

Utjecaj akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na izražaj proteina HIF-1 alfa u krvnim žilama Sprague-Dawley štakora

Pavlović, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:619101>

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 laboratorijske
dijagnostike**

Ana Pavlović

**UTJECAJ AKUTNE I INTERMITENTNE
HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA
IZRAŽAJ PROTEINA HIF-1 ALFA U
KRVNIM ŽILAMA SPRAGUE-DAWLEY
ŠTAKORA**

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Ana Pavlović

**UTJECAJ AKUTNE I INTERMITENTNE
HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA
IZRAŽAJ PROTEINA HIF-1 ALFA U
KRVNIM ŽILAMA SPRAGUE-DAWLEY
ŠTAKORA**

Završni rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Mentor: prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med.

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

Ovaj rad ima 24 lista, 4 tablice i 5 slika.

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med. na pomoći i vođenju tijekom pisanja ovog završnog rada.

Također zahvaljujem i neposrednoj voditeljici, dr. sc., prof. Zrinki Mihaljević na pomoći, strpljivosti i savjetima tijekom provedbe istraživanja i pisanja završnog rada.

Najveće hvala mojoj obitelji, posebno roditeljima, koji su mi omogućili preddiplomski studij i bili najveća potpora tijekom studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Hiperbarična oksigenacija	1
1.2. Hipoksijom inducirani faktor - 1 alfa (HIF-1 α).....	1
2. HIPOTEZA	3
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	4
4. MATERIJALI I METODE.....	5
4.1. Ustroj studije.....	5
4.2. Eksperimentalni životinjski model	5
4.3. Uzorkovanje i priprema uzorka	6
4.4. Kvantifikacija proteina	7
4.5. <i>Western blot</i>	8
4.5.1. Jednodimenzionalna poliakrilamid gel elektroforeza	9
4.5.2. Prijenos proteina na membranu (engl. <i>blotting</i>).....	11
4.5.3. Inkubacija s protutijelima i kemiluminiscencijska detekcija	12
4.6. Statistička obrada podataka	13
5. REZULTATI	14
6. RASPRAVA	18
7. ZAKLJUČAK.....	20
8. SAŽETAK	21
9. SUMMARY.....	22
10. LITERATURA.....	23
11. ŽIVOTOPIS.....	24

Popis kratica

APS	amonijev persulfat
BSA	albumin govedeg seruma (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
CAD	C-terminalna aktivacijska domena
CBB	engl. <i>Coomassie Brilliant Blue</i>
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
FIH-1	faktor inhibicije 1
HBO ₂	hiperbarična oksigenacija
HIF-1	hipoksijom inducirani faktor transkripcije 1
HIF-1 α	hipoksijom inducirani faktor transkripcije 1 (alfa podjedinica)
HIF-1 β	hipoksijom inducirani faktor transkripcije 1 (beta podjedinica)
HRP	peroksidaza iz hrena
ODD	razgradna domena ovisna o kisiku (engl. <i>Oxygen-dependent Degradation Domain</i>)
pO ₂	parcijalni tlak kisika
PVDF	poliviniliden difluorid
SDS	natrij dodecil sulfat (engl. <i>Sodium Dodecil Sulphate</i>)
TEMED	tetrametiletildiamin
Tris	hidroksimetil aminometan
VHL	von Hippel-Lindau

1. UVOD

1.1. Hiperbarična oksigenacija

Hiperbarična oksigenacija (HBO₂) terapijska je metoda koja se koristi u stanjima smanjene oksigenacije tkiva. Terapija hiperbaričnom oksigenacijom podrazumijeva terapijsko ili eksperimentalno korištenje 100 %-tnog kisika pri tlaku koji je iznad razine atmosferskog tlaka (1). Tijekom terapije hiperbaričnom oksigenacijom, tlak se povećava sustavno, a terapija se najčešće provodi u hiperbaričnim komorama koje mogu biti dizajnirane za jednu ili više osoba ili eksperimentalnih životinja. Izlaganje kisiku može se provoditi preko maski (laringealna maska), endotrahealnih cijevi ili cijela komora može biti ispunjena 100 %-tnim kisikom (2).

HBO₂ ima složene učinke na imunitet, transport kisika i hemodinamiku. U stanjima smanjene tkivne oksigenacije, do te mjere da ne zadovoljava metaboličke potrebe, primjena HBO₂ iznimno je korisna jer opskrbljivanje kisikom pod visokim tlakom dovodi do povećanja arterijskog i tkivnog parcijalnog tlaka kisika (pO₂). HBO₂ također povećava razinu otopljenog kisika u plazmi i tako korigira hipoksiju – stanje smanjene razine kisika u krvi (2). Hiperoksija, uzrokovana terapijom HBO₂, uzrokuje brzu i značajnu vazokonstrikciju, ali to se nadoknađuje povećanim prijenosom otopljenog kisika u plazmi, a mikrovaskularni protok krvi u ishemijskom tkivu poboljšan je s HBO₂ (3). U hipoksičnim uvjetima, bilo zbog ishemije ili drugih čimbenika, HBO₂ smanjuje infekciju i staničnu smrt i održava tkivo sposobnim za život tijekom ozdravljenja (2).

Hiperbarična oksigenacija utječe na mehanizam vazorelaksacije koji se aktivira kao tjelesni odgovor na stanje hipoksije. Transkripcijski čimbenik, točnije njegova podjedinica koja se specifično aktivira hipoksijom, naziva se hipoksijom inducirani faktor 1 alfa (HIF-1 α).

1.2. Hipoksijom inducirani faktor-1 alfa (HIF-1 α)

HIF-1 α je hipoksično inducibilna podjedinica heterodimernog kompleksa HIF-1. Kompleks HIF-1, transkripcijski je faktor i ima važnu ulogu u regulaciji gena odgovornih za prilagodbu i preživljavanje stanica tijekom stanja smanjene opskrbe kisikom. Osim HIF-1 α ,

kompleks HIF-1 sadrži i konstitutivno eksprimiranu podjedinicu HIF-1 β (4). Obje podjedinice proteinske su strukture i pripadaju osnovnoj heliks-petlja-heliks Per-ARNT-Sim (bHLH - PAS) proteinskoj obitelji. Glavne domene te proteinske obitelji, bHLH i PAS, potrebne su pri formiranju kompleksa HIF-1.

HIF-1 α jedan je od tri izomorfna oblika HIF- α proteina te su njegova struktura i funkcija opsežnije proučavane od ostala dva oblika (5). Glavni regulator staničnog odgovora na hipoksiju upravo je HIF-1 α protein jer dovodi do ekspresije nekoliko gena uključenih u prilagodbu na smanjenu dostupnost kisika (6). U stanju normoksije HIF-1 α je vrlo nestabilan i brzo se razgrađuje, te ga je zbog toga vrlo teško uočiti (7). Dvije domene unutar HIF-1 α podjedinice odgovorne su za mehanizam kojim stanični kisik regulira HIF-1 aktivnost. Mehanizam razgradnje HIF-1 α proteina u stanju normalne razine kisika regulira razgradna domena ovisna o kisiku (ODD). Ta domena sadrži dva prolinska ostatka (Pro 402 i Pro 564) koji se hidrosiliraju specifičnim HIF prolil-hidrosilazama. Hidrosilacija potiče udruživanje HIF-1 α s von Hippel-Lindau (VHL) E3 ligaznim kompleksom koji aktivira ubikvitin-proteasomski put razgradnje HIF-1 α proteina (4, 5). Drugi mehanizam regulacije aktivnosti kompleksa HIF-1 uključuje C-terminalnu aktivacijsku domenu (CAD), te je za njega bitan faktor inhibicije FIH-1 koji hidrosilacijom asparaginskog ostatka (Asp 803) HIF-1 α sprječava njegovu interakciju s koaktivatorima transkripcije (5).

Za razliku od nestabilnog oblika tijekom normoksije, u stanju hipoksije HIF-1 α stabilizira se te translocira iz citoplazme u jezgru, gdje se s jezgrinim proteinom, HIF-1 β , udružuje u HIF-1 kompleks (4). Formirani kompleks postaje transkripcijski aktivan, povezuje se s elementima odgovora na hipoksiju (HRE) u regulatornim područjima ciljnih gena i veže transkripcijske koaktivatore koji potiču gensku ekspresiju (8).

Malo je podataka o ulozi HIF-1 α i njegovih ciljnih gena na vaskularnu funkciju i učincima na cirkulaciju pri izlaganju hiperbaričnoj oksigenaciji. Također, nije u potpunosti poznato mijenja li se izražajnost proteina HIF-1 α pod utjecajem akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije.

2. HIPOTEZA

Hiperbarična oksigenacija utjecat će na izražaj proteina HIF-1 α .

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog istraživanja utvrditi izražajnost proteina HIF-1 α kod akutne i intermitentne izloženosti hiperbaričnoj oksigenaciji na modelu zdravih *Sprague-Dawley* štakora, metodom *Western blot*.

4. MATERIJALI I METODE

Ekspresija HIF-1 α transkripcijskog čimbenika određena je *Western blot* metodom za određivanje izražajnosti proteina, u uzorcima torakalne aorte *Sprague-Dawley* štakora. *Western blot* metoda temelji se na specifičnom vezanju protutijela na izolirane proteine.

4.1. Ustroj studije

Eksperimentalna studija na pokusnim životinjama (štakorima *Sprague-Dawley*). Završni je rad dio istraživanja VIF2017-MEFOS-4 PROJEKTA „Modulacija oksidativnog stresa i upalnog odgovora hiperbaričnom oksigenacijom u makro- i mikrocirkulaciji *Sprague-Dawley* štakora“.

4.2. Eksperimentalni životinjski model

Istraživanje je provedeno na zdravim *Sprague-Dawley* štakorima starosti 9 – 11 tjedana. Svi štakori uzgajani su u Vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku. Životinje su bile podijeljene u četiri skupine:

- 1) kontrolna skupina (KONTROLA) – zdravi štakori koji nisu bili izloženi hiperbaričnoj oksigenaciji
- 2) štakori izloženi akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (A-HBO₂) – štakori izloženi akutnom djelovanju hiperbaričnog kisika u barokomori te žrtvovani odmah nakon izlaganja
- 3) štakori izloženi akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji i žrtvovani 24 sata nakon izlaganja (24H-HBO₂)
- 4) štakori izloženi intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (4D-HBO₂) – štakori izloženi djelovanju hiperbaričnog kisika u barokomori 4 uzastopna dana i žrtvovani 5. dan

Izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji svih štakora odvijalo se u istoj barokomori (Rekompresijska komora za eksperimente 110 L, Đuro Đaković, Aparati d.d.).

Akutno izlaganje hiperbaričnom kisiku (HBO₂) podrazumijeva smještanje životinja u barokomoru, nakon čega slijedi 15 minuta kompresije na 2,0 atm, otvaranjem kompresijskog ventila (dekompresijski je ventil pri tome bio zatvoren) i puštanjem kisika u komoru. Kompresijski ventil zatvara se pri tlaku od 2,0 atm, te se štakori izlažu djelovanju 100 %-tnog kisika 2 sata uz protok 2 – 3 L/min. Za vrijeme trajanja terapije, sa štakorima u komori smještena je i mala količina granula kalcij-hidroksida i natrij-hidroksida te etilvioleta (Draegersorb 800 Plus, DraegerMedical) za upijanje izdahnutog CO₂. Nakon toga slijedi 15 minuta dekompresije otpuštanjem dekompresijskog ventila.

Intermitentno izlaganje hiperbaričnom kisiku podrazumijeva jedno izlaganje dnevno, otprilike u isto vrijeme, u istim uvjetima kao i kod akutnog izlaganja, ali tijekom četiri uzastopna dana.

4.3. Uzorkovanje i priprema uzorka

Sve životinje usmrćene su na isti način. Prije usmrćivanja, anestezirane su kombinacijom ketamina 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2 ml, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma) te ostavljene neko vrijeme, do početka djelovanja anestetika. Nakon djelovanja anestetika, životinje su dekapitirane na giljotini te je izvršeno uzorkovanje torakalne aorte. Poduzete su sve mjere kako bi se spriječila patnja životinja, a istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Osijeku (#2158-61-07-14-124).

Uzorkovanje je izvršeno uz pomoć škarica i pincete, nakon čega su uzorci aorte, svaka aorta posebno, pohranjeni u označene Eppendorf tubice i stavljene u tekući dušik te naposljetku prebačene na -80 °C do homogenizacije uzoraka.

Homogenizacija uzoraka provedena je usitnjavanjem pojedinih uzoraka u tekućem dušiku do praha, nakon čega su uzorci izvagani te je 100 mg usitnjenog tkiva torakalne aorte pomiješano s 1 ml homogenizacijskog pufera. Homogenizacijski pufer pripremljen je od 1 mM EDTA, 10 mM Tris (FisherScientific, Belgija), 0,4 % SDS (AcrosOrganics, SAD) i koktela inhibitora proteaza 0,4 µl/100 µl (SigmaAldrich) uz dodatak 1 mM kobaltovog klorida za stabilizaciju transkripcijskog čimbenika HIF-1 α . Dodan je i Triton-X, u koncentraciji 0,062 %, u kojoj ne interferira s Bradfordom, reagensom za određivanje koncentracije proteina koja

je slijedila nakon homogenizacije. Koncentracija SDS-a smanjila se na 0,1 % da bi određivanje proteina po Bradfordu bilo pravilnije. Uloga koktela inhibitora proteaza (1 tableta u 1,5 ml dH₂O) jest sprječavanje razgradnje proteina. Svi reagensi s uzorkom dobro su izmiješani na miješalici (*vortexu*) i dodatno homogenizirani uz pomoć mehaničkog homogenizatora (IKA Thurax) na 4 °C kako bi se izbjegla denaturacija proteina.

Nakon homogenizacije uzorci su centrifugirani na 17000 g 30 min na 4 °C, supernatanti su alikvotirani i čuvani na -80 °C do analize.

4.4. Kvantifikacija proteina

Za određivanje koncentracije proteina korištena je spektrofotometrijska Bradford metoda. Metoda se temelji na obojenju otopljenih proteina s reagensom *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBB), pri čemu dolazi do vezanja anionske boje za amino skupine proteina, što je praćeno promjenom boje reagensa (smeđa u plavu) i pojavom apsorpcijskog maksimuma kod 595 nm. Intenzitet plavog obojenja nastao pri reakciji proteina u uzorku s Bradfordovim reagensom proporcionalan je koncentraciji proteina. Nepoznate koncentracije proteina u uzorcima očitavaju se iz kalibracijske krivulje načinjene nizom razrjeđenja standardne otopine albumina govedeg seruma – BSA (engl. *bovine serum albumin*). Kalibracijska krivulja pokazuje ovisnost koncentracije o apsorbciji.

Prethodno pripremljene stock otopine BSA (otapanjem 100 mg BSA u 10 ml destilirane vode (10 mg/ml)), zamrznute na -20 °C i pohranjene u alikvotima od 1 ml, nakon odmrzavanja korištene su za pripremu standardnih otopina BSA poznatih koncentracija 0, 0,1, 0,25, 0,5, 1 i 1,4 mg/ml. Priređene su po dvije replike svakog standarda, a kao slijepa proba koristio se homogenizacijski pufer istog sastava kao i ranije opisani pufer za homogenizaciju uzoraka. Priređeni standardi poznatih koncentracija nanoseni su na mikrotitarsku pločicu, u dvije jažice od svake poznate koncentracije. Nulta proba korištena je kao kontrola za poravnavanje spektrofotometra na vrijednost apsorbcije 0. Volumen uzorka nepoznate koncentracije (prethodno pripremljeni homogenizirani alikvot torakalne aorte) koji se nanosi na mikrotitarsku pločicu prilagođen je tako da se izmjerena apsorbcija nalazi unutar intervala koji je izmjeren za uzorke BSA poznate koncentracije.

Neposredno prije mjerenja apsorbancije na čitaču mikrotitarskih pločica (Slika 1.), u svaku jažicu dodano je 250 μ l Bradfordovog reagensa, dok je u zadnje četiri jažice dodan čisti reagens. Do reakcije dolazi vrlo brzo, pa se već 10 minuta od dodavanja reagensa mjerila apsorbancija na valnoj duljini od 595 nm.



Slika 1. Čitač mikrotitarskih pločica – BioRad (izvor: original autorice rada)

4.5. Western blot

Za određivanje izražaja proteina korištena je *Western blot* metoda, koja se sastoji od nekoliko koraka:

1. jednodimenzionalna poliakrilamid gel elektroforeza
2. prijenos proteina na membranu (engl. *blotting*)
3. inkubacija s protutijelima i kemiluminiscencijska detekcija.

Elektroforezom se pod djelovanjem električnog polja razdvajaju proteini na temelju njihove molekulske mase. Određena masa ukupnih staničnih proteina (denaturiranih ili u nativnoj konformaciji) nanosi se na poliakrilamidni gel na kojem se pod utjecajem struje određenog napona razdvajaju tako da proteini manje mase putuju brže, a veće mase sporije. Tako razdvojeni proteini s gela se prebacuju na membranu pod utjecajem električne struje

određene jakosti, na kojoj se fiksiraju. Protein od interesa ili njegova modifikacija konačno se uočavaju vezanjem specifičnih antitijela, koja uz dodatak supstrata emitiraju svjetlost (kemiluminiscencija), a ti signali se registriraju uz pomoć digitalne kamere.

4.5.1. Jednodimenzionalna poliakrilamid gel elektroforeza

Elektroforezi je prethodila priprema donjeg i gornjeg poliakrilamidnog gela koji se izlijevaju između stakala (1 mm) pričvršćenih na postolje za izlijevanje gelova. Ovisno o molekulskoj masi, odnosno veličini proteina koje želimo uočiti, odabire se gustoća donjeg gela (gela za razdvajanje).

Pripremljen je 10 %-tni donji gel. Svi reagensi za pripremu donjeg gela (Tablica 1.), osim amonijeva persulfata (APS) i tetrametiletilendiamina (TEMED), otpipetirani su i pomiješani te ostavljeni 30 – 45 minuta na magnetskoj miješalici, dok se otopina nije zagrijala na sobnu temperaturu. Prije izlijevanja donjeg gela, uz kratko miješanje, dodani su 10 %-tni APS i TEMED. Izliveni gel (cca 5 ml) odmah je nadslojen izopropanolom (cca 1 ml) kako bi se blokirao kontakt sa zrakom koji sprječava polimerizaciju, te ostavljen da polimerizira idućih 45 minuta do sat vremena.

Tijekom procesa polimerizacije pripremljena je otopina za 4 %-tni gornji gel (*stacking gel*), koja se priprema po istom postupku kao i otopina za donji gel, ali u drugim volumenima i s puferom za gornji gel (Tablica 2.). Prije izlijevanja gornjeg gela izopropanol je uklonjen s površine donjeg gela, ispran destiliranom vodom te je površina donjeg gela pažljivo posušena filter papirom. Gornji gel izliven je na površinu polimeriziranog donjeg gela, do ruba stakla, te je umetnut češljic koji služi za formiranje utora (jažica) u koje su se, nakon polimerizacije, nanosili uzorci. Gornji gel ostavljen je da polimerizira oko 30 – 45 minuta.

Za vrijeme polimerizacije slaže se sustav za elektroforezu (Slika 2.). Nakon polimerizacije, stakla između kojih se nalazio polimerizirani gel postavljena su u kadicu tako da je kraće stakalce okrenuto prema unutrašnjosti kadice, kako bi se omogućila vodljivost. U kadicu je uliven pufer za elektroforezu (10 x Stock, pH 8,3) do razine prekrivanja jažica, uklonjen češljic, nakon čega je uslijedilo ispiranje jažica, od nepolimeriziranog akrilamida, puferom za elektroforezu.

Tablica 1. Priprema 10 ml otopine 10 %-tnog donjeg gela

MiliQ H ₂ O	4,1 ml
Stock akrilamid/bis	3,3 ml
Pufer za donji gel (1,5M Tris-HCl, pH 8,8)	2,5 ml
10 % SDS (natrij dodecil sulfat)	100 µl
10 % APS (amonijev persulfat)	50 µl
TEMED (tetrametiletilendiamin)	5 µl

Tablica 2. Priprema 10 ml otopine 4 %-tnog gornjeg gela

MiliQ H ₂ O	6,1 ml
Stock akrilamid/bis	1,3 ml
Pufer za gornji gel (0,5M Tris-HCl, pH 6,8)	2,5 ml
10 % SDS (natrij dodecil sulfat)	100 µl
10 % APS (amonijev persulfat)	50 µl
TEMED (tetrametiletilendiamin)	10 µl

**Slika 2.** Sustav za elektroforezu (izvor: original autorice rada)

Pufer za nanošenje uzoraka na gel (Tablica 3.), prije nanošenja uzoraka na gel, pomiješan je s prethodno homogeniziranim uzorcima proteina, u omjeru 1 : 1. Mješavina je prokuhana 5 minuta na 95 °, zatim kratko centrifugirana (engl. *spin-down*) te nanosena na gel,

oko 5 do 10 μl po jažici. U posljednju jažicu na gelu nanosen je standard za *Western blot* obilježen *Strep-tag* biljegom (Precision Plus Protein WesternC Standard tvrtke BioRad). Usljedila je elektroforeza 3 h, na 100 V, pri temperaturi od 4 °C.

Tablica 3. Priprema 600 μl pufera za nanošenje uzoraka na gel

Laemmli Sample Buffer	475 μl
β -merkaptoetanol	25 μl
glicerol	100 μl

4.5.2. Prijenos proteina na membranu (engl. *blotting*)

Nakon elektroforeze gel se prenosi na membranu uz pomoć kazeta za prijenos. Unutar kazete slažu se spužvice, PVDF (poliviniliden difluorid) membrana, filter papiri i donji gel s razdvojenim proteinima nakon elektroforeze. Za prijenos proteina bilo je potrebno pripremiti i pufer za prijenos, pH 8,3 (Tablica 4.) i ohladiti ga na 4 °C. Filter papir i PVDF membrana izrezani su prema dimenzijama gela. Prije završetka elektroforeze, prethodno metanolom aktivirane PVDF membrane, namočene su s filter papirima i spužvicama u pufer za prijenos i ohlađene na 4 °C. Nakon završetka elektroforeze, stakla s gelom izvađena su iz kadice za elektroforezu. Jedno staklo odmaknuto je i gornji gel odstranjen je uz pomoć plastične špatule. Na crni šupljikavi okvir kazete postavljena je spužvica, filter papir, donji gel, PVDF membrana, drugi filter papir i konačno druga spužvica. Prije preklapanja složene strukture prozirnim, šupljikavim okvirom kazete i konačnog zatvaranja, uz pomoć plastičnog valjčića istisnut je višak zraka. Složena kazeta postavljena je u kadicu za prijenos tako da je crna strana kazete okrenuta na crnu stranu kadice. Prijenos se provodio 1,5 h, na 200 mA, pri temperaturi od 4 °C. Za vizualizaciju proteina, nakon završetka prijenosa, membrana se nekoliko sekundi uranjala pincetom u Amido-BlueBlack boju (Sigma Aldrich) te se prebacila u kadicu s otopinom za odbojavanje (25 % izopropanol, 10 %-tna vodena otopina octene kiseline), gdje se u nekoliko faza odbojavala (3 x 5 min).

Tablica 4. Priprema pufera za prijenos

Tris (hidroksimetil aminometan)	25 mM
glicin	193 mM
metanol	20 %

4.5.3. Inkubacija s protutijelima i kemiluminiscencijska detekcija

Nakon završetka odbojavanja, membrana se ispiru otopinom za odbojavanje u TBST puferu (50 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween-20 [Sigma Aldrich], pH 7,5) 2 puta 15 min. Potom je membrana blokirana 4 %-tnom otopinom bezmasnog mlijeka u prahu u TBST-u, 1 h na sobnoj temperaturi na tresilici. Blokiranje reducira nespecifično vezanje protutijela na proteine ili membranu. Previše blokirana membrana može dovesti do redukcije signala, dok premalo blokirana membrana za posljedicu uzrokuje jako pozadinsko obojenje.

Nakon završetka blokiranja, uslijedila je inkubacija membrane primarnim protutijelom u otopini za primarna protutijela (3 % bezmasno mlijeko u prahu u TBST-u), 2 ml otopine po membrani. Inkubacija se odvila preko noći, na *rotary shaker*-u, na temperaturi od 4 °C. Nakon završetka, membrana je isprana 4 puta 15 minuta u TBST-u.

Nakon ispiranja primarnog protutijela, membrana je inkubirana sekundarnim protutijelom u otopini za sekundarna protutijela (50 mM Tris-base, 150 mM NaCl, pH 7,5, uz dodatak 5 % v/v BM Chemiluminescence Blotting Substrate - Blocking reagent). Inkubacija je trajala 2 h na sobnoj temperaturi. U otopinu su dodana i protutijela StrepTactin (BioRad), streptaktinska protutijela za detekciju *Step-tag* aminokiselinske sekvence standarda koje sadrže proteini poznate molekulske mase. Protutijela su konjugirana s peroksidazom iz hrena (HRP) kako bi se i proteinski standard prenio na film i uočio, isto kao i traženi proteini. Nakon inkubacije, membrane su isprane 4 puta 15 minuta u TBST-u. Membrana je lagano obrisana Kimtech maramicom i na nju je stavljen kemiluminiscencijski reagens (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, USA), a inkubacija je trajala 1 min na sobnoj temperaturi. Peroksidaza iz hrena katalizira stvaranje aktiviranog intermedijarnog reakcijskog produkta, radikala luminola (endoperoksid), koji se vraća u primarno stanje (3-aminoflatni ion) emitirajući svjetlost. Kao medijator prijenosa elektrona koristi se 4-jodofenolom, kojim se postiže jako pojačanje emisije svjetlosti. Nakon završetka inkubacije, višak reagensa uklonjen je, a membrana je stavljena između 2 folije da se spriječi sušenje te je istisnut višak

zraka. Membrana je snimljena uz pomoć Bio-Rad ChemiDoc digitalne kamere na Medicinskom fakultetu u Osijeku. Nakon snimanja, membrana je dva puta isprana TBST puferom 5 min te pohranjena na 4 °C u slučaju potrebe za ponovnom upotrebom.

Membrana se može koristiti za uočavanje nekog drugog proteina, ali u tom slučaju koristi se novo specifično protutijelo. Ako je ekspresija, odnosno izražajnost novog proteina od interesa u istom rangu kDa kao prethodni protein, potrebno je ispiranje membrane 2 – 5 min puferom za skidanje protutijela te nakon toga ispiranje 10 min TBST puferom. Tako se s membrane uklanjaju sva vezana protutijela, a membrana se priprema za inkubaciju s novim, specifičnim protutijelima. Korak ispiranja membrane nije potrebno raditi ako ekspresija novog proteina od interesa nije u istom rangu kDa kao prethodni protein, već se membrana direktno može inkubirati željenim protutijelom.

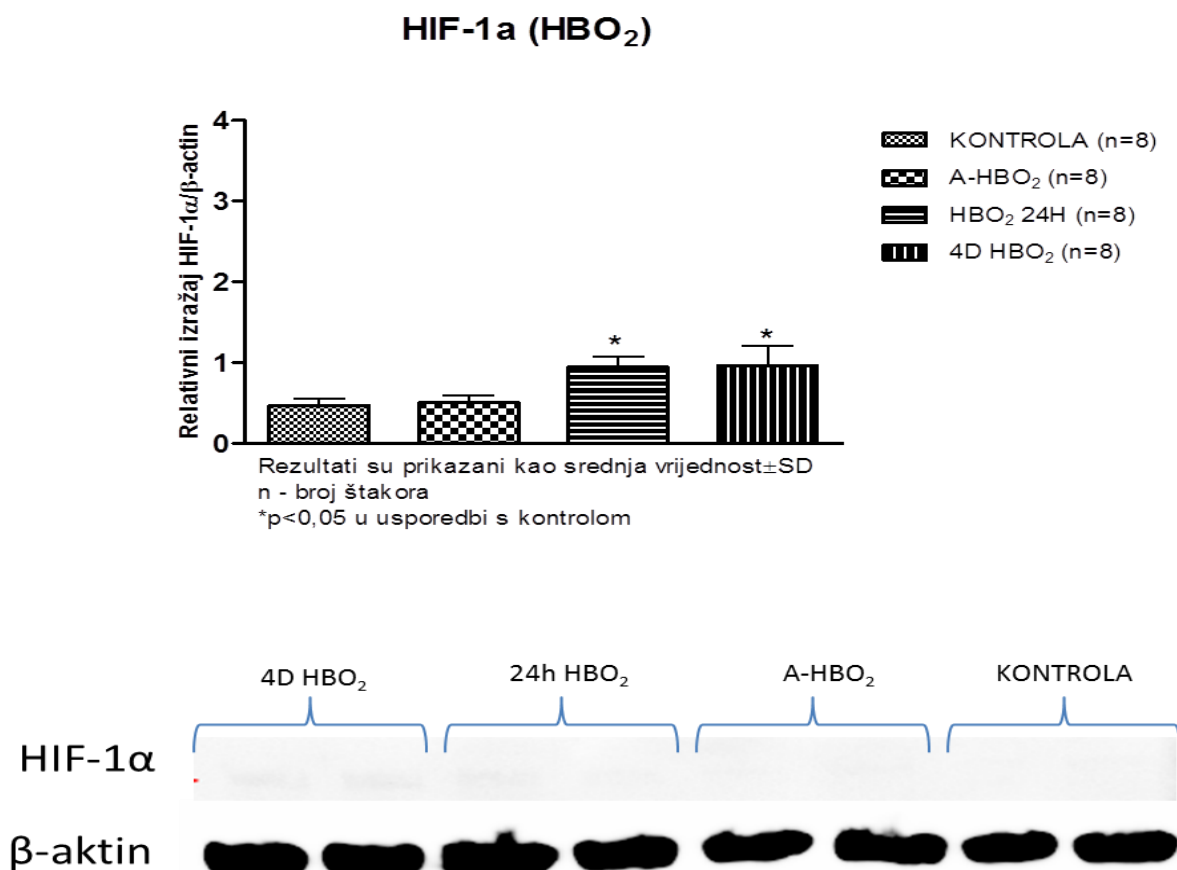
Za normalizaciju i kontrolu nanošenja uzoraka, određena je koncentracija β -aktina (42 kDa), jednog od visoko konzerviranih proteina eukariotskih stanica koji se koristi kao kontrola u *Western blot* metodi. Korišteno je mišje protu-štakorsko β -aktin primarno protutijelo u razrjeđenju 1 : 1000 te sekundarno kozje protu-mišje protutijelo u razrjeđenju 1 : 10000.

4.6. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Normalnost distribucije podataka određena je Kolmogorov – Smirnovljevim testom. Podatci kontrolne skupine i skupina podvrgnutih hiperbaričnoj oksigenaciji uspoređivali su se Studentovim t-testom. Kao prag statističke značajnosti uzeta je vrijednost $p < 0,05$. Veličina uzorka određena je prema prijašnjim studijama provedenim na Katedri za fiziologiju i imunologiju te u skladu s poštenim principima rada s pokusnim laboratorijskim životinjama 3R. Za analizu se koristio SigmaPlot, v11.2 (Systat Software, Inc., Chicago, IL, SAD).

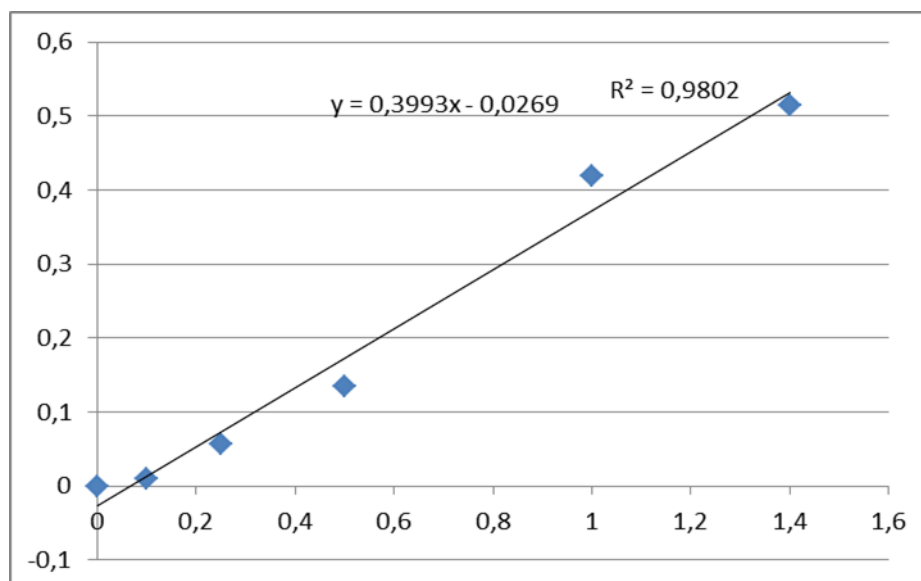
5. REZULTATI

Relativni izražaj HIF-1 α proteina statistički je značajno povećan ($p < 0,05$) u 24H-HBO₂ i 4D-HBO₂ skupinama u usporedbi s KONTROLOM.



Slika 3. Relativni izražaj HIF-1 α proteina u uzorcima torakalne aorte određen *Western blot* metodom na 4 skupine: kontrolna skupina – zdravi, netretirani štakori (KONTROLA), štakori izloženi akutnom djelovanju hiperbarične oksigenacije te žrtvovani odmah nakon izlaganja (A-HBO₂), štakori izloženi akutnom djelovanju hiperbarične oksigenacije i žrtvovani 24 h nakon izlaganja (24H-HBO₂) i štakori izloženi intermitentnom djelovanju hiperbarične oksigenacije (4D-HBO₂). Izražaj je normaliziran prema izražaju za protein β -aktin. Rezultati su prikazani slikovno (slike *Western blota* uslikane digitalnom kamerom Bio-Rad ChemiDoc) i grafički kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija; * $p < 0,05$ (Studentov t-test) u usporedbi s KONTROLOM; n predstavlja broj štakora po skupinama.

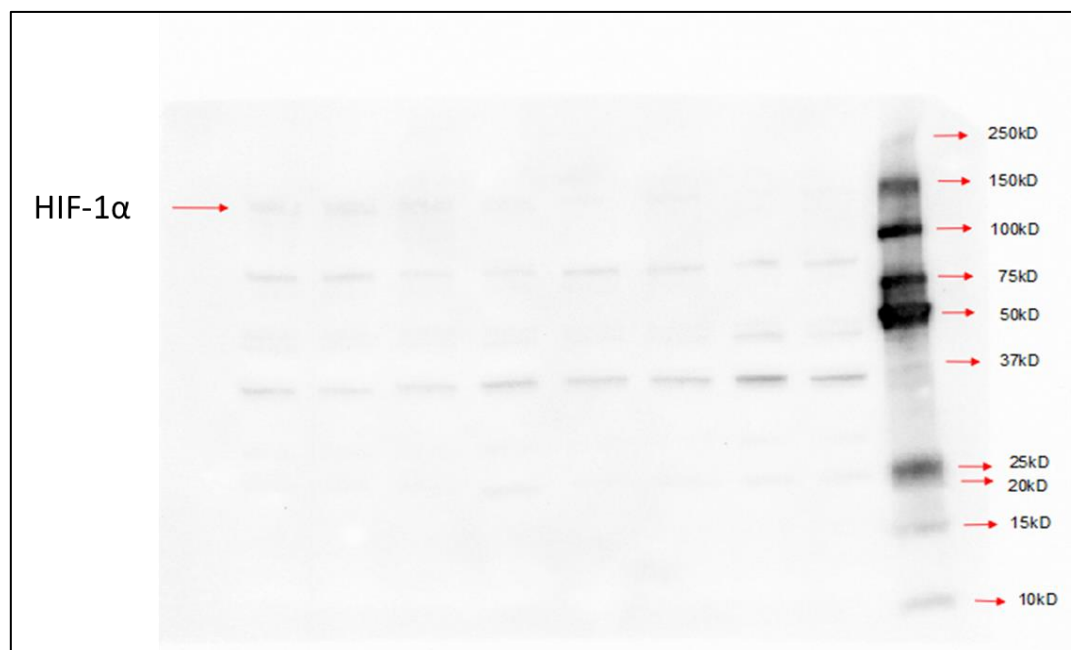
Rezultat spektrofotometrijske Bradford metode određivanja koncentracije proteina jest kalibracijska krivulja iz koje se očitavaju nepoznate koncentracije proteina (Slika 4.).

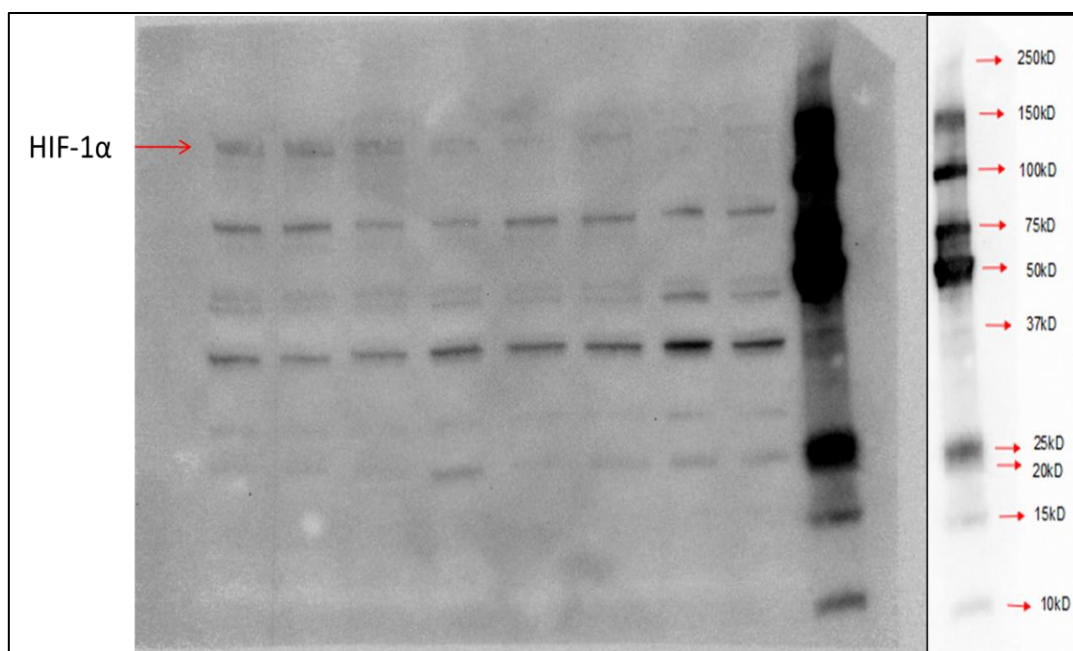
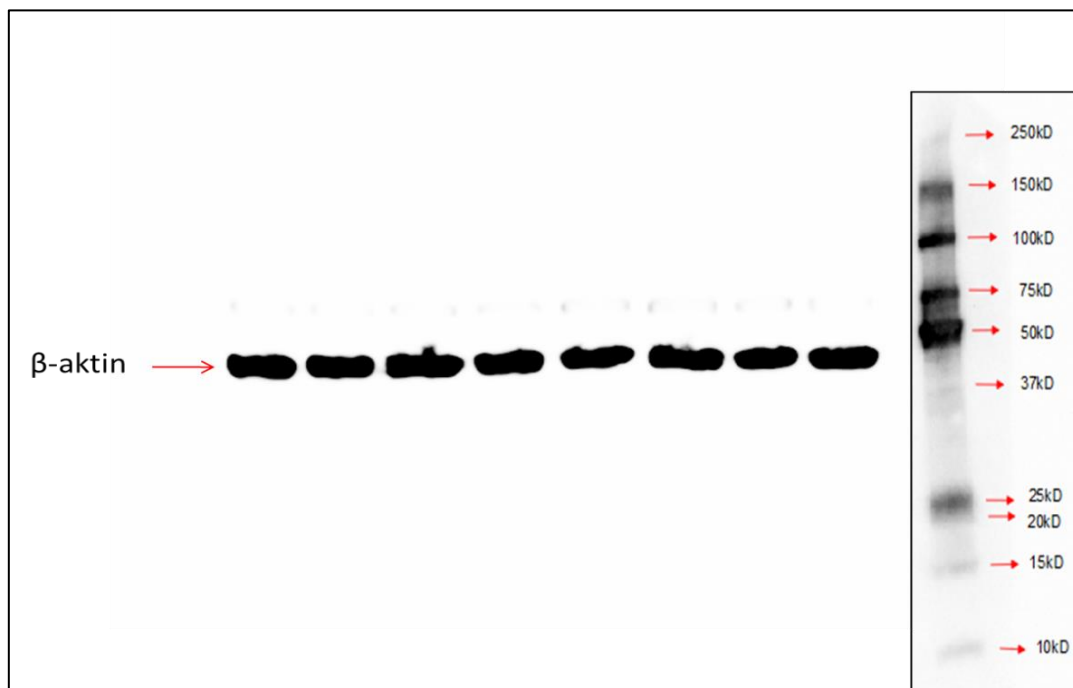


Slika 4. Kalibracijska krivulja načinjena nizom razrjeđenja standardne otopine albumina goveđeg seruma – BSA (engl. *bovine serum albumin*). Pokazuje ovisnost koncentracije proteina (x-os) o apsorbaniji (y-os).

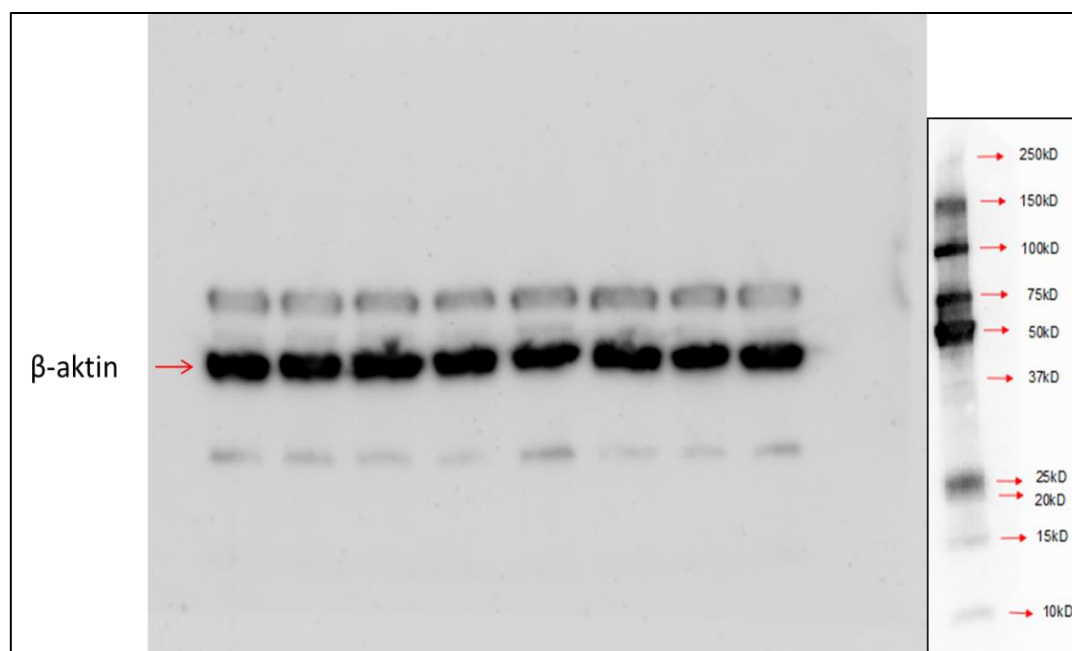
Rezultat *Western blot* metode su slike dobivene digitalnom kamerom:

A



B**C**

D



Slika 5. Originalne slike *Western blota* izrađene od uzoraka torakalne aorte *Sprague-Dawley* štakora. Slike su snimljene Bio-Rad ChemiDoc digitalnom kamerom na Medicinskom fakultetu u Osijeku. Ciljani proteini bili su HIF-1 α veličine 130 kDa (A i B) i β -aktin veličine oko 45 kDa (C i D).

6. RASPRAVA

Dosadašnja istraživanja o utjecaju hiperbarične oksigenacije na izražajnost HIF-1 α proteina pokazuju različite rezultate. Primjerice, Gu i suradnici proučavajući mehanizam ishemijske tolerancije na modelu štakora, potaknute terapijom hiperbarične oksigenacije, uočavaju da ona potiče ekspresiju HIF-1 α proteina (10). S druge strane, Sun i suradnici u svom istraživanju o učinku terapije hiperbaričnom oksigenacijom kod fokalne cerebralne ishemije, na mišjem modelu, uočavaju smanjenu ekspresiju HIF-1 α proteina (11). Aktivacija HIF-1 α podjedinice HIF-1 kompleksa strogo je reguliran i kontroliran proces te se u hiperoksičnim uvjetima aktivira degradacija HIF-1 α putem ubikvitin-proteasomskog puta (5). Neovisno o razini kisika u organizmu, za ekspresiju HIF-1 α proteina nužni su reaktivni kisikovi spojevi (7), a oni se mogu pojačano stvarati pri visokim parcijalnim tlakovima koji se primjenjuju prilikom terapije hiperbaričnom oksigenacijom.

Svrha ovog završnog rada bila je istražiti utječe li i na koji način akutno i intermitentno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji na izražajnost HIF-1 α proteina u uzorcima torakalne aorte te savladati princip *Western blota* – metode za određivanje izražajnosti proteina. Kroz detaljan opis protokola, ista metoda određivanja HIF-1 α proteina može se primijeniti za istraživanje nekih drugih proteina. Budući da je ovim istraživanjem dobivena normalna distribucija podataka, rezultati kontrolne skupine i skupina podvrgnutih hiperbaričnoj oksigenaciji uspoređivali su se Studentovim t-testom. Uočen je statistički značajno povećan relativni izražaj HIF-1 α proteina kod skupine štakora akutno izloženih djelovanju hiperbarične oksigenacije koji su žrtvovani 24 h nakon izlaganja (24H-HBO₂) te kod skupine štakora intermitentno izloženih djelovanju hiperbarične oksigenacije (4D-HBO) u usporedbi s kontrolnom skupinom. U objema skupinama, 24H-HBO₂ i 4D-HBO₂, $p < 0,05$ u usporedbi s kontrolnom skupinom. Uspoređujući kontrolnu skupinu sa skupinom štakora izloženih akutnom djelovanju hiperbarične oksigenacije i žrtvovanih odmah nakon izlaganja (A-HBO₂) nije uočena statistički značajna razlika. Dobiveni rezultati govore u prilog pretpostavci o pojavi pseudohipoksičnih uvjeta u pauzama između izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji. Gomes i suradnici u svome istraživanju govore o stabilizaciji HIF-1 α proteina u stanju pseudohipoksije (12). Stabilizacijom proteina neće doći do njegove degradacije, već aktivacije. Budući da se HIF-1 α aktivira u stanju hipoksije, neposredno nakon izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji organizam je u stanju hiperoksije i tada ne dolazi do aktivacije HIF-1 α proteina, što se slaže s rezultatima A-HBO₂ skupine. 24 h nakon izlaganja

hiperbaričnoj oksigenaciji (24H-HBO₂), kao i nakon periodičnog izlaganja nekoliko uzastopnih dana (4D-HBO₂), HIF-1 α aktivira se, što je vidljivo i po povećanoj ekspresiji tog proteina u objema skupinama. Na temelju dobivenih rezultata, hipoteza ovog rada potvrđena je, te je dokazano da hiperbarična oksigenacija utječe na izražajnost HIF-1 α proteina.

7. ZAKLJUČAK

Akutno i intermitentno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji potiče izražajnost HIF-1 α proteina.

8. SAŽETAK

Cilj: Utvrditi izražajnost proteina HIF-1 α kod akutne i intermitentne izloženosti hiperbaričnoj oksigenaciji (HBO₂) na modelu zdravih *Sprague-Dawley* štakora.

Materijali i metode: Zdravi *Sprague-Dawley* štakori, starosti 9 – 11 tjedana, podijeljeni su u četiri skupine (KONTROLA, A-HBO₂, 24H-HBO₂ i 4D-HBO₂). Kontrolna skupina nije bila izložena djelovanju HBO₂. Akutnom djelovanju HBO₂ izložene su skupine A-HBO₂ (žrtvovani odmah nakon izlaganja) i 24H-HBO₂ (žrtvovani 24 h nakon izlaganja), dok je intermitentnom djelovanju HBO₂ bila izložena 4D-HBO₂ skupina štakora. Izražaj HIF-1 α proteina određen je na uzorcima torakalne aorte SD štakora uz pomoć *Western blot* metode.

Rezultati: Izražaj HIF-1 α proteina statistički je značajno povećan u 24H-HBO₂ i 4D-HBO₂ skupinama u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Zaključak: Akutno i intermitentno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji potiče izražajnost HIF-1 α proteina.

Ključne riječi: HIF-1 α ; hiperbarična oksigenacija; *Western blot*

9. SUMMARY

The effect of acute and intermittent hyperbaric oxygenation on the expression of HIF-1 alpha protein in blood vessels of Sprague-Dawley rats

Aim: The aim of this study was to determine the expression of HIF-1 α protein in acute and intermittent exposure to hyperbaric oxygenation (HBO₂) in healthy Sprague-Dawley rats.

Materials and Methods: Healthy Sprague-Dawley rats, 9 - 11 weeks old, were divided into four groups (CONTROL, A-HBO₂, 24H-HBO₂ i 4D-HBO₂). The control group was not exposed to HBO₂. A-HBO₂ (sacrificed immediately after the exposure) and 24H-HBO₂ (sacrificed 24 hours after the exposure) rats were exposed to the acute HBO₂, while 4D-HBO₂ rats were exposed to the intermittent HBO₂. The expression of HIF-1 α protein was determined on thoracic aorta samples of SD rats by the Western blot method.

Results: The expression of HIF-1 α protein was statistically significantly increased in 24H-HBO₂ and 4D-HBO₂ groups in comparison to the control group.

Conclusion: Acute and intermittent exposure to hyperbaric oxygenation induces HIF-1 α protein expression.

Key words: HIF-1 α ; hyperbaric oxygenation, Western blot

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. Plos One. Effect of hyperbaric oxygen therapy (HBO) on implant-associated osteitis in a femur fracture model in mice. Dostupno na adresi:
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0191594>
Datum pristupa: 15.05.2018.
4. Ke Q, Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol.* 2006;70:1469-1480.
5. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med.* 2004;36:1-12.
6. Plos One. Hypoxia Inducible Factor 1-Alpha (HIF-1 Alpha) Is Induced during Reperfusion after Renal Ischemia and Is Critical for Proximal Tubule Cell Survival. Dostupno na adresi:
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0033258>
Datum pristupa: 15.05.2018.
7. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF-1 α) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions. *J Biol Chem.* 1997; 272:22642-22647.
8. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, and Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science.* 2002;295:858-861.
9. Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulatin of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* 1993;268:21513-21518.
10. Gu GJ, Li YP, Peng ZY, Xu JJ, Kang ZM, Xu WG, et al. Mechanism of ischemic tolerance induced by hyperbaric oxygen preconditioning involves upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and erythropoietin in rats. *J Appl Physiol.* 2008;104:1185-91.
11. Sun L, Marti HH, Veltkamp R. Hyperbaric oxygen reduces tissue hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2008;39:1000–1006.
12. Gomes AP, Price NL, Ling AJY, Moslehi JJ, Montgomery MK, Rajman L, i sur. Declining NAD⁺ Induces a Pseudohypoxic State Disrupting Nuclear-Mitochondrial Communication during Aging. *Cell.* 2013;155(7):1624–1638.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Ana Pavlović

Datum rođenja: 12. 6. 1995.

Mjesto rođenja: Našice

Adresa: J. J. Strossmayera 4a, 31530 Podravska Moslavina

E-pošta: ana.pavlovic.06@gmail.com

Obrazovanje:

2002. – 2010. Osnovna škola Ante Starčevića, Viljevo

2010. – 2014. I. gimnazija, Osijek

2014. Studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku