Praksa za vrijeme studija: Litva, Kaunas (bolnička ljekarna) 2002.
- 2005. Bas Pharmacy, London
- Poslijediplomski znanstveni studij Biologija novotvorina, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu (2007-2017)

#### Radovi:

- Enzyme activity and AGE formation in a model of AST glycoxidation by D-fructose *in vitro*, I.Boušova, D. Vukasović, D.Juretić, V.Palička, J.Dršata, *Acta Pharm.* 55 (2005) 107-114
- Biochemical, pathological and oncological relevance of Gb3Cer receptor, D.Đevenica, V.Čikeš-Čulić, A. Vuica, A.Markotić, *Medical oncology* 28 (2011), S1; S675-S684
- Hyperbaric environment upregulates CD15s expression on leukocytes, downregulates CD77 expression on renal cells and upregulates CD34 expression on pulmonary and cardiac cells in rat, D. Đevenica, A. Markotić, N. Režić-Mužinić, I. Jelaska, T. Zemunik, H. Delić, V. Čikeš Čulić, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* (2016), 19: 821-828

#### Sudjelovanja:

10. Kongres Hrvatskog društva biokemije i molekularne biologije, Opatija, Hrvatska 2010, poster izlaganje, sažetak u Zborniku: Hyperbaric environment downregulates renal CD77 expression in rat, D.Đevenica, V.Čikeš-Čulić, N. Režić, T.Zemunik, S.Dujić-Bilušić, A.Markotić

Jezici: engleski (FCS; First Certificate in English; University of Cambridge, 1997), talijanski

#### Članstva:

- 2004-2007 Internacionalno farmaceutsko studentsko udruženje (IPSF)

- Od 2006. godine članica Hrvatske ljekarničke komore

Ostalo

Zaposlena u struci od 10.05.2004. Trenutno živim i radim u Dubrovniku kao voditeljica ljekarničke jedinice u sustavu Zdravstvene ustanove Ljekarne Pablo.

## 11. DODATAK

Tablica 2. Usporedba postotaka različitih CD11b+ i CD15s+ leukocitnih subpopulacija u kontrolnoj skupini i skupini tretiranoj hiperbaričnim tretmanom

Leukociti	CD15s+CD11b-	CD15s+CD11b+	CD15s- CD11b+	Ukupni CD15s+	Ukupni CD11b+
Kontrola	1.71±1.11	2.90±1.38	4.42±2.32	4.51±2.42	7.32±3.98
HB 1.dan	23.42±2.85*	2.60±2.01	3.00±2.11	25.68±3.22*	5.25±0.75
HB 2.dan	26.53±1.20*	2.26±1.19	4.18±2.62	29.13±1.31*	6.78±1.45
HB 3.dan	16.97±2.89*	2.10±1.13	4.22±2.91	19.06±2.98*	6.32±2.64

Kontrola – skupina netretiranih štakora, HB – skupina tretiranih štakora

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± SD

\*označeni su statistički značajni rezultati  $P < 0.05$  (vs. kontrolna skupina)

Tablica 3. Usporedba postotaka CD77+CD34- stanica, CD77+CD34- stanica , CD77-CD34+ stanica, ukupnih CD77 pozitivnih te ukupnih CD34 pozitivnih stanica u suspenziji ukupnih bubrežnih stanica kontrolne skupine i tretirane skupine štakora

Bubrežne stanice	CD77+CD34-	CD77+CD34+	CD77-CD34+	Ukupni CD77+	Ukupni CD34+
Kontrola	1.74±0.65	14.61±6.51	8.77±4.18	16.35±5.5	23.24±8.38
HB	0.81±0.44*	3.67±1.22*	7.09±5.40	4.48±1.28*	10.76±6.32*

Kontrola – skupina netretiranih štakora, HB – skupina tretiranih štakora

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± SD

\*označeni su statistički značajni rezultati  $P < 0.05$  (vs. kontrolna skupina)

Tablica 4. Usporedba postotaka CD77+CD34- stanica, CD77+CD34+ stanica, CD77-CD34+ stanica, te ukupnih CD77 pozitivnih i CD34 pozitivnih stanica u suspenziji ukupnih stanica pluća kontrolne skupine i tretirane skupine štakora

Plućne stanice	CD77+CD34-	CD77+CD34+	CD77-CD34+	Ukupni CD77+	UkupniCD34+
Kontrola	1.52±0.96	1.89±2.36	1.38±1.07	3.41±2.11	3.27±2.01
HB	12.91±7.13*	10.62±5.80*	1.30±1.15	23.53±13.09*	11.92±6.22*

Kontrola – skupina netretiranih štakora, HB – skupina tretiranih štakora

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± SD

\*označeni su statistički značajni rezultati  $P < 0.05$  (vs. kontrolna skupina)

Tablica 5. Usporedba postotaka CD77+CD34- stanica, CD77+CD34+ stanica, CD77-CD34+ stanica, te ukupnih CD77 pozitivnih i CD34 pozitivnih stanica u suspenziji ukupnih stanica srčanog mišića kontrolne skupine i tretirane skupine štakora

Srčane stanice	CD77+CD34-	CD77+CD34+	CD77- CD34+	Ukupni CD77+	Ukupni CD34+
Kontrola	0.12±0.10	1.70±1.06	3.28±1.79	1.81±2.15	4.98±3.17
HB	0.14±0.12	8.05±4.24*	25.74±11.27*	8.19±4.29*	33.79±14.69*

Kontrola – skupina netretiranih štakora, HB – skupina tretiranih štakora

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± SD

\*označeni su statistički značajni rezultati  $P < 0.05$  (vs. kontrolna skupina)