

# Izražaj biljega CD15s na leukocitima štakora i biljega CD77 na štakorskom bubregu pod hiperbaričnim uvjetima

---

**Delić, Hrvoje**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2015**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:226689>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Hrvoje Delić**

**IZRAŽAJ BILJEGA CD15s NA LEUKOCITIMA ŠTAKORA I BILJEGA CD77  
NA ŠTAKORSKOM BUBREGU POD HIPERBARIČNIM UVJETIMA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Akadska godina:**

**2014./2015.**

**Mentor:**

**Doc.dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić**

**Split, srpanj 2015.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Hrvoje Delić**

**IZRAŽAJ BILJEGA CD15s NA LEUKOCITIMA ŠTAKORA I BILJEGA CD77  
NA ŠTAKORSKOM BUBREGU POD HIPERBARIČNIM UVJETIMA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Akadska godina:**

**2014./2015.**

**Mentor:**

**Doc.dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić**

**Split, srpanj 2015.**

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. STANIČNA MEMBRANA I GLIKOSFINGOLIPIDI.....	2
1.1.1. Građa stanične membrane .....	2
1.1.2. Struktura i organizacija glikosfingolipida.....	2
1.1.3. Funkcija glikosfingolipida .....	4
1.2. CD15s .....	6
1.3. CD11b.....	8
1.4. CD34.....	9
1.5. CD77.....	11
1.6. PROTOČNA CITOMETRIJA .....	13
1.7. HIPERBARIČNI TRETMAN .....	15
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	17
3. MATERIJALI I METODE .....	19
3.1. Protočna citometrija leukocita .....	20
3.2. Protočna citometrija stanica tkiva.....	21
3.3. Statistička analiza .....	21
4. REZULTATI.....	23
5. RASPRAVA.....	27
5.1. Utjecaj hiperbaričnog tretmana na leukocitne biljege CD11b i CD15s .....	28
5.2. Utjecaj hiperbaričnog tretmana na CD77 i CD34 biljege na bubrežnim stanicama.....	28
5.3. Utjecaj hiperbaričnog tretmana na CD77 i CD34 biljege na stanicama pluća .....	30
5.4. Utjecaj hiperbaričnog tretmana na CD77 i CD34 biljege na srčanim stanicama .....	30
6. ZAKLJUČCI.....	32
7. POPIS CITIRANE LITERATURE.....	34

8. SAŽETAK.....	43
9. ABSTRACT .....	45
10. ŽIVOTOPIS .....	47

*Zahvaljujem se svojoj dragoj mentorici doc.dr.sc. Vedrani Čikeš Čulić na velikoj količini strpljenja i razumijevanja tokom izrade diplomskog rada te na bezuvjetnoj podršci tijekom studija, savjetima i, iznad svega, prijateljstvu.*

*Hvala mojoj obitelji što je bila uz mene u najboljim i u najgorim trenucima.*

## **1. UVOD**

## **1.1. STANIČNA MEMBRANA I GLIKOSFINGOLIPIDI**

Sve stanice okružene su staničnom membranom – fosfolipidnim dvoslojem koji određuje stanične granice i odjeljuje njihov sadržaj od okoliša tj. oblikuje stabilnu barijeru između dvaju različitih vodenih odjeljaka (unutarstaničnog i izvanstaničnog prostora). Stanična membrana je nepropusna za većinu u vodi topljivih molekula, stoga ioni i većina bioloških molekula mogu prolaziti kroz staničnu membranu (bilo da ulaze u stanicu ili izlaze iz nje) zahvaljujući proteinima koji su odgovorni za selektivni prijenos molekula. Osim ovih transportnih proteina, na površini stanica se nalaze još i brojne druge molekule koje su uključene u međustaničnu signalizaciju odnosno služe kao senzori pomoću kojih stanica prima signale iz svog okoliša (1).

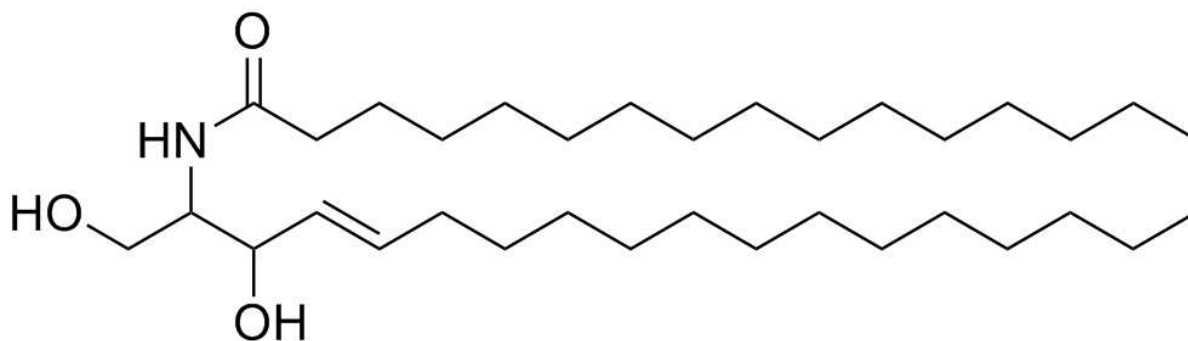
### **1.1.1. Građa stanične membrane**

Stanične membrane animalnih stanica građene su od fosfolipida, kolesterola, membranskih proteina i glikolipida. Kolesterol ima posebnu ulogu, ugrađujući se u dvosloj fosfolipida, održavanja stanične fluidnosti pri različitim temperaturama. Membranski proteini odgovorni su većinom za izvršavanje specifičnih membranskih funkcija, dok je uloga glikolipida sudjelovanje u mnogim biološkim funkcijama poput razvrstavanja proteina, membranske signalizacije, međustaničnog prepoznavanja te adhezije stanica. Dijelovi struktura glikolipida čine tkivno-specifične antigene te antigene krvnih grupa, a određene vrste imaju ulogu receptora za bakterijske toksine (npr. kolera-toksin) (1).

### **1.1.2. Struktura i organizacija glikosfingolipida**

Glikolipidi su lipidi koji sadržavaju masnu kiselinu te ugljikohidratni dio koji se nalaze isključivo u vanjskom sloju stanične membrane. S obzirom na lipidni dio, glikolipide dijelimo u dvije strukturalne kategorije: glikofosfolipide, koji imaju jezgru građenu od fosfatidilglicerola, te glikosfingolipide (GSL), koji su nastaju vezanjem ugljikohidrata na ceramidnu jezgru. Ceramid je građen od masne kiseline vezane amidnom vezom na dugolančani amino alkohol sfingozin (Slika 1), pa otuda potječe ime glikosfingolipidima (2). Sintetizira se u endoplazmatkom retikulumu kondenzacijom serina i acil-CoA te kao takav ima funkciju signalne molekule tzv. „drugog glasnika“. Njegova funkcija je da regulira stanične procese: stanični ciklus, diferencijaciju i starenje, no uglavnom djeluje protuproliferativno i izaziva apoptozu (3).





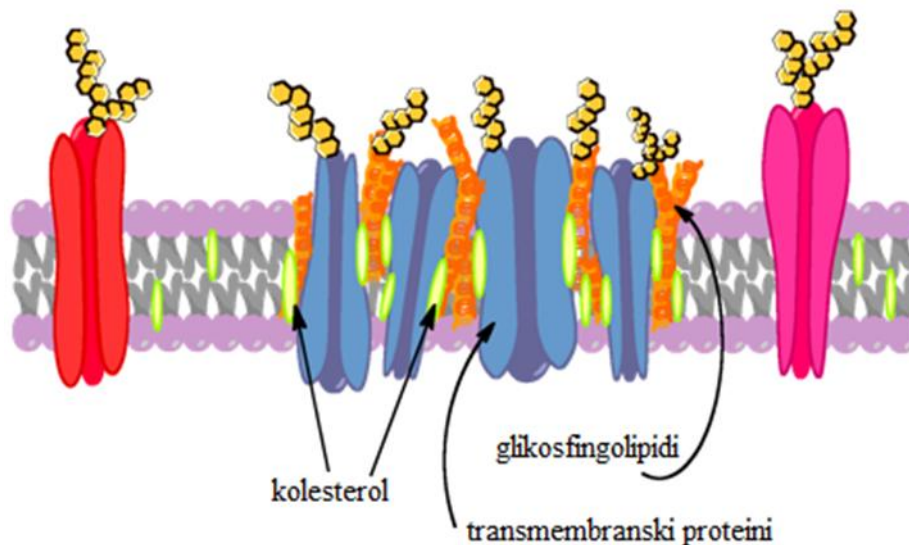
C16 - Ceramid

Slika 1. Kemijska struktura ceramida (preuzeto sa: <http://www.labmuffin.com/labmuffin/wp-content/uploads/2012/10/ceramide.png>)

Najjednostavniji GSL, poznati još i kao cerebrozidi, su galaktozilceramid (GalCer, koji nastaje vezanjem galaktoze na ceramid, a nalazi se većinom u neuralnim tkivima) te glukozilceramid (GlcCer, koji nastaje vezanjem glukoze na ceramid, a nalazi se većinom u ne-neuralnim tkivima) (3). Na temelju toga, GSL dijelimo u tri glavne skupine: neutralne GSL (bez nabijenih šećera ili ionskih grupa), ganglioze (koji nastaju iz GlcCer te su kiseli GSL koji sadržavaju sijalinsku kiselinu) i sulfatidi (koji nastaju sulfatiranjem GalCer) (4). Nadalje, možemo ih grupirati na temelju njihove sinteze, u jednu od četiri glavne strukturalne obitelji: ganglio-, globo-, lakto- i/ili neolakto- skupine (5, 6). Ove podgrupe glikosfingolipida su karakteristične za neka tkiva, pa se tako npr. ganglio-GSL, iako široko rasprostranjeni, najviše nalaze u mozgu, dok su neolakto-GSL česti na određenim hematopoetskim stanicama uključujući leukocite. Lakto-GSL izraženi su u sekretornim organima, dok globo-GSL u najvećem broju nalazimo na eritrocitima. Nomenklatura GSL temelji se na IUPAC-IUB preporuci (7) i Svennerholm-ovoj nomenklaturi (8).

Sinteza GSL započinje na luminalnoj strani membrane Golgijevog aparata. Nakon toga GSL prolaze kroz membranu bilo da difundiraju kroz nju, preskaču je ili prelaze kao monomeri. Oni nisu uniformno raspoređeni, već formiraju tzv. „lipidne splavi“ odnosno „glikosignalizirajuće domene“ na vanjskoj strani plazma membrane (Slika 2) (9). Iako je točna struktura lipidnih splavi upitna, za njihove izvanstanične komponente se vjeruje da su građene od sfingolipida, uključujući GSL i sfingomijelin. Osim sfingolipida, lipidne splavi su bogate kolesterolom i nekim proteinima, poput transmembranskih signalnih proteina, u

svojem hidrofobnom dijelu dok su na citoplazmatskoj strani povezani sa G proteinima odnosno tirozin-kinazom (10).



Slika 2. Prikaz građe lipidne splavi

### 1.1.3. Funkcija glikosfingolipida

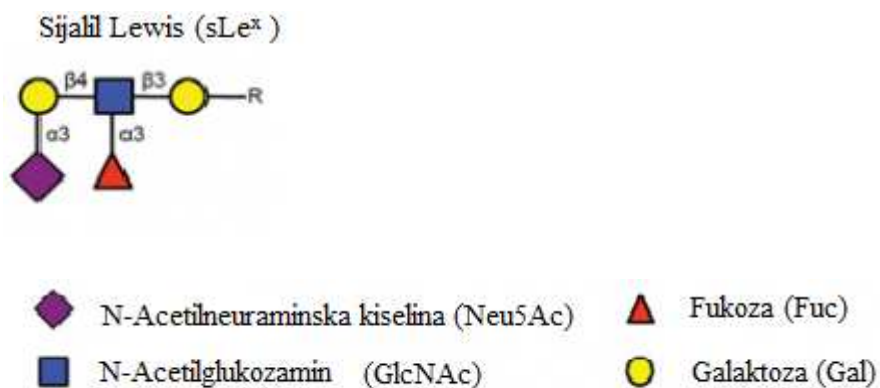
Glikosfingolipidi se primarno nalaze na vanjskom sloju fosfolipidnog dvosloja. Njihov ceramidni, hidrofobni dio uklopljen je u staničnu membranu, dok se glikani pružaju u izvanstanični prostor. Taj je položaj glavni uvjet za njihovo normalno funkcioniranje. Njihova funkcija dijeli se na dvije velike kategorije: međustaničnu interakciju te moduliranje aktivnosti proteina na staničnoj membrani iste stanice. Na jednostaničnoj razini, GSL nisu neophodni za život. Stanice bez njih mogu preživjeti, proliferiraju te čak imaju i sposobnost diferencijacije. Međutim, od iznimne su važnosti za razvoj cjelokupnog organizma. To najbolje pokazuje pokus na miševima kojima su oduzeti geni za GlcCer te se oni ne razvijaju dalje od gastrule zbog ekstenzivne apoptoze u embriju. Drugi primjer međustanične interakcije jest uloga GSL na leukocitima i njihovo adheriranje i konačno vezanje za endotel krvnih žila u procesu upale. Prva faza odgovora na upalu je upravo adhezija leukocita na endotel. Ova interakcija je posredovana glikan-vežućim proteinima, selektinima. Jedan od selektina, E-selektin koji je lociran na lipidnim splavima endotelnih stanica, veže se za GSL na leukocitima i time potpomaže u inicijalnom priljublivanju leukocita za endotelne stanice, nakon čega se oni mogu zaustaviti te migrirati na područje upale. Ova dva primjera pokazuju da su GSL iznimno važni za međustanično komuniciranje i koordinaciju u višestaničnih organizama (10). Osim ovoga, oni služe i kao receptori za bakterije, viruse i toksine. Jedan od

poznatijih primjera za ovo jest gangliozyd GM1, receptor za enterotoksin *V.cholerae*. (11). Ovaj receptor nam dokazuje da GSL imaju važnu ulogu u staničnom funkcioniranju i modulaciji aktivnosti staničnih proteina. Nakon što se kolera toksin veže za GM1, aktivira se G-protein vezan za receptor što dovodi do povećane aktivnosti adenilat ciklaze i posljedičnog povećanja cikličkog AMP-a. Kao drugi glasnik, ciklički AMP povećava propusnost staničnih CFTR proteina (engl. *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (koji su zapravo kloridni kanali) (12).

GSL služe i kao antigeni krvnih grupa, kao specifični stanični biljezi te kao CD molekule (engl. *Cluster of differentiation*). CD nazivlje je utemeljeno na Prvoj međunarodnoj radionici i konferenciji o humanim leukocitnim diferencijacijskim antigenima (engl. *1st International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens*). Ovaj sustav služi za klasifikaciju monoklonskih protutijela (mAb) koji djeluju na epitope koji se nalaze na površini leukocita. Određenoj molekuli na površini stanice se dodjeljuje CD broj nakon što se za nju vežu dva specifična monoklonska protutijela. Ako molekula pak ima samo jedno monoklonsko protutijelo ili nije dovoljno istražena, dodjeljuje joj se indikator „w“.

## 1.2. CD15s

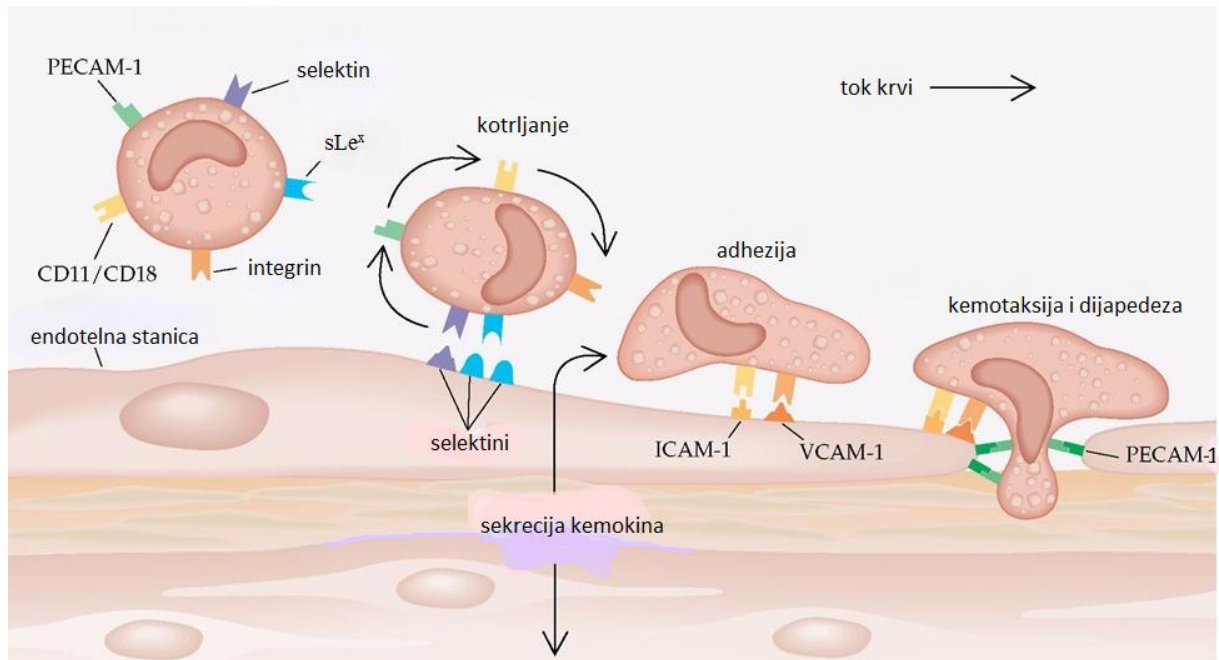
Leukociti, da bi izvršili svoju obrambenu funkciju, moraju prijeći iz krvotoka u tkivo, tj. u područje upale. Kao što je već navedeno, taj proces započinje njihovim priljublivanjem uz zid krvne žile te kotrljanjem po njenoj stijenci. U tom procesu sudjeluju određene molekule, kako na endotelu krvnih žila (E i P-selektini), tako i na staničnoj membrani leukocita (13). Biokemijskim ispitivanjima utvrđeno je da različiti glikoproteini prepoznaju E-selektin te se vežu za njega (PSGL-1, L-selektin, CD43, CD44 itd) (14). Svim ovim molekulama je zajedničko da na svojoj površini imaju izražene glikane tipa sijalil Lewis x, stoga se smatra da upravo ova molekula ima važnu ulogu u adheziji leukocita, tj. da ona služi kao ugljikohidratni ligand za E i P-selektin (15-19). Sijalil Lewis x ( $sLe^x$ , CD15s) je tetrasaharid i najmanji poznati ligand za selektine. On nastaje sijalizacijom distalne laktozaminske jedinice prije njene fukozilacije (20) (Slika 3).



Slika 3. Struktura sijalil Lewis x

Ova molekula je izražena na staničnim membranama monocita i granulocita, te vezanjem za endotelne selektine posreduje u adheziji leukocita na endotelne stanice. U istraživanjima na leukemijskim blastima nađeno je da su isti bili negativni za CD15 i slabo pozitivni za CD15s te da je, sazrijevanjem stanica prema zrelim oblicima, rastao i izražaj ovih molekula na staničnoj površini (21-23). Leukociti, pod utjecajem kemoatraktanata, povećavaju izražaj  $sLe^x$ . Oni se potom, došavši na mjesto upale, vežu slabim, reverzibilnim vezama za selektine. Obzirom da ta veza nije dovoljno jaka da se suprotstavi strujanju krvi, leukociti se nastavljaju kotrljati po endotelu neprestano stvarajući i razbijajući te veze. Nakon upalnog podražaja, dolazi do izražaja i drugih molekula na površinama leukocita i endotela

koje, stvarajući jače veze, u konačnici zaustavljaju leukocit i omogućuju njegovu ekstravazaciju (24) (Slika 4). Važnost ovog procesa dokazali su Zen i sur. koji su, inhibirajući sLe<sup>x</sup> specifičnim monoklonskim protutijelom, poremetili migraciju, indukciju agregacije neutrofila te indukciju oslobađanja njihovih sekundarnih granula (25). Osim na leukocitima, CD15s je najučestaliji ligand vezan za N-i O- glikane na zoni pellucidi jajnih stanica te sudjeluje u procesu oplodnje tj. vezanju spermija za jajnu stanicu (26).



Slika 4. Proces adhezije leukocita na endotelne stanice

### 1.3. CD11b

Integrini su velika obitelj staničnih površinskih  $\alpha\beta$  heterodimera koji su uključeni u interakcije koje se zbivaju između stanica te stanice i njenog okruženja.  $\beta 2$  integrini, koji imaju zajedničku  $\beta$ -podjedinicu ( $\beta 2$ , CD18), ali različite  $\alpha$ -podjedinice (CD11a, CD11b, CD11c i CD11d), važni su leukocitni receptori ne samo za funkciju leukocita već i za razvoj upalnog odgovora *in vivo* (27).

Integrin CD11b/CD18 ( $\alpha M\beta 2$ ), poznat i pod nazivima Mac-1 i komplement receptor tip 3 (CR3), je dominantni  $\beta 2$  integrinski receptor na neutrofilima, makrofagima i monocitima (28). Ovaj integrin ima posebnu ulogu u upalnom procesu, dijelom zajedno s integrinom CD11a (29), a njegovu biološku važnost za normalno funkcioniranje imunoloških procesa potvrđuju i različita patološka stanja gdje su integrini defektni ili nedostaju i u tih osoba njihov nedostatak uzrokuje životno ugrožavajuće infekcije. U bolesti nazvanoj Leukocitna adhezijska deficijencija tip 1 cirkulirajući neutrofili ne mogu adherirati ili migrirati preko endotela pa su bolesnici podložni ponavljajućim, životno ugrožavajućim bakterijskim infekcijama (30-32). Slično tome, pojačana aktivacija leukocitnih integrina uzrokuje stalno poticanje i održavanje upale, nastanak ishemijsko-reperfuzijske ozljede (akutno bubrežno zatajenje, aterosklerozu itd (32-34) i razvoj različitih autoimunih bolesti (35) te u konačnici dovodi do štetnih posljedica za zdravlje.

U mirujućim neutrofilima odraslih, većina CD11b/CD18 kompleksa pohranjena je i nalazi se uklopljena u membrane specifičnih granula i sekretornih vezikula, a samo je 5% izraženo na staničnoj površini. Nakon što proupalni podražaj dovede do stimulacije neutrofila, dolazi do pojačanog izražaja CD11b na njihovoj površini (36). Upravo zato uočavanje pojačanog izražaja CD11b može poslužiti kao pokazatelj da je nastupila aktivacija neutrofila (37, 38).

## 1.4. CD34

Obitelj CD34 površinskih staničnih transmembranskih proteina obuhvaća CD34 stanični antigen hematopoetskih prekursorskih stanica, podokaliksin (poznat i kao *podocalyxin-like protein 1*, PODXL) i endoglikan (poznat i kao *podocalyxin-like protein 2*, PODXL2) (39). CD34 je transmembranski fosfoglikoprotein izražen na pretečama hematopoetskih stanica i stanicama endotela krvnih žila, te se koristi kao biljeg u izolaciji i identifikaciji hematopoetskih stanica i prastanica u procesu pripreme za transplantaciju koštane srži (40). Danas se još koristi i kao biljeg u identifikaciji drugih tkivno-specifičnih matičnih stanica, poput mišićnih satelitskih stanica i preteča epidermalnih stanica.

Funkcije CD34 obitelji proteina još uvijek nisu u potpunosti razjašnjene iako im se pripisuje čitav niz različitih uloga. Smatra se da CD34 potiče staničnu proliferaciju i/ili blokira diferencijaciju prastanica, a podokaliksin i CD34 potiču migraciju hematopoetskih stanica. Podokaliksin igra ulogu u staničnoj morfogenezi. Zanimljivo je istaknuti da članovi CD34 obitelji ujedno potiču i blokiraju staničnu adheziju (41).

Najbolje istražena funkcija CD34 obitelji proteina jest limfocitna adhezija na krvožilni endotel i limfatička tkiva (42). Usprkos ovoj jasno istraženom ulozi u poticanju adhezije, druge studije ukazuju da CD34 proteini u većini slučajeva djeluju blokirajući adheziju, kao što je kod adhezije mastocita (43). Objašnjenje za ovakvo razilaženje vjerojatno se nalazi u jačini izražaja i učinku koje različite razine ovih proteina imaju na druge molekule. CD34 je vrlo dobro poznat po svom izražaju na stanicama hematopoetskog sustava i pretpostavlja se da je, u fiziološkim uvjetima, potreban za njihovu migraciju. Utvrđeno je da ima sličnu ulogu u poticanju i olakšavanju prometa mastocita i eozinofila u periferna tkiva (44). CD34 se smatra biljegom endotelno progenitornih stanica koje cirkuliraju u perifernoj krvi te tako obnavljaju stjenku krvnih žila (45). Postoji skupina necirkulirajućih zrelih endotelnih stanica koje su također CD34+, smještenih u malim krvnim žilama, dok je većina endotelnih stanica u velikim venama i arterijama CD34- (46). Rezultati istraživanja Beauchamp i suradnika pokazuju da CD34 ima važnu ulogu u regulaciji diferencijacije mišićnih progenitornih stanica (47).

Podokaliksin je neophodan za razvoj i održavanje strukture bubrežnih podocita. Ove epitelne stanice građene su od staničnog tijela s brojnim nastavcima te malih, interdigitalnih "nožica" koje se šire iz većih nastavaka. Apikalne površine staničnih tijela i nastavaka podocita prekrivene su podokaliksinom, a *Podxl* *-/-* miševi uopće nemaju razvijene "nožice"

podocita. U glomerularnoj strukturi podokaliksini potiče adheziju, dok na stanicama endotela krvnih žila blokira adheziju i pomaže imunostaničnu migraciju u limfne čvorove interakcijom sa L - selektinima cirkulirajućih limfocita, slično kao CD34 (48).

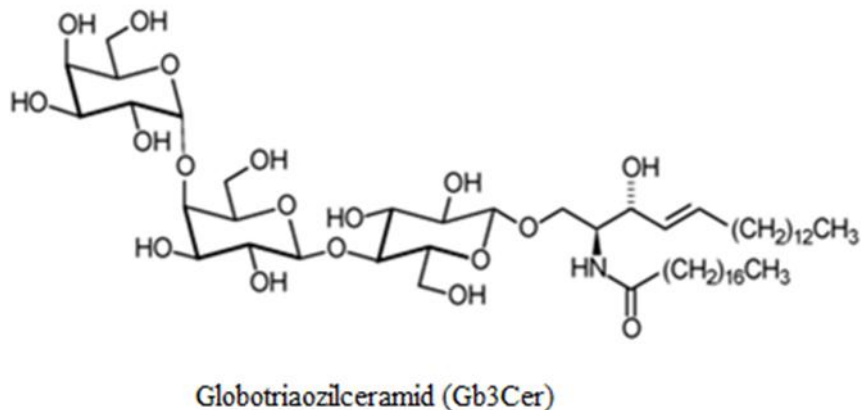
Fieger i suradnici 2003. godine objavili su da endoglikan, kao i druga dva člana CD34 obitelji, može funkcionirati kao L-selektin ligand (nakon posttranslacijske modifikacije), no on koristi drugačiji mehanizam vezanja, koji jako slični onome kod glikoproteinski ligand P-selektina tipa 1 (PSGL-1, eng. *P-selectin glycoprotein ligand-1*) (49).

Zbog svega navedenog, važno je istaknuti nužnost daljnjeg istraživanja koje će rasvijetliti točne uloge članova CD34 obitelji u različitim tkivima (50).



## 1.5. CD77

Kaveole endotelnih plazma membrana, pa tako i humanog bubrega i organa kardiovaskularnog sustava, bogate su neutralnim GSL, posebice globotriaozilceramidom, Gb3Cer ili CD77 (51, 52). Prilikom sinteze Gb3Cer na glukozilceramid veže se galaktoza djelovanjem  $\beta$ 1,4-galaktoziltransferaze i nastaje laktozilceramid, na koji  $\alpha$ 1,4-galaktoziltransferaza dodaje galaktozu i nastaje globotriaozilceramid (Slika 5).



Slika 5. Prikaz strukture globotriaosilceramida (Gb3Cer/CD77)

Gb3Cer/CD77 sudjeluje u patogenezi infekcija uzrokovanih *E. coli* 0157: H7 i *Shigella dysenteriae* tip 1, koje uzrokuju gastrointestinalne bolesti, uključujući i hemoragični kolitis, a mogu uzrokovati i hemolitičko uremijski sindrom (HUS, engl. *Hemolytic uremic syndrome*) koji je glavni uzrok akutnog bubrežnog zatajenja u djece (53). Toksin ovih bakterija, tj. Shiga-toxin (Stx), koji je glavni toksin u patofiziologiji HUS-a, djeluje na endotelne stanice krvnih žila (54) te dovodi do njihova oštećenja bilo inhibicijom sinteze proteina, stimuliranjem protrombotskih poruka/impulsa ili induciranjem apoptoze. Stx su trenutno najvažniji i najbolje okarakterizirani STEC (eng. *Shiga toxin-producing Escherichia coli*) virulentni čimbenici koji mogu uzrokovati mikrovaskularno endotelno oštećenje (55). Stx, također poznati kao verotoksini, nazvani su prema svom selektivnom citotoksičnom djelovanju na Vero-stanice, stanične loze epitela bubrežnih tubula afričkog zelenog majmuna.

Stx je član obitelji AB5 obitelji proteinskih holotoksina koji se sastoje od enzimske podjedinice (A) nekovalentnom vezom vezan za podjedinicu (B) koja se veže za njegov receptor Gb3Cer/CD77 na površini prijemljivih endotelnih stanica (56). Podjedinica B je pentamer odgovoran za stanično obilježavanje i unutarstanični prijenos holotoksina te može vezati od 10 do 15 molekula Gb3Cer (57). Vjeruje se da su oba dijela, i ugljikohidratni i

ceramidni dio, sidro receptora te da su važni za vezanje toksina. Dokazano je da duljina lanaca masnih kiselina Gb3Cer ima utjecaj na funkciju receptora, unutarstanično sortiranje i retro-translokaciju Stx u citosol i staničnu signalizaciju (58, 59). Nakon što se veže za receptor, verotoksin biva ubačen u stanicu. Retrogradnim transportom prolazi kroz Golgijev aparat te dolazi do ER-a gdje se proteolitički razdvaja podjedinica A od kompleksa receptor-toksin. Kada se odvoji, podjedinica A ispoljava svoj učinak, tj. inhibira sintezu proteina što u konačnici dovodi do smrti stanice (56).

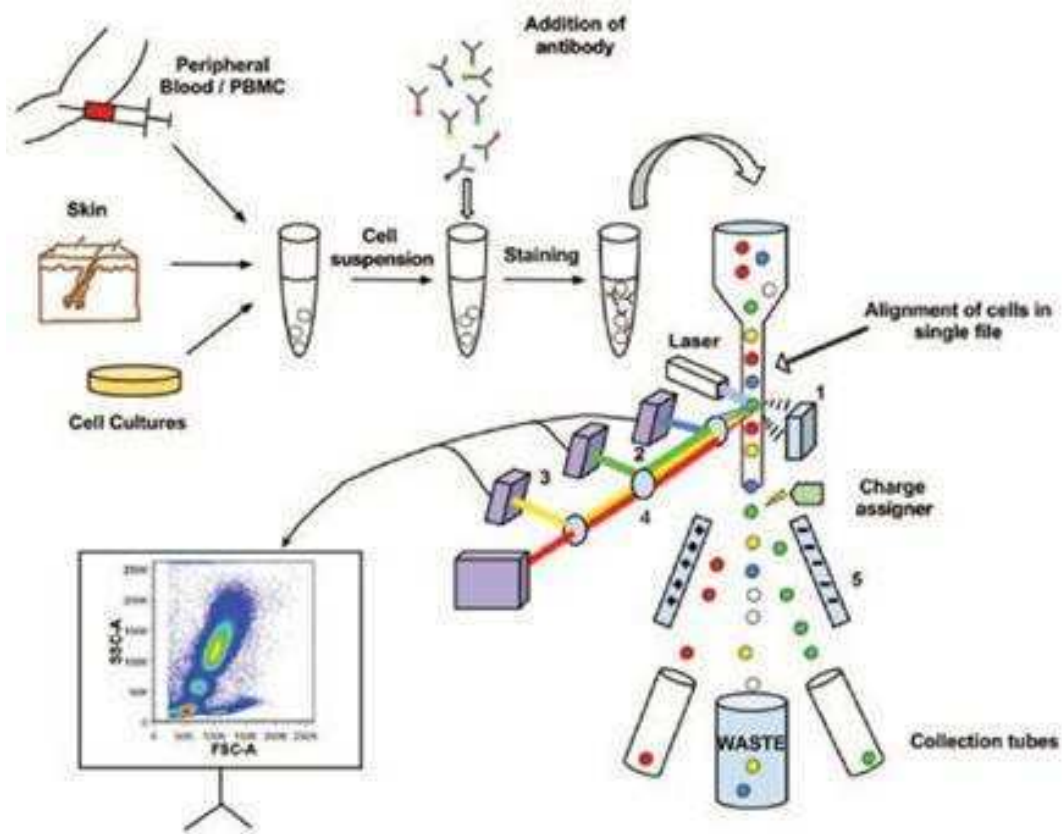
## 1.6. PROTOČNA CITOMETRIJA

Protočni citometar je uređaj koji se sastoji od 3 međusobno povezana sustava: protočnog, optičkog i elektronskog. Protočni sustav čine pokretačka tekućina, koja je nosač stanične suspenzije, stanična suspenzija i zračni potisak, a omogućuje da stanice iz stanične suspenzije pojedinačno laminarnom protokom kroz sustav uske kapilare dolaze do snopa laserskog svjetla. Lasersko svjetlo s lećama, filtrima i osjetnicima čini optički sustav. Stanice se obasjavaju laserskim svjetlom, a stupanj raspršenja svjetlosti iste valne duljine pokazatelj je fizičkih osobina stanica - veličine (svjetlost koja se raspršila pod malim kutom od 0,5-10°, FSC - prema engl. *forward scatter*) i zrnatosti (svjetlost raspršena pod pravim kutom - SSC, prema engl. *side scatter*). Dodatno obilježavanje stanica slobodnim ili (ponajčešće) za monoklonska protutijela vezanim fluorescentnim bojama (fluorokromima) rabi se za dodatno obilježavanje specifičnih staničnih struktura. Fluorokromi obasjani laserskom svjetlošću emitiraju svjetlost veće valne duljine od ulazne svjetlosti, a hvataju je specifični osjetnici (detektori) protočnog citometra. Najčešći fluorokromi koji se koriste su fikoeritrin (engl. *phycoerythrin*, PE) i fluorescein izotiocijanat (engl. *fluorescein-isothiocyanate*, FITC). Sve svjetlosne signale elektronski sustav pretvara u digitalne signale koji se prenose u elektroničko računalo i služe za analizu. Za definiciju staničnih populacija najčešće se koristi citogram veličine i zrnatosti stanica (FSC×SSC) na kojem se postavlja regija (R) analize oko ciljnih stanica iz kojih će se analizirati specifični fluorescentni signali. Upravo je to jedna od najvećih prednosti moderne protočne citometrije, budući 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), pa se na modernim citometrima istodobno može analizirati i do šezdesetak parametara (60).

Premda je do danas razvijen velik broj protočno-citometrijskih testova za analizu različitih staničnih obilježja i/ili funkcija, ona se još uvijek ponajviše rabi u cilju imunofenotipizacije, tj. obilježavanje specifičnih staničnih biljega. Od imunofenotipskih analiza posebno se izdvaja analiza limfocita periferne krvi u cilju ocjene imunološkog statusa, imunofenotipizacija leukemija i limfoma i praćenje ostalih malignih stanica (minimalne rezidualne bolesti), mjerenje broja CD34+ krvotvornih matičnih stanica u perifernoj krvi i leukocitnom koncentratu za potrebe transplantacije krvotvornih matičnih stanica, dijagnostika paroksizmalne noćne hemoglobinurije i mjerenje sadržaja stanične DNA u cilju otkrivanja

aneuploidija (najčešće u leukemijama) i proliferacijske aktivnosti stanica (za funkcijske testove limfocita ili procjenu proliferacije tumorskih stanica).

Tehnike protočne citometrije postaju sve važnije u suvremenoj kliničkoj medicini ponajviše zahvaljujući činjenici da ona omogućuje objektivnu, osjetljivu, brzu i točnu analizu relativno velikog broja staničnih svojstava. Iako je svoju primjenu našla i u drugim granama medicine, kao što su patologija, biokemija, mikrobiologija i interna medicina, najčešće se koristi u hematologiji i imunologiji (61) (Slika 6).



Slika 6. Princip rada protočne citometrije (preuzeto sa: [http://www.nature.com/jid/journal/v132/n10/fig\\_tab/jid2012282f1.html](http://www.nature.com/jid/journal/v132/n10/fig_tab/jid2012282f1.html))

## 1.7. HIPERBARIČNI TRETMAN

Hiperbarični tretman je proces u kojem se nastoji povećati otopljenost kisika u krvi udisanjem kisika pod tlakom koji je viši od atmosferskog. Danas se posebna grana medicine, hiperbarična medicina, bavi primjenom hiperbaričnog kisika u liječenju brojnih stanja (62).

97,5% kisika se u krvi prenosi hemoglobinom koji se nalazi u eritrocitima, a ostalih 2,5% je otopljeno u plazmi. Povećanjem atmosferskog tlaka, povećava se topljivost kisika u plazmi. Elementarni kisik neophodan je za održavanje staničnog disanja i sintezu staničnih proteina. Povećanjem koncentracije kisika otopljenog u plazmi povećava se i priljev kisika tkivima. Zbog tog svojstva, hiperbarični tretman se počeo koristiti u liječenju nekoliko bolesti. Kod trovanja ugljikovim monoksidom, zbog većeg afiniteta i ireverzibilnog vezanja monoksida za hemoglobin, eritrociti nisu u stanju prenositi dovoljno kisika tkivima pa se ovim postupkom nastoji održati normalna oksigenacija tkiva. Iz istog razloga koristi se i kod kroničnih rana koje ne zacjeljuju, rana kod dijabetičara, reperfuzijskih i iradijacijskih ozljeda itd. Kod dekompresijske bolesti, koja nastaje zbog prebrzog izrona ronioca s bocama, u krvi nastaju mjehurići plina. Primjenom hiperbaričnog zraka sprječava se nastanak tih mjehurića te se dopušta pacijentu da višak plina, koji se otopio u krvi, izdahne plućima i izbjegne nastanak dekompresijske bolesti. Nadalje, poznato je kako Hiperbarični tretman ima direktan toksični učinak i na neke anaerobne bakterije, poglavito na *Clostridium perfringens*, te se zbog toga počela koristiti u liječenju klostridijskih gangrena i nekrotizirajućeg fascitisa. Međutim, kod prevelikih doza, u dužem periodu vremena, kisik ispoljava i neke toksične učinke koji su povezani sa stvaranjem i oslobađanjem reaktivnih molekula poput superoksida, hidroksilnih radikala i vodikovog peroksida. Organizam čovjeka posjeduje mehanizme koji neutraliziraju ove visokoreaktivne spojeve (superoksid dismutaza, glutation i glutation reduktaza te katalaza), ali kao i svi mehanizmi, i oni imaju svoj maksimum djelovanja. Kada priljev kisika premaši njihove kapacitete, dolazi do oštećenja staničnih membrana, proteina i enzima (62).



Slika 7. Hiperbarična komora (preuzeto sa: <http://www.etcaerospacesolutions.com/wp-content/media/product/images/chamber-main.jpg>)

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog istraživanja je procijeniti utjecaj hiperbaričnog tretmana na izražaj biljega CD77 na endotelnim (CD34+) stanicama štakorskih bubrega, pluća i srca te proupalnih biljega CD11b i CD15s na leukocitima u usporedbi sa životinjama koje su bile uzgajane pri normalnim uvjetima.



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

U ovom radu je provedeno eksperimentalno istraživanje pri Katedri za medicinsku kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta u Splitu na mužjacima štakorskog soja Sprague-Dawley koji su uzgajani u kontroliranim uvjetima (temperatura  $22\pm 1^\circ\text{C}$ , 14h svjetlo/10h mrak) u Sveučilišnoj nastambi za pokusne životinje Sveučilišta u Splitu.

Hrana i vodovodna voda su davane *ad libitum*. Životinje su uzgajane i održavane sukladno Vodiču za njegu i korištenje laboratorijskih životinja, te je protokol odobren od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

4 tjedna stari štakori podijeljeni su u dvije grupe: ispitivanu skupinu ( $n=9$ ) koja je podvrgnuta hiperbaričnom tretmanu te netretiranu kontrolnu skupinu ( $n=5$ ). Tretirana skupina štakora ju bila izložena hiperbaričnom tlaku smjese zraka (21% kisik, 79% dušik), koji odgovara zaronu od 65 metara (7.5 ATA), u trajanju od 30 minuta. Dekompresijske pauze su bile 1 minuta na dubini od 15 metara, 7 min na 12 m, 10 min na 9 m, 23 min na 6 m i 47 min na 3 m, sukladno dekompresijskim tablicama Američke mornarice ([http://www.usu.edu/scuba/navy\\_manual6.pdf](http://www.usu.edu/scuba/navy_manual6.pdf)). Isti protokol se ponavljao sljedeća 2 dana. U izboru pravog protokola vodili smo se prethodnim rezultatima (63). Životinje su podvrgnute hiperbaričnim uvjetima u Comex hiperbaričnoj komori (Comex, Marseilles, Francuska). Razine kisika i ugljičnog dioksida u komori su kontrolirane Servomex 570A analizatorom kisika (Servomex, Houston, TX, SAD) te infracrvenim analizatorom ugljičnog dioksida (Infrared Industries inc., Santa Barbra, CA, SAD).

U ovoj studiji, metode pripreme uzoraka za protočnu citometriju, kao i protutijela, bila su u skladu s prethodnom studijom (64).

### **3.1. Protočna citometrija leukocita**

Uzorci krvi za protočnu citometriju su uzeti iz vene jugularis u vakumirane staklene epruvete sa EDTA antikoagulansom, jedan sat nakon hiperbaričnog tretmana, a prije žrtvovanja. Sto mikrolitara pune krvi je prvo tretirano sa FcR (Fc-receptor) blokerom (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka) u svrhu sprječavanja nespecifičnog vezanja te je inkubirano u mraku, na ledu, 30 minuta sa  $0.5\ \mu\text{g}$  primarnog protu-CD15s mišjeg protutijela (Pharmigen, San Diego, CA, SAD). Nakon dva ispiranja u  $0.1\ \text{M}$  PBS-u (otopina fosfatnog pufera, od engl. *phosphate buffer solution*) sa  $0.1\%$  natrijevim azidom, stanicama je dodano  $0.5\ \mu\text{g}$  sekundarnog FITC-konjugiranog kunićjeg protu-mišjeg protutijela (Pharmigen, San Diego, CA, SAD) te  $1\ \mu\text{g}$  PE-konjugiranog protutijela reaktivnog na CD11b (IQ Test, Beckman Coulter, Marseille, Francuska) i inkubirano u mraku na ledu 30 min. Nakon

hemolize eritrocita otopinom za liziranje (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Njemačka),  $10^5$  događaja je zabilježeno na Coulter Epics XL protočnom citometru (Beckman Coulter Corporation, Miami, SAD). Kao negativna kontrola korištene su fluorokrom-minus-jedan i isotipske kontrole kao i nebojane stanice. Analiza uzoraka provedena je na WinMDI 2.9 programu za analizu. Rezultati su prikazani kao postotak stanica koje pokazuju izražaj ispitivanih biljega.

### **3.2. Protočna citometrija stanica tkiva**

Nakon trećeg hiperbaričnog tretmana, štakori su žrtvovani produženim izlaganjem dietileteru te su bubrezi, pluća i srce izvađeni iz svih životinja. Tkiva su usitnjena škarama i inkubirana u 0.1 M otopini PBS-a s 0.1%-tnom (za bubrege) i 0.2%-tnom (za srce i pluća) kolagenazom tipa IA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka) u omjeru: 100 mg tkiva/5 mL kolagenaze u PBS-u. Stanične suspenzije su inkubirane 30 min/1 sat (bubreg/srce, pluća) na 37°C uz lagano miješanje. Nakon inkubacije, stanične suspenzije su filtrirane kroz najlonsku mrežicu širine pora 40  $\mu\text{m}$  (Cell Strainer, BD Biosciences, San Jose, CA, SAD) te je učinjena suspenzija stanica od  $1.0 \times 10^6$  stanica u 100  $\mu\text{L}$  0.1 M PBS. Monoklonska protu-CD34 protutijela konjugirana sa fikoeritrin cijaninom 5 (PC5, Beckman Coulter, Marseilles, Francuska) korištena su za detekciju CD34 pozitivnih stanica. Monoklonska protu-CD77 protutijela konjugirana sa FITC-om (BD Pharmingen, Erembodegem, Belgija) korištena su za detekciju CD77 pozitivnih stanica. Izolirane stanice su inkubirane u mraku 30 min na 4°C s dva protutijela za dvostruko obilježavanje: 1  $\mu\text{g}$  protu-CD34-PC5 i 1  $\mu\text{g}$  protu-CD77-FITC. Nakon 2 ispiranja u 0.1 M PBS-u, stanice su suspendirane u 0.3 mL 0.1 M PBS-u.  $10^5$  događaja je zabilježeno na Coulter Epics XL protočnom citometru (Beckman Coulter Corporation, Miami, SAD). Fluorokrom-minus-jedan kontrole kao i nebojane stanice su mjerene i obrađene kao negativne kontrole u svrhu postavljanja odgovarajućih regija. Analiza uzoraka je provedena na WinMDI 2.9 programu za analizu. Rezultati su prikazani kao postotak stanica koje pokazuju izražaj ispitivanih biljega.

### **3.3. Statistička analiza**

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Ukupni CD15s+ leukociti su definirani kao zbroj % CD11b-CD15s+ i % CD11b-CD15s+ leukocita. Ukupni CD11b leukociti su definirani kao zbroj % CD11b+CD15s+ i % CD11b+CD15s- stanica. Ukupne CD34+ stanice su definirane kao zbroj % CD34+-CD77- i % CD34+CD77+

stanica. Ukupne CD77+ stanice su definirane kao zbroj % CD34-CD77+ i % CD34+CD77+ stanica. Obzirom na relativno malen uzorak, neparametrijski Mann Whitney U test je korišten u svrhu testiranja značaja razlike između kontrolne i ispitivane skupine. Koeficijent podudarnosti je izračunat između varijabli: CD11b+ i CD15s+ leukocita i CD34+ i CD77+ tkivnih stanica. Svi rezultati se smatraju značajnima s 95%-tnom razinom značaja ( $P < 0.05$ ) te su dobiveni koristeći program Statistica 12.0 (StatSoft, SAD).

## **4. REZULTATI**

Tablica 1. Usporedba postotaka različitih CD11b+ i CD15s+ leukocitnih subpopulacija u kontrolnoj skupini i tretiranoj skupini

<b>Leukociti</b>	<b>CD15s+ CD11b-</b>	<b>CD15s+ CD11b+</b>	<b>CD15s- CD11b+</b>	<b>Ukupni CD15s+</b>	<b>Ukupni CD11b +</b>
<b>KONTROLA</b>	1.71±1.11	2.90±1.38	4.42±2.32	4.51±2.42	7.32±3.98
<b>HB 1.DAN</b>	23.42±2.85*	2.60±2.01	3.00±2.11	25.68±3.22*	5.25±0.75
<b>HB 2.DAN</b>	26.53±1.20*	2.26±1.19	4.18±2.62	29.13±1.31*	6.78±1.45
<b>HB 3.DAN</b>	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)

Postotci CD15s+CD11b- i ukupnih CD15s leukocita su značajno povišeni u skupini tretiranih štakora. Hiperbarični tretman nije značajno promijenio postotak ukupnih CD11b+ leukocita

Tablica 2. Usporedba postotaka CD77 pozitivnih ne-endotelnih (CD34-) stanica, CD77 pozitivnih i CD77 negativnih endotelnih (CD34+) stanica, ukupnih CD77 pozitivnih te ukupnih CD34 pozitivnih stanica u suspenziji ukupnih bubrežnih stanica kontrolne skupine i tretirane skupine štakora

<b>Bubrežne stanice</b>	<b>CD77+ CD34-</b>	<b>CD77+ CD34+</b>	<b>CD77- CD34+</b>	<b>Ukupni CD77+</b>	<b>Ukupni CD34+</b>
<b>KONTROLA</b>	1.74±0.65	14.61±6.51	8.77±4.18	16.35±5.5	23.24±8.38
<b>HB</b>	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)

Postotci CD77+CD34-, CD77+CD34+, ukupnih CD77+ i ukupnih CD34+ bubrežnih stanica štakora u tretiranoj skupini su bili značajno smanjeni u usporedbi sa kontrolnom skupinom. Hiperbarični tretman nije značajno promijenio postotak CD77-CD34+ stanica.

Tablica 3. Usporedba postotaka CD77 pozitivnih ne-endotelnih (CD34-) stanica, CD77 pozitivnih i CD77 negativnih endotelnih (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+	Ukupni CD34+
<b>KONTROLA</b>	1.52±0.96	1.89±2.36	1.38±1.07	3.41±2.11	3.27±2.01
<b>HB</b>	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)

Postotci CD77+CD34-, CD77+CD34+, ukupnih CD77+ i ukupnih CD34+ stanica pluća štakora u tretiranoj skupini su bili značajno povišeni u usporedbi sa kontrolnom skupinom. Hiperbarični tretman nije značajno promijenio postotak CD77-CD34+ stanica.

Tablica 4. Usporedba postotaka CD77 pozitivnih ne-endotelnih (CD34-) stanica, CD77 pozitivnih i CD77 negativnih endotelnih (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+
<b>KONTROLA</b>	0.12±0.10	1.70±1.06	3.28±1.79	1.81±2.15	4.98±3.17
<b>HB</b>	0.14±0.12	8.05±4.24*	25.74±11.27*	8.19±4.29*	33.79±14.69*

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± SD

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

Postotci CD77+CD34+, CD77-CD34+, ukupnih CD77+ i ukupnih CD34+ srčanih stanica štakora u tretiranoj skupini su bili značajno povišeni u usporedbi sa kontrolnom skupinom. Hiperbarični tretman nije značajno promijenio postotak CD77+CD34- stanica.

Tablica 5. Korelacija između udjela različitih leukocita i staničnih subpopulacija iz srca, pluća i bubrega

Tkivne stanične subpopulacije		Leukocitne populacije			
		Ukupni 11b+		Ukupni 15s+	
		<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
<b>Srčani</b>	<b>Ukupni 34+</b>	0.55	0.12	-0.28	0.46
	<b>Ukupni 77+</b>	0.64	0.06	-0.51	0.16
<b>Plućni</b>	<b>Ukupni 34+</b>	0.46	0.21	-0.30	0.43
	<b>Ukupni 77+</b>	0.24	0.53	-0.57	0.11
<b>Bubrežni</b>	<b>Ukupni 34+</b>	0.26	0.50	0.17	0.67
	<b>Ukupni 77+</b>	-0.17	0.67	0.29	0.45

Rezultati korelacijske analize između leukocitnih biljega CD11b i CD15s i tkivnih antigena CD34 i CD77 nisu pokazali statistički značaj.



## **5. RASPRAVA**

## **5.1. Utjecaj hiperbaričnog tretmana na leukocitne biljege CD11b i CD15s**

U ovoj studiji istraživana je učinak 3 ponavljana hiperbarična tretmana na postotak CD11b+ i CD15s+ leukocita. Postotci CD15s+CD11b- i ukupnih CD15s su značajno povišeni u hiperbaričnim tretmanom tretiranoj skupini štakora. Hiperbarični tretman nije promijenio postotak ukupnih CD11b+ leukocita (Tablica 1).

Pronađeno je da je izražaj aterogene adhezijske molekule, CD11b, snižen nakon visokointenzivne dugotrajne tjelovježbe (65). Granulocit-endotelna stanica adhezijski testovi su pokazali da je izražaj CD11b, velikog membranskog proteina dekoriranog CD15s molekulom (25), snižen nakon hiperbaričnog tretmana. Međutim, dobiveni podatci pokazuju nepromijenjen izražaj CD11b na leukocitima štakora nakon hiperbaričnog tretmana. Suprotni rezultati bi se mogli objasniti drugačijim uvjetima u običnom hiperbaričnom tretmanu nasuprot hiperbaričnoj oksigenaciji.

Rezultati statistički značajnog porasta CD15s+ leukocita nakon ponavljanih hiperbaričnih tretmana u skladu su sa prethodnim istraživanjima te rasvijetljavaju ulogu ovog proteina u akutnim upalnim stanjima. Postotci CD15s+CD11b- leukocita snizili su se drugog i trećeg dana, iako ne statistički značajno. Nakon velikog početnog povećanja postotka ukupnih CD15s+ leukocita nakon prvog i drugog hiperbaričnog tretmana, ovaj postotak se lagano smanjio nakon trećeg tretmana. Primjećen je nekoliko puta viši postotak ukupnih CD15s+ u usporedbi s ukupnim postotkom CD11b+ leukocita. Ovo bi mogla biti posljedica većeg afiniteta vezanja protu-CD15s protutijela na Sialyl Lewis x glikoepitop CD11b glikoproteina od afiniteta protu-CD11b protutijela na peptidni epitop Mac-1 na CD11b glikoproteinu. Rezultati ovog rada ukazuju na značaj CD15s kao glavnog proupalnog leukocitnog biljega te prezentiraju CD15s+ leukocite kao inteligentne stanice kritične za regulaciju upalnih procesa sa sposobnošću prilagođavanja ekstremnim uvjetima.

## **5.2. Utjecaj hiperbaričnog tretmana na CD77 i CD34 biljege na bubrežnim stanicama**

Bubrezi imaju važnu ulogu u održavanju homeostaze krvi. Edremitlioglu i sur. su pokazali da se bubrežna insuficijencija u sepsi poboljšala korištenjem hiperbarične oksigenacije te da je bila popraćena povećanjem antioksidativnih obrambenih mehanizama: superoksid dismutaze i katalaze u bubrežnoj kori, i povećanjem aktivnosti katalaze u srži bubrega (66). Utjecaj hiperbaričnog tretmana na zdrave bubrege do danas ostaje nepoznat.

Dnevno izlučivanje urina povećava se za 500 mL tijekom ronjenja s mješavinom zraka (do 3-49 ATA), unatoč nepromijenjenom unosu tekućine i brzini glomerularne filtracije (67). Nadalje, pokazano je da je Gb3 prekomjerno izražen u proliferirajućim endotelnim stanicama rastućih tumora u usporedbi sa stanicama u stanju mirovanja te bi mogao biti dobra alternativna meta za tumorsku imunoterapiju i inhibiciju angiogeneze (68). Ova studija pokazuje da su postotci CD77+CD34+ stanica bubrega štakora u skupini izloženoj hiperbaričnim uvjetima bili značajno niži nego u kontrolnoj skupini, kao i postotci ukupnih CD77+ stanica (Tablica 2). Uzevši u obzir činjenicu da se CD77 molekule nalaze pokraj Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP-aze u kaveolama bubrežnih epitelnih stanica (69), naši rezultati pokazuju moguću ulogu CD77 u mehanizmima odgovornim za razvoj hiperbarične diureze. Sukladno našim saznanjima, također smatramo da su pozitivni učinci hiperbarične oksigenacije kod renalne disfunkcije u sepsi uzrokovanoj *E.coli* (66) posredovani smanjenim postotkom CD77+ stanica.

U odraslim bubrezima, protutijela na CD34 označavaju gotovo sve endotelne stanice (70). Podocitna luminalna membrana sadrži i druge sijalomucine iz CD34 obitelji: podokaliksin i endoglin, čije funkcije nisu do kraja razjašnjene. Acevedo i sur. su prikazali povećan izražaj CD34 na glomerularnim stanicama starijih dijabetičnih životinja što upućuje na sudjelovanje CD34 u patogenezi glomerularnih promjena povezanih s dijabetesom i starošću (71). Samo jedan zaron akutno inducira vaskularni oksidativni stres uzrokujući prolaznu endotelnu disfunkciju. Progenitorne stanice endotela te cirkulirajuće angiogene stanice doprinose popravku endotela, bilo da se uklope u oštećeni endotel ili da izlučuju angiogene faktore rasta (72). Ova studija je, upravo suprotno, dokazala smanjenje postotka CD34+ bubrežnih stanica nakon ponavljanih hiperbaričnih tretmana. Smatra se da hiperoksijom inducirano stvaranje reaktivnih radikala kisika (ROS), smanjenje dostupnosti dušikovog oksida te direktna mehanička oštećenja endotela tijekom dekompresije imaju veliku ulogu u endotelnoj disfunkciji (73). Također se smatra da je ROS-om inducirana apoptoza bubrežnih CD34+ mogući mehanizam za njihovo sniženje. Dodatno, pokazano je u štakora da dekompresijska trauma akutno povećava razine interleukina-6 (74) stoga možemo pretpostaviti da otpuštanje proupalnih citokina kao odgovor na hiperbarični tretman može uzrokovati apoptozu u endotelnim stanicama bubrega.

### **5.3. Utjecaj hiperbaričnog tretmana na CD77 i CD34 biljege na stanicama pluća**

Dobro je poznato da je plućni epitel jedna od meta za Stxs te se smatra da Stx-om posredovane ozljede plućnih epitelnih stanica imaju važnu ulogu u patogenezi plućnih simptoma povezanih sa *E. coli* infekcijom (75). Prema rezultatima našeg istraživanja, hiperbarični tretman neće imati povoljan učinak na pluća u stanjima povezanim sa *E.coli* infekcijom jer se postotak ukupnih CD77+ stanica u plućnom tkivu povećao u skupini tretiranih štakora (Tablica 3).

Postotak ukupnih CD34+ stanica u plućnom tkivu se također povećao, stoga možemo pretpostaviti kako hiperbarični uvjeti potiču plućnu endotelnu angiogenezu. Nekoliko novijih studija pokazuje kako CD34+ endotelne progenitorne stanice iz krvi pridonose plućnoj angiogenezi. Zaključeno je da cirkulirajuće CD34+ progenitorne stanice, karakterizirane aktivnom staničnom diobom te pojačanom transkripcijom, prelaze u zrele endotelne stanice tijekom kompenzatornog rasta pluća. Neki autori raspravljaju o tome kako bi terapijsko manipuliranje ovim stanicama moglo biti blagotvorno u različitim plućnim bolestima (76). Naši rezultati povećanog postotka CD34+ plućnih stanica nakon hiperbaričnog tretmana podupiru hipotezu da endotelne progenitorne stanice igraju važnu ulogu u rastu pluća u fiziološkim i mnogim patofiziološkim stanjima.

### **5.4. Utjecaj hiperbaričnog tretmana na CD77 i CD34 biljege na srčanim stanicama**

Poznato je da i ishemija miokarda i periferna ishemija stimuliraju endogenu CD34+ staničnu mobilizaciju. Tokom mobilizacije, ove stanice teže prema ciljnim zonama ishemije gdje, smatra se, potpomažu angiogenezu bilo njihovim direktnim uklapanjem u novonastale krvne žile ili izlučivanjem angiogenih faktora rasta koji stimuliraju lokalni peri-endotelni razvoj krvnih žila (77, 78). Korištenje CD34+ stanica u liječenju ishemijskih bolesti srca je relativno nova metoda. Nekoliko istraživačkih skupina je pokazalo da nastup jedne maksimalne tjelovježbe izaziva povećanje u broju cirkulirajućih progenitornih endotelnih stanica i u zdravih ispitanika i u kardiovaskularnih bolesnika (79, 80). Visoko vaskularno oksidativno opterećenje koje nastupa u jednoj maksimalnoj tjelovježbi izaziva privremeno smanjenje endotelno-ovisne vazodilatacije, koja je praćena značajnim poboljšanjem nakon 12-24 h. Čini se da takav akutni period vaskularnog stresa potiče popravljачke mehanizme, uključujući mobilizaciju progenitornih endotelnih stanica, što bi mogao biti adekvatni fiziološki odgovor.

Ova studija je prva koja pokazuje utjecaj hiperbaričnog okoliša na CD34+ srčane stanice štakora. Otkriveno je značajno povećanje u postotku CD34+ srčanih stanica u štakora nakon hiperbaričnog tretmana, u usporedbi s kontrolnom skupinom (Tablica 4), koja je u skladu s prethodno opisanim popravljajkim mehanizmima hiperoksijom ozlijeđenog endotela.

Ova saznanja su jako zanimljiva te otvaraju široki spektar mogućih objašnjenja. Za sada, možemo jedino nagađati o povoljnom učinku hiperbaričnog tretmana u povećanju srčane angiogeneze kao i korištenju hiperbaričnih uvjeta kao moguće terapijske metode za ishemijsku bolest srca.

## **6. ZAKLJUČCI**

Temeljem istraživanja provedenog u ovom radu možemo donijeti slijedeće zaključke:

1. Postotci CD15s+CD11b- i ukupnih CD15s leukocita su značajno povišeni u skupini tretiranih štakora. Hiperbarični tretman nije značajno promijenio postotak ukupnih CD11b+ leukocita

2. Postotci CD77+CD34-, CD77+CD34+, ukupnih CD77+ i ukupnih CD34+ bubrežnih stanica štakora u tretiranoj skupini su bili značajno smanjeni u usporedbi sa kontrolnom skupinom. Hiperbarični tretman nije značajno promijenio postotak CD77-CD34+ stanica.

3. Postotci CD77+CD34-, CD77+CD34+, ukupnih CD77+ i ukupnih CD34+ stanica pluća štakora u tretiranoj skupini su bili značajno povišeni u usporedbi sa kontrolnom skupinom. Hiperbarični tretman nije značajno promijenio postotak CD77-CD34+ stanica.

4. Postotci CD77+CD34+, CD77-CD34+, ukupnih CD77+ i ukupnih CD34+ srčanih stanica štakora u tretiranoj skupini su bili značajno povišeni u usporedbi sa kontrolnom skupinom. Hiperbarični tretman nije značajno promijenio postotak CD77+CD34- stanica.

5. Rezultati korelacijske analize između leukocitnih biljega CD11b i CD15s i tkivnih antigena CD34 i CD77 nisu pokazali statistički značaj.

## **7. POPIS CITIRANE LITERATURE**



1. Cooper GM, Hausman RE. Stanična membrana. U: Stanica: Molekularni pristup. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 529-69.
2. Taylor ME, Drickamer K. Glycolipids and membrane protein glycosylation. U: Introduction to glycobiology. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2006. str. 69-85.
3. Botham KM. Metabolizam acilglicerola i sfingolipida. U: Murray RK. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 205-11.
4. Botham KM. Fiziološki značajni lipidi. U: Murray RK. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 121-30.
5. Kolter T, Doering T, Wilkening G, Werth N, Sandhoff K. Recent advances in the biochemistry of glycosphingolipid metabolism. Biochemical Society transactions. 1999;27(4):409-15. Epub 2000/08/05.
6. Hakomori SI. Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends. Biochimica et biophysica acta. 2008;1780(3):325-46. Epub 2007/11/03.
7. IUPAC-IUB joint commission on biochemical nomenclature (JCBN) nomenclature of glycolipids recommendations 1997. Journal of molecular biology. 1999;286(3):963-70. Epub 1999/02/20.
8. Svennerholm L. Chromatographic Separation of Human Brain Gangliosides. Journal of neurochemistry. 1963;10:613-23. Epub 1963/09/01.
9. Reuter G, Kelm S, Schauer R. Chemistry and biology of cell surface glycoconjugates. Acta histochemica Supplementband. 1988;36:51-79. Epub 1988/01/01.
10. Schnaar RL, Suzuki A, Stanley P. Glycosphingolipids. U: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al.. Essentials of Glycobiology. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY)2009.
11. Fishman PH. Role of membrane gangliosides in the binding and action of bacterial toxins. The Journal of membrane biology. 1982;69(2):85-97. Epub 1982/01/01.
12. Bharati K, Ganguly NK. Cholera toxin: a paradigm of a multifunctional protein. The Indian journal of medical research. 2011;133:179-87. Epub 2011/03/19.
13. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. Annual review of physiology. 1995;57:827-72. Epub 1995/01/01.
14. Kotovuori P, Tontti E, Pigott R, Shepherd M, Kiso M, Hasegawa A, et al. The vascular E-selectin binds to the leukocyte integrins CD11/CD18. Glycobiology. 1993;3(2):131-6. Epub 1993/04/01.

15. 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(4984):1132-5. Epub 1990/11/23.
16. Berg EL, Robinson MK, Mansson O, Butcher EC, Magnani JL. A carbohydrate domain common to both sialyl Le(a) and sialyl Le(X) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(23):14869-72. Epub 1991/08/15.
17. Lawrence MB, Springer TA. Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol*. 1993;151(11):6338-46. Epub 1993/12/01.
18. Abbassi O, Kishimoto TK, McIntire LV, Anderson DC, Smith CW. E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *The Journal of clinical investigation*. 1993;92(6):2719-30. Epub 1993/12/01.
19. Mulligan MS, Warner RL, Rittershaus CW, Thomas LJ, Ryan US, Foreman KE, et al. Endothelial targeting and enhanced antiinflammatory effects of complement inhibitors possessing sialyl Lewisx moieties. *J Immunol*. 1999;162(8):4952-9. Epub 1999/04/14.
20. Nakayama F, Nishihara S, Iwasaki H, Kudo T, Okubo R, Kaneko M, et al. CD15 expression in mature granulocytes is determined by alpha 1,3-fucosyltransferase IX, but in promyelocytes and monocytes by alpha 1,3-fucosyltransferase IV. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(19):16100-6. Epub 2001/03/30.
21. Clarke JL, Watkins W. Alpha1,3-L-fucosyltransferase expression in developing human myeloid cells. Antigenic, enzymatic, and mRNA analyses. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(17):10317-28. Epub 1996/04/26.
22. Skacel PO, Edwards AJ, Harrison CT, Watkins WM. Enzymic control of the expression of the X determinant (CD15) in human myeloid cells during maturation: the regulatory role of 6-sialyltransferase. *Blood*. 1991;78(6):1452-60. Epub 1991/09/15.
23. Terstappen LW, Safford M, Loken MR. Flow cytometric analysis of human bone marrow. III. Neutrophil maturation. *Leukemia*. 1990;4(9):657-63. Epub 1990/09/01.
24. Janeway C. *Host Defence Against Infection*. U: Immunobiology. 4th ed. London, New York: Elsevier Science Ltd/Garland Publishing; 1999. str. 363-415.
25. 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(1):54-63. Epub 2007/10/09.

26. 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(6050):1761-4. Epub 2011/08/20.
27. Simon DI, Dhen Z, Seifert P, Edelman ER, Ballantyne CM, Rogers C. Decreased neointimal formation in Mac-1(-/-) mice reveals a role for inflammation in vascular repair after angioplasty. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(3):293-300. Epub 2000/02/17.
28. Arnaout MA, Todd RF, 3rd, Dana N, Melamed J, Schlossman SF, Colten HR. Inhibition of phagocytosis of complement C3- or immunoglobulin G-coated particles and of C3bi binding by monoclonal antibodies to a monocyte-granulocyte membrane glycoprotein (Mol). *The Journal of clinical investigation*. 1983;72(1):171-9. Epub 1983/07/01.
29. Dunne JL, Collins RG, Beaudet AL, Ballantyne CM, Ley K. Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF-alpha-induced inflammation. *J Immunol*. 2003;171(11):6105-11. Epub 2003/11/25.
30. Horwitz AF. Integrins and health. *Scientific American*. 1997;276(5):68-75. Epub 1997/05/01.
31. 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(1):51-60. Epub 2003/01/04.
32. Arnaout MA. Leukocyte adhesion molecules deficiency: its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response. *Immunological reviews*. 1990;114:145-80. Epub 1990/04/01.
33. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002;110(6):673-87. Epub 2002/09/26.
34. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(29):21785-8. Epub 2000/05/10.
35. Tang T, Rosenkranz A, Assmann KJ, Goodman MJ, Gutierrez-Ramos JC, Carroll MC, et al. A role for Mac-1 (CD11b/CD18) in immune complex-stimulated neutrophil function in vivo: Mac-1 deficiency abrogates sustained Fc gamma receptor-dependent neutrophil adhesion and complement-dependent proteinuria in acute glomerulonephritis. *The Journal of experimental medicine*. 1997;186(11):1853-63. Epub 1998/01/07.
36. Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA, Borregaard N. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *The Journal of clinical investigation*. 1993;92(3):1467-76. Epub 1993/09/01.

37. Repo H, Rochon YP, Schwartz BR, Sharar SR, Winn RK, Harlan JM. Binding of human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes to E-selectin (CD62E) does not promote their activation. *J Immunol.* 1997;159(2):943-51. Epub 1997/07/15.
38. Vuorte J, Lindsberg PJ, Kaste M, Meri S, Jansson SE, Rothlein R, et al. Anti-ICAM-1 monoclonal antibody R6.5 (Enlimomab) promotes activation of neutrophils in whole blood. *J Immunol.* 1999;162(4):2353-7. Epub 1999/02/11.
39. Hilkens J, Ligtenberg MJ, Vos HL, Litvinov SV. Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. *Trends in biochemical sciences.* 1992;17(9):359-63. Epub 1992/09/01.
40. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* 1984;133(1):157-65. Epub 1984/07/01.
41. Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. *Journal of cell science.* 2008;121(Pt 22):3683-92. Epub 2008/11/07.
42. Krause DS, Ito T, Fackler MJ, Smith OM, Collector MI, Sharkis SJ, et al. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood.* 1994;84(3):691-701. Epub 1994/08/01.
43. Drew E, Merzaban JS, Seo W, Ziltener HJ, McNagny KM. CD34 and CD43 inhibit mast cell adhesion and are required for optimal mast cell reconstitution. *Immunity.* 2005;22(1):43-57. Epub 2005/01/25.
44. Kelley TW, Huntsman D, McNagny KM, Roskelley CD, Hsi ED. Podocalyxin: a marker of blasts in acute leukemia. *American journal of clinical pathology.* 2005;124(1):134-42. Epub 2005/06/01.
45. Brenes RA, Bear M, Jadlowiec C, Goodwin M, Hashim P, Protack CD, et al. Cell-based interventions for therapeutic angiogenesis: review of potential cell sources. *Vascular.* 2012;20(6):360-8. Epub 2012/10/23.
46. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood.* 1990;75(12):2417-26. Epub 1990/06/15.
47. Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, et al. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *The Journal of cell biology.* 2000;151(6):1221-34. Epub 2000/12/21.

48. Sassetti C, Tangemann K, Singer MS, Kershaw DB, Rosen SD. Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD34. *The Journal of experimental medicine*. 1998;187(12):1965-75. Epub 1998/06/24.
49. Fieger CB, Sassetti CM, Rosen SD. Endoglycan, a member of the CD34 family, functions as an L-selectin ligand through modification with tyrosine sulfation and sialyl Lewis x. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(30):27390-8. Epub 2003/08/02.
50. He XY, Antao VP, Basila D, Marx JC, Davis BR. Isolation and molecular characterization of the human CD34 gene. *Blood*. 1992;79(9):2296-302. Epub 1992/05/01.
51. Bauwens A, Bielaszewska M, Kemper B, Langehanenberg P, von Bally G, Reichelt R, et al. Differential cytotoxic actions of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2 on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Thrombosis and haemostasis*. 2011;105(3):515-28. Epub 2010/12/08.
52. Betz J, Bielaszewska M, Thies A, Humpf HU, Dreisewerd K, Karch H, et al. Shiga toxin glycosphingolipid receptors in microvascular and macrovascular endothelial cells: differential association with membrane lipid raft microdomains. *Journal of lipid research*. 2011;52(4):618-34. Epub 2011/01/22.
53. Lingwood CA. Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends in microbiology*. 1996;4(4):147-53. Epub 1996/04/01.
54. Bielaszewska M, Karch H. Consequences of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection for the vascular endothelium. *Thrombosis and haemostasis*. 2005;94(2):312-8. Epub 2005/08/23.
55. Brigotti M, Alfieri R, Sestili P, Bonelli M, Petronini PG, Guidarelli A, et al. Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells. *Faseb J*. 2002;16(3):365-72. Epub 2002/03/05.
56. Muthing J, Schweppe CH, Karch H, Friedrich AW. Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. *Thrombosis and haemostasis*. 2009;101(2):252-64. Epub 2009/02/05.
57. Ling H, Boodhoo A, Hazes B, Cummings MD, Armstrong GD, Brunton JL, et al. Structure of the shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3. *Biochemistry*. 1998;37(7):1777-88. Epub 1998/03/04.
58. Schnaar RL. Glycosphingolipids in cell surface recognition. *Glycobiology*. 1991;1(5):477-85. Epub 1991/11/01.
59. Boyd B, Magnusson G, Zhiuyan Z, Lingwood CA. Lipid modulation of glycolipid receptor function. Availability of Gal(alpha 1-4)Gal disaccharide for verotoxin binding in

natural and synthetic glycolipids. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1994;223(3):873-8. Epub 1994/08/01.

60. 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(7):705-13. Epub 2010/06/29.

61. Maecker HT, Nolan GP, Fathman CG. New technologies for autoimmune disease monitoring. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2010;17(4):322-8. Epub 2010/06/10.

62. Tibbles PM, Edelsberg JS. Hyperbaric-oxygen therapy. *The New England journal of medicine*. 1996;334(25):1642-8. Epub 1996/06/20.

63. Culic VC, Kurir TT, Radic S, Zemunik T, Mesaric M, Markotic A. Exposure to hyperbaric pressure alters ganglioside expression in rat liver following partial hepatectomy. *Period Biol*. 2005;107(2):267-9.

64. Rezic-Muzinic N, Cikes-Culic V, Bozic J, Ticinovic-Kurir T, Salamunic I, Markotic A. Hypercalcemia induces a proinflammatory phenotype in rat leukocytes and endothelial cells. *Journal of physiology and biochemistry*. 2013;69(2):199-205. Epub 2012/09/27.

65. Mogensen CE, Solling. Studies on renal tubular protein reabsorption: partial and near complete inhibition by certain amino acids. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 1977;37(6):477-86. Epub 1977/10/01.

66. 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(8):653-61. Epub 2005/07/22.

67. Park YS, Claybaugh JR, Shiraki K, Mohri M. Renal function in hyperbaric environment. *Applied human science : journal of physiological anthropology*. 1998;17(1):1-8. Epub 1998/05/12.

68. Desselle A, Chaumette T, Gaugler MH, Cochonneau D, Fleurence J, Dubois N, et al. Anti-Gb3 monoclonal antibody inhibits angiogenesis and tumor development. *PloS one*. 2012;7(11):e45423. Epub 2012/11/29.

69. 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(6):C1550-60. Epub 2003/02/28.

70. 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(6):1558-66. Epub 2007/03/06.

71. 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(6):605-14. Epub 2008/03/06.

72. Culic VC, Van Craenenbroeck E, Muzinic NR, Ljubkovic M, Marinovic 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(2):97-104. Epub 2014/05/24.

73. 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(1):41-5. Epub 2010/01/12.

74. Dujic Z, Valic Z, Brubakk AO. Beneficial role of exercise on scuba diving. *Exercise and sport sciences reviews*. 2008;36(1):38-42. Epub 2007/12/25.

75. Uchida H, Kiyokawa N, Taguchi T, Horie H, Fujimoto J, Takeda T. Shiga toxins induce apoptosis in pulmonary epithelium-derived cells. *The Journal of infectious diseases*. 1999;180(6):1902-11. Epub 1999/11/24.

76. 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(3):283-9. Epub 2011/09/17.

77. 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(1):199-206. Epub 2004/09/04.

78. 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(4):434-8. Epub 1999/04/15.

79. 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(4):684-90. Epub 2004/02/28.

80. 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. J Appl Physiol (1985). 2008;104(4):1006-13. Epub 2008/01/26.



## **8. SAŽETAK**

**CILJ ISTRAŽIVANJA:** Procijeniti mogući proupalni učinak hiperbaričnog tretmana u štakora određujući izražaj biljega CD11b i CD15s na leukocitima. Opisati promjene u izražaju biljega CD77 na štakorskim endotelnim (CD34+) stanicama bubrega, pluća i srca nakon izlaganja hiperbaričnom tlaku.

**MATERIJALI I METODE:** Eksperimentalno istraživanje provedeno je na Katedri za medicinsku kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta u Splitu. Mužjaci štakorskog soja Sprague-Dawley, starosti 4 tjedna bili su podijeljeni u 2 skupine: ispitivanu skupinu koja je podvrgnuta hiperbaričnom tretmanu (n=9) i netretiranu kontrolnu skupinu (n=5). Štakori su podvrgnuti hiperbaričnom tlaku smjese zraka koji odgovara dubini zarona od 65 m, u trajanju od 30 min. Tijekom tri dana, nakon izlaganja hiperbariji, štakorima je uzet uzorak krvi za određivanje leukocitnih biljega CD15s i CD11b protočnom citometrijom. Trećeg dana životinje su žrtvovane produljenom anestezijom dietileterom te su im nakon toga izvađeni bubrezi, srce i pluća. Pripremljene stanice bubrega, pluća i srca obilježene su protutijelima za CD34 i CD77 te su analizirane protočnom citometrijom. Za statističku obradu korišten je neparametrijski Mann Whitney U test.

**REZULTATI:** Postotci CD15s+CD11b- leukocita i ukupnih CD15s leukocita bili su značajno povišeni u skupini tretiranih štakora naspram kontrolne skupine. Postotak CD77+CD34- stanica bubrega štakora u ispitivanoj (HB) skupini bio je značajno manji nego u kontrolnoj skupini, kao i udio ukupnih CD77+ stanica. Uočeno je značajno smanjenje % CD77+CD34+ bubrežnih stanica u HB skupini u odnosu na kontrolnu skupinu. Ukupni udio CD34+ bubrežnih stanica bio je značajno povišen u odnosu na kontrolu. Postotak CD77+CD34-, % ukupnih CD77+, % CD77+CD34+, kao i % ukupnih CD34+ stanica pluća štakora u HB skupini bio je značajno viši nego u kontrolnoj skupini. Postotak ukupnih CD77+, % ukupnih CD34+, % CD77+CD34+, kao i % CD77-CD34+ stanica srca štakora u HB skupini bio je značajno viši nego u kontrolnoj skupini.

**ZAKLJUČAK:** Rezultati povećanog postotka leukocita koji imaju izražen CD15s, ligand za endotelni selektin, nakon hiperbaričnog tretmana, ukazuju na njegovu ulogu u prevenciji oštećenja endotela. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na moguću ulogu CD77 u mehanizmu odgovornim za razvoj hiperbarične diureze. Hiperbarični tretman značajno je povećao postotak plućnih i srčanih endotelnih stanica što može biti dio mehanizma popravka hiperoksijom ozlijeđenog endotela.

## **9. ABSTRACT**

**AIM OF RESEARCH:** To estimate the potential pro-inflammatory effect of hyperbaric treatment in rats by determination of CD11b and CD15s on leukocytes. To describe the changes in the expression of CD77 in rat's kidney, pulmonary and cardiac endothelial (CD34+) cells.

**MATERIALS AND METHODS:** Experimental research was conducted at Department for Medical Chemistry and Biochemistry, University of Split School of Medicine. Male Sprague-Dawley rats, 4 weeks old, were divided into 2 groups: the examination group, that undergone hyperbaric treatment (n=9) and untreated control group (n=5). The rats were exposed to hyperbaric pressure of air composition that equals the depth of immersion of 65 m, in duration of 30 min. During three days, after the treatment, a blood sample was collected from the rats for determination of leukocyte CD11b and CD15s markers. By the end of the third day from the beginning of hyperbaric treatment rats were sacrificed in prolonged anesthesia with diethylether and their kidneys, lungs and heart were extracted afterwards. Furthermore, prepared isolated renal, pulmonary and cardiac cells were incubated with antibodies for CD34 and CD77, and were analysed by flow cytometry. For statistical analysis non-parametric Mann Whitney U test was used.

**RESULTS:** The percentage of CD15s+CD11b- leukocytes and total CD15s leukocytes were significantly increased in examination group compared to control group. The percentage of CD77+CD34+ kidney cells in examination group was significantly lower compared to control group, as well as the percentage of total CD77+ cells. A significant decrease in % CD77+CD34+ kidney cells was observed in examination group compared to control group. Total share of CD34+ kidney cells was significantly higher compared to control group. The percentage of CD77+CD34-, % of total CD77+, % CD77+CD34+, as well as the % of total CD34+ pulmonary cells in examination group was significantly higher compared to control group. The percentage of total CD77+, % of total CD34+, % of CD77+CD34+, as well as % of CD77-CD34+ cardiac cells in examination group was significantly higher compared to control group.

**CONCLUSION:** The results of increased percentage of leukocytes that have CD15s, ligand for endothelial selectin, after hyperbaric treatment, suggest its role in the prevention of endothelial damage. The results of this experiment indicate a possible role of CD77 in the mechanism responsible for hyperbaric diuresis. Hyperbaric treatment significantly increased the percentage of pulmonary and cardiac endothelial cells which may be a part of hyperoxia-induced endothelial damage repair mechanism.

## **10. ŽIVOTOPIS**

**OPĆI PODACI:**

**Ime i prezime:** Hrvoje Delić

**Datum rođenja:** 20. rujna 1990.g.

**Adresa stanovanja:** Mosečka 18, Split

**Telefon:** 021/501-729

**Mobitel:** 091/934-7940

**E-mail:** [hrvojedelic20@gmail.com](mailto:hrvojedelic20@gmail.com)

**OBRAZOVANJE:**

1997 – 2005 Osnovna škola „Sućidar“, Split

2005 – 2009 Zdravstvena škola Split

2009 – 2015 Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

**AKTIVNOSTI:**

2011 – 2013 demonstrator na Katedri za medicinsku kemiju i biokemiju

2012. / 2013. demonstrator na Katedri za Medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju

2015 član studentske udruge CroMSIC

**OSTALO:**

Aktivno se služim engleskim i pasivno njemačkim jezikom