

Utjecaj kisika na izražaj gena adenozijskih A1 i A2a receptora u krvnim žilama Sprague-Dawley štakora

Kovač, Lora

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:402653>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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



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

Lora Kovač

UTJECAJ KISIKA NA IZRAŽAJ GENA
ADENOZINSKIH A1 I A2A RECEPTORA
U KRVNIM ŽILAMA SPRAGUE-DAWLEY
ŠTAKORA

Završni rad

Osijek, 2022.

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

Lora Kovač

UTJECAJ KISIKA NA IZRAŽAJ GENA
ADENOZINSKIH A1 I A2A RECEPTORA
U KRVNIM ŽILAMA SPRAGUE-DAWLEY
ŠTAKORA

Završni rad

Osijek, 2022.

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

Mentor rada: doc. dr. sc. Zrinka Mihaljević

Neposredni voditelj: doktorand, asistent Petar Šušnjara

Ovaj rad ima 19 listova, 1 tablicu i 1 sliku.

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Hiperbarična oksigenacija..... | 1 |
| 1.2. Adenozinski receptori..... | 2 |
| 1.2. RTqPCR..... | 3 |
| 2. HIPOTEZA..... | 4 |
| 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA..... | 5 |
| 4. MATERIJALI I METODE..... | 6 |
| 4.1. Ustroj studije..... | 6 |
| 4.2. Životinjski model..... | 6 |
| 4.3. Protokol hiperbarične oksigenacije i uzorkovanje krvnih žila mozga..... | 7 |
| 4.4. Izolacija RNA..... | 7 |
| 4.5. RTqPCR..... | 8 |
| 4.6. Statistička obrada podataka..... | 9 |
| 5. REZULTATI..... | 10 |
| 5.1. Relativan izražaj A1..... | 10 |
| 5.2. Relativan izražaj A2a..... | 11 |
| 6. RASPRAVA..... | 12 |
| 7. ZAKLJUČAK..... | 13 |
| 8. SAŽETAK..... | 14 |
| 9. SUMMARY..... | 15 |
| 10. LITERATURA..... | 15 |
| 11. ŽIVOTOPIS..... | 19 |

Popis kratica

| | |
|------------------|--|
| A1 | adenozin receptor 1 |
| A2a | adenozin receptor 2a |
| A2b | adenozin receptor 2b |
| A3 | adenozin receptor 3 |
| AR | adenozinski receptori |
| ATP | adenozin trifosfat (engl. <i>adenosine triphosphate</i>) |
| cDNA | komplementarna deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>complementary DNA</i>) |
| dNTP | deoksiribonukleozid trifosfat (engl. <i>deoxyribonucleoside triphosphate</i>) |
| EET | epoksieikozatrienoična kiselina (engl. <i>epoxyeicosatrienoic acid</i>) |
| eNOS | endotelna NO-sintetaza |
| GPCR | receptori vezani za G-protein (engl. <i>G-protein coupled receptors</i>) |
| HBO ₂ | hiperbarična oksigenacija |
| HIF | hipoksijom-inducirani čimbenik transkripcije (engl. <i>hypoxia inducible factor</i>) |
| HPRT1 | hipoksantin fosforibozil transferaza 1 |
| I/R | ishemija/reperfuzija |
| NFW | voda bez nukleaza (engl. <i>nuclease free water</i>) |
| NO | dušikov (II) oksid (engl. <i>nitric oxide</i>) |
| PCR | lančana reakcija polimeraze (engl. <i>polymerase chain reaction</i>) |
| qPCR | kvantitativna lančana reakcija polimeraze (engl. <i>quantitative PCR</i>) |
| ROS | slobodni kisikovi radikali (engl. <i>reactive oxygen species</i>) |
| RTqPCR | kvantitativna reverzna transkripcija s lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (engl. <i>quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>) |

1. UVOD

1.1. Hiperbarična oksigenacija

Terapija hiperbaričnim kisikom (HBO_2) je medicinski postupak korišten za dopremanje većih koncentracija kisika do tkiva u stanjima upale ili hipoksije. Tretman se može primijeniti u hiperbaričnoj komori za jednu osobu koja je ispunjena kisikom ili hiperbaričnim komorama za više osoba koje se nalaze pod povišenim tlakom u kojima više pacijenata udiše kisik pomoću maske ili kapuljače. Postupak se sastoji od izlaganja 100%-tnom kisiku pri tlaku većem od 1,4 atm (1). Sama primjena kisika nije dovoljna za korekciju hipoksije. Pod utjecajem hiperbarične oksigenacije povećava se količina kisika otopljenog u plazmi i drugim tjelesnim tekućinama, stoga se HBO_2 koristi kao tretman tijekom akutne ishemije, u slučaju trovanja ugljikovim monoksidom, teške anemije, embolije te za brže zacijeljivanje rana, između ostalog (1, 2). Hiperoksija prisutna tijekom HBO_2 ima učinak i na vazodinamiku, angiogenezu i upalni odgovor. Za vrijeme primjene HBO_2 javlja se snažna vazokonstrikcija (1).

Tijekom ponovnog uspostavljanja protoka krvi nakon ishemije tj. tijekom reperfuzije može doći do oštećenja tkiva. Primjećeno je da primjena HBO_2 ima mogućnost smanjenja intenziteta ishemijsko/reperfuzijske (I/R) ozlijede. Primjena HBO_2 prije nastanka ishemije pokazala je bolji oporavak tkiva, stoga je HBO_2 jedna od metoda ishemijskog prekondicioniranja (3). Ishemijsko prekondicioniranje je izlaganje organizma prolaznoj ne letalnoj ishemiji u svrhu poticanja protektivnog učinka u slučaju ponovljene ishemije (4, 5).

Hiperoksija vodi do produkcije slobodnih kisikovih radikala (ROS). ROS sadrže nespareni elektron u svojoj vanjskoj orbitali zbog čega stupaju u reakcije s proteinima, lipidima, ugljikohidratima i nukleinskim kiselinama, pritom izazivajući njihovo oštećenje. Kao odgovor na oksidativni stres, organizam potiče ekspresiju antioksidativnih gena. Prilikom ponavljano izlaganja hiperoksiji koju uzrokuje HBO_2 , u razdoblju između dva izlaganja, potaknut je protektivni fiziološki odgovor organizma koji se inače javlja prilikom hipoksije (6). Hipoksija povisuje koncentracije vanstaničnog adenzina zbog njegovog oslobađanja uslijed stanične smrti što aktivira adenzinske receptore (AR) (4).

1.2. Adenozinski receptori

Adenozinski receptori (AR) su skupina receptora vezanih za G-protein (GPCR). Imaju α -helikalnu strukturu sa sedam transmembranskih odjeljaka. C-terminalni kraj nalazi se unutar stanice, a N-terminalni kraj izvan stanice (7). Imaju fiziološki učinak na metabolizam, vaskularnu funkciju, regulaciju imuniteta i neuromodulaciju. Pojačana aktivacija AR prisutna je u stanjima upale i ishemije. AR mogu biti prisutni kao jedan od četiri izomera: A1, A2a, A2b i A3. Oni su kodirani *Adora1*, *Adora2a*, *Adora2b* i *Adora3* genima. Jedini endogeni agonist koji djeluje na sve AR je adenzin (4). Nastaje metabolizmom adenzin trifosfata (ATP) unutar i izvan stanice. A1 i A2a pokazuju najveći afinitet za adenzin i rasprostranjeni su u većini tkiva, uključujući endotel krvnih žila (7). Prilikom hipoksije, povećana je produkcija izvanstaničnog adenzina koji aktivira A1 i A2a. Dolazi do pokretanja kaskade koja pojačava ekspresiju adenozinskih receptora posredovanjem hipoksijom-induciranog čimbenika transkripcije (HIF) i smanjuje aktivnost enzima koji metaboliziraju adenzin (4). Aktivacija AR ima značajan učinak na endotel, što uključuje vazokonstrikciju, vazodilataciju i angiogenezu (4).

Najveće koncentracije A1 nalaze se u mozgu, srcu, bubrezima i adipoznom tkivu. Aktivacija A1 inhibira aktivnost adenilil ciklaze i nastanak cAMP. Nedostatak *Adora1* gena kod miševa za posljedicu ima značajno smanjen životni vijek i povišen rizik od napadaja. A1 također ima ulogu u regulaciji sna i očuvanju funkcije bubrega (4). Aktivacija A1 uzrokuje vazokonstrikciju (4), no tijekom hipoksije uočena je vazodilatacija koja se javlja kao obrambeni mehanizam (5). Vazodilatacija se javlja tijekom ishemijskog prekondicioniranja i pokazuje kardioprotektivni učinak (5, 8). Dodatak adenzina ili drugih selektivnih agonista pojačava kardioprotektivni učinak, dok ga A1 antagonisti poništavaju (9, 10). Adenzin direktno utječe na vazodilataciju produkcijom dušikovog (II) oksida (NO) koji nastaje aktivacijom endotelne NO-sintetaze (eNOS) te je uočena pojačana fosforilacija eNOS prilikom aktivacije A1 (5). A2a su također široko rasprostranjeni u tkivima, a najveće koncentracije se nalaze u prugastom tijelu mozga, imunskim stanicama slezene, timusu, leukocitima i trombocitima. Aktivacija A2a potiče aktivnost adenilil ciklaze i sintezu cAMP. Imaju ulogu u regulaciji imunskog odgovora u perifernim tkivima (4). U mozgu sudjeluju u regulaciji otpuštanja neurotransmitera (11). Miševi s isključenim *Adora2a* genom pokazuju promjene u ponašanju, produljeno vrijeme reakcije na bolne podražaje, a tlak i puls su

im povišeni (4, 12). Aktivacija A2a potiče vazodilataciju i poboljšava protok krvi, što je potaknuto uslijed ishemijske. Nedostatak A2a kompenziran je povećanim izražajem *Adora1* gena (11). A2a imaju kardioprotektivnu ulogu ukoliko su aktivirani tijekom reperfuzije (8). Aktivacija A2a potiče sintezu epoksieikozatrienoične kiseline (EET) (13). EET ima vazodilatatornu, antihipertenzivnu i kardioprotektivnu ulogu (14).

1.2. RTqPCR

Lančana reakcija polimeraze (PCR) je molekularna metoda analize nukleinskih kiselina koja služi za umnožavanje malih količina DNA u uzorku (15). Prvu PCR metodu razvio je znanstvenik Kary Mullis 1985. godine (16). Sekvencioniranje gena u uzorku koji sadrži malu količinu DNA imalo je za posljedicu slab signal, stoga se razvila potreba za metodom koja će povećati koncentracije nukleinskih kiselina u uzorku (16). Prva metoda bila je dugotrajna i zahtjevna. Tijekom godina razvijene su brojne modifikacije PCR metode, ali osnovni su koraci jednaki za svaku vrstu. Postupak se sastoji od izolacije nukleinske kiseline iz uzorka, denaturacije, vezanja početnica i umnažanja pomoću enzima DNA polimeraze. Početnice su kratki slijedovi nukleotida koji su komplementarni slijedu nukleotida na genu koji se umnaža.

Kada su 1993. razvijene metode praćenja PCR reakcije u stvarnom vremenu, sve češće je u uporabu ulazio kvantitativni PCR (qPCR). Uvođenjem praćenja u stvarnom vremenu, uklonjena je potreba za provođenjem elektroforeze na kraju umnažanja i omogućeno je praćenje nastajanja produkta tijekom svakog ciklusa (16). Ubrzo nakon toga razvijena je i kvantitativna reverzna transkripcija s lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (RTqPCR). Metode se razlikuju prema početnom uzorku. Dok qPCR umnaža DNA, RTqPCR, korištenjem enzima reverzne transkriptaze, ima mogućnost prevođenja RNA u komplementarni DNA produkt (cDNA) (17). Dodatkom reverzne transkripcije prije umnažanja, omogućeno je umnažanje RNA koja bez tog koraka ne može služiti kao kalup za PCR reakciju (16, 17). Detekcija u stvarnom vremenu moguća je korištenjem obilježenih proba ili korištenjem boje koja veže dvolančani DNA produkt, kao što je SYBR Green (18). Danas RTqPCR ima široku primjenu koja uključuje mikrobiološku dijagnostiku bakterija i virusa, proizvodnju cDNA za uporabu u genetskom inženjstvu i kvantifikaciju mRNA za istraživanja genske ekspresije (15, 18).

2. HIPOTEZA

Izlaganje hiperbaričnom kisiku utjecat će na izražaj A1 i A2a gena u krvnim žilama Sprague-Dawley štakora.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj završnog rada je odrediti učinak akutnog i intermitentnog izlaganja hiperbaričnom kisiku na izražaj A1 i A2a gena u uzorcima krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora u odnosu na netretiranu skupinu.

4. MATERIJALI I METODE

Izražaj A1 i A2a gena određen je na pohranjenim uzorcima površinskih krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora. Korištena je RTqPCR metoda koja se zasniva na prevođenju RNA iz uzroka u cDNA produkt, koji se zatim umnaža korištenjem specifičnih početnica.

4.1. Ustroj studije

Eksperimentalna studija na izoliranim organima pokusnih životinja (*Sprague-Dawley* štakori). Provedeno istraživanje je u skladu sa etičkim standardima Direktive 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (Klasa: 602-04/22-08/02 Ur. Broj: 2158-61-46-22-74).

4.2. Životinjski model

Kao uzorak korištene su pohranjene površinske krvne žile mozga zdravih Sprague-Dawley štakora oba spola, starosti 8 - 10 tjedana. Štakori su uzgojeni u Vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Štakori su bili podijeljeni u tri skupine (N=18, 6 štakora po skupini):

- 1) Kontrolna skupina (KONTROLA) koja nije izložena hiperbaričnoj oksigenaciji
- 2) Akutno izložena (A-HBO₂) skupina koja je jednom izložena hiperbaričnoj oksigenaciji i žrtvovana odmah nakon izlaganja
- 3) Intermitentno izložena (4D-HBO₂) skupina koja je izlagana HBO₂ protokolu svakodnevno kroz četiri dana i potom žrtvovana peti dan

4.3. Protokol hiperbarične oksigenacije i uzorkovanje krvnih žila mozga

Za primjenu HBO₂ korištena je hiperbarična komora za male životinje (Rekompresijska komora za eksperimente 110 L, Đuro Đaković, Aparati d.d.). Komora sadrži ventile za kompresiju i dekompresiju pomoću kojih je kontroliran tlak kojem su životinje izložene. Protokol hiperbarične oksigenacije sastojao se od izlaganja 100%-tnom kisiku pri tlaku od 2 bara u trajanju od dva sata jednom dnevno uz dodatnih 15 minuta potrebnih za kompresiju i 15 minuta za dekompresiju. Unutar komore smještene su i granule natrijevog hidroksida, kalcijevog hidroksida i etilvioleta (Draegersorb 800 Plus, DraegerMedical) sa svrhom vezanja izdahnutog CO₂. Za 4D-HBO₂ skupinu, protokol je ponovljen kroz četiri uzastopna dana, u približno jednako vrijeme.

Štakori su izvagani i potom anestetizirani ketamin-kloridom (3 ml/kg) i midazolamom (0,5 ml/kg). Nakon početka djelovanja anestetika štakori su dekapitirani. Izolirani su uzorci površinskih krvnih žila mozga. Nakon izolacije, uzorci su smrznuti korištenjem tekućeg dušika i pohranjeni na -80 °C do analize.

4.4. Izolacija RNA

Homogenizacija uzoraka je provedena pomoću tekućeg dušika u tarioniku. Nakon što je uzorak maksimalno mehanički usitnjen u tarionik je dodan 1 ml TRIzol-reagensa. Pomoću reagensa je oslobođena DNA i RNA iz stanica. Zbog toksičnosti TRIzol-reagensa postupak je potrebno provoditi u digestoru. Uzorak je repipetiran i prenešen iz tarionika u Eppendorf tubicu u koju je dodano 100 µl 1-brom-3-klor-propana. Uzorci su miješani naglim pokretima kroz 15 sekundi, inkubirani osam minuta i centrifugirani petnaest minuta na 12000 okretaja pri 4 °C što je dovelo do odvajanja slojeva. Gornji sloj sadrži RNA, dok donji sloj i međusloj sadrže DNA i proteine. Supernatant je odvojen u nove Eppendorf tubice i potom je dodano 500 µl izopropanola. Uzorci su lagano miješani okretanjem kroz 15 sekundi, inkubirani osam minuta i centrifugirani osam minuta na 12000 okretaja pri 4 °C. Došlo je do precipitacije RNA, dok je u supernatantu zaostao stanični sadržaj. Pipetiranjem je uklonjen supernatant i na precipitat je dodano 1 ml 75 %-tnog etanola. Uzorak je centrifugiran pet minuta na 7500 okretaja pri 4 °C. Postupak s je ponovljen. Nakon pročišćavanja, uklonjen je supernatant i uzorak je sušen na zraku jednu minutu dok preostali

etanol nije ishlapio. Zatim je RNA resuspendirana u 30 μ l NFW. Koncentracija RNA i čistoća uzorka izmjerene su fotometrijski.

4.5. RTqPCR

Nakon ujednačavanja koncentracija proveden je DNAza tretman kako bi se osiguralo isključivo umnožavanje RNA. Za umnažanje RNA korištena je metoda RTqPCR na Bio-Rad Real Time PCR CFX96 uređaju. Reakcijska smjesa za PCR sadrži termostabilnu DNA polimerazu koja produljuje lanac, pufer, dNTP potrebne za produljivanje lanca, specifične početnice koje se vežu za DNA kalup čiji slijed nukleotida odgovara slijedu na genu za traženi adenzinski receptor, otopinu $MgCl_2$ i boju pomoću koje se detektira umnoženi DNA produkt.



Slika 1. Uređaj CFX96 Real-Time System (Bio-Rad), Laboratorij za kliničku i molekularnu imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku (izvor:original autorice rada)

Prije umnožavanja provedena je reverzna transkripcija prilikom koje je RNA iz uzorka prevedena u cDNA produkt djelovanjem enzima reverzne transkriptaze. Dvolančana DNA je zatim denaturirana povišenjem temperature (95 °C) i lanci su razdvojeni. Spuštanjem temperature, na DNA lanac su vezane početnice. Djelovanjem DNA polimeraze, lanac DNA je produljen. Ciklus umnažanja se ponavlja. Metoda je kvantitativna i omogućava praćenje nastajanje produkta u stvarnom vremenu, nakon svakog provedenog ciklusa umnožavanja, za razliku od klasične RT-PCR metode kod koje se produkti vizualiziraju na kraju reakcije. Praćenje u stvarnom vremenu omogućuje SYBR Green boja koja se nalazi u reakcijskoj smjesi.

Ciljni geni za umnožavanje su *Adora1* gen koji kodira adenzinski receptor 1 i *Adora2a* gen koji kodira adenzinski receptor 2a. Normalizacija je provedena mjerenjem ekspresije HPRT1 gena koji kodira hipoksantin fosforibozil transferazu 1. HPRT1 je izražen u svim stanicama stoga je pogodan za korištenje kao „housekeeping gen“.

Tablica 1. Slijed nukleotida korištenih početnica

| Naziv početnice | Slijed nukleotida | |
|-----------------|-------------------|--|
| A1 | Forward | 5' TTC CAG GCT GCC TAC ATT GG 3' |
| | Reverse | 5' ATG GAG CTC TGG GTG AGG AT 3' |
| A2a | Forward | 5' GCA GCG CTA GTT TCG AAG TC 3' |
| | Reverse | 5' CTC GAA CAG ACA GGT CAC CC 3' |
| HPRT1 | Forward | 5' GAA AGA ACG TCT TGA TTG TTG AAG ATAT 3' |
| | Reverse | 5' GAG AGG TCC TTT TCA CCA GCA A 3' |

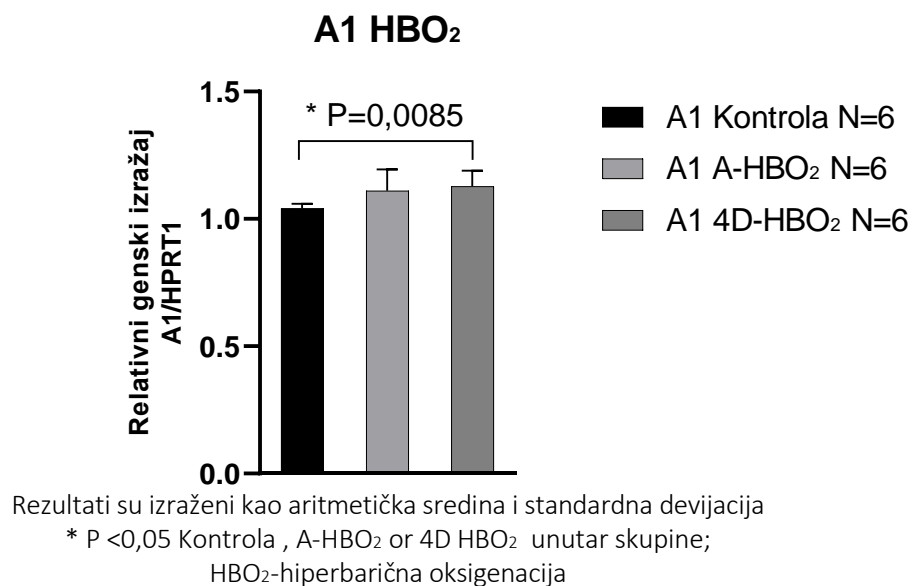
4.6. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Za statističku analizu i usporedbu rezultata relativnog izražaja proteina korišten je test za jednosmjernu analizu varijanci za nezavisne uzorke (One-Way ANOVA) ili u slučaju neravnomjerne distribucije dobivenih podataka Holm-Sidak ili Kruskal-Wallis test. Razina statističke značajnosti određena je sa $P < 0,05$. Korišteni su statistički programi SigmaPlot 11.2 (Systat Software, Inc., Chicago, SAD) te GraphPad Prism5 (San Diego, CA, SAD).

5. REZULTATI

5.1. Relativan izražaj A1

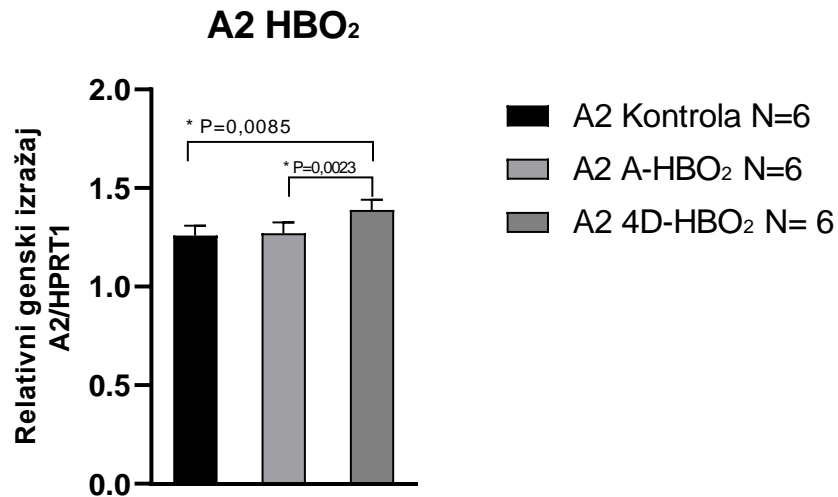
Relativan izražaj A1 gena značajno je povećan ($P = 0,0085$) u 4D-HBO₂ skupini u odnosu na kontrolu. Nema značajne promjene izražaja A1 gena ($P = 0,0803$) u A-HBO₂ skupini u odnosu na kontrolu (Slika 2).



Slika 2. Relativan izražaj A1 gena u uzorcima krvnih žila mozga *Sprague-Dawley* štakora određenih RTqPCR metodom, uzorci su podijeljeni u tri skupine: kontrolna skupina koja nije izložena hiperbaričnoj oksigenaciji (KONTROLA), skupina jednom izložena protokolu hiperbarične oksigenacije i potom žrtvovana (A-HBO₂) i skupina izložena protokolu hiperbarične oksigenacije kroz četiri uzastopna dana i žrtvovana peti dan (4D-HBO₂), normalizacija izražaja je provedena prema izražaju gena za hipoksantin fosforibozil transferazu 1 (HPRT1), rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija; * $P < 0,05$ u usporedbi s kontrolom, N predstavlja broj uzoraka po skupini.

5.2. Relativan izražaj A2a

Relativan izražaj A2a gena značajno je povećan u 4D-HBO₂ skupini u odnosu na kontrolnu ($P = 0,0085$) i A-HBO₂ ($P = 0,0023$) skupinu. Nema značajne promjene izražaja A2a gena ($P = 0,7262$) u A-HBO₂ skupini u odnosu na kontrolu (Slika 3).



Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija

* $P < 0,05$ Kontrola, A-HBO₂ or 4D HBO₂ unutar skupine;
HBO₂-hiperbarična oksigenacija

Slika 3. Relativan izražaj A2 gena u uzorcima krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora određenih RTqPCR metodom, uzorci su podijeljeni u tri skupine: kontrolna skupina koja nije izložena hiperbaričnoj oksigenaciji (KONTROLA), skupina jednom izložena protokolu hiperbarične oksigenacije i potom žrtvovana (A-HBO₂) i skupina izložena protokolu hiperbarične oksigenacije kroz četiri uzastopna dana i žrtvovana peti dan (4D-HBO₂), normalizacija izražaja je provedena prema izražaju gena za hipoksantin fosforibozil transferazu 1 (HPRT1), rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija; * $P < 0,05$ u usporedbi s kontrolom, N predstavlja broj uzoraka po skupini.

6. RASPRAVA

Prijašnja istraživanja o utjecaju hiperbarične oksigenacije na vaskularnu reaktivnost promatrala su promjene vezane uz sintezu EET. U istraživanju koje su proveli Mihaljević i suradnici, uočena je pojačana sinteza EET pod utjecajem HBO₂ (14). Razdoblje između dva izlaganja karakterizirano je kao pseudohipoksija tijekom koje se javlja adaptivni odgovor organizma koji štiti organizam prilikom ponovnog izlaganja oksidativnom stresu (14, 19). Hachmo i suradnici, također su uočili fenomen prilagodbe tijekom intermitentnog izlaganja HBO₂ koji je karakteriziran kao hiperoksični-hipoksični paradoks (6). Zhou i suradnici, promatrali su učinak HBO₂ na produkciju ROS u humanim staničnim kulturama endotela pupčane vene. Prilikom izlaganja povećanom parcijalnom tlaku kisika, koji je uzrokovan HBO₂, pojačana je sinteza ROS koji djeluju na staničnu signalizaciju potičući sintezu citoprotektivnih proteina (20). Pojačana sinteza ROS oštećuje stanice što dovodi do oslobađanja adenzina i aktivacije AR. Chen i suradnici, uočili su povećane koncentracije adenzina u mozgu *Sprague-Dawley* štakora tijekom primjene HBO₂ pri tlaku od 5 atm, i posljedično aktivaciju A1 što ima neuroprotektivni učinak. Dodatak A2a antagonista produljilo je vrijeme potrebno za nastanak oksidativnog oštećenja te je atenuacija A2a, uz stimulaciju A1, pokazala najbolje rezultate u smanjenju oštećenja moždanog tkiva kisikom (21). U kasnijem istraživanju, Cheng i suradnici, potvrdili su povećanje koncentracije adenzina nakon izlaganja akutnoj HBO₂ pri tlaku od 6 atm (22).

Svrha ovog rada bila je utvrditi utjecaj akutnog i intermitentnog izlaganja HBO₂ na izražaj A1 i A2a gena u uzrocima krvnih žila mozga *Sprague-Dawley* štakora. Uočen je statistički povećan izražaj A1 i A2a gena, u odnosu na kontrolu, nakon intermitentnog izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji (4D-HBO₂), dok kod akutnog izlaganja (A-HBO₂) nije uočena značajna promjena izražaja A1, niti A2a gena. Dobiveni rezultati u skladu su s prijašnjim istraživanjima u kojima je primjećena pojava pseudohipoksije između dva izlaganja protokolu hiperbarične oksigenacije (14, 19).

Adenzinski receptori aktiviraju se tijekom hipoksije stoga njihov izražaj nije povećan neposredno nakon akutnog izlaganja HBO₂, već je potrebno vrijeme prilagodbe organizma na pseudohipoksične uvjete koji su prisutni tijekom intermitentnog izlaganja HBO₂ protokolu. Na temelju dobivenih rezultata, potvrđen je utjecaj hiperbarične oksigenacije na izražaj A1 i A2a gena.

7. ZAKLJUČAK

Akutno izlaganje HBO₂ ne pokazuje značajan učinak na izražaj adenzinskih receptora, dok intermitentno izlaganje HBO₂ djeluje kao pseudohipoksija, koja potiče povećanje izražaja A1 i A2a gena.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Utvrditi utjecaj akutnog i intermitentnog izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji (HBO₂) na izražaj gena adenzinskih receptora (A1 i A2a) u krvnim žilama mozga *Sprague-Dawley* štakora.

Nacrt studije: Eksperimentalna studija na izoliranim organima pokusnih životinja (*Sprague-Dawley* štakori).

Materijal i metode: Zdravi *Sprague-Dawley* štakori oba spola, starosti 8 - 10 tjedana, podijeljeni su u tri skupine: KONTROLA (kontrolna skupina, nije izložena HBO₂), A-HBO₂ (akutno izložena skupina, jednom izložena HBO₂ u trajanju od 2 sata pod tlakom od 2 bara i potom žrtvovana) i 4D-HBO₂ (intermitentno izložena skupina, izložena HBO₂ po 2 sata dnevno kroz 4 dana, uzorkovanje je obavljeno peti dan). Uzeti uzorci površinskih krvnih žila mozga korišteni su za RTqPCR. Određen je relativni izražaj A1 i A2a gena uz korištenje HPRT1 kao *housekeeping* gena.

Rezultati: Akutno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji nije značajno utjecalo na izražaj A1 ili A2a gena. Uočen je značajan porast izražaja A1 i A2a gena u intermitentno izloženoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu.

Zaključak: Akutno izlaganje HBO₂ ne pokazuje značajan učinak na izražaj adenzinskih receptora, dok intermitentno izlaganje HBO₂ djeluje kao pseudohipoksija, koja potiče povećanje izražaja A1 i A2a gena.

Ključne riječi: adenzinski receptori; hiperbarična oksigenacija; izražaj gena; krvne žile mozga; *Sprague-Dawley* štakori

9. SUMMARY

Influence of Oxygen on Adenosine A1 and A2a Receptor Gene Expression in Cerebral Blood Vessels of Sprague-Dawley Rats

Objectives: This study aimed to determine the influence of acute and intermittent hyperbaric oxygenation (HBO₂) on the expression of adenosine receptor genes (A1 and A2a) in brain blood vessels of Sprague-Dawley rats.

Study design: Experimental animal study using isolated organs of Sprague-Dawley rats.

Material and methods: Healthy, male and female Sprague-Dawley rats (aged 8 - 10 weeks) were randomly divided into three groups (N=18, 6 rats per group): CONTROL group (was not exposed to HBO₂), acute HBO₂ group (A-HBO₂, exposed to the HBO₂ protocol once and sacrificed immediately after) and intermittent HBO₂ group (4D-HBO₂, exposed to the HBO₂ protocol during four consecutive days and sacrificed on the fifth day). The HBO₂ protocol consisted of two hours of exposure to 100% oxygen under 2 bars of pressure. Afterwards, samples of surface brain blood vessels were obtained and used to extract RNA. Using quantitative RT-PCR, relative gene expression of A1 and A2a receptor genes was measured using HPRT1 as the housekeeping gene.

Results: Acute exposure to HBO₂ did not significantly impact the gene expression of A1 or A2a, while there was a significant increase in both A1 and A2a gene expression in the intermittent group compared to the CONTROL group.

Conclusion: Acute exposure to HBO₂ does not significantly alter adenosine receptor gene expression, whereas intermittent exposure acts as pseudohypoxia, leading to an increase in A1 and A2a gene expression.

Key words: adenosine receptors, cerebral blood vessels, gene expression, hyperbaric oxygenation, Sprague-Dawley rats

10. LITERATURA

1. Kirby J, Snyder J, Schuerer D, Peters J, Bochicchio G. Essentials of Hyperbaric Oxygen Therapy: 2019 Review. *Missouri medicine*. 2019;116(3), 176–179.
2. Choudhury R. Hypoxia and hyperbaric oxygen therapy: A Review. *International Journal of General Medicine*. 2018;11:431–42.
3. Hentia C, Rizzato A, Camporesi E, Yang Z, Muntean D, Săndesc D i sur. An overview of protective strategies against ischemia/reperfusion injury: The role of hyperbaric oxygen preconditioning. *Brain and Behavior*. 2018;8(5):e00959.
4. Chen J, Eltzschig H, Fredholm B. Adenosine receptors as drug targets — what are the challenges?. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2013;12(4):265-286.
5. Paez D, Garces M, Calabró V, Bin E, D’Annunzio V, del Mauro J i sur. Adenosine A1 receptors and mitochondria: targets of remote ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2019;316(3):H743-H750.
6. Hachmo Y, Hadanny A, Abu Hamed R, Daniel-Kotovsky M, Catalogna M, Fishlev G i sur. Hyperbaric oxygen therapy increases telomere length and decreases immunosenescence in isolated blood cells : a prospective trial. *Aging*. 2020.
7. Sheth S, Brito R, Mukherjea D, Rybak L, Ramkumar V. Adenosine receptors: Expression, function and regulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(2):2024–52.
8. McIntosh V, Lasley R. Adenosine Receptor-Mediated Cardioprotection. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2011;17(1):21-33.
9. McCully J, Toyoda Y, Uematsu M, Stewart R, Levitsky S. Adenosine-enhanced ischemic preconditioning: adenosine receptor involvement during ischemia and reperfusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2001;280(2):H591-H602.
10. Duarte F, Amorim J, Varela A, Teodoro J, Gomes A, Cunha R i sur. Adenosine receptors: regulatory players in the preservation of mitochondrial function induced by ischemic

- preconditioning of rat liver. *Purinergic Signalling*. 2016;13(2):179-190. *ysiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2001;280(2):H591-H602.
11. Ning Y-L, Yang N, Chen X, Xiong R-P, Zhang X-Z, Li P, i sur. Adenosine A2A receptor deficiency alleviates blast-induced cognitive dysfunction. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2013;33(11):1789–98.
 12. Ledent C, Vaugeois J, Schiffmann S, Pedrazzini T, Yacoubi M, Vanderhaeghen J i sur. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature*. 1997;388(6643):674-678.
 13. Hanif A, Edin ML, Zeldin DC, Morisseau C, Falck JR, Ledent C, i sur. Reduced coronary reactive hyperemia in mice was reversed by the soluble epoxide hydrolase inhibitor (T -AUCB): Role of adenosine a 2A receptor and plasma oxylipins. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2017;131:83–95.
 14. Mihaljević Z, Matic A, Stupin A, Frkanec R, Tavčar B, Kelava V, i sur. Arachidonic acid metabolites of CYP450 enzymes and hif-1 α modulate endothelium-dependent vasorelaxation in Sprague-dawley rats under acute and intermittent hyperbaric oxygenation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(17):6353.
 - 15: Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR. *Experimental Hematology*. 2002;30(6):503–12.
 16. Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. PCR past, present and future. *BioTechniques*. 2020.;69(4):317–25.
 17. Bustin SA. Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2000.;25(2):169–93.
 18. Mo Y, Wan R, Zhang Q. Application of reverse transcription-PCR and real-time PCR in nanotoxicity research. *Methods in Molecular Biology*. 2012;:99–112.
 19. Mihaljević Z, Matic 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. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018;2018:1–15.

20. Zhou Q, Huang G, Yu X, Xu W. A novel approach to estimate Ros Origination by hyperbaric oxygen exposure, targeted probes and specific inhibitors. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;47(5):1800–8.
21. Yu-liang C, Ya-nan Z, Zhong-zhuang W, Wei-gang X, Run-ping L, Jun-dong Z. Effects of adenosine metabolism in astrocytes on central nervous system oxygen toxicity. *Brain Research*. 2016;1635:180–9.
22. Xie C-wei, Wang Z-zhuang, Zhang Y-nan, Chen Y-liang, Li R-ping, Zhang J-dong. Effect of interaction between adenosine and nitric oxide on central nervous system oxygen toxicity. *Neurotoxicity Research*. 2019;36(1):193–203.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Lora Kovač

Datum rođenja: 6. 6. 2000.

Mjesto rođenja: Osijek

Adresa: Osječka 169, 31207 Tenja

E-pošta: lora.kovac.a@gmail.com

Školovanje:

2007. – 2015. Osnovna škola Frana Krste Frankopana, Osijek

2015. – 2019. Tehnička škola i prirodoslovna gimnazija Ruđera Boškovića, Osijek

2019. Studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta

Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Stručne aktivnosti i publikacije:

Kovač, Lora; Đambić, Vedran; Šušnjara, Petar; Kibel, Aleksandar, Drenjančević, Ines; Mihaljević, Zrinka. Influence of Oxygen on Adenosine A1 and A2a Receptor Gene Expression in Cerebral Blood Vessels of Sprague-Dawley Rats // 4th International Student and 17th Bridges in Life Sciences Conferences / Prunchunas, Edward; Vari, Sandor G.; Laureova, Simona; Vladar, Csaba (ur.). Book of abstracts. 2022. str. 30-30 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).