

Učinak hiperbarične oksigenacije na HIF-1alpha posredovanu modulaciju ravnoteže Th17 i Treg stanica nakon akutnog i intermitentnog izlaganja kod Sprague-Dawley štakora

Duvnjak, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:152:874185>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Marija Duvnjak

**UČINAK HIPERBARIČNE
OKSIGENACIJE NA HIF-1ALPHA
POSREDOVANU MODULACIJU
RAVNOTEŽE TH17 I TREG STANICA
NAKON AKUTNOG I
INTERMITENTNOG IZLAGANJA
HIPERBARIČNOJ OKSIGENACIJI KOD
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**

Završni rad

Osijek, 2019.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Marija Duvnjak

**UČINAK HIPERBARIČNE
OKSIGENACIJE NA HIF-1ALPHA
POSREDOVANU MODULACIJU
RAVNOTEŽE TH17 I TREG STANICA
NAKON AKUTNOG I
INTERMITENTNOG IZLAGANJA
HIPERBARIČNOJ OKSIGENACIJI KOD
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**

Završni rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu u Osijeku, na Katedri za fiziologiju i imunologiju, u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju.

Mentor rada: Izv.prof.dr.sc. Martina Mihalj, dr.med.

Rad ima 43 (četrdeset i tri) lista i 11 (jedanaest) slika.

Zahvale

Zahvaljujem svima koji su vjerovali i bili uz mene tijekom ovog studija.

Posebno hvala mojim roditeljima, sestri i braći, jer bez njihove pomoći ne bih ostvarila svoje ciljeve.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Martini Mihalj, dr. med. na velikoj stručnoj pomoći tijekom istraživanja i izrade završnog rada.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Aniti Matić, dipl. ing. i dr.sc. Zrinki Mihaljević, prof na trudu, strpljenju i pomoći tijekom izvođenja praktičnog dijela završnog rada.

Isto tako ovim putem zahvaljujem profesorima i predavačima na nesebičnom dijeljenju iskustva i znanja kako bi što lakše usvojili potrebno gradivo.

Hvala svim mojim kolegama koji su pridonijeli stvaranju ovog završnog rada i onima koji su moje studentske dane pretvorili u neizbrisive uspomene.

SADRŽAJ RADA

1. UVOD	1
1.1. Hiperbarična oksigenacija	1
1.1.1. Učinci hiperbarične oksigenacije	1
1.2. Imunost i podjela T limfocita	2
1.2.1. Regulacijski limfociti T	3
1.2.2. Pomagački limfociti T	4
1.3. HIF-1 α	5
1.3.1. Uloga HIF-1 α u diferencijaciji regulatornih i Th17 T limfocita	6
2. HIPOTEZA	7
3. CILJ	8
4. MATERIJALI I METODE	9
4.1. Ustroj studije	9
4.2. Ispitanici (materijal)	9
4.3. Metode	10
4.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica iz periferne krvi	10
4.3.2. Izolacija limfocita iz mezenteričnih limfnih čvorova (mLN)	11
4.3.3. Kultivacija i stimulacija stanica	12
4.3.4. Protočna citometrija	12
4.3.5. Western blot	15
4.3.6. Blokiranje membrane i inkubacija protutijelima	15
4.3.7. Kemiluminiscencijska detekcija	16
4.3.8. Ispiranje vezanih protutijela s membrane	17
4.4. Statističke metode	17
5. REZULTATI	18
6. RASPRAVA	26

7. ZAKLJUČAK	29
8. SAŽETAK.....	30
9. SUMMARY	31
10. LITERATURA.....	32
11. ŽIVOTOPIS	35

POPIS KRATICA

CD – klaster diferencijacije, engl. *cluster of differentiation*

CTLA-4 – antigen 4 povezan s aktivnošću citotoksičnih T-limfocita, engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*

EDTA – etilendiaminotetraoctena kiselina, engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*

FoxP3 – transkripcijski čimbenik Foxp3, engl. *forkhead box p3*

HBO₂ – hiperbarična oksigenacija, engl. *hyperbaric oxygen treatment*

HIF – hipoksijom inducirani čimbenik, engl. *hypoxia-inducible factor*

HIF-1 α – hipoksijom inducirani čimbenik 1 alfa, engl. *hypoxia-inducible factor 1 alpha*

HILPDA – lipidna kapljica inducirana hipoksijom, engl. *hypoxia inducible lipid droplet associated*

HRE – element odgovora na hipoksiju, engl. *hypoxia- response element*

HRP – peroksidaza iz hrena, engl. *horse radish peroxidase*

IL – interleukin

INF- γ – interfero- γ

mLN – mezenterični limfni čvor, engl. *mesenteric lymph nodes*

NK – prirodno ubilačke stanice, engl. *natural killer*

PBMC – mononuklearne stanice periferne krvi, engl. *peripheral blood mononuclear cell*

PMA – forbol-12-miristat-13-acetata

ROR γ t – engl. *retinoic acid-related orphan receptor gamma*

RPMI – Roswell Park Memorial Institute 1640 medij za stanične kulture

SCC – zrnatost, engl. *side scatter*

SGK – glukokortikoidna kinaza, engl. *serum glucocorticoid-regulated kinase*

TGF- β – transformirajući faktor rasta β , engl. *transforming growth factor β*

Th – pomoćnički T limfociti, engl. *T helper*

Treg – regulatorni limfociti T, engl. *regulatory T cell*

VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta, engl. *vascular endothelial growth factor*

WB – Western blot analiza

1. UVOD

1.1. Hiperbarična oksigenacija

Hiperbarizam je pojava koja opisuje izlaganje krvi u plućima izrazito visokim tlakovima alveolarnih plinova, što je slučaj kod ronjenja. Nakon određene granice ti visoki tlakovi mogu uzrokovati značajne promjene tjelesnih funkcija, može doći do dekompresijske bolesti i plućne embolije (1). Na dubinama od 10 metara pod morskom površinom čovjek će biti izložen tlaku od 202,6 kPa. Kada je tlak kisika u krvi viši od 13 kPa dolazi do povećanja količine otopljenog kisika u tekućoj fazi krvi te samo udisanje kisika pod viskom alveolarnim tlakom prilično je štetno za mnoga tkiva u organizmu. Izlaganje kisiku pod tlakom višem od 400 kPa uzrokuje epileptične napade nakon kojih osoba pada u komu (1). Jedini poznati način za povećanje količine otopljenog kisika u krvi hiperbarična je oksigenacija. Temelj terapije hiperbaričnom oksigenacijom (engl. *hyperbaric oxygen treatment*, HBO_2) je povećanje količine kisika u krvi pri tlaku od 100 kPa u komorama posebne konstrukcije. Porastom tlaka kisika kojeg udišemo za 100 kPa (1,0 bara), sa svakih 100 ml krvi organizmu se doprema oko 2,4 ml fizički otopljenog kisika bez posredovanja hemoglobina (2). Krv se može i hiperoksigenirati te primiti još više kisika jer se pod takvim tlakom kisik bolje otapa u krvnoj plazmi (Henryjev zakon). Takva krv donosi više kisika povrijeđenim tkivima, što utječe na različite načine na ublažavanje bolesti. Prilikom difuzije kisika otopljenog u krvi prema tkivima, velikom brzinom se ispravlja lokalna ili opća hipoksija (nedostatak kisika u tkivima) (2, 3).

1.1.1. Učinci hiperbarične oksigenacije

Najizraženiji učinci hiperbarične oksigenacije su:

1. povećavanje količine kisika u stanicama s obzirom na fizikalno otopljen kisik u plazmi čime se regulira hipoksija i smanjuje upalna reakcija
2. poboljšavanje cirkulacije, smanjenje gustoće plazme, povećavanje elastičnosti opne crvenih krvnih stanica, smanjenje ljepljivosti krvnih pločica i bijelih krvnih stanica te ubrzanje stvaranja mreže novih krvnih kapilara
3. odstranjenje plinskih mjehurića iz organizma, što je iznimno važno kod ronjenja i plinske embolije

4. povećanje obrambene sposobnosti organizma zbog povećavanja sposobnosti bijelih krvnih stanica te na taj način zaustavlja rast bakterija i uništava ih
5. povećanje osjetljivosti zloćudnih stanica tumora na zračenje
6. pospješuje zarastanje kostiju (4).

Hiperbarična komora sofisticiran je medicinski uređaj koji osigurava boravak u sredini sniženog ili povišenog tlaka u odnosu na normalni atmosferski tlak od 100 kPa. Nerijetko se naziva stimulatorom ronjenja, osim što je umjesto vodom ispunjena plinom (4). Za HBO₂ koristi se primjena tlaka do 3,0 bara te je dokazano da je HBO₂ terapija sigurna za bolesnike i da su nuspojave rijetke kada se tretman provodi pri tlaku manjem od 3,0 bara. Isto tako, dokazano je da ekstremno hiperbarično stanje ili predugo izlaganje tretmanu može dovesti do toksičnosti kisika. Tako izlaganje tretmanu od 4,0 bara pogoršava oksidacijski stres u moždanom tkivu, dok izlaganje tretmanu od 5,0 bara znatno povisuje rizik od dobivanja napada epilepsije i udara (3-5).

1.2. Imunost i podjela T limfocita

Imunost je sposobnost obrane domaćina od stranih antigena, a isto tako sudjeluje i u uklanjanju mrtvih stanica te pokretanju popravka tkiva. Razlikujemo urođenu imunost, koja je uvijek prisutna kod zdravih pojedinaca i stečenu imunost, koja se još naziva i adaptiva ili specifična jer se prilagođava napadu mikroorganizama, zahtjeva umnažanje i diferencijaciju limfocita. Stečeni imunološki sustav čine limfociti T (T stanice) i njihovi produkti poput protutijela. Postoji nekoliko različitih vrsta limfocita T koji prepoznaju različite antigene i diferenciraju se u izvršne stanice što im omogućuje uništenje ciljnih antigena te samim time i zaštitu organizma (6). Na temelju toga razlikujemo:

1. Pomagačke limfocite T, koji prepoznaju antigene na površinama antigen- prezentirajućih stanica i izlučuju citokine koji potiču različite mehanizme upale. Sam naziv dobili su na temelju toga što pomažu B limfocitima u proizvodnji protutijela, a fagocitima eliminirati unesene mikroorganizme.
2. Citotoksične limfocite T, koji prepoznaju antigene na zaraženim stanicama te ih ubijaju.

3. Regulacijske limfocite T, koji ograničavaju aktivaciju drugih limfocita, posebno T limfocita, i sprječavaju autoimunost.

Te se stanice razlikuju po površinskim proteinima koje dokazujemo upotrebom monoklonskih protutijala. Kao standardnu oznaku tih proteina uzimamo klaster diferencijacije (*engl. cluster of differentiation, CD*) te brojčanu vrijednost koja opisuje površinski protein koji određuje odgovarajuću stanicu ili fazu diferencijacije stanice i koje prepoznaje određena grupa protutijela (6).

1.2.1. Regulacijski limfociti T

Regulacijski limfociti T (nazivani i Treg), prije poznati kao T supresorske stanice, su vrsta limfocita T koji moduliraju imunološki sustav, održavaju toleranciju na vlastite antigene i sprječavaju autoimune bolesti. Kao što sam naziv sugerira, to su stanice koje imaju ulogu u regulaciji ili suzbijanju ostalih stanica u imunološkom sustavu (7). Njihovu ulogu također možemo primijetiti u nizu kliničkih stanja počevši od alergija i autoimunih bolesti gdje je opisan smanjeni broj ili funkcionalna sposobnost ovih stanica, do infekcija pojedinim patogenima i tumorskih oboljenja gdje je situacija suprotna. Dvije su osnovne populacije regulacijskih limfocita T:

1. Prirodni regulacijski limfociti T koji se do svoje potpune zrelosti razvijaju u timusu. Predodređeni su za obavljanje supresivnih funkcija i na temelju toga imaju bitnu ulogu za održavanje tolerancije na vlastito te za održavanje periferne homeostaze. Njihova bitna karakteristika je konstitutivna ekspresija α lanca receptora za interleukin 2 (IL-2) CD25 i transkripcijskog čimbenika FOXP3 (*engl. forkhead box p3*).
2. Inducirani regulacijski limfociti T koji nastaju na periferiji nakon kontakta s antigenom. Oni mogu suprimirati i ciljane stanice koje ne djeluju na njihovu specifičnost za antigen koji ih je potaknuo (8).

Većina njih su CD4⁺ i izražavaju visoku razinu CD25, lanac α receptora za interleukin-2 (IL-2). Isto tako, one izražavaju transkripcijski faktor FoxP3, koji je nedavno opisan kao važan faktor transkripcije i najspecifičniji molekularni marker za do sada poznate regulacijske limfocite T (9). Mutacije u genu koji kodira FoxP3 kod ljudi i miševa uzrokuju velike promjene

u organizmu. Dokazano je kako te promjene posljedično uzrokuju sistemska, multiorgansku autoimunu bolest te time pokazuju stvarnu važnost FoxP3 regulacijskih limfocita T (6).

Postoji nekoliko mehanizama pomoću kojih regulacijski limfociti T suprimiraju imunološki odgovor. Neke regulacijske stanice proizvode citokine poput IL-10 i transformirajući faktor rasta β (engl. *transforming growth factor* β , TGF- β) koji inhibiraju aktivaciju makrofaga, dendritičkih stanica i limfocita. Isto tako mogu izražavati antigen 4 povezan s aktivnošću citotoksičnih T-limfocita (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*, CTLA-4), koji može blokirati molekule B7 s APC i onesposobiti ih za pružanje kostimulacije preko CD28 i aktiviranja T limfocita. Također, regulacijski limfociti T mogu preko svojih receptora vezati visoke razine IL-2 te na taj način reducirati njegovu dostupnost reagirajućim T limfocitima (6).

1.2.2. Pomagački limfociti T

Na temelju analize proizvodnje različitih citokina otkriveno je kako postoje funkcionalno različite podvrste CD4⁺ T limfocita. One se mogu diferencirati u pet temeljnih podvrsta izvršnih stanica koje stvaraju različite grupe citokina te time obavljaju različite funkcije u procesu obrane domaćina. Te vrste stanica uključuju T pomagačke stanice tipa 1 (Th1), pomagačke stanice tipa 2 (Th2), Th17, T folikularne pomagačke (Tfh) i regulatorne T (Treg) stanice (10).

Th1 stanice stimuliraju makrofage i posreduju imunološki odgovor na unutarstanične patogene. Njihov prepoznatljiv citokin je interfero- γ (INF- γ), danas poznat kao najmoćniji aktivator makrofaga. Djeluju preko CD40-liganda i INF- γ te tako pojačavaju sposobnost makrofaga za ubijanje mikroorganizama. Kada mikroorganizmi dospiju u fagosome makrofaga, peptidni dio mikroorganizma se predočavaju na molekulama MHC II i prepoznaju ih CD4⁺ T stanice. Ako te stanice pripadaju Th1 podvrsti, one izražavaju CD4-ligand i izlučuju INF- γ . Vezanje liganda na CD40 na makrofagima i vezanje INF- γ za vlastiti receptor na istim makrofagima potiče biokemijski put razaranja mikroorganizama (6).

Th2 stanice stimuliraju mastocite, eozinofile i bazofile i posreduju imunološki odgovor na helminte. Njihovi prepoznatljivi citokini su IL-4, IL-5 i IL-13 i oni skupa sudjeluju u uklanjanju infekcija helmintima. S obzirom da su helminti preveliki da bi ih se fagocitiralo, za

njihovo uništenje potrebni su drugačiji mehanizmi nasuprot onog što je aktivacija makrofaga. IL-4 potiče stvaranje imunoglobulina E (IgE) koji oblažu helminte, zatim se eozinofili preko svojih Fc receptora vežu za te IgE. IL-5, kojeg stvaraju Th2, ima ulogu u aktivaciji navedenih eozinofila koji otpuštaju sadržaj svojih granula i toksičan je za parazite. IL-13 potiče peristaltiku crijeva i lučenje sluzi te tako olakšava izbacivanje parazita iz crijeva (6).

Th17 stanice stimuliraju mnoge tipove stanica da usmjere neutrofile na mjesta infekcije i posreduju imunološkoj reakciji protiv izvanstaničnih bakterija i gljivica. Njihovi prepoznatljivi citokini su IL-22 i IL-17. Ključna uloga Th17 stanica je poticanje privlačenja neutrofila, te u manjoj mjeri i monocita, čime omogućuje početak upalnih reakcija koje prate brojne stečene imunološke odgovore posredovane T-stanicama. IL-17 potiče proizvodnju kemokina koji su odgovorni za privlačenje leukocita. Isto tako, IL-17 potiče stanice na stvaranje antimikrobnih tvari zvanih defenzini, koji djeluju kao lokalno stvoreni, endogeni antibiotici. Za razliku od IL-17, IL-22 pomaže u održavanju epitelnih barijera te potiče stanice na popravak oštećenog epitela (6-11).

1.3. HIF-1 α

Hipoksijom inducirani faktor (engl. *hypoxia-inducible factor*, HIF), heterodimerni protein, građen je od dvije podjedinice. α podjedinica regulirana je od strane kisika, dok je beta podjedinica konstruktivno izražena. Hipoksijom inducirani čimbenik 1 α (engl. *hypoxia-inducible factor 1 alpha*, HIF-1 α) glavni je transkripcijski čimbenik koji potiče izražaj na hipoksiju. Od prve identifikacije hipoksičnih stanica unutar karcinoma 1950-ih godina, hipoksija je postala poznata kao znak stanica karcinoma i njihove mikrookoline. Ona potpomaže karcinomima u njihovom rastu, preživljavanju i metastaziranju. Kisik-neovisna glikoliza aktivira se u stanicama karcinoma čak i u stanju normoksije, što je poznato i kao Warburg-ov efekt (12). Spomenuti efekt još se naziva i aerobna glikoliza jer je uočeno da stanice raka pokazuju povećanu glikolizu usprkos dovoljnoj količini kisika, odnosno uočena je pojačana potrošnja glukoze i akumulacija velike količine laktata. Postoje različiti mehanizmi koji stvaraju pseudohipoksične uvjete, čak i kod normoksije. S obzirom na važnost HIF-1 α za patofiziologiju raka, koncept pseudohipoksije mogao bi riješiti dugogodišnji misteriji Warburg efekta i omogućiti bolje razumijevanje različitih pojava kod karcinoma (12).

1.3.1. Uloga HIF-1 α u diferencijaciji regulatornih i Th17 T limfocita

Kod adaptivnog odgovora na hipoksiju, HIF-1 α djeluje kao glavni regulator transkripcije gena. U hipoksičnim uvjetima potiče transkripciju preko 40 gena, uključujući transportere glukoze, eritropoetin, glikolitičke enzime, HILPDA (engl. *hypoxia inducible lipid droplet associated*), vaskularni endotelni faktor rasta i druge oblike odgovora na hipoksiju. Ima ključnu ulogu u angiogenezi tumora, embrionalnoj vaskularizaciji i patofiziologiji ishemijske bolesti. Hipoksija je jedno od ključnih obilježje karcinoma i povezana je sa malignom transformacijom, metastazama i otpornošću na kemoterapiju. Pod normoksičnim stanjem, HIF-1 α se brzo razgrađuje kroz ubikvitin-proteasomski put (13). U uvjetima hipoksije proces degradacije se inhibira i HIF-1 α se prenosi iz stanične plazme u jezgru, gdje se može vezati na elemente odgovora hipoksije (engl. *hypoxia- response element*, HRE) koji reguliraju transkripciju mnogih gena relevantnih za transport kisika, metabolizam glukoze, staničnu proliferaciju i apoptozu (14). Isto tako, važno je napomenuti da HIF-1 α regulira ravnotežu diferencijacije između Th17 i Treg limfocita. Pospješuje diferencijaciju Th17 stanica izravnom aktivacijom transkripcijskog čimbenika ROR γ t-a (engl. *retinoic acid-related orphan receptor gamma*) koji je središnji faktor i koji kontrolira transkripciju IL-17 i diferencijaciju Th17 stanica. Ima sposobnost stvaranja i terciarnog kompleksa vezanjem ROR γ t i p300 na promotor IL17. Suprotno tome, HIF-1 α inhibira diferencijaciju Treg stanica vezanjem FoxP3 proteina te na taj način usmjerava Treg stanice na razgradnju u proteosomu. Zanimljivo je da su brojna istraživanja pokazala da je upalni okoliš relativno hipoksičan. Zbog toga je bitno znati da aktivnost HIF-1 α predstavlja glavni mehanizam pomoću kojeg hipoksična stanja povezana s upalom mogu potaknuti diferencijaciju Th17 stanica (15). Također, važno je da se ta regulacija odvija i u normoksičnim i u hipoksičnim uvjetima, kako bi se spriječile bolesti povezane s neravnotežom Th17 i Treg stanica.

2. HIPOTEZA

Polazna pretpostavka je da će nakon akutnog i intermitentnog izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji doći do promjene ravnoteže između Treg i Th17 stanica, a njihove frekvencije će biti u korelaciji s izražajem HIF-1 α transkripcijskog čimbenika u mononuklearnim stanicama periferne krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cell*, PBMC).

3. CILJ

Cilj istraživanja je ispitati učinak akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na:

- I. izražaj transkripcijskog čimbenika HIF-1 α u mononuklearnim stanicama periferne krvi i mezenteričnim limfnim čvorovima
- II. frekvencije i omjer Th17 i Treg stanica u perifernoj krvi i mezenteričnim limfnim čvorovima
- III. međusobni odnos Th17 i Treg stanica.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao pokusno (eksperimentalno) istraživanje na životinjskom modelu. Praktični dio istraživanja proveden je u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju, na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku. Eksperimentalni postupci bili su u skladu s Europskim smjernicama za dobrobit laboratorijskih životinja koje se koriste u istraživanjima (Direktiva 210/63/EU) te ih je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku br. 2158-61-07-14-124 i Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske.

4.2. Ispitanici (materijal)

U istraživanju su korišteni zdravi Sprague-Dawley štakori u dobi od šest do devet tjedana. Životinje su bile uzgojene u Vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku te su tijekom pokusa bile smještene u eksperimentalnoj nastambi. Tijekom cijelog pokusa životinje su imale pristup vodi i hrani *ad libidum* te su bile izložene dvanaestosatnom ciklusu svjetla i tame. Pokusne životinje bile su podijeljene u tri skupine (N=6 – 9 po skupini):

1. životinje podvrgnute akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (HBO₂) – A-HBO₂
2. životinje podvrgnute intermitentnoj HBO₂ tijekom 4 uzastopna dana – 4D-HBO₂
3. skupina zdravih štakora koji nisu bili izloženi HBO₂ – KONTROLA

Štakori iz grupe A-HBO₂ i 4D-HBO₂ bili su izlagani hiperbaričnom kisiku (100 % O₂) u rekompresijskoj komori za eksperimente na malim životinjama (110L, Đuro Đaković, Aparati d.d.) pri tlaku od 2,0 bara tijekom 60 minuta, uz 15 minuta postepene kompresije i dekompresije. Neposredno nakon završetka posljednjeg ciklusa HBO₂ štakori su anestetizirani kombinacijom ketamina (75 mg/kg, 25 mg/ml Ketanest S, Pfizer) i midazolama (2.5 mg/kg, 5 mg/ml Midazolam Torrex, Torrex Chiesi Pharma) i žrtvovani dekapitacijom. Pri tome je sakupljena puna krv u tubice koje su sadržavale 2 mM EDTA (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*).



Slika 1. Barokomora, složeni medicinski uređaj unutar kojeg su zdravi Sprague-Dawley štakori bili izloženi HBO₂ (izvor: original autorice rada).

4.3. Metode

4.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica iz periferne krvi

Periferna krv štakora sakupljena je u tubice koje su sadržavale 2 mM EDTA. Potom su PBMC izolirane na gradijentu fikoza (Ficoll-Paque PREMIUM 1,084, GE Healthcare) sukladno uputama proizvođača te im je određena koncentracija pomoću Bürker-Türk komorice u kojima smo primijenili 50 μ l suspenzije stanica te 100 μ l otopine tripanskog plavila. Koncentraciju smo odredili uz pomoć sljedeće formule:

$$\text{Koncentracija stanica} = (\text{BROJ STANICA}/4) \times 3 \times 10^4/\text{ml}$$

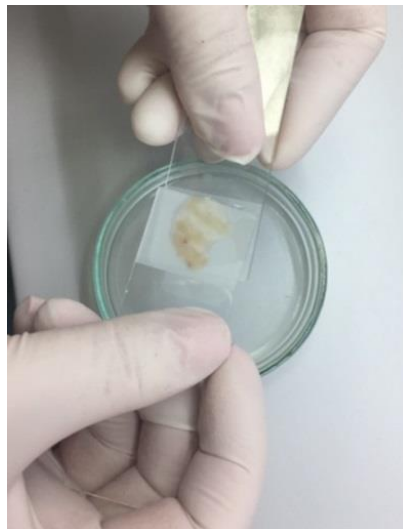
*dilucijski faktor je 3 (50 u 100 μ l)



Slika 2. Izolacija mononuklearnih stanica periferne krvi na gradijentu fikola. Slika 2 A prikazuje uzorak periferne krvi, a slika 2 B fikol u originalnom pakiranju. Naslojavanje krvi na fikol prikazuje slika 2 C, dok su na slici 2 D vidljivi slojevi nastali odvajanjem komponenti krvi na gradijentu fikola nakon centrifugiranja (izvor: original autorice rada).

4.3.2. Izolacija limfocita iz mezenteričnih limfnih čvorova

Neposredno nakon anesteziranja i žrtvovanja štakorima je otvoren abdomen, prikazan je mezenterij te prepariran set limfnih čvorova. Nježnom disocijacijom tkiva pritiskanjem mezenteričnih limfnih čvorova (engl. *mesenteric lymph nodes*, mLN) između dvaju matiranih krajeva histoloških odnosno predmetnih stakalaca dobivena je suspenzija stanica koja se zatim susljedno propuštala kroz pamučnu vatu.



Slika 3. Izolacija limfocita iz mezenteričnih limfnih čvorova. Disocijacija tkiva koja nastaje pritiskanjem mezenteričnih limfnih čvorova između dvaju matiranih krajeva predmetnih stakalaca (izvor: original autorice rada).

4.3.3. Kultivacija i stimulacija stanica

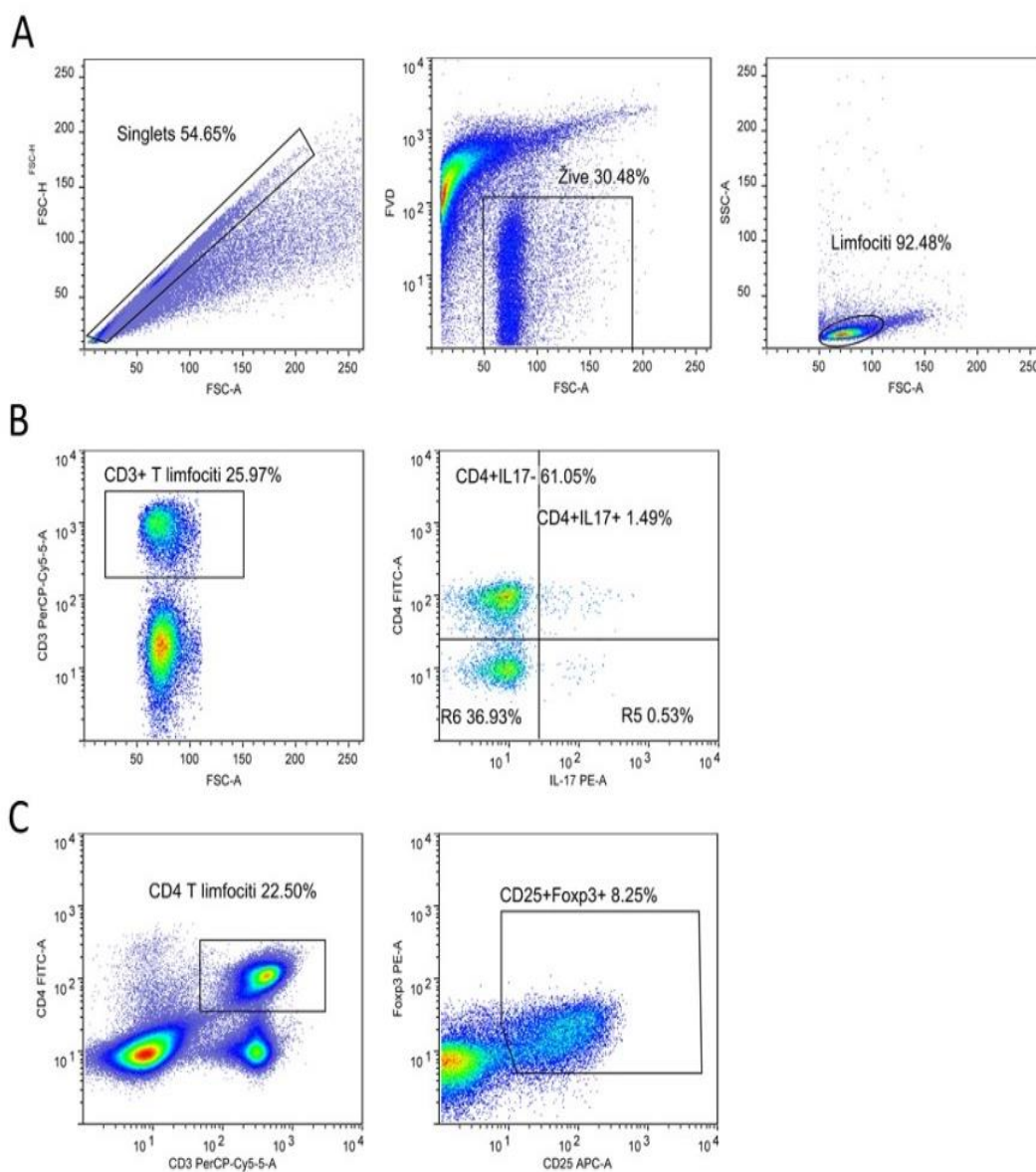
Ovako dobivena suspenzija stanica i PBMC-a bile su kultivirane u kompletnom RPMI mediju u prisutnosti forbol-12-miristat-13-acetata (PMA), ionomicina (10mM, Abcam, Ujedinjeno Kraljevstvo) i Brefeldina A (10 mg/mL Invitrogen, Sjedinjene Američke Države) tijekom 4 sata. Nakon toga su obrađene za analizu protočnim citometrom ili smrznute na temperaturi do -80° C do Western blot analize.

4.3.4. Protočna citometrija

Protočna citometrija osjetljiva je analitička metoda koja se koristi za izolaciju specifičnih stanica iz smjese te nam daje podatke o fizikalnim svojstvima stanica, odnosno njihovoj veličini, obliku i zrnatosti, kao i drugim parametrima poput promjena u jezgri ili kariotipu stanica i broju mitozama. Na temelju ovih parametara može se utvrditi heterogenost populacije stanica te razlikovati pojedine podskupine i odrediti njihov udio unutar određene populacije stanica (16). U osnovi se sastoji od tri međusobno povezana sustava, a to su sustav tekućina, sustav optike i elektronika. Mjerenje se provodi kada stanice ili čestice prolaze u struji izotonične tekućine. Stanice se osvijetle laserskom svjetlošću, a stupanj raspršenja svjetlosti pokazatelj je fizičkih i kemijskih svojstava stanica ili ostalih bioloških čestica koje se promatraju. Ta se svojstva analiziraju pomoću optičkog i elektroničkog sustava. Optički dio mjeri raspršenje svjetlosti sa stanica, dok elektronički sustav skuplja sve svjetlosne signale te ih zatim pretvara u digitalni signal koji se prenose u elektroničko računalo i služi za analizu (17). Protočna citometrija koristi specifične fluorescentne molekule (fluorokrome) koje se direktno vežu na stanične sastojke ili se daju u konjugiranom obliku. Ekspresija molekule može se otkriti fluorescentnim markerima specifičnim za određenu molekulu i mjerenjem količine fluorescencije koja se emitira sa površine ili iz stanice.

U slučaju određivanja udjela Th17 stanica, limfociti izolirani iz mLN i periferne krvi najprije su stimulirani s PMA i ionomicinom kao je prethodno opisano te potom označeni sa FITC anti-CD4 (klon OX35, eBioscience), PerCP-eFluor710 anti-CD3 (klon G4.18, eBioscience) i anti-IL17 PE (klon eBio17B7, eBioscience). U slučaju određivanja Treg limfocita, korištene su nestimulirane stanice iz mLN i periferne krvi te su bile označene s FITC anti-CD4 (klon OX35, eBioscience), PerCP-eFluor710 anti-CD3 (klon G4.18, eBioscience), PE anti-Foxp3 (klon FJK-16s, eBioscience) te APC-CD25 (klon OX39, eBioscience)

protutijelima. Sve je izvršeno prema standardnom protokolu za bojanje površnih staničnih i nuklearnih antigena uz pomoć „Foxp3 staining“ seta pufera (eBioscience). Strategija primijenjena za analizu Th17 i regulatornih T limfocita prikazana je na slici 4. Mrtve stanice isključene su na temelju bojanja fiksabilnom bojom za vijabilnost stanica (LIVE/DEAD®Fixable Near-IR stain, Thermo Fisher), dvostruke (tzv. „doublets“) stanice analizom FSS-A i FSS-H parametara. Analizirano je 50 000 živih, jednostrukih stanica pomoću BD FACS Canto II protočnog citometra (FACS Canto II, Becton Dickinson, Sjedinjene Američke Države) te FlowLogic programom (Inivai Technologies, Victoria, Australija). Dok se izražaj proteina HIF-1 α odredio putem Western blota te su dobivene vrijednosti normalizirane prema izražaju beta-aktina (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, Sjedinjene Američke Države) u istim uzorcima.



Slika 4. Reprezentativni primjer analize mononuklearnih stanica iz periferne krvi Sprague-Dawley štakora protočnom citometrijom. Slika 4 A prikazuje susljedno postavljanje prozora za izdvajanje jednostrukih živih mononuklearnih stanica. Mrtve su stanice bile isključene na temelju bojanja fiksabilnom bojom za vijabilnost stanica (FVD), dok su jednostruke stanice (tzv. singlets) izdvojene analizom FSS-A i FSS-H parametara. Slika 4 B prikazuje strategiju analize CD4 T limfocita, koji luče IL-17, dok je na slici 4 C prikazana strategija analize regulatornih T limfocita definiranih pomoću CD4, CD25 i Foxp3 markera. Periferne mononuklearne stanice izolirane iz krvi štakora na gradijentu fikola analizirane su na protočnom citometru BD FACS Canto II.

4.3.5. Western blot

Western blotting tehnika je koja se koristi već više od tri desetljeća. Iako je postignut značajan napredak i u tehnologiji za obradu slika i reagensima za poboljšanje osjetljivosti i brzini, osnovna tehnika ostala je nepromijenjena. Označava analitičku metodu razdvajanja proteina s obzirom na njihovu molekulsku masu pod djelovanjem električnog polja te služi za kvantitativno tumačenje podataka u smislu promjene u ekspresiji proteina između uzoraka (18). Princip metode temelji se na pripremi uzoraka, elektroforezi na gelu, transferu proteina na membranu, blokiranju nespecifičnog vezanja antitijela na membrani, tretiranju membrane primarnim i sekundarnim antitijelom te na završnoj detekciji kompleksa antigen-antitijelo nakon koje slijedi analiza dobivenih rezultata (19).

Izražaj proteina HIF-1 α bio je obrađen putem WB, a dobivene vrijednosti normalizirane prema izražaju beta-aktina u istim uzorcima. Nakon pripreme suspenzije stanica limfnih čvorova i PBMC-a na -80°C slijedila je elektroforeza na poliakrilamidnom gelu. Prvo se pripremi 10%-tni donji gel (gel za razdvajanje) koji odgovara veličini proteina te se prelije izopropanolom kako bi se spriječio kontakt sa zrakom i kako bi se onemogućila polimerizacija. Isto tako pripremljen je 4%-tni gornji gel (gel za sabijanje) nakon kojeg je slijedila polimerizacija. Sustav za elektroforezu bio je postavljen u kadicu napunjenu puferom te se potom nanosilo oko 5 do 10 μ l uzorak po jažici zajedno s puferom na gel. Elektroforeza je provedena na 100V, na 4°C, oko 3 sata. Nakon što je elektroforeza završila, gornji gel se uklonio, a donji gel s proteinima je pažljivo prenet u posudu s hladnim puferom za prijenos. Na bijeli šupljikavi okvir bila je postavljena spužvicu, filter papir i PVDF membranu, a na PVDF membranu bio je prebačen donji gel, filter papir i spužvica te je cijela struktura pričvršćena crnim šupljikavim okvirom. Transfer se provodio 2 sata na 200 mA i 4°C nakon kojeg se membrana bojala u Amido-BlueBlack boji nekoliko sekundi, a potom je prebačena u otopinu za odbojavanje.

4.3.6. Blokiranje membrane i inkubacija protutijelima

Nakon odbojavanja, membrana je isprana od otopine za odbojavanje u TBST puferu 2 puta po 15 minuta. Nakon ispiranja, membrana je blokirana u 4%-tnoj otopini bezmasnog mlijeka u prahu, s dodatkom 1% BSA, 2 sata na sobnoj temperaturi tresilica. Blokiranje reducira nespecifično vezanje protutijela na proteine ili membranu. Ukoliko se membrana previše

blokira, može doći do redukcije signala, a ukoliko se premalo blokira, dolazi do jakog pozadinskog obojenja. Po završetku blokiranja, membrana je inkubirana primarnim protutijelima u otopini za primarna protutijela (3%). Stavlja se 2 mL otopine po membrani, a inkubacijski pufer za primarna protutijela sastoji se od bezmasnog mlijeka u prahu i TBST-a. Membrana se inkubirala u primarnim protutijelima preko noći na 4° C na rotary shakeru, a zatim i na sobnoj temperaturi 2 sata. Membrana je isprana u TBST-u 4 puta po 15 minuta. Korišteno je zečje protu-štakorsko HIF-1 α protutijelo u razrjeđenju 1:1000 (Applied Biosystems LS 4351104 Waltham, MA, Sjedinjene Američke Države).

Nakon toga membrana je inkubirana sekundarnim protutijelima koja se otapaju u otopini za sekundarna protutijela, a inkubacija traje 2 sata na sobnoj temperaturi na rotary shakeru. Korišteno je kozje protu-zečje sekundarno protutijelo HRP (engl. *horse radish peroxidase*) obilježeno u razrjeđenju 1:10000. Tijekom inkubacije sa sekundarnim kozjim protutijelima usmjerenim na Fc fragment mišjih protutijela, dodana su i streptaktinska protutijela za detekciju *Strep-Tag* aminokiselinske sekvence koju sadrže proteini poznate molekulske mase, konjugirana s peroksidazom iz hrena, kako bi se i proteinski standard prenio na film i detektirao na isti način kao i traženi proteini. Nakon inkubacije, membrana je isprana 4 puta po 15 minuta u TBST puferu.

4.3.7. Kemiluminiscencijska detekcija

Nakon ispiranja, membrana je lagano obrisana i na nju je primjenjen kemiluminiscencijski reagens, te je inkubirana 1 minutu na sobnoj temperaturi. Supstrat s kojim će reagirati peroksidaza iz hrena (HRP) pripremi se miješanjem komponenti A (luminol) i komponente B u omjeru 100:1.

U prisutnosti vodikovog peroksida, HRP katalizira oksidaciju cikličkog diacilhidrazida kao što je luminol. Pritom se stvara aktivirani intermedijarni reakcijski produkt, radikal luminola (endoperoksid), koji se vraća u primarno stanje (3-aminoflatni ion) što emitira svjetlost. Jako pojačanje emisije svjetlosti proizvodi se 4-jodofenolom koji služi kao medijator prijenosa elektrona. Nakon inkubacije, uklonjen je višak kemiluminiscencijskog reagensa, a membrana je stavljena između dvije folije kako se ne bi posušila, a mjehurići zraka su istisnuti. Membrane su postavljene u kazetu, učvršćene, te je u potpunom mraku u kazetu stavljen

radiološki film. Membrane su snimljene na Odjelu za radiologiju, u Kliničkoj bolnici, Osijek. Ekspozicija je trajala 15 sekundi, 30 sekundi, 1 minutu i 5 minuta.

4.3.8. Ispiranje vezanih protutijela s membrane

Po završetku ekspozicije, membrana je isprana 2 puta po 15 minuta u TBST puferu te je čuvana na 4° C. Membrana se može upotrijebiti za detekciju nekog drugog proteina s novim protutijelom. Ako novi protein, čiju ekspresiju želimo provjeriti nije u istom rangu kDa kao prethodni, nije potrebno uklanjati protutijela niti ponovno blokirati membranu, već se direktno može staviti na inkubaciju u željenom protutijelu. Međutim, kada su istraživani proteini u blizu po rangovima kDa, tada se membrana tretira s puferom za skidanje protutijela kako bi se uklonila sva vezana protutijela, 2-5 minuta, a nakon toga se ispiru 10 minuta u TBST puferu.

Za kontrolu nanošenja uzoraka i za normalizaciju određena je i koncentracija β -aktina (42 kDa). Beta aktin jedan je od visoko konzerviranih proteina u eukariotskim stanicama i zato 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.

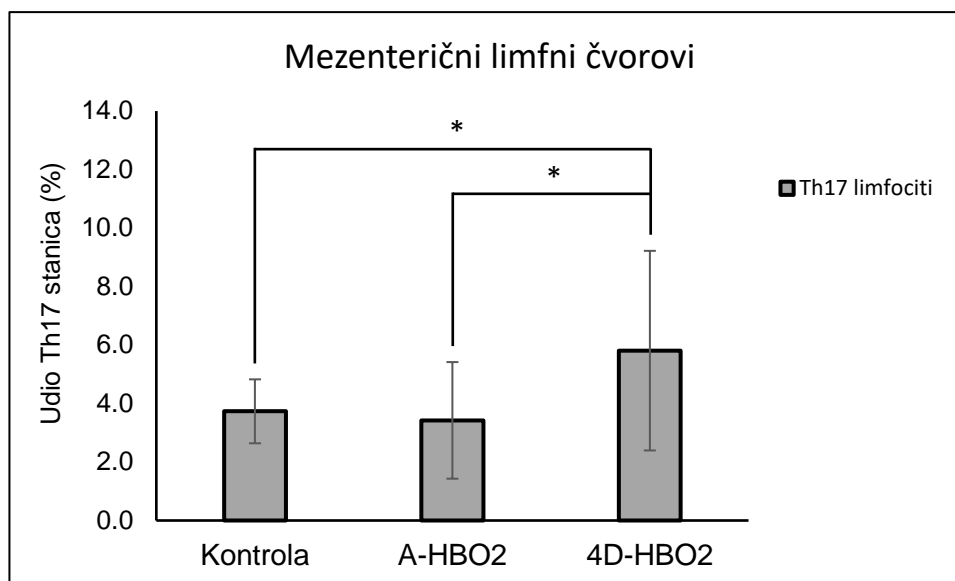
4.4. Statističke metode

Normalnost raspodjele numeričkih varijabli bila je testirana Kolmogorov-Smirnovljevom testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između tri nezavisne skupine bile su testirane jednosmjernom analizom varijanci (One way ANOVA), a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Kruskal Wallis testom. Razlike između skupina dodatno su testirane Holm Sidak ili Tukey post hoc testom. Povezanost kontinuiranih varijabli je Spearmanovim i Pearsonovim koefcijentom korelacije rangova (ρ). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardne devijacije, a razina značajnosti bila je postavljena na $p < 0,05$. Za statističku analizu korišten je statistički program Stigma stat 11.0 (Systat Software, Inc. Chicago, IL, Sjedinjene Američke Države).

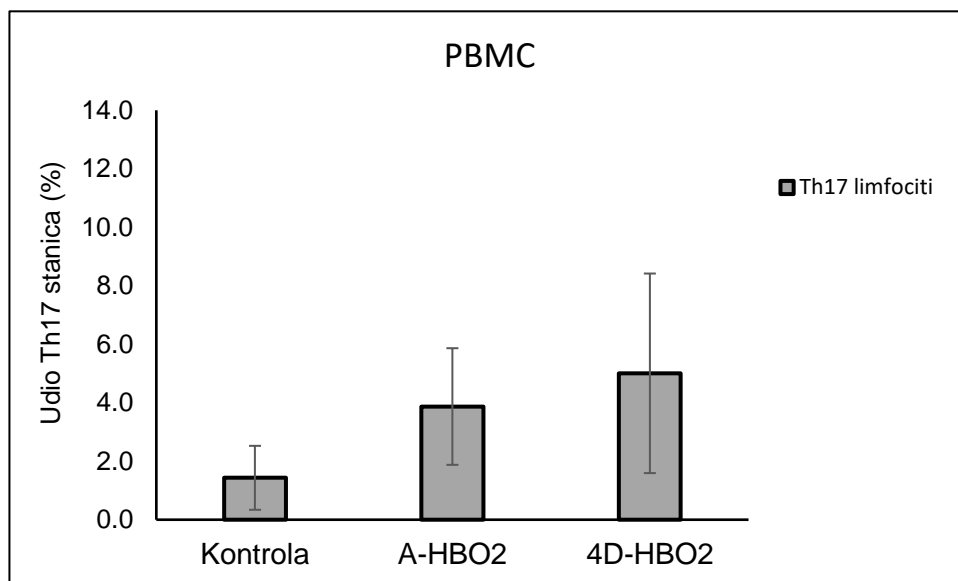
5. REZULTATI

5.1 Udio Th17 T limfocita u perifernoj krvi i mezenteričnim limfnim čvorovima

U ovoj studiji analizirali smo udjele Th17 stanica u populaciji mononuklearnih stanica izoliranih iz periferne krvi i mezenteričkih limfnih čvorova (I) kontrolne skupine Sprague – Dawley štakora, (II) štakora izluženih akutnoj HBO₂ (A-HBO₂) te (III) skupini štakora koji su bili izloženi intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji tijekom 4 uzastopna dana (4D-HBO₂). Rezultati su pokazali značajan porast udjela Th17 stanica u mezenteričnim limfnim čvorovima 4D-HBO₂ skupine životinja u odnosu na kontrolnu skupinu [5,81 (0,89) vs 3,73 (1,19), $p=0,05$; jednosmjerna analiza vatrijanci i Holm Sidak post hoc test; Slika 5] i A-HBO₂ skupinu životinja [5,81 (0,89) vs 3,42 (1,18), $p=0,039$; jednosmjerna analiza vatrijanci i Holm Sidak post hoc test; Slika 5]. Slične promjene su uočene i u slučaju mononuklearnih stanica periferne krvi, međutim one nisu dosegle razinu statističke značajnosti ($p=0,144$, jednosmjerna analiza vatrijanci, Slika 6).



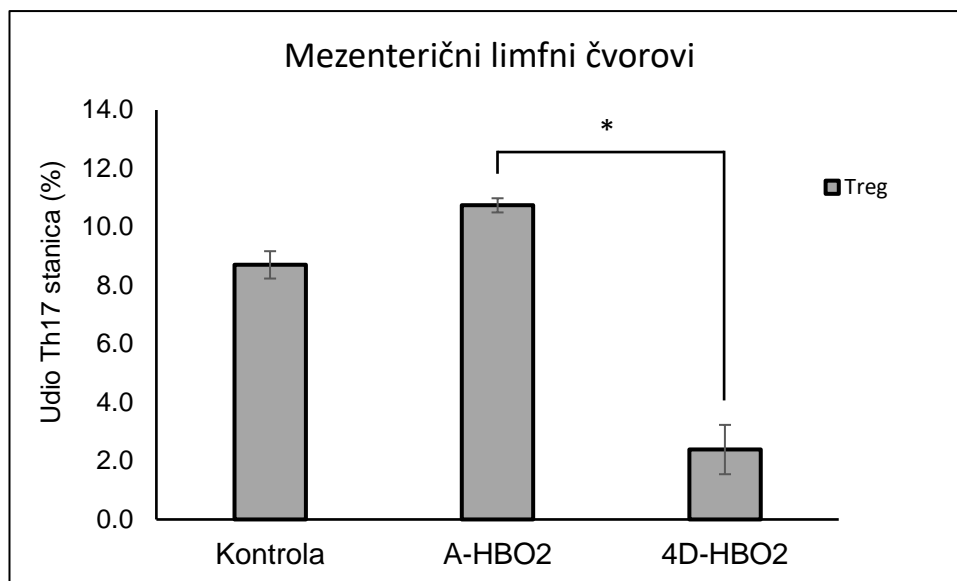
Slika 5. Udio Th17 limfocita u mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora nakon akutnog i intermitentnog izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji. Prikazuje udio CD4 T limfocita koji luče IL-17 (Th17 limfociti) u perifernoj krvi Sprague-Dawley štakora. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija te su uspoređeni jednosmjernom analizom varijanci i Holm-Sidak post hoc testom. *statistički značajna razlika, $p < 0,05$. HBO₂ – hiperbarična oksigenacija, Kontrola – skupina zdravih štakora koji nisu bili izloženi HBO₂, A-HBO₂ - životinje podvrgnute akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (HBO₂), štakori koji su hranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje; 4D-HBO₂ – životinje podvrgnute intermitentnoj HBO₂ tijekom 4 uzastopna dana.



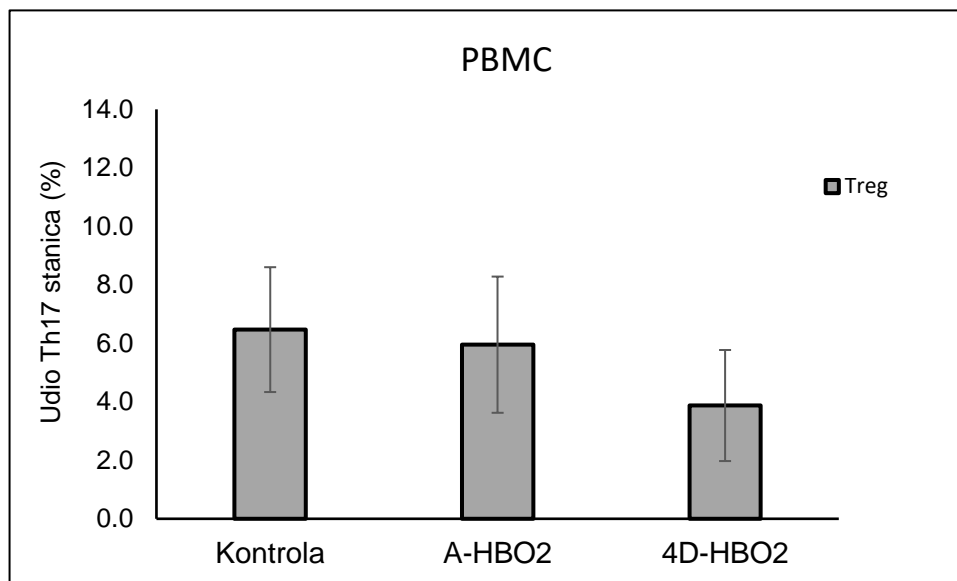
Slika 6. Udio Th17 limfocita u perifernoj krvi Sprague-Dawley štakora nakon akutnog i intermitentnog izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji. Prikazuje udio CD4 T limfocita koji luče IL-17 (Th17 limfociti) u perifernoj krvi Sprague-Dawley štakora. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija te su uspoređeni jednosmjernom analizom varijanci. PBMC – mononuklearne stanice periferne krvi, HBO₂ – hiperbarična oksigenacija, Kontrola – skupina zdravih štakora koji nisu bili izloženi HBO₂, A-HBO₂ - životinje podvrgnute akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (HBO₂), štakori koji su hranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje; 4D-HBO₂ – životinje podvrgnute intermitentnoj HBO₂ tijekom 4 uzastopna dana.

5.2 Udio regulatornih T limfocita u perifernoj krvi i mezenteričnim limfnim čvorovima

Rezultati ove studije su također pokazali značajan učinak HBO₂ na udio regulatornih stanica. Naime, 4D-HBO₂ skupina štakora je imala statistički značajno manje udjele regulatornih stanica u odnosu na A-HBO₂ skupinu životinja [10,74 (0,24) vs 2,39 (0,84), $p=0,005$; Kruskal Wallis i Tukey post hoc test; Slika 7]. Sličan pad udjela regulatornih T limfocita zamjećen je i u populaciji mononuklearnih stanica periferne krvi, međutim te razlike nisu bile statistički značajne ($p=0,242$, jednosmjerna analiza varijanci, Slika 8).



Slika 7. Udio regulatornih T limfocita u mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora nakon akutnog i intermitentnog izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji. Prikazuje udio regulatornih T limfocita (Treg) u perifernoj krvi Sprague-Dawley štakora. Protočnom citometrijom su analizirane mononuklearne stanice izolirane iz mezenteričnih limfnih čvorova, a Treg stanice definirane kao CD3+CD4+CD25+Foxp3+ stanice. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija te su uspoređeni Kruskal Wallis testom i Tukey post hoc testom. *statistički značajna razlika, $p < 0,05$. HBO₂ – hiperbarična oksigenacija, Kontrola – skupina zdravih štakora koji nisu bili izloženi HBO₂, A-HBO₂ - životinje podvrgnute akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (HBO₂), štakori koji su hranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje; 4D-HBO₂ – životinje podvrgnute intermitentnoj HBO₂ tijekom 4 uzastopna dana.

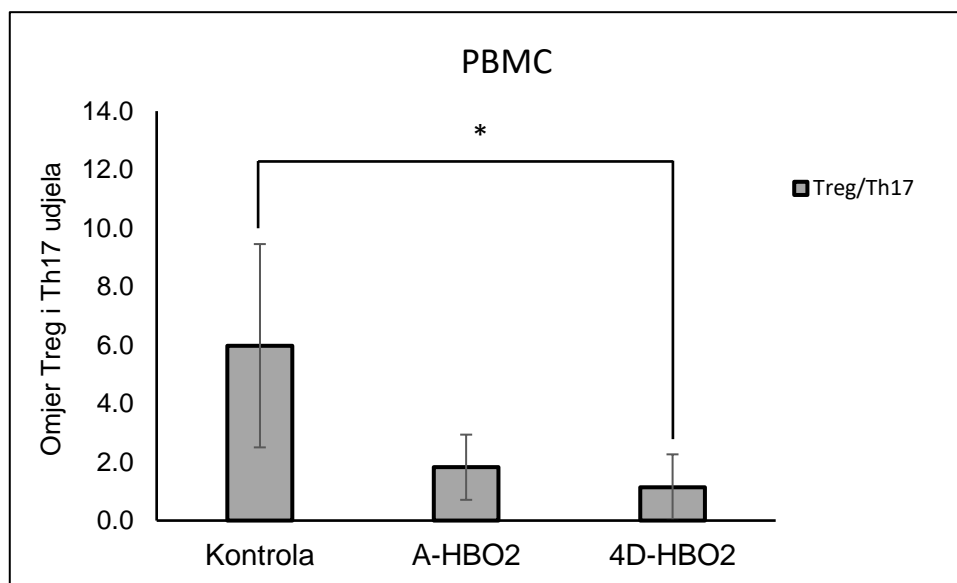


Slika 8. Udio regulatornih T limfocita u perifernoj krvi Sprague-Dawley štakora nakon akutnog i intermitentnog izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji. Prikazuje udio regulatornih T limfocita (Treg) u perifernoj krvi Sprague-Dawley štakora. Mononuklearne stanice periferene krvi (PBMC) analizirane su protočnom citometrijom te su Treg stanice bile definirane kao CD3+CD4+CD25+Foxp3+ stanice. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija te su uspoređeni jednosmjernom analizom varijanci. HBO₂ – hiperbarična oksigenacija, Kontrola – skupina zdravih štakora koji nisu bili izloženi HBO₂, A-HBO₂ - životinje podvrgnute akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (HBO₂), štakori koji su hranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje; 4D-HBO₂ – životinje podvrgnute intermitentnoj HBO₂ tijekom 4 uzastopna dana.

5.3 Omjer regulatornih i Th17 T limfocita u perifernoj krvi i mezenteričnim limfnim čvorovima

U ovom istraživanju dodatno smo analizirali omjer regulatornih i Th17 T limfocita (Treg/Th17), obzirom da je on indirektni pokazatelj ravnoteže između inhibicije i aktivacije imunološkog sustava. Rezultati analiza su pokazali da intermitentna HBO₂ dovodi do značajnog pada Treg/Th17 omjera u populaciji mononuklearnih stanica izoliranih iz periferne krvi ($p=0,024$; Kruskal Wallis test; Slika 9) i iz mezenteričnih limfnih čvorova ($p=0,005$; Kruskal Wallis; Slika 10). Naime, u slučaju mononuklearnih stanica iz periferne krvi štakori iz

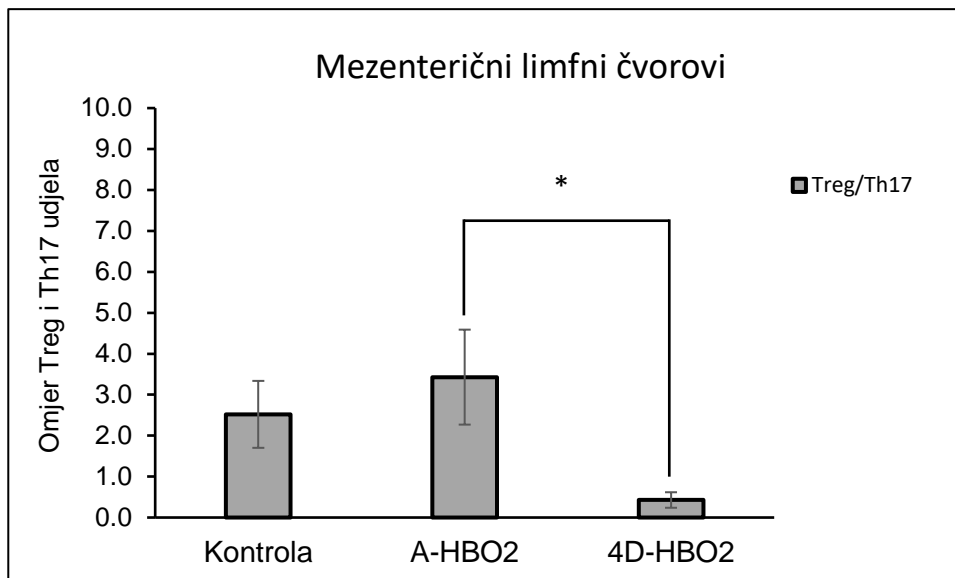
4D-HBO₂ skupine su imali značajno niži omjer Treg/Th17 štakora u odnosu na kontrolnu skupinu životinja [1,13 (1,13) vs 5,98 (3,48), $p=0,029$; Kruskal Wallis i Tukey post hoc test; Slika 9].



Slika 9. Omjer regulatornih i Th17 T limfocita u perifernoj krvi Sprague-Dawley štakora nakon akutnog i intermitentnog izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji. Prikazuje omjer udjela regulatornih (Treg) i Th17 T limfocita u perifernoj krvi Sprague-Dawley štakora. Mononuklearne stanice periferene krvi (PBMC) analizirane su protočnom citometrijom, a Treg stanice definirane kao CD3+CD4+CD25+Foxp3+, odnosno Th17 stanice kao CD3+CD4+IL-17+ stanice. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija te su uspoređeni Kruskal Wallis testom i Tukey post hoc testom. *statistički značajna razlika, $p < 0,05$. HBO₂ – hiperbarična oksigenacija, Kontrola – skupina zdravih štakora koji nisu bili izloženi HBO₂, A-HBO₂ - životinje podvrgnute akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (HBO₂), štakori koji su htranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje; 4D-HBO₂ – životinje podvrgnute intermitentnoj HBO₂ tijekom 4 uzastopna dana.

U slučaju mononuklearnih stanica izoliranih iz mezenteričkih limfnih čvorova, 4D-HBO₂ skupina štakora imala je statistički značajno niži omjer Treg/Th17 štakora u odnosu na A-HBO₂

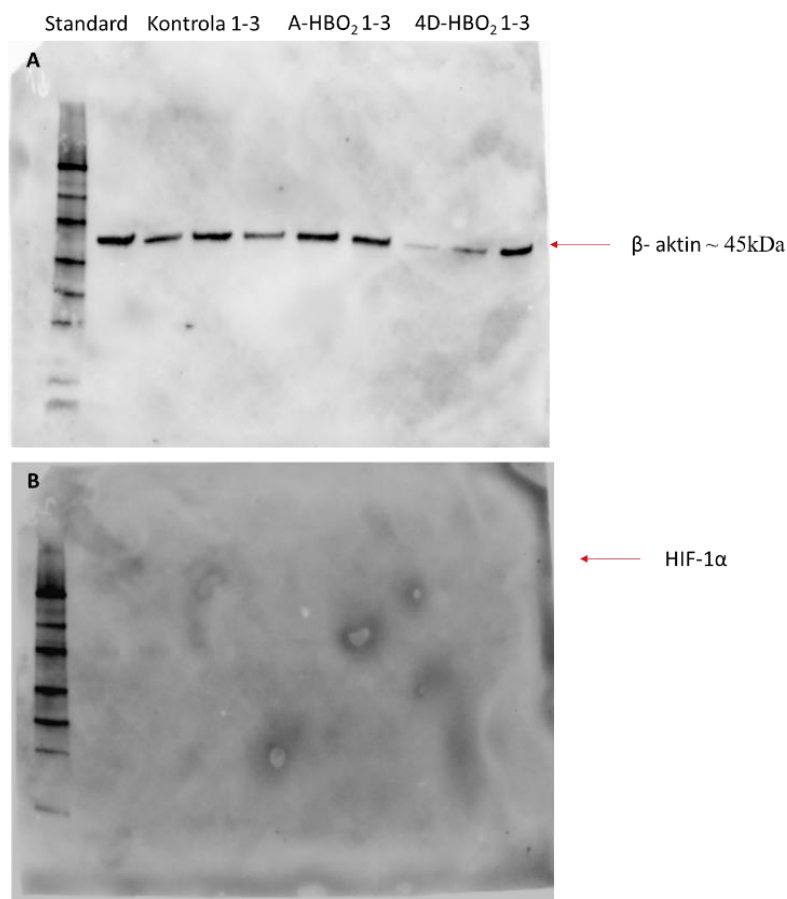
skupinu životinja [0,43 (0,19) vs 3,43 (1,16), $p=0,017$; Kruskal Wallis i Tukey post hoc test; Slika 10].



Slika 10. Omjer regulatornih i Th17 T limfocita u mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora nakon akutnog i intermitentnog izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji. Prikazuje omjer udjela regulatornih (Treg) i Th17 T limfocita u mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora. Mononuklearne stanice izolirane iz mezenteričnih limfnih čvorova analizirane su protočnom citometrijom, a Treg stanice definirane kao CD3+CD4+CD25+Foxp3+, odnosno Th17 stanice kao CD3+CD4+IL-17+ stanice. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija te su uspoređeni Kruskal Wallis testom i Tukey post hoc testom. *statistički značajna razlika, $p < 0,05$. HBO₂ – hiperbarična oksigenacija, Kontrola – skupina zdravih štakora koji nisu bili izloženi HBO₂, A-HBO₂ - životinje podvrgnute akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (HBO₂), štakori koji su htranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje; 4D-HBO₂ – životinje podvrgnute intermitentnoj HBO₂ tijekom 4 uzastopna dana.

5.4 Izražaj HIF-1 α u mononuklearnim stanicama periferne krvi

U ovom istraživanju koristili smo Western blott metodu za određivanje izražaja HIF-1 α transkripcijskog čimbenika u mononuklearnim stanicama periferne krvi, međutim, iako smo koristili standardiziranu i validiranu metodu, nismo uspjeli izmjeriti izražaj HIF-1 α (Slika 11).



Slika 11. Izražaj proteina na membranama nakon inkubacije protutijelom za detekciju β-aktina (A) i HIF-1 α (B). HIF-1 α – hipoksijom inducirani čimbenik 1 alfa (prema engl. hypoxia-inducible factor 1 alpha) Kontrola – skupina zdravih štakora koji nisu bili izloženi HBO₂, A-HBO₂ - životinje podvrgnute akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (HBO₂), štakori koji su hranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje; 4D-HBO₂ – životinje podvrgnute intermitentnoj HBO₂ tijekom 4 uzastopna dana. Membrane su slikane na Bio-Rad ChemiDoc uređaju metodom kemiluminiscencije.

6. RASPRAVA

HBO₂ se obično koristi kao pomoćna metoda u liječenju ozljeda povezanih s hipoksijom i ishemijom. Isto tako, kliničke studije su pokazale pozitivne učinke u liječenju infekcija poput plinske gangrene, meningokokne sepse. Posljednjih godina također se istražuje potencijal HBO₂ u liječenju infarkta miokarda, moždane ishemije, autoimunih bolesti i neurodegenerativnih poremećaja, odnosno u različitim stanjima koja su povezana s upalom tkiva.

Aktivacija HIF-1 kompleksa strogo je kontroliran proces koji u hiperoksičnim uvjetima uzrokuje degradacija HIF-1 α podjedinice putem ubikvitin-proteasomskog puta. Za ekspresiju HIF-1 α proteina potrebni su reaktivni kisikovi spojevi (ROS) koji se također stvaraju pri povišenim parcijalnim tlakovima kisika, kakve nalazimo kod primjene HBO₂ (20). To je osobito izraženo kod akutnog i kratkotrajnog izlaganja HBO₂ dok kod dugotrajne primjene dolazi do aktivacije kompenzatornih mehanizama koji smanjuju stvaranje slobodnih kisikovih radikala te potom između opetovanih izlaganja HBO₂ pri normalnim tlakovima djeluju protuupalno i potiču obnavljanje oštećenih tkiva. Eksperimentalni i klinički podaci pokazuju da HBO₂ smanjuje edem tkiva, mijenja vaskularnu reaktivnost na podražaje, povećava sintezu dušikovog monoksida (glavnog endotelnog posrednika vazodilatacije), inhibira apoptotičke putove i ekspresiju neuroinflamatornih čimbenika te uzrokuje promjenu ravnoteže između Treg i Th17 stanica (21). Dosadašnja istraživanja o učinku HBO₂ na izražajnost HIF-1 α podjedinice pokazuju različite rezultate, a utjecaj na ravnotežu Treg i Th17 T limfocita nije poznat te je stoga svrha ovog rada bila odrediti utjecaj akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na izražaj HIF-1 α posredovanu modulaciju ravnoteže Th17 i Treg stanica u uzorcima pune krvi i mezenteričnim limfnim čvorovima.

Gu i suradnici koristili su štakorski model moždane ishemije za proučavanje mehanizma ishemijske tolerancije potaknute terapijom hiperbarične oksigenacije. Uočili su da ona potiče ekspresiju HIF-1 α proteina te da nakon ishemije, HBO₂ potpomaže boljem oporavku neuroloških funkcija štakora te značajno smanjuje rizik od infarkta miokarda (22).

Suprotno tome, Sun i suradnici su u svom istraživanju proučavali učinak terapije hiperbaričnom oksigenacijom kod fokalne cerebralne ishemije, također na mišjem modelu, no uočili su smanjenu ekspresiju HIF-1 α proteina (23). Razlog za ovo smanjenje ekspresije HIF-

1α ispod konstitutivnih razina u cijelom ishemijskom području vjerojatno leži u tome što stanice s morfološkim značajkama neurona nisu uspjele izraziti HIF- 1α zbog prekomjernog oštećenja.

Isto tako, činjenica da povišene razine reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), prisutne i kod HBO₂, mogu poboljšati liječenje psorijeze potaknulo je Kima i suradnike na formiranje istraživanja koja ispituje učinak razine ROS-a na funkcije Th17 i Treg stanica. Rezultati su pokazali da su kod povišenih razina ROS-a Treg stanice hiperfunkcionalne, dok su pri sniženim razinama ROS-a Treg stanice hipofunkcionalne. Pored toga, povišena razina Treg stanica potrebna je za suzbijanje destruktivnih oštećenja, jer Treg stanice suprimiraju imunološke odgovore Th1, Th2, Th17 i NK stanice. Stoga se može tvrditi da je funkcija Treg stanica usko povezana s razinom ROS-a, a oni mogu pridonijeti obrani od oštećenja tkiva uzrokovanih reaktivnim kisikovim spojevima. Također su pokazali da je hiperoksigenacija tkiva putem HBO₂ ublažila psorijazu aktivacijom Treg i Th17 stanica (24).

Suprotno tome, nekoliko istraživanja je pokazalo da HIF- 1α pospješuje diferencijaciju Th17 stanica izravnom aktivacijom transkripcijskog čimbenika ROR γ t-a koji je središnji faktor i koji kontrolira transkripciju IL-17 i diferencijaciju Th17 stanica (15, 25). Ima sposobnost stvaranja i terciarnog kompleksa vezanjem ROR γ t i p300 na promotor IL17. Istovremeno HIF- 1α inhibira diferencijaciju Treg stanica vezanjem FoxP3 proteina te na taj način usmjerava Treg stanice na razgradnju u proteosomu (15).

U našem istraživanju dostupnom metodom nismo uspjeli odrediti izražaj HIF- 1α transkripcijskog čimbenika u mononuklearnim stanicama periferne krvi. Mogući razlog tome su vrlo niske koncentracije HIF- 1α , ispod donje granice našeg detekcijskog sustava. To je u suprotnosti s prethodno navedenim studijama, koje su izvjestile kako mjerljive razine HIF- 1α proteina u T limfocitima, tako i promjene u njihovom izražaju u uvjetima hipoksije i pseudohipoksije (15, 24, 25). Nadalje, naše istraživanje je pokazalo da intermitentna HBO₂, ali ne i akutna HBO₂, dovodi do statistički značajnih promjena u udjelima regulatornih i Th17 T limfocita te njihovim međusobnim omjerima. Intermitentna HBO₂ tijekom 4 uzastopna dana, dovela je do značajnog smanjenja udjela regulatornih T limfocita uz istovremeni porast udjela Th17 stanica u mezenteričnim limfnim čvorovima, što je rezultiralo u značajnom smanjenju omjera ovih stanica. Ovi rezultati sugeriraju da intermitentna HBO₂ tijekom 4 uzastopna dana stvara proupalno okruženje, što je u suprotnosti s uočenim pozitivnim i protuupalnim učincima

HBO₂ u eksperimentalnim i kliničkim studijama. Vjerojatno obrazloženje za ovaj nalaz je kratko trajanje HBO₂, obzirom da klinički protokoli najčešće uključuju 15 do 20 tretmana po ciklusu HBO₂ terapije. Osim toga, opisane su Th17 stanice koje pod utjecajem HIF-1 α mogu izgubiti proupalnu funkciju te lučiti inhibitorne citokine poput IL-10. Stoga su potrebne dodatne funkcionalne analize u budućnosti, kako bismo odredili funkciju stanica koje odgovaraju TH17 fenotipu nakon kratkotrajne intermitentne HBO₂.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata ovog istraživanja možemo postaviti slijedeće zaključke:

1. Kratkotrajna intermitentna HBO₂ dovodi do značajnog porasta udjela Th17 stanica u mezenteričnim limfnim čvorovima u odnosu na kontrolnu skupinu i A-HBO₂ skupinu životinja. Slične promjene su uočene i u slučaju mononuklearnih stanica periferne krvi, međutim one nisu dosegle razinu statističke značajnosti.
2. U mezenteričnim limfnim čvorovima intermitentna HBO₂ tijekom 4 uzastopna dana dovodi do značajnog smanjenja udjela regulatornih T limfocita u odnosu na skupinu životinja koje su bile jednokratno izložene HBO₂. Sličan pad udjela regulatornih T limfocita zamjećen je i u populaciji mononuklearnih stanica periferne krvi, međutim te razlike nisu bile statistički značajne.
3. Rezultati dodatnih analiza su pokazali da intermitentna HBO₂ dovodi do značajnog pada Treg/Th17 omjera u populaciji mononuklearnih stanica izoliranih iz periferne krvi u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. Pad omjera je također zamjećen kod mononuklearnih stanica izoliranih iz mezenteričkih limfnih čvorova u skupini Sprague-Dawley štakora izloženih intermitentnoj HBO₂ tijekom 4 uzastopna dana, u odnosu na skupinu životinja koje su jednokratno bile izložene HBO₂.
4. U našem istraživanju, dostupnom metodom, nismo uspjeli odrediti izražaj HIF-1 α transkripcijskog čimbenika u mononuklearnim stanicama periferne krvi. Obzirom da smo uspješno odredili izražaj HIF-1 α u krvnim žilama mozga, mogući razlog negativnom rezultatu u slučaju mononuklearnih stanica iz periferne krvi su vrlo niske koncentracije HIF-1 α , ispod donje granice našeg detekcijskog sustava.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ispitati učinak akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na HIF-1 α posredovanu modulaciju ravnoteže Th17 i Treg stanica.

Nacrt studije: Pokusno (eksperimentalno) istraživanje

Materijali i metode: Istraživanje je provedeno na zdravim Sprague-Dawley štakorima u starosti od 9 do 11 tjedana. Životinje su bile podijeljene u 3 skupine (N = 6 - 9): (1) životinje podvrgnute akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (A-HBO₂); (2) životinje podvrgnute intermitentnoj HBO₂ tijekom 4 uzastopna dana (4D-HBO₂) te (3) skupina zdravih štakora koji nisu bili izloženi HBO₂. Prikupljene mononuklearne stanice iz uzoraka periferne krvi i mezenteričnih limfnih čvorova analizirane su protočnom citometrijom (BD FACS Canto II) i Western blot metodom.

Rezultati: Naše istraživanje je pokazalo da intermitentna HBO₂, ali ne i akutna HBO₂, dovodi do statistički značajnih promjena u udjelima regulatornih i Th17 T limfocita te njihovim međusobnim omjerima. Intermitentna HBO₂ tijekom 4 uzastopna dana, dovela je do značajnog smanjenja udjela regulatornih T limfocita uz istovremeni porast udjela Th17 stanica u mezenteričnim limfnim čvorovima, što je rezultiralo u značajnom smanjenju omjera ovih stanica.

Zaključak: Rezultati ovog istraživanja sugeriraju da intermitentna HBO₂ tijekom 4 uzastopna dana stvara proupalno okruženje u perifernoj krvi i mezenterički limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora.

Ključne riječi: Hiperbarična oksigenacija; Hipoksijom inducirani čimbenik 1 α ; pomoćnički T limfociti.

9. SUMMARY

Title: The effect of hyperbaric oxygenation on the HIF-1 α mediated modulation of Th17/Treg cell balance following acute and intermitent hyperbaric oxygenation in Sprague-Dawley rats

Objectives: The effect of acute and intermittent hyperbaric oxygenation (HBO₂) on the HIF-1 α mediated modulation of Th17 and Treg cell balance.

Study draft: Experimental research

Materials and methods: Sprague-Dawley rats at the age of 6 - 11 weeks were divided into three groups (N= 6-9/group). The first group of animals was exposed to single hyperbaric oxygenation (A-HBO₂) session, the second group of animals was exposed to intermittent HBO₂ for 4 consecutive days (4D-HBO₂), while the third group consisted of healthy, untreated animals (control). Mononuclear cells isolated from peripheral blood and mesenteric lymph nodes were analysed by flow cytometry (BD FACS Canto II) and Western blot.

Results: Our study showed that intermittent HBO₂, but not acute HBO₂, led to a statistically significant changes in the frequencies of regulatory and Th17 T lymphocytes, and their ratio. Intermittent HBO₂ applied for 4 consecutive days led to a significant decrease in the frequency of regulatory T lymphocytes with a parallel increase in the proportion of Th17 cells in mesenteric lymph nodes, resulting in a significant decrease in the Treg/Th17 ratio.

Conclusion: The results of this study suggest that intermittent HBO₂ over 4 days creates proinflammatory environment in the peripheral blood and mesenteric lymph nodes of Sprague-Dawley rats.

Key words: Hyperbaric Oxygenation; Hypoxia-Inducible Factor 1, α Subunit; T-helper Cells.

10. LITERATURA

1. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. 13. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2006.
2. Bilić I, Petri NM. Hiperbarična oksigenacija u liječenju infekcija središnjeg živčanog sustava. *Infektološki glasnik*. 2013;33:177-181.
3. Thom SR. Hyperbaric oxygen – its mechanisms and efficacy. *Plast Reconstr Surg*. 2011; 127:131-141.
4. Drenjancevic I, Kibel A. Restoring vascular function with hyperbaric oxygen treatment: recovery mechanisms. *J Vasc Res*. 2014;51:1-13.
5. Zhai WW, Sun L, Yu ZQ, Chen G. Hyperbaric oxygen therapy in experimental and clinical stroke. *Med Gas Res*. 2016;6:111-118.
6. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Osnove imunologije. Funkcije i poremećaji imunološkog sustava. 5. izd. Split: Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet; 2017.
7. Moncrieffe H. British Society for Immunology. Dostupno na adresi: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/cells/regulatory-t-cells-tregs>. Datum pristupa: 08.09.2019.
8. Zurunić A. Fenotipska karakterizacija regulacijskih T-limfocita. Dostupno na adresi: <https://repositorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:2346>. Datum pristupa: 08.09.2019.
9. Ormandy LA, Hilleman T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy LA. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2005;65.6:2457-2464.
10. Lee GR. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3):730.
11. Hayashi Y, Yokota A, Harada H, Huang G. Hypoxia/pseudohypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1 α in cancer. *Cancer Sci*. 2019;110(5):1510-1517.
12. Križnik B. Warburg efekt: metabolizam stanica raka. Dostupno na adresi: <https://zir.nsk.hr/islandora/object/pmf%3A4195/datastream/PDF/view>. Datum pristupa: 09.09.2019.
13. Conde E, Alegre L, Blanco-Sanchez I, Saenz-Morales D, Aguado-Fraile E, Ponte B, i sur. Hypoxia inducible factor 1- α (HIF-1 α) is induced during reperfusion after renal ischemia and is critical for proximal tubule cell survival. *PloS One*. 2012;7.3:e33258.
14. Cell Metabolism. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. Dostupno na stranici: <http://www.cell.com/cell->

- metabolism/fulltext/S1550-4131(06)00060-X?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS155041310600060X%3Fshowall%3Dtrue
15. Dang EV, Barbi J, Yang HY, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, i sur. Control of T_H17/T_{reg} Balance by Hypoxia-inducible Factor 1. *Rev Paul Pediatr.* 2015;33(1):114–121.
 16. Mihoković S, Kezić D, Mišić M, Popović M, Hohšteter M. Komparativna analiza tumora sjemenika pasa upotrebom histopatološke pretrage i metodom protočne citometrije. *Veterinar.* 2017;55.1:0-0.
 17. Blažević M. Utjecaj kratkotrajno povećanog unosa kuhinjske soli na udio regulatornih T limfocita u perifernoj krvi i mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora. *Diplomski rad. Medicinski fakultet Osijek.* 2019.
 18. Taylor SC, Posch A. The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. *BioMed Research International.* 2014;2014:1-8.
 19. Mahmood T, Yang PC. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci.* 2012; 4(9): 429–434.
 20. Pavlović A. Utjecaj akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na izražaj proteina HIF-1 alfa u krvnim žilama Sprague-dawley štakora. Dostupno na adresi: <https://zir.nsk.hr/islandora/object/mefos%3A816>. Datum pristupa: 23.08.2019.
 21. Mihaljević Z, Matić A, Stupin A, Rašić L, Jukić I, Drenjančević I. 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;2018:7406027.
 22. Gu GJ, Li YP, Peng ZY, Xu JJ, Kang ZM, Xu WG, i sur. 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.
 23. 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.
 24. Kim HR, Lee A., Choi EJ, Hong MP, Kie JH, Lim W, i sur. Reactive oxygen species prevent imiquimod-induced psoriatic dermatitis through enhancing regulatory T cell function. *PloS One.* 2014;9.3:e91146.

25. Feldhoff LM, Rueda CM, Moreno-Fernandez ME, Sauer J, Jackson CM, Chougnnet CA, Rupp J. IL-1 β induced HIF-1 α inhibits the differentiation of human FOXP3(+) T cells. *Sci Rep.* 2017 Mar 28;7(1):465. doi: 10.1038/s41598-017-00508-x. PubMed PMID: 28352109; PubMed Central PMCID: PMC5428734.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Marija Duvnjak

Datum rođenja 4. listopada 1997. godine

Mjesto rođenja: Osijek, Hrvatska

Adresa: N. Š. Zrinskog 177, Koška

Mobitel: 099 5151 085

E-pošta: marija.duvnjak97@gmail.com

OBRAZOVANJE

2004. – 2012. Osnovna škola Ivane Brlić Mažuranić, Koška

2012. – 2016. I. Gimnazija Osijek (Opća gimnazija)

2016. – trenutno Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet

OSTALE AKTIVNOSTI

Predstavnik studenata u Fakultetskom vijeću Medicinskog fakulteta Osijek 2019. godine

Predsjednica Studentskog zbora Medicinskog fakulteta Osijek 2019. godine

Član studentske udruge CMLDSA od 2016. godine