

Utjecaj hiperbarične oksigenacije na proteinski izražaj TRP ionskih kanala kod zdravih Spargue-Dawley štakora

Main, Ena

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:762130>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ena Main

**UTJECAJ HIPERBARIČNE
OKSIGENACIJE NA PROTEINSKI
IZRAŽAJ TRP IONSKIH KANALA KOD
ZDRAVIH SPRAGUE – DAWLEY
ŠTAKORA**

Završni rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ena Main

**UTJECAJ HIPERBARIČNE
OKSIGENACIJE NA PROTEINSKI
IZRAŽAJ TRP IONSKIH KANALA KOD
ZDRAVIH SPRAGUE – DAWLEY
ŠTAKORA**

Završni rad

Osijek, 2020.

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu Osijek, na Katedri za fiziologiju i imunologiju.

Mentorica rada: doc.dr.sc. Ivana Jukić, dr. med.

Neposredni voditelj: dr.sc. Zrinka Mihaljević, prof.

Rad ima 26 listova, 2 tablice i 13 slika.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici, doc.dr.sc. Ivani Jukić, dr. med. na pomoći i vođenju tijekom pisanja ovog završnog rada. Također zahvaljujem i neposrednoj voditeljici, dr. sc., prof. Zrinki Mihaljević na pomoći tijekom provedbe istraživanja i pisanja rada.

Posebnu zahvalu upućujem svojim roditeljima, baki i djedu koji su mi bili najveća potpora tijekom studiranja.

1. UVOD	1
1.1. Hiperbarična oksigenacija	1
1.2. Oksidativni stres	2
1.3. Ionski kanali	3
1.4. Western blot metoda	3
2. HIPOTEZA	5
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	6
4. MATERIJALI I METODE	7
4.1. Ustroj studije	7
4.2. Eksperimentalne skupine	7
4.3. Izlaganje štakora hiperbaričnoj oksigenaciji	8
4.4. Uzorkovanje i priprema uzorka	8
4.5. Homogenizacija	9
4.6. Određivanje proteinskog izražaja	11
4.7. Prijenos proteina na membranu	12
4.8. Inkubacija s protutijelima	13
4.9. Kemiluminiscencijska detekcija	15
4.10. Statističke metode	15
5. REZULTATI	16
5.1. Tjelesna masa životinja	16
5.2. Proteinski izražaj KCNMB1 proteina u eksperimentalnim skupinama	16
5.3. Proteinski izražaj TRPV4 proteina u eksperimentalnim skupinama	17
6. RASPRAVA	19
7. ZAKLJUČAK	21
8. SAŽETAK	22
9. SUMMARY	23
10. LITERATURA	24
11. ŽIVOTOPIS	26

Popis kratica

TRP	kanalni receptori prolaznog potencijala (engl. <i>transient potential receptor channel</i>)
ROS	reaktivne kisikove čestice (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
sGC	solubilna gvanilat – ciklaza (engl. <i>soluble guanylate cyclase</i>)
EDHF	hiperpolarizirajući faktori endotelnog porijekla (engl. <i>endothelium derived hyperpolarizing factor</i>)
EETs	epoksiekozatrienoična kiselina (engl. <i>epoxyeicosatrienoic acid</i>)
H ₂ O ₂	vodikov peroksid (engl. <i>hydrogen peroxide</i>)
NO	dušikov oksid (engl. <i>nitric oxide</i>)
PGI ₂	prostaciklin (engl. <i>prostacyclin</i>)
PVDF	poliviniliden difluorid (engl. <i>polyvinylidene fluoride</i>)
SDS	natrij dodecil sulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
HRP	peroksidaza iz hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)

1. UVOD

1.1. Hiperbarična oksigenacija

Terapija hiperbaričnim kisikom (HBO_2) ili hiperbarična oksigenacija predstavlja terapeutsko ili eksperimentalno udisanje 100 %-tnog kisika pri tlaku koji je iznad razine atmosferskog tlaka (1). Tijekom terapije hiperbaričnim kisikom, tlak se povećava sustavno, a izlaganje kisiku može se provoditi preko maski (laringealna maska), endotrahealnih cijevi ili cijela komora može biti ispunjena 100 %-tnim kisikom (2). Koristi se u stanjima smanjene oksigenacije tkiva, može dovesti do promjene izražaja proteina te utječe na vaskularnu strukturu i funkciju. U uvjetima hiperbarične oksigenacije povećava se razina otopljenog kisika u plazmi što utječe na normaliziranje razine tkivnog kisika u tkivima koja su hipoksična, a povećava se i broj reakcija vezanih za kisik, kao i broj signalnih puteva. Hiperoksija uzrokovana terapijom hiperbaričnim kisikom uzrokuje brzu vazokonstrikciju, a mikrovaskularni protok krvi u ishemijskom tkivu terapijom je poboljšana stoga se primjenjuje kod infekcija, poput meningokokne sepse i plinske gangrene, kod infarkta miokarda, cerebralne ishemije, pa i nekih neurodegenerativnih poremećaja (3). Eksperimentalni i klinički podaci pokazuju kako terapija intermitentnim hiperbaričnim kisikom smanjuje edem tkiva, potiče sintezu dušikovog oksida (NO, engl. nitric oxide), mijenja vaskularnu reaktivnost te inhibira apoptotske puteve (3). Prethodne studije potvrdile su kako klinička učinkovitost HBO_2 proizlazi iz činjenice da terapija dovodi do sinteze čimbenika rasta koji potiču zacjeljivanje rana, neoangiogenezu i poboljšavaju postishemijske i postupalne ozljede (4).

Kisik je visoko reaktivna molekula koja, pri visokim parcijalnim tlakovima (poput onog u HBO_2), može pridonijeti povećanom stvaranju reaktivnih kisikovih čestica (ROS, engl. reactive oxygen species) i utjecati na hemodinamiku i krvožilni sustav (3). Međutim, novi podaci sugeriraju kako proizvodnja reaktivnih kisikovih čestica ovisi o protokolu po kojem se terapija hiperbaričnim kisikom provodi. Na primjer, istraživanje provedeno na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek pokazalo je kako akutna izloženost hiperbaričnoj oksigenaciji povećava oksidativni stres u plazmi, izmjeren pomoću razine lipidne peroksidacije (5). S druge strane, intermitentno izlaganje terapiji hiperbaričnom kisiku poboljšalo je vaskularnu relaksaciju (6) i promijenilo metaboličke puteve koji su sudjelovali u vazorelaksaciji kod zdravih i dijabetičnih životinja, no nije utjecalo na razinu oksidativnog stresa (7).

1.2. Oksidativni stres

Oksidativni stres predstavlja metaboličko stanje organizma, u kojem dolazi do neravnoteže prooksidanata i antioksidanata, praćeno povećanjem količine reaktivnih kisikovih molekula i smanjenjem sposobnosti antioksidansa da neutraliziraju štetne učinke (9). Povećana razina oksidativnog stresa jedan je od glavnih čimbenika u razvoju i napredovanju različitih patoloških stanja povezanih s kardiovaskularnim bolestima, uključujući aterosklerozu, hipertenziju, dijabetes melitus, hiperkolesterolemiju (10). Endotelna disfunkcija smatra se ključnim događajem u razvoju kardiovaskularnih bolesti (9). Endotelne su stanice posebno osjetljive na oksidativni stres, ne samo reakcijama posredovanim reaktivnim kisikovim molekulama (ROS), već i zbog smanjene biorasploživosti dušikovog oksida (10). Također, oksidativni stres oštećuje i DNA te mijenja puteve stanične signalizacije, stoga može biti ključan pri nastanku različitih oblika malignih oboljenja (11).

U reaktivne kisikove čestice ubrajaju se superoksidni radikali zajedno s hidroksilnim radikalima, hidroperoksilnim radikalima, ali i nekim neradikalima poput vodikovog peroksida, hipoklorita ili singlet kisika (11). ROS pripadaju slobodnim radikalima koje karakterizira nespareni elektron u vanjskoj orbitali, kratak poluvijek života te velika nestabilnost i reaktivnost. Kako bi slobodni radikali sparili svoj nespareni elektron moraju stupiti u reakciju s biološkim molekulama poput ugljikohidrata, proteina, lipida i nukleinskih kiselina, čime dolazi do štetnog djelovanja i razaranja organskih molekula (12).

Antioksidativni sustav služi obrani organizma od oštećenja nastalog djelovanjem slobodnih kisikovih radikala. On uključuje antioksidativne enzime kao što su glutation-peroksidaze, superoksid dismutaze i katalaze. Uz njega, postoji još i neenzimski unutarstanični i izvanstanični sustav kojeg čine različite kemijske skupine: vitamini, aminokiseline, karotenoidi i peptidi koje pronalazimo u raznim staničnim strukturama (9). Svi antioksidansi, bilo da pripadaju enzimskom ili neenzimskom sustavu, čine antioksidativni kapacitet. Utjecaj hiperbarične oksigenacije na antioksidativni obrambeni mehanizam može biti važan modulator različitih učinaka akutne i kronične hiperoksigenacije (3).

1.3. Ionski kanali

Intermitentno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji oporavlja dilataciju te mijenja metaboličke puteve koji su uključeni u vazorelaksaciju (5). Unutarstanični procesi u vaskularnim glatkim mišićima koji su regulirani akutnim promjenama pO_2 uključuju kalijeve kanale, sustave koji kontroliraju unutarstanični kalcij (Ca^{2+}) i aktivnost sGC (solubilna gvanilat-ciklaza, engl. soluble guanylate cyclase). Na vazodilataciju utječu hiperpolarizirajući faktori endotelnog porijekla (EDHF, engl. endothelium derived hyperpolarizing factor), poput kalijevih iona, vodikovog peroksida (H_2O_2 , engl. hydrogen peroxide) i EETs-a (eikozatrienoična kiselina, engl. epoxyeicosatrienoic acid). Vazodilatacija se događa kada stimulacija endotelne stanice uzrokuje hiperpolarizaciju stanice glatkih mišića otvaranjem provodljivih kalijevih kanala aktiviranih kalcijem. Hiperpolarizacija zatim inhibira kalcijeve kanale i na taj način sprječava ulazak kalcijevih iona u stanicu glatkih mišića. U stanicama vaskularnog glatkog mišića dominantni ionski provodni putevi su upravo kalcijevi kanali, stoga njihova aktivnost doprinosi regulaciji potencijala membrane i vaskularnog tonusa. Kalijevi kanali reguliraju membranski potencijal i endotelnih stanica, te se aktiviraju porastom unutarstanične koncentracije kalcija (12). Ukoliko je povećana hiperpolarizacija endotelnih stanica, povećava se i pokretačka sila za ulazak kalcija, moguće kanalnim receptorima prolaznog potencijala (TRP, engl. transient potential receptor channel). Povećanje koncentracije kalcija povećava sintezu dušičnog oksida (NO) i proizvodnju metabolita arahidonske kiseline kao što su prostaciklin (PGI_2 , engl. prostacyclin) i epoksieikozatrienoična kiselina (EETs) (12). Ti metaboliti mogu hiperpolarizirati susjedne glatke mišićne stanice. Porast pO_2 primjenom hiperbarične oksigenacije može modulirati TRP receptore na membrani endotelne stanice što posljedično može dovesti do poboljšane vazodilatacije (5).

1.4. Western blot metoda

Western blot uobičajena je metoda čija je primjena identifikacija određenih proteina ili određivanja važnih obilježja proteinskih antigena iz otopine proteina ekstrahiranih iz stanica (13). Western blot analiza uključuje nekoliko postupaka. Prvi je priprema uzorka, odnosno ekstrakcija i kvantifikacija proteina uzetih iz stanica ili tkiva. Nakon denaturacije proteina slijedi elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u kojoj se koristi natrijev dodecil sulfat za (engl. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE). U SDS-PAGE

metodi negativno nabijeni proteini putuju ka pozitivno nabijenoj elektrodi, a razdvajaju se na osnovi veličine. U drugom koraku razdvojeni se proteini prenose na PVDF membranu (engl. polyvinylidene fluoride), dodaje se protutijelo specifično za protein od interesa i protutijelo se veže na protein. Zatim se dodaje i sekundarno protutijelo koje je obilježeno kemiluminescentnim ili fluorescentnim molekulama i specifično je za primarno protutijelo. U zadnjem koraku, imunodetekciji proteina na membrani, uređajem za detekciju mjeri se signal nastao stvaranjem kompleksa antitijela i proteina (14). Varijacije u bilo kojem koraku procesa mogu utjecati na rezultat, stoga se mora voditi računa o standardizaciji svakog koraka Western blot postupka radi ponovljivosti i visoke osjetljivosti (15). Razvoj Western blot metode od identifikacije određenog proteina u smjesi do izravnog otkrivanja proteina u jednoj stanici daje ovoj metodi bitno mjesto u kliničkim istraživanjima.

2. HIPOTEZA

Osnovna pretpostavka ovog istraživanja je da hiperbarična oksigenacija utječe na proteinski izražaj TRPV4 proteina, koji izgrađuju TRP ionske kanale uključene u mehanizme vaskularne reaktivnosti.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

- 1) Odrediti utjecaj akutne hiperbarične oksigenacije na proteinski izražaj TRPV4 proteina u TRP ionskim kanalima izoliranih krvnih žila mozga muških Sprague – Dawley štakora.
- 2) Odrediti utjecaj intermitentne hiperbarične oksigenacije na proteinski izražaj TRPV4 proteina u TRP ionskim kanalima izoliranih krvnih žila mozga muških Sprague – Dawley štakora.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao eksperimentalno istraživanje na pokusnim laboratorijskim životinjama (muškim Sprague-Dawley štakorima). Svi eksperimentalni postupci usklađeni su s europskim smjernicama za skrb i primjenu laboratorijskih životinja propisanim od strane Europskog parlamenta i Vijeća o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (Direktiva 210/63/EU). Poduzete su sve mjere kako bi se spriječila patnja životinja. Istraživanje je za provedbu odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (klasa: 602-04/20-08/07; ur. broj: 2158-61-07-20-96) te Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske.

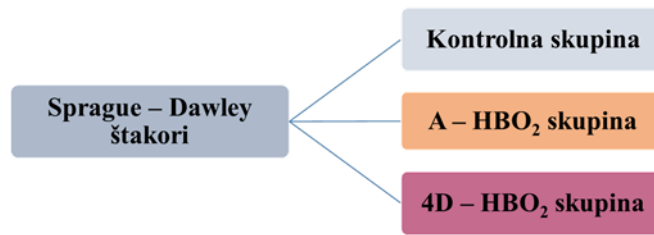
4.2. Eksperimentalne skupine

Istraživanje se provodilo na zdravim Sprague – Dawley štakorima muškog spola u dobi od 9 do 11 tjedana starosti. Svi štakori su iz vlastitog uzgoja Vivarija pri Medicinskom fakultetu Osijek.

Životinje su nasumce podijeljene u tri skupine:

- 1) kontrolna skupina (KONTROLA) – zdravi netretirani štakori;
- 2) štakori izloženi akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (A – HBO₂) – štakori tretirani jednom HBO₂ u barokomori te žrtvovani odmah nakon terapije;
- 3) štakori izloženi intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (4D – HBO₂) – štakori izloženi hiperbaričnoj oksigenaciji četiri dana uzastopno te žrtvovani peti dan.

Izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji svih štakora odvijalo se u barokomori (Rekompresijska komora za eksperimente 110 L, proizvođač Đuro Đaković, Aparati d. d., Slavonski Brod) u Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije Medicinskog fakulteta u Osijeku. Praktični dio istraživanja izražaja proteina proveden je u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.



Slika 1. Prikaz eksperimentalnih skupina

4.3. Izlaganje štakora hiperbaričnoj oksigenaciji

Štakori su izloženi terapiji akutnim hiperbaričnim kisikom prema standardiziranom protokolu (5). Izlaganje hiperbaričnom kisiku (HBO₂) započinje smještanjem životinje u barokomoru, nakon čega slijedi 15 minuta kompresije na 2,0 atm, otvaranjem kompresijskog ventila (pri čemu je dekompresijski ventil zatvoren) te puštanjem kisika u komoru. Kompresijski ventil zatvara se pri tlaku od 2,0 atm te se štakori izlažu djelovanju stopostotnog kisika tijekom 2 sata. Tijekom terapije, u komori sa štakorima nalaze se i granule kalcij-hidroksida, natrij-hidroksida te etilvioleta (Draegersorb 800 Plus, DraegerMedical) za upijanje izdahnutog CO₂. Idući korak je 15 minuta dekompresije otpuštanjem dekompresijskog ventila.

Za razliku od akutnog, intermitentno izlaganje hiperbaričnom kisiku podrazumijeva jedno izlaganje dnevno, otprilike u isto vrijeme, u istim uvjetima kao i kod akutnog izlaganja, ali u trajanju četiri uzastopna dana.

4.4. Uzorkovanje i priprema uzorka

Postupku uzorkovanja prethodilo je vaganje i anesteziranje štakora kombinacijom ketamina 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2ml, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma) (16), nakon čega slijedi dekapitacija. Nakon toga izolirane su krvne žile mozga za određivanje razine proteinskog izražaja TRP ionskih kanala. Zbog premale količine uzorka za određivanje izražaja proteina koristile su se krvne žile mozga dvaju životinja. Uzorci su nakon izolacije smrznuti u tekućem dušiku i čuvani na - 80°C do izvođenja pokusa određivanja izražaja proteina.

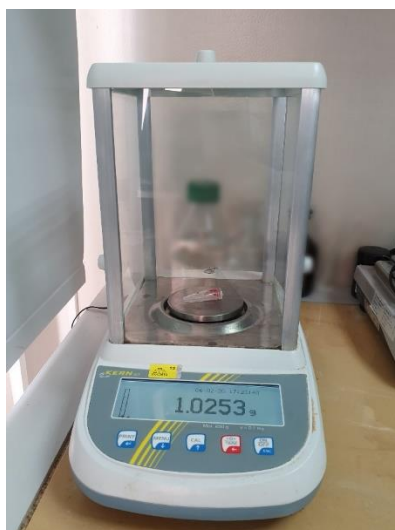
4.5. Homogenizacija

Uz pomoć skalpela usitnjeni su uzorci krvnih žila mozga koji su zatim preliveni tekućim dušikom i pomoću tučka usitnjeni u tarioniku.



Slika 2. Homogenizirani uzorak krvnih žila mozga (izvor: original autorice rada)

Izvagana je masa Eppendorf tubice u kojoj se nalazi usitnjeni uzorak krvnih žila mozga te je od te mase oduzeta masa prazne Eppendorf tubice, kako bismo dobili masu uzorka.



Slika 3. Vaganje uzorka u Eppendorf tubici (izvor: original autorice rada)

U tubicu u kojoj se nalazio usitnjeni uzorak dodan je 1 mL homogenizacijskog pufera koji je sadržavao 10 mM tris-a (Fischer Scientific, Belgija), 1mM EDTA, 0,4% SDS-a (AcrosOrganics, SAD) i 0,062% Triton-X na 100mg tkiva. Kako ne bi došlo do razgradnje

proteina, uzorcima je dodan i koktel inhibitora proteaze (Sigma Aldrich). Sve je izmiješano na Vortex homogenizatoru.



Slika 4. Homogenizacija na Vortex homogenizatoru (izvor: original autorice rada)

Uzorak je u završnom koraku homogenizacije centrifugiran na 15 000 G tijekom 30 minuta na temperaturi 4 °C. U drugu Eppendorf tubicu odvojen je supernatant i pohranjen na - 80 °C za daljnju analizu proteinskog izražaja.



Slika 5. Centrifugiranje uzorka (izvor: original autorice rada)

4.6. Određivanje proteinskog izražaja

Izražaj proteina TRP ionskih kanala krvnih žila mozga određen je korištenjem Western blot metode koja se temelji na specifičnom vezanju protutijela na izolirane proteine. Metoda se sastoji od nekoliko koraka. Prvi korak je SDS denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE elektroforeza), zatim slijedi prijenos proteina na PVDF membranu (engl. blotting), dok je posljednji korak inkubacija s protutijelima i kemiluminiscencijska detekcija.

Elektroforeza omogućuje razdjeljivanje molekula DNA, RNA ili proteina usmjerenim gibanjem električno nabijenih molekula kroz gel pod utjecajem električnog polja. Prije SDS – PAGE elektroforeze potrebno je pripremiti pufer za transfer (sastoji se od 100 mL 10% stock otopine, 100 mL metanola i 800 mL destilirane vode) te pufer za elektroforezu volumena 500 mL koji nastaje miješanjem 15,15 g TRIS baze, 72 g glicina i 5 g SDS-a te dodavanjem destilirane vode do oznake 1L. Puferi se do izvođenja elektroforeze čuvaju na 4°C, a pufer za elektroforezu potrebno je razrijediti neposredno prije upotrebe pomoću destilirane vode (100 mL pufera razrijediti s 900 mL destilirane vode).

Zatim je pripremljen pufer za nanošenje uzorka na gel (475 μ L Leammly pufera, 25 μ L β -merkaptoetanol i 100 μ L glicerola) koji je potom u volumenu od 12,5 μ L dodan u epruvete u koje je prethodno dodano 12,5 μ L uzorka. Slijedi homogenizacija pufera i uzorka te kuhanje na 95 °C tijekom 5 minuta.



Slika 6. Kuhanje pufera i uzorka (izvor: original autorice rada)

U sljedećem koraku u kadicu za elektroforezu stavljena su 4 akrilamidna gela (upotrijebljeni su komercijalno dostupni gelovi Mini – protean TGX Stain – free tvrtke Bio – Rad) te je kadica napunjena razrijeđenim puferom za elektroforezu. Svaki gel sadrži 10 jažica u koje su nanoseni uzorci određenim redoslijedom: na prvo mjesto nanosi se standard, zatim kontrola, na trećem mjestu nalazi se uzorak A – HBO₂, a na četvrtom 4D – HBO₂.

Nakon nanošenja uzoraka, kadica je postavljena u hladnjak jer se elektroforeza odvija na temperaturi 4°C pod djelovanjem konstantnog napona od 200 V tijekom 2 sata. Proteini se razdvajaju na temelju veličine, odnosno mase pa tako proteini manje mase putuju brže, a oni veće mase sporije.



Slika 7. Sustav za SDS – PAGE elektroforezu na 4°C (izvor: original autorice rada)

4.7. Prijenos proteina na membranu

Proteini razdvojeni elektroforezom zatim se prenose s gela na PVDF membranu pod utjecajem električne struje jakosti 200 mA tijekom 2 sata na temperaturi 4 °C.

Prijenos proteina vrši se pomoću kazete za prijenos koja se postavlja u kadicu u koju se dolije pufer za transfer ohlađen na 4 °C. Unutar kazete postavljena je spužvica, filter papir, gel s razdvojenim proteinima nakon elektroforeze, PVDF membrana, drugi filter papir i konačno druga spužvica. Djelovanjem električne struje dolazi do izlaženja proteina iz gela i njihovog putovanja kroz mrežu akrilamida. Membrana djeluje kao barijera koja proteine zaustavi na svoju površinu. Radi vizualizacije proteina, nakon prijenosa, membrana je obojena uranjanjem

u Amido-BlueBlack boju (Sigma Aldrich). Odmah nakon toga stavljena je u kadu za odbojavanje koja sadrži izopropanol i 10 %-tnu vodenu otopinu octene kiseline, gdje se u nekoliko faza odbojavala (tri puta po pet minuta). Nakon odbojavanja, membrana je isprana od otopine za odbojavanje u TBST puferu (50 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween-20 [Sigma Aldrich], pH 7,5) 2 puta po 15 minuta. Nakon ispiranja, membrana je blokirana u 5%-tnoj otopini bezmasnog mlijeka u prahu, na tresilici tijekom 2 sata pri sobnoj temperaturi. Blokiranje membrane reducira nespecifično vezanje protutijela na proteine ili membranu.



Slika 8. Kazeta za prijenos proteina (izvor: original autorice rada)

4.8. Inkubacija s protutijelima

Nakon blokiranja membrane, slijedila je inkubacija primarnim protutijelima u otopini za primarna protutijela (10x razrijeđena 5% otopina bezmasnog mlijeka u prahu u TBST-u), u volumenu od 5 mL otopine po membrani. Inkubacija se odvila preko noći na Mini Rotatoru i temperaturi od 4 °C.



Slika 9. Mini Rotator na kojemu se odvija inkubacija (izvor: original autorice rada)

Primarna protutijela koja su korištena (TRPV4 poliklonsko protutijelo, KCNMB1 poliklonsko protutijelo, i mišje monoklonalno anti – β aktin protutijelo) specifična su za proteine od interesa (KCNMB1 veličine 28 kDa, TRPV4 veličine 105 kDa i β – aktin veličine 42 kDa). Anti – β aktin protutijelo obilježeno je peroksidazom iz hrena (HRP, engl. horseradish peroxidase) koja razgrađuje luminol i proizvodi luminiscentni signal, stoga sekundarno protutijelo nije potrebno.

Za određivanje proteina TRPV4 i KCNMB1 nakon inkubacije s primarnim protutijelom, potrebna je i inkubacija sa sekundarnim protutijelom (kozje protužeće protutijelo) koje je specifično za primarno i obilježeno peroksidazom iz hrena kako bi kemiluminiscencijska detekcija bila moguća. Inkubacija sekundarnim protutijelom odvijala se 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon obje inkubacije, membrane su isprane 4 puta po 15 minuta u TBST-u.

Tablica 1. Omjeri razrjeđenja u otopini za protutijela

Protutijelo	Razrjeđenje
anti – β aktin protutijelo	1 : 30 000
KCNMB1 poliklonsko protutijelo	1 : 500
TRPV4 poliklonsko protutijelo	1: 500

4.9. Kemiluminiscencijska detekcija

Nakon inkubacije sekundarnim protutijelima i ispiranja, slijedilo je stavljanje kemiluminiscencijskog reagensa (Pierce ECL Western blotting Substrate, ThermoScientific, USA). Nakon inkubacije u trajanju 1 minute, uklonjen je višak reagensa, a kako bi se spriječilo sušenje, membrana je postavljena između dvije folije. Nastali signal snimljen je uz pomoć Bio-Rad ChemiDoc digitalne kamere. Za kontrolu ekspresije proteina koristilo se mišje monoklonalno anti – β aktin protutijelo (Sigma-Aldrich), specifično za β – aktin, visoko konzervirani protein eukariotskih stanica koji se koristi kao kontrola u Western blot metodi. Kvantifikacija izražaja detektiranih proteina analizirala se pomoću ImageJ programa (17).

Nakon snimanja, membrana je isprana TBST puferom dva puta po 5 min i pohranjena na 4 °C u slučaju potrebe za ponovnom upotrebom.

4.10. Statističke metode

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli određena je Kolmogorov – Smirnovljevim testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između ispitivanih skupina (tri nezavisne eksperimentalne skupine) testirane su analizom varijance (ANOVA). Kao prag statističke značajnosti uzeta je vrijednost $p < 0,05$. Veličina uzorka određena je u skladu s poštenim principima rada s pokusnim laboratorijskim životinjama 3R. Koristio se statistički program SigmaPlot (v11.2, Systat Software, Inc., Chicago, IL, SAD) te GraphPad Prism5.

5. REZULTATI

5.1. Tjelesna masa životinja

Osamnaest zdravih, muških Sprague-Dawley štakora slučajnim je odabirom podijeljeno u tri skupine (šest štakora po skupini). Svakoj životinji izmjerena je tjelesna masa na kraju hiperbaričnog protokola. U tablici 2. prikazane su vrijednosti tjelesnih masa po skupinama izražene u gramima (g).

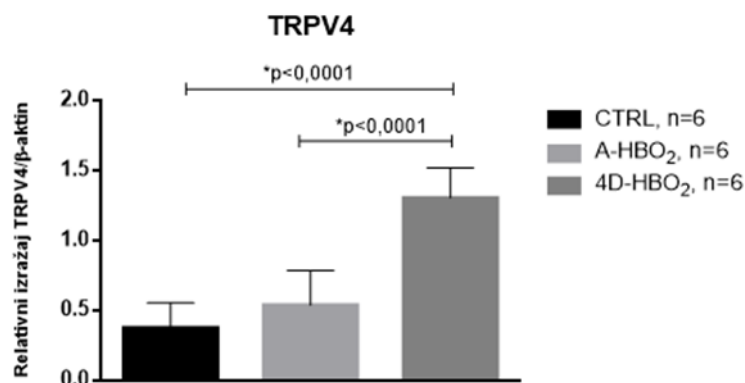
Nije utvrđena statistički značajna razlika u tjelesnoj masi između ispitivanih skupina ($p=0,9421$; vrijednost je dobivena jednosmjernom analizom varijance ANOVA).

Tablica 2. Vrijednosti tjelesne mase

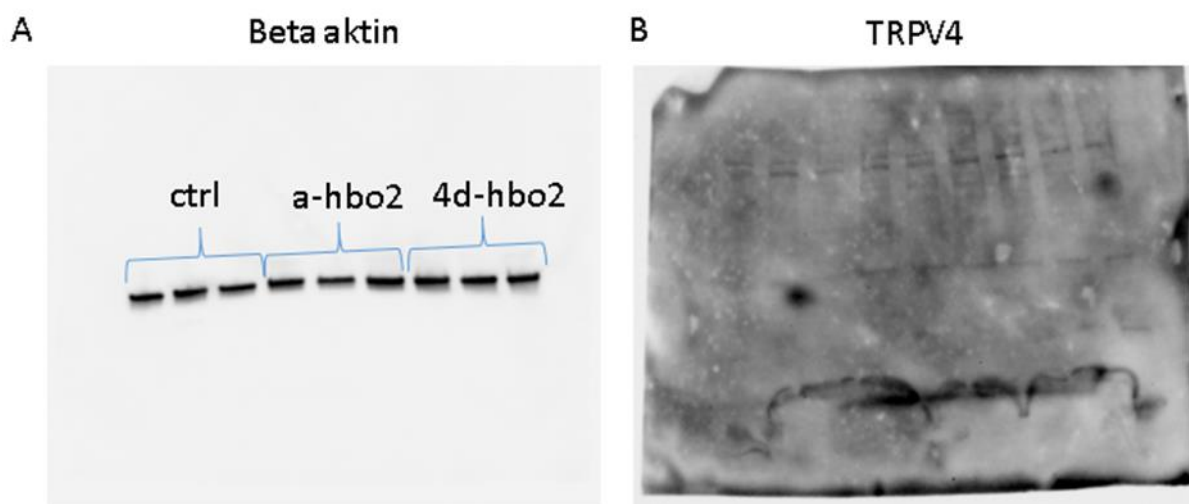
Pokusna skupina	Broj životinja po skupini	Tjelesna masa [g]	P
KONTROLA	6	329 ± 18	0.9421
A- HBO ₂	6	332 ± 22	
4D- HBO ₂	6	323 ± 39	

5.2. Proteinski izražaj TRPV4 proteina u eksperimentalnim skupinama

Slika 10. prikazuje proteinski izražaj TRPV4 proteina kod skupina CTRL, A-HBO₂ i 4D-HBO₂. Proteinski izražaj TRPV4 proteina značajno je povećan u 4D-HBO₂ skupini u usporedbi s CTRL i A-HBO₂ skupinom.



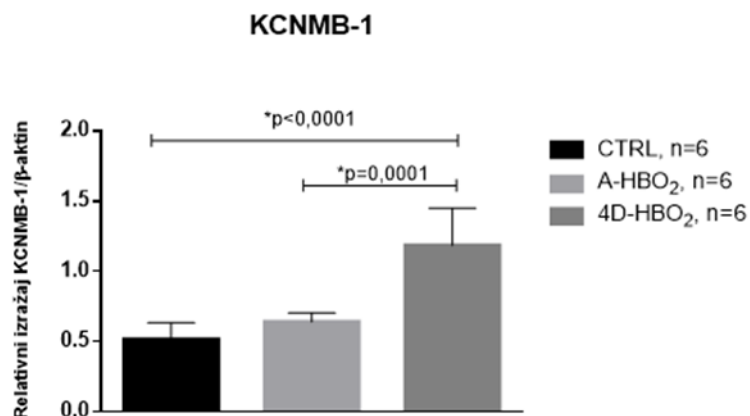
Slika 10. Relativni proteinski izražaj TRPV4 proteina u uzorcima krvnih žila mozga kod skupina CTRL, A-HBO₂ i 4D-HBO₂. Izražaj je normaliziran prema izražaju za protein β-aktin. Rezultati su prikazani grafički kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Oznaka n predstavlja broj štakora po skupinama.



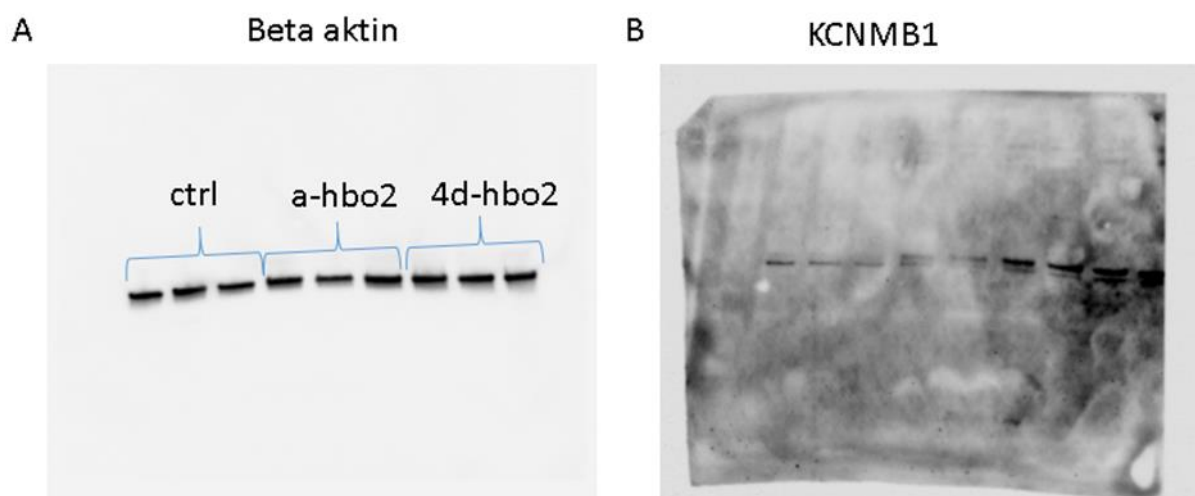
Slika 11. Originalne slike Western blota. Slike su snimljene Bio-Rad ChemiDoc digitalnom kamerom na Medicinskom fakultetu u Osijeku. Ciljani proteini bili su β-aktin (A) i TRPV4 (B).

5.3. Proteinski izražaj KCNMB1 proteina u eksperimentalnim skupinama

Slika 12. prikazuje proteinski izražaj KCNMB1 proteina kod skupina CTRL, A-HBO₂ i 4D-HBO₂. Proteinski izražaj KCNMB1 proteina značajno je povećan u 4D-HBO₂ skupini u usporedbi s CTRL i A-HBO₂ skupinom.



Slika 12. Relativni proteinski izražaj KCNMB1 proteina u uzorcima krvnih žila mozga kod skupina CTRL, A-HBO₂ I 4D-HBO₂. Izražaj je normaliziran prema izražaju za protein β-aktin. Rezultati su prikazani grafički kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Oznaka n predstavlja broj štakora po skupinama.



Slika 13. Originalne slike Western blota. Slike su snimljene Bio-Rad ChemiDoc digitalnom kamerom na Medicinskom fakultetu u Osijeku. Ciljani proteini bili su β-aktin (A) i KCNMB1 (B).

6. RASPRAVA

Dosadašnje studije provedene na Katedri za fiziologiju i imunologiju, koje istražuju utjecaj hiperbarične oksigenacije na vaskularni odgovor kod Sprague-Dawley štakora, pokazale su kako akutno izlaganje hiperbaričnom kisiku povećava razinu oksidativnog stresa te oštećuje vaskularnu relaksaciju (3, 7). Prvo istraživanje koje je izravno procijenilo proizvodnju superoksida i ekspresiju antioksidativnih enzima u različitim protokolima hiperbarične oksigenacije i povezal ga s vaskularnom reaktivnošću je studija Mihaljević i suradnika (3). Rezultati pokazuju da na oslabljenu vazorelaksaciju i hipoksiju u akutnom izlaganju hiperbaričnom kisiku može utjecati povećani oksidativni stres, odnosno stvaranje superoksida. Povećan oksidativni stres potvrđen je povišenjem razine produkata lipidne peroksidacije u serumu i povećane proizvodnje aortalnog superoksida u skupini s akutnom izloženošću hiperbaričnom kisiku (3). Za razliku od akutne, intermitentna hiperbarična oksigenacija nije utjecala na proizvodnju superoksida, već je potakla aktivaciju antioksidativnih enzima (3).

Hiperbarična oksigenacija ima brojne pozitivne učinke, kao što je poboljšanje oksigenacije tkiva, smanjenje edema tkiva, utjecaj na vaskularnu strukturu i funkciju (18). No, osim pozitivnih učinaka, dokumentirani su i štetni učinci djelovanja kisika pa je tako studija Drenjančević i suradnika (5) utvrdila kako akutno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji povećava razinu lipidne peroksidacije u serumu zdravih štakora, ali ne mijenja razinu antioksidativnog kapaciteta. Toksičnost kisika očituje se u nastanku reaktivnih kisikovih čestica (ROS), odnosno stanju neravnoteže između njihova stvaranja i uklanjanja putem antioksidanata i enzima, što dovodi do pojave oksidativnog stresa (11). Reaktivne kisikove čestice su radikali, ioni ili molekule koje nastaju uslijed metabolizma kisika, a reaktivne su jer sadrže nesporen elektron pa mogu reagirati s različitim molekulama u stanici, što može dovesti do oštećenja (12). Rezultatima studije utvrđeno je kako izlaganje akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji povećava oksidativni stres, ali ako se primijeni intermitentno izlaganje hiperbaričnoj oksigenacije (kroz 4 uzastopna dana), oksidativni status vraća se u normalu. Također, povećana razina oksidativnog stresa utječe i na funkciju endotela pa je tako vazorelaksacija krvnih žila smanjena kod skupina koje su izložene akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (5).

Ovo istraživanje istražuje utjecaj akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na proteinski izražaj TRPV4 proteina u TRP ionskim kanalima i KCNMB1 proteina u kalijevim kanalima ovisnima o kalciju na uzorku krvnih žila mozga muških Sprague – Dawley štakora.

Štakori su izloženi terapiji akutnim i intermitentnim hiperbaričnim kisikom prema standardiziranom protokolu (5), a za utvrđivanje promjene proteinskog izražaja primijenjena je Western blot metoda.

Intermitentno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji povećava proteinski izražaj KCNMB1 i TRPV4 proteina što bi moglo biti razlogom očuvane vaskularne reaktivnosti u usporedbi s akutnim izlaganjem hiperbaričnom kisiku.

Na temelju dobivenih rezultata, hipoteza ovog rada je potvrđena te je dokazano da hiperbarična oksigenacija utječe na izražajnost KCNMB1 i TRPV4 proteina.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata možemo zaključiti da primjena intermitentne hiperbarične oksigenacije kod zdravih životinja dovodi do značajno povećanog proteinskog izražaja TRPV4 proteina u krvnim žilama mozga Sprague – Dawley štakora. Primjena intermitentne hiperbarične oksigenacije kod zdravih životinja dovodi i do značajno povećanog proteinskog izražaja KCNMB1 proteina uključenog u izgradnju kalijevih kanala ovisnih o kalciju.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Utvrditi promjenu proteinskog izražaja TRPV4 proteina u TRP ionskim kanalima izoliranih krvnih žila mozga muških Sprague – Dawley štakora podvrgnutih akutnoj i intermitentnoj terapiji hiperbaričnim kisikom, korištenjem metode Western blot.

Nacrt studije: Eksperimentalna studija na pokusnim laboratorijskim životinjama.

Ispitanici i metode: Zdravi Sprague – Dawley štakori (n=18) muškog spola u dobi od 9 do 11 tjedana starosti nasumce su razvrstani u tri skupine: CTRL skupina (zdravi netretirani štakori, n=6), A – HBO₂ skupina - štakori izloženi akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (štakori tretirani jednom HBO₂ u barokomori te žrtvovani odmah nakon terapije, n=6) i 4D – HBO₂ skupina - štakori izloženi intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (štakori izloženi hiperbaričnoj oksigenaciji četiri dana uzastopno te žrtvovani peti dan, n=6). Postupku uzorkovanja prethodilo je vaganje i anesteziranje štakora. Nakon toga izolirane su krvne žile mozga radi određivanja razine proteinskog izražaja KCNMB1 i TRPV4 proteina Western blot metodom.

Rezultati: Nije utvrđena statistički značajna razlika u tjelesnoj masi između ispitivanih skupina ($p = 0.9421$). Proteinski izražaj KCNMB1 i TRPV4 proteina značajno je povećan u skupini 4D–HBO₂ u odnosu na proteinski izražaj istih proteina kod CTRL i A–HBO₂ skupine.

Zaključak: Intermitentna primjena hiperbarične oksigenacije kod zdravih životinja dovodi do značajno povećanog proteinskog izražaja KCNMB1 i TRPV4 proteina u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora.

Ključne riječi: hiperbarična oksigenacija; KCNMB1, krvne žile mozga, proteinski izražaj, TRPV4

9. SUMMARY

Effect of hyperbaric oxygenation on protein expression of TRP ion channels in healthy Sprague-Dawley rats

Aim: The main goal of this study was to determine the expression of the TRPV4 protein in brain blood vessels of healthy Sprague-Dawley rats exposed to acute and intermittent hyperbaric oxygenation (HBO₂).

Study design: Experimental study on laboratory animals (Sprague – Dawley rats)

Materials and methods: 9 – 11 weeks old healthy male Sprague-Dawley rats (n=18) were randomly assigned to three groups: CTRL group (intact animals, n=6), A – HBO₂ group - rats that underwent single (acute) hyperbaric oxygenation treatment (n=6) and 4D – HBO₂ group - rats underwent intermittent hyperbaric oxygenation (4 consecutive HBO₂ treatments for 4 days in a row, n=6). Prior to sampling the animals were weighed and anaesthetized. After that brain blood vessels were isolated in order to determine the protein expression of the KCNMB1 and TRPV4 proteins using the Western Blot method.

Results: There was not statistically significant difference in body mass between the experimental groups (p = 0.9421). Protein expression of KCNMB1 and TRPV4 proteins was significantly increased in the 4D – HBO₂ group compared to the protein expression of the same proteins in the CTRL and A – HBO₂ groups.

Conclusion: Intermittent exposure of healthy Sprague-Dawley rats to hyperbaric oxygenation leads to significantly increased KCNMB1 and TRPV4 protein expressions in the brain blood vessels of Sprague-Dawley rat.

Keywords: blood vessels, hyperbaric oxygenation, KCNMB1, protein expression, TRPV4

10. LITERATURA

1. Huang L, Boling W, Zhang JH. Hyperbaric oxygen therapy as adjunctive strategy in treatment of glioblastoma multiforme. *Med Gas Res.* 2018;8(1):24-28.
2. Gill AL, Bell CNA. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM.* 2004;97:385–395.
3. Mihaljević Z, Matić A, Stupin A, Barić L, Jukić I, Drenjančević Ines. Acute hyperbaric oxygenation, contrary to intermittent hyperbaric oxygenation, adversely affects vasorelaxation in healthy Sprague – Dawley rats due to increased oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Apr 29;2018:7406027.
4. Camporesi E. M., Bosco G. Mechanisms of action of hyperbaric oxygen therapy. *Undersea and Hyperbaric Medicine.* 2014;41(3):247–252.
5. Drenjančević I, Kibel A, Kibel D, Seric V, Cosic A. Blood pressure, acid-base and blood gas status and indicators of oxidative stress in healthy male rats exposed to acute hyperbaric oxygenation. *Undersea Hyperb Med.* 2013;40(4):319-28.
6. Drenjančević I., Kibel A. Restoring vascular function with hyperbaric oxygen treatment: recovery mechanisms. 2014;51(1):1–13.
7. Unfirer S., Mihalj M., Novak S., et al. Hyperbaric oxygenation affects the mechanisms of acetylcholine-induced relaxation in diabetic rats. 2016;43(7):787–803.
8. Verma R, Chopra A, Giardina C, Sabbisetti V, Smyth JA, Hightower LE, et al. Hyperbaric oxygen therapy (HBOT) suppresses biomarkers of cell stress and kidney injury in diabetic mice. *Cell Stress Chaperones.* 2015 May;20(3):495-505.
9. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *PubMed. Pharmacogn Rev.* 2010 Jul-Dec; 4(8): 118–126.
10. Stupin A, Cosic A, Novak S, et al. Reduced Dietary Selenium Impairs Vascular Function by Increasing Oxidative Stress in Sprague-Dawley Rat Aortas. *Int J Environ Res Public Health.* 2017 Jun 2;14(6):591.
11. Balmus I, Ciobica A, Antioch I, Dobrin R, Timfote D. Oxidative Stress Implications in the Affective Disorders: Main Biomarkers, Animal Models Relevance, Genetic Perspectives, and Antioxidant Approaches. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 3975101.

12. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
13. Kurien BT, Scofield RH. Other notable protein blotting methods: a brief review. *Methods Mol Biol*, 2015;1312, 487–503.
14. Mishra M., Tiwari S., Gomes AV. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Rev Proteomics*. 2017; 14(11): 1037–1053.
15. Capobiango JD, Monica TC, Ferreira FP et al. Evaluation of the Western blotting method for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Pediatr (Rio J)*, 2016;92(6), 616–623.
16. Grizelj I, Cavka A, Bian JT, Szczurek M, Robinson A, Shinde S, Nguyen V, Braunschweig C, Wang E, Drenjancevic I, Phillips SA. Reduced flow-and acetylcholine-induced dilations in visceral compared to subcutaneous adipose arterioles in human morbid obesity. *Microcirculation*. 2015;22(1):44-53.
17. Collins TJ. ImageJ for microscopy. *BioTechniques*. 2007; 43:25-30.
18. Mathieu D., Marroni A., Kot J. Tenth European Consensus Conference on Hyperbaric Medicine: recommendations for accepted and non-accepted clinical indications and practice of hyperbaric oxygen treatment. 2017;47(1):24–32.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ena Main

Datum i mjesto rođenja: 29. 10. 1998., Virovitica, Republika Hrvatska

Adresa stanovanja: Grofa Janka Draškovića 1, 33520 Slatina

E-mail adresa: ena.main@gmail.com

Obrazovanje:

2005. – 2009. Osnovna škola Eugena Kumičića, Slatina

2009. – 2013. Osnovna škola Josipa Kozarca, Slatina

2013. – 2017. Matematička gimnazija, Gimnazija Petra Preradovića Virovitica

2017. – 2020. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko – laboratorijska dijagnostika,

Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijek