Izražaj biljega CD34 i CD77 na plazma membrani srčanih stanica hiperkalcijemičnih štakora

Knežević, Mirjana

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:176:585476

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

Repository of the University Department for Health Studies, University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
Podružnica
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Studentica: Mirjana Knežević

IZRAŽAJ MOLEKULE CD77 NA PLAZMA MEMBRANI CD34+ BUBREŽNIH STANICA HIPERKALCIJEMIČNIH ŠTAKORA

Završni rad

Split, 2014.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
Podružnica
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Studentica: Mirjana Knežević

IZRAŽAJ MOLEKULE CD77 NA PLAZMA MEMBRANI CD34+ BUBREŽNIH STANICA HIPERKALCIJEMIČNIH ŠTAKORA

Završni rad

Mentor:

Doc. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Splitu, srpanj 2014.

SADRŽAJ

1. UVOD

1.1. BUBREG ..... ….5

1.2. KALCIJ 7

1.3. FUNKCIJA BUBREGA U HOMEOSTAZI KALCIJA 8

1.4. GLIKOSFINGOLIPIDI 10

1.5. STRUKTURA I ORGANIZACIJA CD34 11

1.5.1. FUNKCIJA CD34……12

1.6. CD77……..13

1.7. PROTOČNA CITOMETRIJA……...14

2. CILJ RADA…….16

3. MATERIJALI I METODE……18

4. REZULTATI……...21

5. RASPRAVA……23

6. ZAKLJUČCI……...26

7. SAŽETAK……28

8. SUMMARY…….30

9. LITERATURA……32

10. ŽIVOTOPIS…….....35

Rad je izrađen na Medicinskom fakultetu, Sveučilišta u Splitu, u laboratoriju Katedre za medicinsku kemiju i biokemiju pod nadzorom doc.dr.sc Vedrane Čikeš Čulić u vremenskom razdoblju od ožujka do lipnja 2014. godine.

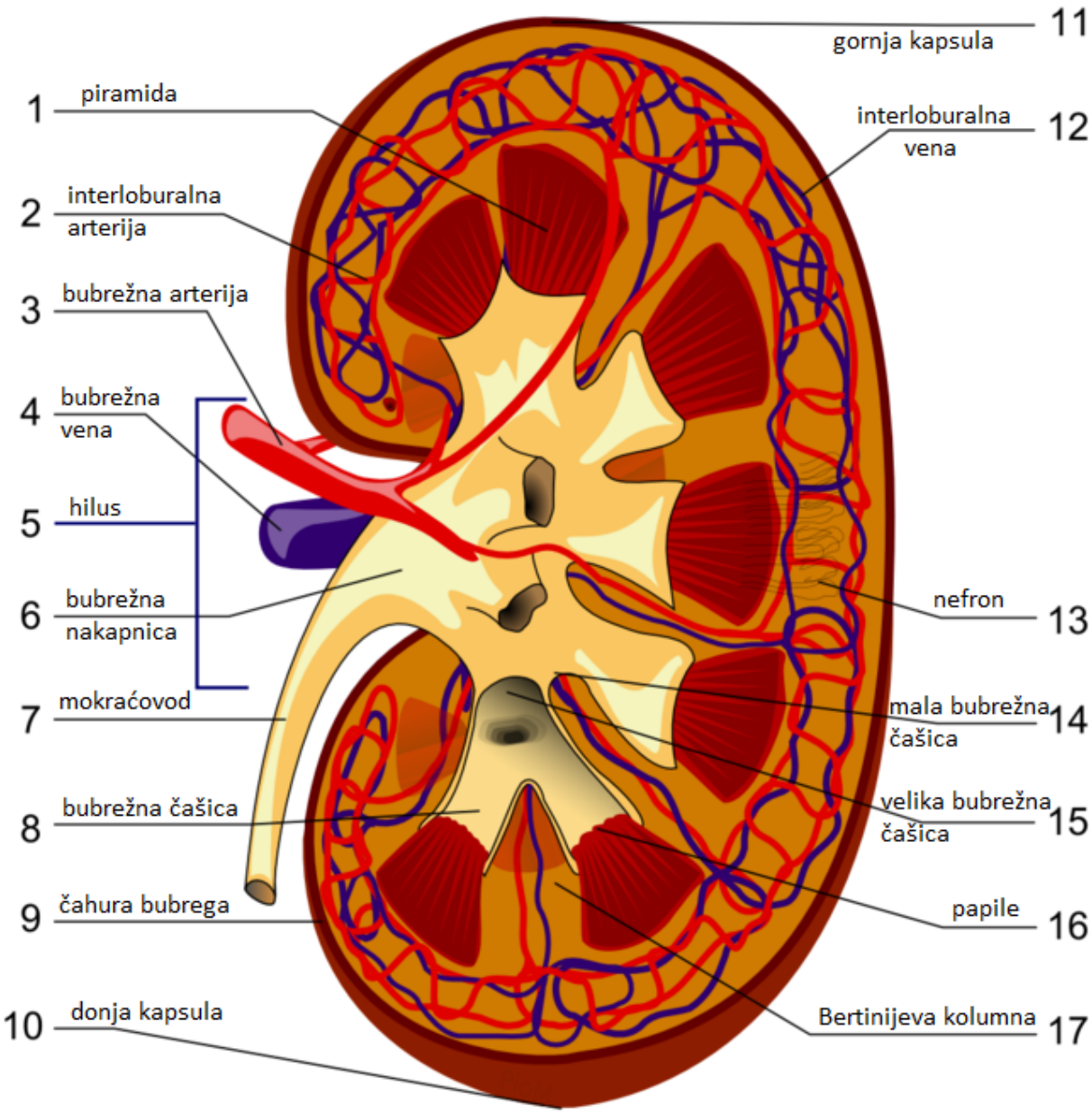
ZAHVALA

Zahvaljujem osoblju Katedre za medicinsku kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu za pomoć pri radu, a posebno hvala doc.dr.sc.Vedrani Čikeš Čulić na strpljenju, stručnoj pomoći i svim savjetima koje mi je pružila tijekom izrade ovog završnog rada.

1. UVOD

1.1. Bubreg

Bubreg je parni organ koji izlučuje mokraću. U odrasle osobe teži oko 120-200 grama, dužine je oko 11 cm, širine oko 5 cm, a debljine oko 3 cm. Smješten je retroperitonealno, gornja trećina leži na dijafragmi, na granici gornje i srednje trećine ukoso križa 12. rebro, dok je hilus bubrega u osobe u ležećem položaju u visini 2. lumbalnog kralješka. Uzdužna osovina bubrega položena je koso tako da su gornji polovi bliže od donjih. Desni bubreg leži malo niže od lijevog (1). Bubrežni parenhim je ovijen vezivnom čahurom koja se lako ljušti. Oko vezivne čahure nalazi se masna kapsula koja bubreg održava u normalom položaju. Preko masne kapsule nalazi se bubrežna fascija koja se sastoji od subperitonealnog tkiva, a koja ovija bubreg i nadbubrežnu žlijezdu koja je smještena uz gornji pol bubrega. Iznad fascije na prednjoj strani oba bubrega nalazi se peritoneum (1). Bubreg čine medula (lat. *medulla renis*) i kora (lat. *cortex renis*). Medularnu supstancu izgrađuju bubrežne piramide čija je baza okrenuta prema gore, a vrh prema hilusu. Kortikalna tvar se dijeli na dvije zone od kojih se pars radiata nastavlja na bazu piramide i sadržava ravne kanaliće koji dolaze iz piramida, a preostali gornji dio kore je pars convoluta i sadržava glomerule (Malpighijeva tjelešca) i zavijene kanaliće (1). Glomerul ili Malpighijevo tjelešce nastaje iz metanefrogenog tkiva, a sastoji se od mreže kapilara koja se utiskuje u tubularni sustav tako da nastaje omot dvostrukog zida koji se zove Bowmanova čahura. Visceralni list čahure čine podociti koji prekrivaju kapilarno klupko, a vanjski parijetalni list čine pločaste stanice.



Slika 1. Prikaz građe bubrega

1.2. Kalcij

Kalcij je građevni element u ljudskom tijelu (po definiciji, to su elementi koji sudjeluju u sustavu organizma u količini od više od 50 mg po kg tjelesne mase) te time ne spada u elemente u tragovima. S udjelom u prosječnom ljudskom organizmu od oko 1 do 1,1 kg, kalcij je po količini jedan od najzastupljenijih minerala u čovjeku. Oko 99% kalcija koji se u tijelu nalaze sadržan je u kostima i zubima. Kalcij je najvažniji parametar u dijagnostici izmjene tvari u kostima. Povećana koncentracija kalcija u krvi naziva se hiperkalcijemija, dok se suprotno stanje naziva hipokalcijemija. Hiperkalcijemija je poremećaj elektrolita kojeg karakterizira povišenje koncentracija kalcija u krvi. Normalne vrijednosti koncentracije kalcija u plazmi za odrasle su između 2.14 i 2.53 mmol/L. Nalaz povišene koncentracije kalcija može biti asimptomatski laboratorijski nalaz, a može biti i udružen s raznim bolestima. Do povišenja kalcija u krvi može doći zbog pojačanog otpuštanja kalcija iz kosti, pojačane apsorpcije iz probavnog sustava ili zbog smanjenog izlučivanja bubrezima.

1.3. Funkcija bubrega u homeostazi kalcija

Bubrežne promjene manifestiraju se recidivnom (ponavljajućom) pojavom nefrolitijaze (stvaranje bubrežnih kamenaca), nefrokalcinoze (odlaganje kalcija u bubrege i stvaranje kalcifikata) i oštećenjem bubrežne funkcije. Učestala je i hiperkalciurija, to jest pojačano izlučivanje kalcija putem mokraće.

Glavna je zadaća bubrega odstranjivanje otpadnih produkata metabolizma. Ukoliko bubrezi ne vrše svoju ulogu zbog nastanka bolesti, razvija se kronična bubrežna bolest i bubrežno zatajenje. Znaci kroničnog bubrežnog zatajenja uključuju osjećaj slabosti, otežanu dnevnu aktivnost, osjećaj umora, gubitak apetita, osjećaj mučnine i druge znakove. Mnogi se bolesnici javljaju liječniku tek kada nastupe znakovi kronične bubrežne bolesti. Kronični bubrežni bolesnici nisu najčešće svjesni uloge koju bubreg ima u očuvanju zdravlja kostiju.

Kod bubrežnog oštećenja brojni otpadni produkti metabolizma ostaju u cirkulaciji. U isto vrijeme, bubrezi počinju smanjeno lučiti neke hormone te nastaju metabolički poremećaji među kojima je značajna bubrežna anemija. Jednako tako, bubrezi smanjeno obavljaju pretvorbu vitamina D u njegov aktivni oblik, te dolazi do podražaja i povećanog lučenja paratireoidnog hormona (PTH) u paratireoidnim žlijezdama i nastaje metabolički poremećaj kalcija i fosfata. Aktivni oblik vitamina D potreban je za regulaciju kalcija koji uzimamo s hranom, a potreban je za izgradnju kostiju. Takav poremećaj odgovoran je za nastanak metaboličke bolesti kostiju ili tzv. renalne osteodistrofije. On već u ranijim stupnjevima bubrežne bolesti dovodi do poremećaja pregradnje kostiju. Najvažniji čimbenici u nastanku koštane bolesti su poremećaj metabolizma kalcija (hipokalcijemija), fosfata (hiperfosfatemija) i smanjena sinteza kalcitriola. Do poremećaja dolazi kada je bubrežna funkcija smanjena za oko 50%. Sva tri čimbenika djeluju izravno ili posredno na paratireoidne žlijezde, izazivajući ne samo povećano lučenje PTH, nego i uvećanje stanica paratireoidne žlijezde, čime se i same žlijezde povećavaju. Posljedica povećanog lučenja PTH je koštana bolest, ali i oštećenje ostalih tkiva i organa: kože, perifernih živaca, srca itd. Zbog toga je pobol i smrtnost bolesnika s izraženom koštanom bolesti vrlo velik (12).

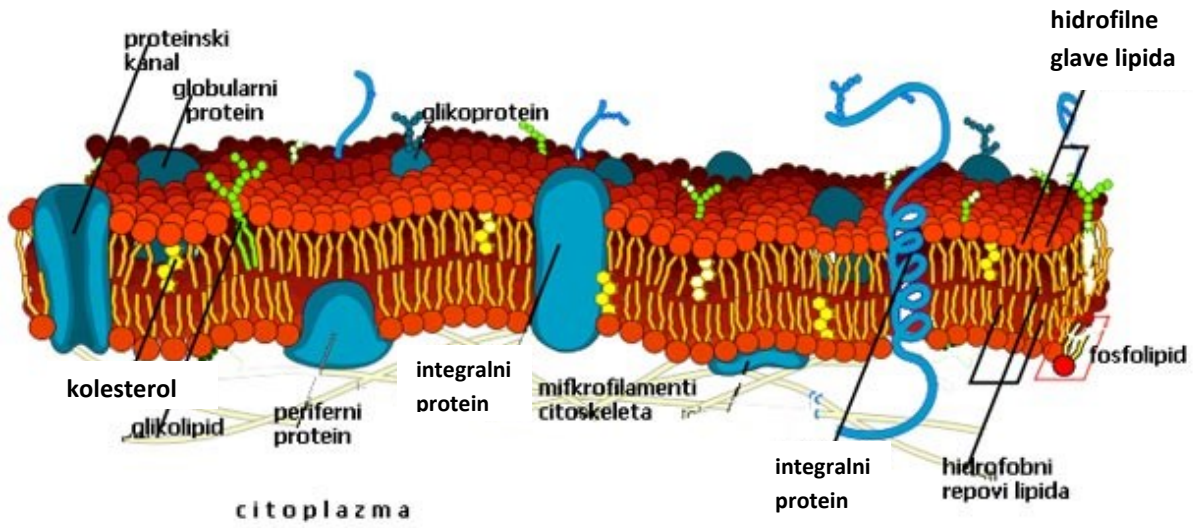
U svih bolesnika s izraženom kroničnom bubrežnom bolešću neophodno je odrediti razinu PTH, kalcija i fosfata. Optimalna razina PTH ne bi smjela biti dva puta veća od normalne (ne veća od 12,1 pmol/L), a u bolesnika na liječenju dijalizom dozvoljene razine PTH se kreću od 16,5 do 33 pmol/L. Razinu kalcija u serumu treba održavati u rasponu od 2,14 do 2,53 mmol/L, a u bolesnika na liječenju dijalizom poželjan je raspon od 2,1 do 2,37 mmol/L. Razina

fosfata u bolesnika s kroničnom bubrežnom bolešću treba biti u rasponu od 0,87 do 1,49 mmol/L, a u bolesnika na liječenju dijalizom u rasponu od 1,13 do 1,78 mmol/L. Umnožak razine kalcija i fosfata treba biti manji od 4,4 mmol2/L2. U uznapredovanom stupnju bubrežnog zatajenja neophodna je i češća kontrola razine kalcija i fosfata (2).

Hiperkalcijemija je jedan od najčešćih paraneoplastičnih sindroma i javlja se u oko 20% bolesnika s karcinomom bubrega, a predstavlja loš prognostički znak (13). Nastanak nemetastatske hiperkalcijemije objašnjava se prisutnošću tvari koje imitiraju učinak PTH, osim u pacijenata s karcinomom bubrega koji imaju sniženu reapsorpciju kalcija u bubrezima, smanjenu apsorpciju u crijevima i sniženu sintezu vitamina D. TGF-β je također medijator kojeg luče neki solidni tumori, pa tako i karcinom bubrežnih stanica, a koji pridonosi hiperkalcijemiji stimulacijom osteoklastične resorpcije kosti. Mučnina, anoreksija i umor su neki od simptoma koji mogu biti vezani uz hiperkalcijemiju. Metastatska hiperkalcijemija vezana je uz koštane metastaze i ne smatra se pravim paraneoplastičnim sindromom (14).

1.4. Glikosfingolipidi

Glikosfingolipidi (GSL) sastavni su dijelovi stanične membrane svih stanica u sisavaca, ali se nalaze i u unutarstaničnim organelama. (Slika 2.) Građeni su od oligosaharidnog lanca vezanog za lipidnu strukturu nazvanu ceramid, za razliku od fosfolipida koji nastaju iz diacilglicerola. Diacilglicerol sadrži glicerol i alkoholnu skupinu dok ceramid sadrži amino alkohol sfingozin (2). Glikosfingolipidi se nalaze u izobilju u neuralnim tkivima, ali su također nađeni kao dijelovi plazma membrana svih tkiva i stanica kralježnjaka, gdje su organizirani u stanične i tkivno - specifične obrasce (3,4). Odmah nakon otkrića GSL i opisa njihove kemijske strukture, počela su istraživanja kojima bi se objasnila njihova funkcija. Kemijska građa, u kojoj se u svakoj molekuli GSL razlikuje hidrofobni ceramidni dio i hidrofilni oligosaharidni lanac, upućivala je na moguću lokalizaciju tih spojeva unutar staničnih membrana, pri čemu bi ceremidni dio molekule bio uklopljen u membranu, a oligosaharidni bi se pružao u izvanstanični prostor (2). Brojni GSL identificirani su kao antigeni krvnih grupa, kao CD (eng. *cluster of differentiation*) molekule, kao specifični stanični površinski biljezi (5).



Slika 2. Prikaz građe stanične membrane

1.5. CD34

CD34 obitelj površinskih staničnih transmembranskih proteina obuhvaća CD34 stanični antigen hematopoetskih prekursorskih stanica, podokaliksin (poznat i kao podocalyxin-like protein 1, PODXL1) i endoglikan (poznat i kao podocalyxin-like protein 2, PODXL2) (6). CD34 široko je korišten kao biljeg u izolaciji i identifikaciji hematopoetskih matičnih stanica i prekursorskih stanica u procesu pripreme za transplantaciju koštane srži. U novije vrijeme koristi se i kao biljeg u identifikaciji drugih tkivno-specifičnih matičnih stanica, poput mišićnih satelitskih stanica i preteča epidermalnih stanica. Članovi CD34 obitelji iskazuju značajna preklapanja u izražaju, ali svaki od ovih proteina pokazuje i specifičan izražaj u određenim tkivima. Podokaliksin je prvotno opisan kao biljeg glomerularnih epitelnih stanica bubrega (podocita) i neophodan je za razvoj bubrega (7). Sva tri člana obitelji CD34 imaju vanstaničnu domenu bogatu serinom, treoninom i prolinom koja je izrazito glikozilirana i sijalinizirana. Molekularna masa ovih proteina, koja iznosi 90-170 kDa, svrstava CD34 obitelj u podtip sijalomucina (6). Svaki protein sadrži jednu transmembransku uzvojnicu i citoplazmatski rep s mjestima za fosforilaciju. Organizacija genoma CD34, PODXL1 i PODXL2 jasno ukazuje na evolucijsku povezanost ova tri gena (8). Svaki protein kodiran je s osam egzona, a u pojedinih članova obitelji individualni egzoni kodiraju ekvivalentne proteinske motive stalne duljine (8).

1.5.1. Funkcija CD34

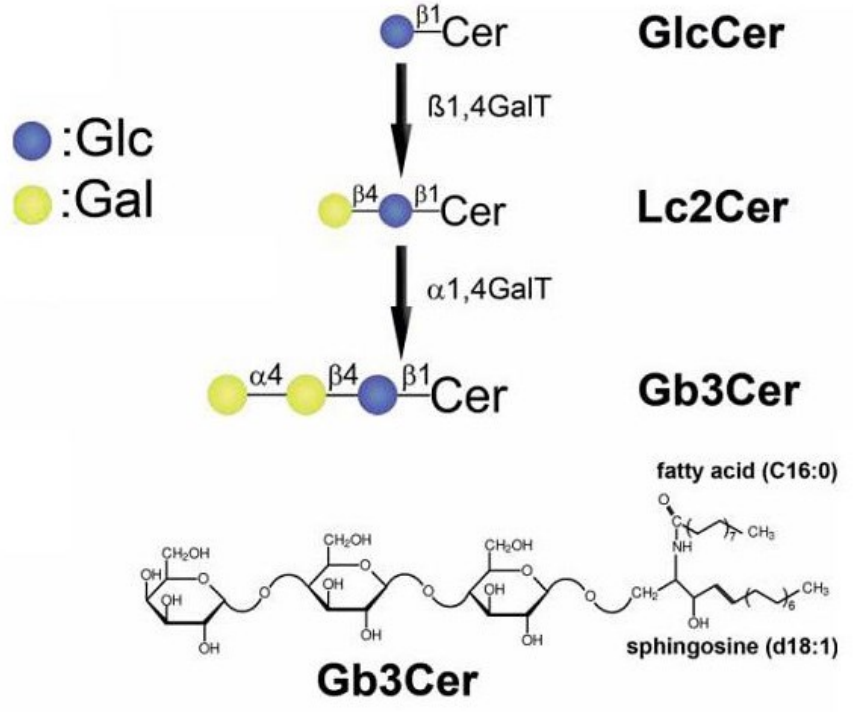
Funkcije CD34 obitelji proteina još uvijek nisu u potpunosti razjašnjene iako im se pripisuje čitav niz različitih uloga. Smatra se da CD34 potiče staničnu proliferaciju i blokira diferencijaciju prastanica, a podokaliksin i CD34 potiču migraciju hematopoetskih stanica. Podokaliksin igra ulogu u staničnoj morfogenezi. Zanimljivo je istaknuti da članovi CD34 obitelji ujedno potiču i blokiraju staničnu adheziju. Najbolje izražena funkcija CD34 obitelji proteina jest promocija limfocitne adhezije na specijalizirani vaskularni endotel i limfatička tkiva (9). Druge studije ukazuju da CD34 proteini u većini slučajeva djeluju blokirajući adheziju. 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 (10). Podokaliksin je neophodan za razvoj i održavanje strukture bubrežnih podocita (7,9). Ove stanice građene su od staničnog tijela s brojnim nastavcima te malih, integralnih nožica koje se šire iz većih nastavaka. Brojne funkcije koje potencijalno pripadaju članovima CD34 obitelji dolaze do izražaja u različitim tkivima, ovisno o jačini izražaja pojedinih molekula, a donekle su i oprečne (11).

1.6. CD77

Globotriaozilceramid (Gb3Cer) se sintentizira tako da se glukozilceramid veže na galaktozu djelovanjem β1,4-galaktoziltransferaze pri čemu nastaje laktozilceramid na koji α1,4-galaktoziltransferaza dodaje galaktozu i nastaje globotriaozilceramid. (Slika 3.)

Gb3Cer/CD77 sudjeluje u patogenezi infekcije *Shigella dysenteriae* tip 1, koja uzrokuje gastrointestinalne bolesti kao receptor na površini stanice Shiga-like toksin (Stx). Stx toksin veže se na glikosfingolipid globotriaozilceramida i oštećuje ljudske endotelne stanice (15). Shiga toksini poznatiji su kao verotoksini (VT). Dijelimo ih u dvije obitelji: Stx1 (VT-1) i Stx2(VT-2)

Stx1 se vežu brže na Gb3Cer nego Stx2. No, zato su veze koje Stx2 stvara sa Gb3Cer jače. Vjeruje se da su oba, ugljikohidratni dio i ceramidni dio lipida, sidro receptora i da su važni za vezanje toksina (4). Heterogenost ceramida primarno ovisi o sastavu masnih kiselina. Stupanj nezasićenosti i hidroksilacije kod sfingozina može varirati. Kaveole bubrežnih endotelnih i epitelnih plazma membrana posebice obiluju u sadržaju neutralnog glikosfingolipida CD77 (15).

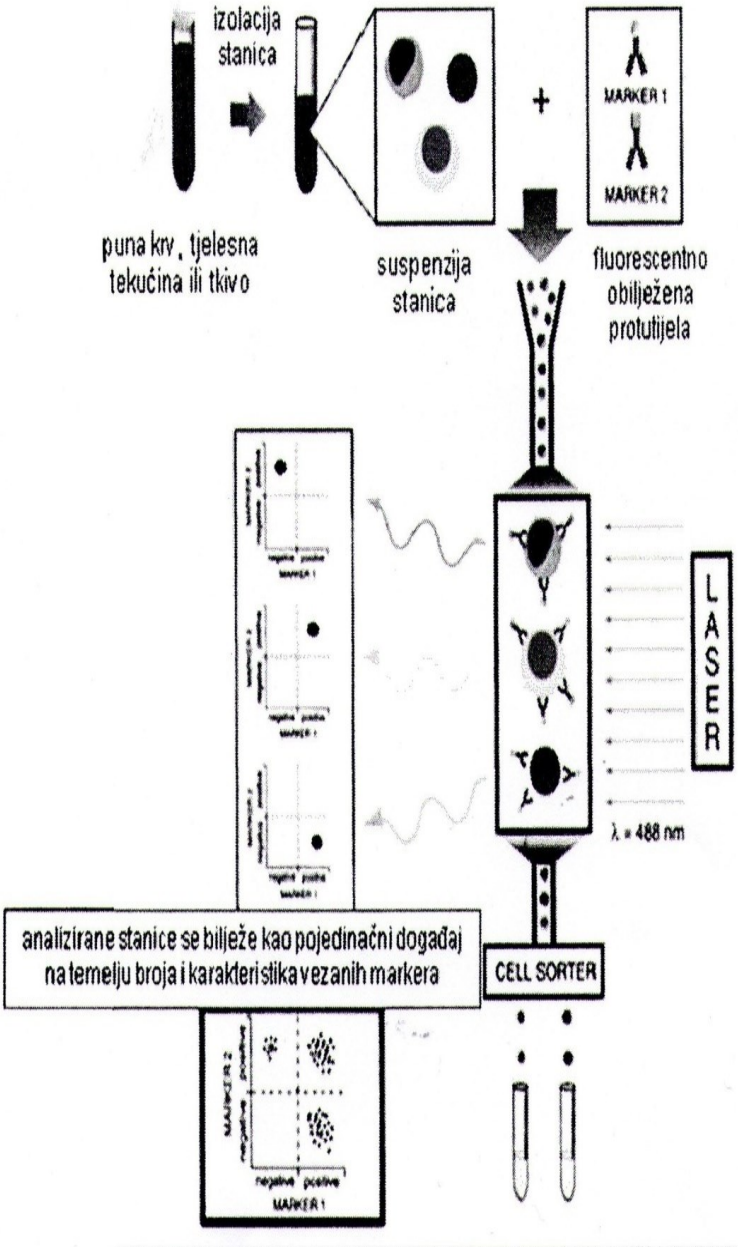


Slika 3. Prikaz građe i sinteze Gb3Cer/CD77

1.7. Protočna citometrija

Protočna citometrija je u današnjem obliku poznata 30-ak godina, iako su se slični oblici mjerenja protočnim sustavom s pomoću rasapa svjetla pojavili puno prije. Protočni citometar se sastoji od 3 međusobno povezana sustava: protočnog, optičkog i elektronskog. Protočni sustav omogućuje da stanica iz stanične suspenzije pojedinačno laminarnim protokom kroz sustav uske kapilare dolazi do snopa laserskog svjetla koje s lećama, filtrima i detektorima čine 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 0,5 - 10°) i zrnatost (svjetlost raspršena pod pravim kutom). Dodatno obilježavanje stanica slobodnim ili najčešće za monoklonska protutijela vezanim fluorescentnim bojama (flurokromima) rabi se za dodatno obilježavanje specifičnih staničnih struktura. Fluorokromi obasjani laserskom svjetlošću emitiraju svjetlost veće valne duljine od ulazne svjetlosti, a hvataju je specifični detektori protočnog citometra. Sve svjetlosne signale elektronski sustav pretvara u digitalne signale koji se prenose u elektroničko računalo i služe za analizu.

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.



Slika 4. Princip rada protočnog citometra

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada bio je procjena utjecaja hiperkalcijemije u štakorima određivanjem izražaja CD77 na CD34+ endotelnim stanicama u bubrezima. Izražaj CD77 na CD34+ stanicama u staničnoj suspenziji bubrega kod hiperkalcijemičnih i kontrolnih štakora odrediti će se protočnom citometrijom.

3. MATERIJALI I METODE

Životinje

Svi štakori su uzgojeni pod kontroliranim uvjetima (temp. 22±1°C; raspored svjetlosti:14h svjetla i 10h tame) na Sveučilištu u Splitu, Nastamba za životinje. Životinje su uzimale hranu 4RF21 GLP Mucedola (Settimo Milanese, Italija), koja sadržava vitamin D3 1.260 UI/kg, kalcij 9.163 g/kg i fosfor 7.589 g/kg. Održavanje životinja bilo je u skladu s „Vodičem za njegu i korištenje laboratorijskih životinja“ (1985, NIH, Bethesda) te je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu odobrilo eksperimentalni postupak.

Kako bi se postigla hiperkalcijemija, Sprague-Dawley muški štakori, stari 6 tjedana, dobivali su 14 dana prirodnu vodu obogaćenu kalcijevim kloridom (1.5%-tna koncentracija elementarnog kalcija). Nijedna životinja nije uginula tijekom studije. Dvije životinje su isključene iz istraživanja jer nisu razvile hiperkalcijemiju. Dobivena hiperkalcijemična skupina sadržavala je osam štakora. Na kraju eksperimenta, prije žrtvovanja, hiperkalcijemični štakori su težili 199.5±8.6 g (srednja vrijednost ± standardno odstupanje).

8 tjedana stari Sprague-Dawley muški štakori (n=9), težine 202.0±6.6 g, dobivali su prirodnu vodu i služili su kao kontrolna skupina. Sve životinje su žrtvovane produženom anestezijom (dietileterom).

Biokemijska analiza

Uzorci krvi za analizu kalcija su uzeti iz jugularne vene u staklene Vacutainer epruvete s litij-heparinom kao antikoagulansom, prije žrtvovanja štakora. Koncentracija ionskog kalcija u plazmi mjerena je ion selektivnom elektrodom na Blood Gas Analyzer Rapid Lab Model 348 (Bayer Diagnostics,Toronto, Kanada). Ukupna koncentracija kalcija u plazmi mjerena je na Autoanalizatoru Au 2700 (Olympus Corporation, Mishima Olympus Co. Ltd., Shizuoka, Japan).

Statistička analiza

Rezultati su iskazani kao srednja vrijednost ± standardno odstupanje. Razlike u svim parametrima između hiperkalcijemične i kontrolne skupine određene su koristeći se Mann-Whitney U testom. Statistička značajnost koja je zadana je $P < 0,05$. Podatci su analizirani statističkim softverom MedCalc za Windows, verzija 11.5.1.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija).

Obrada tkiva

Nakon žrtvovanja hiperkalcijemičnih i kontrolnih štakora, bubrezi su izvađeni iz svih životinja. Odstranjena tkiva bubrega su isjeckana škarama i inkubirana u otopini 0.1 M otopine fosfatnog pufera (PBS od eng. *phosphate buffer solution*) s 0.1%-tnom kolagenazom tipa IA (iz *Clostridium histolyticum*, SIGMA, St. Louis, MO, SAD), 30 min na 37°C uz lagano miješanje. Stanične suspenzije su propuštene kroz 40 mikrometarsku najlonsku mrežu (Cell Strainer; BD Biosciences, San Jose, CA, SAD) i suspendirane na $1.0x10^6$ stanica/mL u 0.1 M PBS-u.

Protočna citometrija

Stanice (10^6) su inkubirane 30 min na ledu u tami s protu-CD77 protutijelom konjugiranim s flureseinom (FITC) (Pharmingen,San Diego, CA, SAD) i protu-CD34 protutijelom konjugiranim s fikoeritrin-cijaninom (PC5) (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD). Nakon dva ispiranja u 0.1M PBS-u, stanice su resuspendirane u 1 mL 0.1 PBS-a. Fluorescencija je mjerena na protočnom citometru Episcs XL (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD). Izotipska kontrola i neobojene stanice uzorka su korištene kao negativna kontrola. Ukupno je analizirano $1x10^5$ stanica.

4. REZULTATI

Koncentracija ionskog kalcija je bila 1.37±0.01 mM u hiperkalcemičnim štakorima naprema 1.19±0.03 mM u kontrolnih štakora (P<0.001). Koncentracija ukupnog kalcija u hiperkalcijemičnih štakora iznosila je 2.91±0.05 mM naspram 2.78±0.06 mM u kontrolnih štakora (P=0.125). Postotak ionskog kalcija bio je 48±0.30 % u hiperkalcijemičnim naspram 44±0.96 % u kontrolnim štakorima (P=0.013).

Tablica 1. Različite stanične subpopulacije u suspenzijama stanica bubrega kontrolnih i hiperkalcijemičnih štakora

Tkivo	Stanična subpopulacija	Kontrola (%)	Hiperkalcijemija (%)
Bubreg	CD34+ CD77-	0.88±0.13	0.39±0.17*
	CD34+ CD77+	1.16±0.29	1.22±0.29
	CD34- CD77+	1.90±0.44	1.56±0.66
	Ukupno CD34+	2.04±0.51	1.61±0.44
	Ukupno CD77+	3.07±0.39	2.78±0.66

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardno odstupanje

*P=0.043

U bubregu hiperkalcijemičnih štakora postotak CD34+CD77- stanica je snižen u odnosu na kontrolnu skupinu (P=0.043, Tablica 1).

Ne postoji značajna razlika u postotku CD77+CD34+ stanica bubrega štakora u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu. Ukupni udio CD34+ stanica bio je nešto snižen u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu, ali bez statističke značajnosti (Tablica 1.).

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju određen je izražaj biljega CD77 na CD34+ endotelnim stanicama u suspenzijama stanica tkiva bubrega. Hiperkalcijemija je rezultirala smanjenjem udjela endotelnih CD34+CD77- stanica u bubregu.

Poznato je da je PTH u obrnutoj korelaciji s koncentracijom kalcija u serumu i da hiperkalcijemija može utjecati i na razine serumskih fosfata, ali PTH i razine fosfata nisu određivani u ovom istraživanju. Pacijenti s blagim primarnim hiperparatoidizmom i normalne bubrežne funkcije pokazuju znakove subkliničke upale i endotelne disfunkcije. *In vitro* PTH u razinama unutar normalnog raspona regulira endotelni stanični izražaj proinflamatornih i aterosklerotičnih posrednika interleukina-6 i receptora naprednih krajnjih produkata glikacije (glikozilacije). PTH stimulira (potiče) otpuštanje fosfata i kalcija iz kostiju. Izravni učinci fosfata na oksidativnu fosforilaciju i stanični energetski metabolizam, mogli bi također pridonijeti oksidacijskom stresu i oštećenju endotelnih stanica.

U ovom istraživanju, hiperkalcijemični model štakora razvijen je prema Puero Vincente-u i suradnicima. U njihovom eksperimentu, hiperkalcijemija se pojavila dva dana nakon povećanja sadržaja kalcija u piću. Ukupne i razine ionskog kalcija u plazmi, ostale su visoke tijekom 14 dana tretmana, iako niže nego nakon samo 2 dana. Blago smanjenje kalcija od drugog do četrnaestog dana može biti posljedica promjene razine hormona za regulaciju kalcija, uključujući PTH. Kako se izlučivanje PTH javlja kao odgovor na smanjenje serumskog kalcija, može se pretpostaviti niži PTH kod hiperkalcijemične skupine u ovom istraživanju. Niži PTH znači otpuštanje manje fosfata iz kostiju, ali i manje bubrežno izlučivanje fosfata. Stoga, naša pretpostavka je da je promatrani fenotip endotelnih stanica bubrega u ovom istraživanju uglavnom izravno pod utjecajem hiperkalcijemije, ali učinak povišenja fosfata nije moguće isključiti.

Rasprava je dodatno ograničena zbog nedostatka podataka o obujmu potrošnje dane otopine i o pH krvi. U ovom istraživanju, postojala je tendencija prema nižoj tjelesnoj težini kod hiperkalcijemičnih štakora naspram njihovih kontrola, kao i u istraživanju Puero Vincente-a i suradnika. Možemo pretpostaviti da nije postojala značajna razlika u volumenu dane otopine kao što su Puero Vicente i suradnici otkrili kod svog hiperkalcijemičnog štakorskog modela (referenca).

Široki raspon Ca^{2+} signala može biti učinkovito koordiniran kroz organiziranje specifičnih Ca^{2+} kanala, crpki, pufera, izmjenjivača i proteinskih skela u zajedničke mikrodomene. Membranske splavi osiguravaju takvu mikrodomenu u kojoj se mogu učinkovito izvršavati vis**o**ko specifični signalizacijski događaji. Apikalna lokalizacija membranske kalcij ovisne ATPaze je vrlo osjetljiva na nedostatak kolesterola (15). S druge strane, povećano

nakupljanje endotelnog glikosfingolipida CD77 uzrokuje disfunkciju K(Ca) kanal (16). CD34+CD77- stanice bubrega u ovom istraživanju pokazale su visoku osjetljivost na povišen kalcij. Ovi rezultati su značajni s obzirom na nedavne razultate koji pokazuju da se zbog priljeva Ca^{2+} cijepa kadherin na endotelu krvnih žila što doprinosi raspadu adherentnih veza za vrijeme aktivacije i apoptoze endotelnih stanica (17). Zanimljivo je nagađati da CD34+CD77- stanice, zbog njihovog siromašnijeg sadržaja lipidnih splavi, podliježu u većoj mjeri raspadu adherentnih veza tijekom aktivacije endotelnih stanica i apoptoze uzrokovanih priljevom Ca^{2+}.

6. ZAKLJUČCI

- Hiperkalcijemija je značajno smanjila udio CD34+CD77- stanica u suspenziji ukupnih bubrežnih stanica u odnosu na netretiranu, kontrolnu skupinu.

- Ne postoji značajna razlika u postotku CD77+CD34+ stanica bubrega štakora u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu.

- Ukupni udio CD34+ stanica bio je nešto snižen u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu, ali bez statističke značajnosti.

7. SAŽETAK

CILJ: Odrediti izražaj CD77 molekule na CD34+ stanicama bubrega štakora koji su dobivali 14 dana prirodnu vodu obogaćenu kalcijevim kloridom (15%-tna koncentracija elementarnog kalcija) u usporedbi s izražajem CD77 na CD34+ stanicama bubrega štakora koji su dobivali prirodnu vodu.

METODE: Svi štakori su uzgojeni pod kontroliranim uvjetima, s tim da su bili podijeljeni u dvije skupine: ispitivana skupina koja je bila tretirana vodom obogaćenom kalcijem i kontrolna skupina koja je dobivala prirodnu vodu. Nakon 14 dana određena je koncentracija ionskog kalcija u plazmi, mjerena je ion selektivnom elektrodom na Blood Analyzern Rapid Lab Model 348. Nakon žrtvovanja hiperkalcijemičnih i kontrolnih štakora, bubrezi su izvađeni iz svih životinja. Izolirane stanice bubrega inkubirane su sa dva protutijela za dvostruko bojanje stanica: protutijelo na CD34 konjugirano s PC5 i CD77 konjugirano s FITC-om, te analizirane protočnom citometrijom.

REZULTATI: Postotak ionskog kalcija bio je 48±0.30 % u hiperkalcijemičnim naspram 44±0.96 % u kontrolnim štakorima (P=0.013). U bubregu hiperkalcijemičnih štakora postotak CD34+CD77- stanica je niži u odnosu na kontrolnu skupinu(P=0.043).

ZAKLJUČAK ISTRAŽIVANJA: U ovom istraživanju određen je izražaj biljega CD77 na CD34 pozitivnim endotelnim stanicama u suspenzijama stanica tkiva bubrega. CD34+CD77- stanice bubrega u ovom istraživanju pokazali su visoku osjetljivost na povišen unos kalcija. Hiperkalcijemija je rezultirala smanjenjem udjela endotelnih CD34+CD77- stanica u bubregu.

8. SUMMARY

OBJECTIVE: To determine the expression of CD77 molecule on CD34+kidney cells of rats that received 14 days natural water enriched with calcium chloride (15% concentration of elemental calcium) in comparison to the expression of CD77 on CD34+ kidney cells of rats that received natural water.

METHODS: All rats were grown under controlled conditions, divided into two groups: a test group, which was treated with water enriched with calcium and a control group, receiving the natural water. After 14 days, the concentration of ionic calcium in the plasma was measured by ion selective electrode on Blood Analyzern Rapid Lab Model 348. After sacrificing, hypercalcemic and control rat kidneys were removed from all animals. Isolated kidney cells were incubated with the two antibodies for double staining: anti-CD34 conjugated with PC5 and anti-CD77 conjugated with FITC, and analyzed by flow cytometry.

RESULTS: The percentage of ionic calcium was 48% ± 0:30 in hypercalcemic rats comparing with 44 ± 0.96% in the control rats (P = 0.013). In the kidney of hypercalcemic rats percentage of CD34+CD77- cells was lower than in the control group (P=0.043).

CONCLUSION: The present study determined the expression of the marker CD77 on CD34 positive endothelial cells in cell suspensions of kidney tissue. CD34+CD77- kidney cells in this study showed high sensitivity to increased calcium intake. Hypercalcemia resulted in a decrease of endothelial CD34+CD77-cells in the kidney.

9. LITERATURA

1. Nikolina Režić-Mužinić. Vedrana Čikeš-Čulić, Joško Božić, Tina Tičinović-Kurir, Ilza Salamunić, Anita Markotić, Hypercalcemia induces a proinflammatory phenotype in rat leukocytes and endothelial cells.
2. Stults CLM, Sweeley CC, Macher BA. Glycosphingolipids:Structure,biological source and properties. Methods Entymol 1989; 179: 167-214.
3. Reuter G, Kelm S, Schauer R.Chemistry and biology of cell surface glycoconjugates. Acta Histochem 1988; Suppl. 36: 51-79.
4. Hakomori S-I Glycophingolipids in cellular interacition,differentiation and oncogenesis. Anna Rev Biochem 1981; 50: 733-64.
5. Zeller CB, Marchase RB. Gangliosides as modulators of cell function. Am J Physiol 1992; 262: C1341-55.
6. Hilkens J, Ligtenberg MJ, Vos H et al.Cell membrane associated mucins and their adheion-modulating property. Trends Biochem Sci 1992; 17: 359-363.
7. Doyonnas R, Kershaw DB, Duhme C et al.Anuria ,omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the CD34-related protein podocalyxin. J Exp Med 2001; 194: 13-27.
8. Brown J, Greaves MF, Molgarad HV. The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in hemopietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. In Immunol 1991; 3: 175-184.
9. Krause DS, Ito T, Fackler MJ et al. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoetic progenitor and stem cells. Blood 1994; 84: 691-701.
10. Kelley T, Huntsman D, Mcnagy KM et al. Podocalyxin: a marker of blasts in acute leukemia. Am J Clin Pathol 2005; 124: 134-142.
11. He XY, Antao VP, Basila D et al.Isolation and molecular charactization of the human CD34 gene. Blood 1992; 79: 2296-2302.
12. Krmpotić-Nemanić J. Anatomija čovjeka. 5. izd, Zagreb: Medicinska naklada, 1993, str. 831-5.
13. Muggia FM. Overview of cancer-related hypercalcemia: epidemiology and etiology. Semin Oncol 1990:17:3-9.
14. Gold PJ, Fefer A, Thompson JA. Paraneoplastic manifestations of renal cell carcinom. Semin Urol Oncol 1996;14:216-22.
15. Pani B, Singh BB (2009) Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling. Cell Calcium 45:625–633).

16. Park S, Kim JA, Joo KY, Choi S, Choi EN, Shin JA, Han KH, Jung SC, Suh SH (2011) Globotriaosylceramide leads to K(Ca)3.1 channel dysfunction: a new insight into endothelial dysfunction in Fabry disease. Cardiovasc Res 89:290–299**.**

17. Schulz B, Pruessmeyer J, Maretzky T, Ludwig A, Blobel CP, Saftig P, Reiss K (2008) ADAM10 regulates endothelial permeability and T-cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. Circ Res 102:1192–1201 .

18. Božić Joško, Izražaj glikokonjugata CD34 i CD77 na štakorskom bubregu pod hiperbaričnim uvjetima, Joško Božić diplomski rad, Split, 2010.

OPĆI PODACI

Ime i prezime: Mirjana Knežević

Datum rođenja: 27. veljače 1974 g.

Adresa stanovanja: Put borika 18, Split

Telefon: 021/325-330

Mobitel: 098/832-044

E-mail: lovricknezevic@gmail.com

OBRAZOVANJE:

- **1988. – 1992. Zdravstveni obrazovni centar Split, smjer: zdravstveni tehničar-laborant**
- **2011. – 2014. Sveučilište u Splitu, Odjel zdravstvenih studija, smjer: medicinsko laboratorijska dijagnostika (preddiplomski sveučilišni studijski program)**

<u>Radno iskustvo:</u>

- **1992. – 2001. Dom zdravlja Split**
- **2001. -2013 Medicinsko biokemijski laboratorij Tonkica Ivanković mag.med.biochem.Split ,Put Supavla 19**
- **2013. -2014. Medicinsko biokemijski laboratorij Tonkica Ivanković mag.med.biochem. i Stella Tomić ,mag.med.biochem spec.medicinske biokemije i laboratorijske medicine Split ,A.G.Matoša 2**