

Imunometabolički profil staničnog odgovora na intermitentnu hipoksiju

Šarić, Alen

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:338259>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

STUDIJ MEDICINA

Alen Šarić

IMUNOMETABOLIČKI PROFIL STANIČNOG ODGOVORA NA INTERMITENTNU

HIPOKSIJU

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

STUDIJ MEDICINA

Alen Šarić

IMUNOMETABOLIČKI PROFIL STANIČNOG ODGOVORA NA INTERMITENTNU

HIPOKSIJU

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Natalia Kučić, dr. med.

Diplomski rad ocjenjen je dana _____ u/na _____

_____ pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Ivana Marić, dr. med. (predsjednica Povjerenstva)

2. Doc. dr. sc. Tomislav Jakljević, dr. med.

3. Doc. dr. sc. David Bonifačić, dr. med.

Rad sadrži 48 stranica, 6 slika, 96 literaturnih navoda.

Zahvaljujem se mojoj djevojci Ani na neiscrpoj potpori, razumijevanju, motivaciji i ljubavi koja me je gurala i u najtežim trenucima te bez koje ne bih bio ovdje.

Zahvaljujem se cijeloj mojoj obitelji koja me je podupirala na sve moguće načine tijekom ovih šest godina studiranja, posebno mojim roditeljima koji su bili uvijek tu za mene.

Također, hvala svim mojim dragim prijateljima, a posebno onima s kojima sam proveo svih šest godina na fakultetu koji su ovaj put znatno olakšali.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Nataliji Kučić, dr. med. na strpljenju i pomoći u pisanju ovog rada.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. SVRHA RADA	3
3. PREGLED LITERATURE NA ZADANU TEMU	3
3.1. Signalni put prepoznavanja kisika (od engl. oxygen sensing pathway, OSP)	3
3.1.1. Stanični senzori kisika.....	5
3.2. Akutna/kronična/intermitentna hipoksija	7
3.2.1. Akutna i kronična hipoksija	7
3.2.2. Intermitentna hipoksija (IH)	9
3.2.2.1.. Kronična intermitentna hipoksija (K-IH).....	9
3.2.2.2. Akutna intermitentna hipoksija (A-IH).....	11
3.2.3. Modeli intermitentne hipoksije	13
3.2.3.1. Klinički modeli intermitentne hipoksije	13
3.2.3.2. Stanični modeli intermitentne hipoksije	15
3.3. Hipoksija kao prototip stresa i sterilne upale	17
3.4. Oksidacijski status kao prilagodba na hipoksiju	21
3.5. Metabolička prilagodba na hipoksiju	23
3.6. HIF-1α kao ključni i sveobuhvatni regulator imunometaboličkog odgovora na hipoksiju	25
3.6.1. Stanični fenotip u uvjetima intermitentne hipoksije.....	28
4. RASPRAVA	29
5. ZAKLJUČCI	30
6. SAŽETAK	31
7. SUMMARY	32
8. LITERATURA	33
9. ŽIVOTOPIS	48

POPIS KRATICA I AKRONIMA

HIFs – hipoksijom potaknuti čimbenici, od engl. hypoxia inducible factors

IH – intermitentna hipoksija

IHC – intermitentno hipoksijsko kondicioniranje

OSP – signalni put prepoznavanja kisika, od engl. oxygen sensing pathway

PHD – prolil hidroksilaza, od engl. prolyl hydroxylase domain protein

VHL – von Hippel-Lindau protein

CBP – CREP-vezujući protein, od engl. CREP-binding protein

EPO – eritropoetin

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

NOS – dušična oksid sintetaza

HO – hem oksigenaza

TGF- β – transformirajući čimbenik rasta, od engl. transforming growth factor β

2-OG – 2-oksoglutarat

TCA – ciklus limunske kiseline, od engl. tricarboxylic acid cycle

ROS – reaktivni kisikovi radikali, od engl. reactive oxygen species

FIH1 – HIF1 inhibicijski faktor, od engl. factor inhibiting HIF1

HDM – histonske demetilaze, od engl. histone demethylases

HSP70 – protein toplinskog šoka veličine 70-kilodaltona, od engl. heat shock protein 70

CHIP – C-terminalni dio Hsc70 povezanog proteina, od engl. C terminus of Hsc70-interacting protein

HAF – faktor povezan s hipoksijom, od engl. hypoxia-associated factor

MAPK – mitogen-aktivirane protein kinaze, od engl. mitogen-activated protein kinase

ERK – izvanstaničnim signalom regulirana kinaza, od engl. extracellular signal-regulated kinase

K-IH – kronična intermitentna hipoksija

OSA – opstruktivna apneja u spavanju, od engl. obstructive sleep apnea

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat

NOX – nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat oksidaza, od engl. NADPH oxidase

XO – ksantin oksidaza, od engl. xanthine oxidase

PLC – fosfolipaza C, od engl. phospholipase C

IP3 – inozitol trifosfat, od engl. inositol trisphosphate

DAG – diacilglicerol, od engl. diacylglycerol

PKC – protein kinaza C, od engl. protein kinase C

mTOR – ciljna molekula rapamicina u sisavaca, od engl. mammalian target of rapamicin

CaMK – kalcij-kalmodulin ovisna kinaza, od engl. calcium/calmodulin-dependent protein kinase

SOD – superoksid dismutaza

A-IH – akutna intermitentna hipoksija

PKA – protein kinaza A, od engl. protein kinase A

PI3K – fosfatidilinozitol-3-kinaza

Akt – protein kinaza B, od engl. protein kinase B

eNOS – endotelna dušikova sintetaza, od engl. endothelial nitric oxide synthase

GSK – glikogen sintetazna kinaza, od engl. glycogen synthase kinase

TNF – faktor tumorske nekroze, od engl. tumor necrosis factor

TNF-2R – receptor faktora tumorske nekroze 2

AMP – adenzin monofosfat

AMPK – adenzin monofosfat- aktivirana protein kinaza

CaMKKB – kalcij/kalmodulin ovisna kinaza kinaze B, od engl. calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase B kinaza B

HDAC5 – histonska deacetilaza 5

HPreC – hipoksijsko prekondicioniranje

HPeriC – hipoksijsko perikondicioniranje

HPostC – hipoksijsko postkondicioniranje

RIC – udaljeno ishemijsko kondicioniranje, od engl. remote ischemic conditioning

PCI – primarna koronarna intervencija, od engl. primary coronary intervention

IL-6 – interleukin 6

CRP – C-reaktivni protein

TLR4 – Toll-u sličan receptor 4, od engl. Toll-like receptor 4

IL-1 – interleukin 1

IL-1R – receptor za IL-1

NO – dušikov oksid

H₂S – sumporovodična kiselina

NF-κB – nuklearni faktor κB

IκB – inhibitorna komponenta κB

TAK1 – TGF-β-aktivirana kinaza 1, od engl. TGF-β- activated kinase 1

IKK – inhibitorna IκB kinaza

ER – endoplazmatski retikulum

NEMO – NF-κB regulatorna podjedinica IKK-γ, od engl. NF-κB essential modulator

TRAF6- adaptorski protein RANK receptora 6, od engl. tumour necrosis factor receptor associated factor 6

TRK – tirozinske kinaze

GLT1 – glutamatni transporter 1

MyD88 – mijeloidni faktor diferencijacije 88, od engl. myeloid differentiation primary response 88

NLRP3 – NOD-u sličan receptor 3, od engl. NOD-like receptor protein 3

HMGB1 – proteini visoke pokretljivosti iz skupine 1, od engl. high mobility group box one protein

RAGE – receptori za krajnje proizvode usmjerene glikacije, od engl. Receptor for Advanced Glycation Endproducts

MCP-1 - monocitni kemokin, od engl. monocyte chemoattractant protein-1

GR – glutation reduktaza

Nrf2 – nuklearni faktor 2 povezan s eritroidnim faktorom 2, od engl. nuclear factor erythroid 2-related factor 2

CO – ugljični monoksid

nNOS – neuralna dušikova sintetaza

iNOS – inducibilna dušikova sintetaza

MCT4 – monokarboksilni transporter 4, od engl. monocarboxylate transporter 4

GLUT – glukozni transporter, od engl. glucose transporter

LDH – laktat dehidrogenaza

CoA – koenzim A

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid

FADH₂ – flavin adenin dinukleotid

PDK1 – piruvat dehidrogenaza kinaza 1

PPP – pentoza fosfatni put

HRE – geni povezani s hipoksijom, od engl. hypoxia responsive elements

MPTP – mitohondrijske tranzicijske pore, od engl. mitochondrial permeability transition pores

NCX – Na⁺/Ca²⁺ izmjenjivač, od engl. Na⁺/Ca²⁺ exchanger

BDNF – neurotropni čimbenik rasta, od engl. brain-derived neurotrophic factor

1. UVOD

Stanje hipoksije prisutno je u mnogim bolestima uključujući apneju pri spavanju, tumorski rast, anginu pectoris, ishemijsku bolest srca, moždani udar, itd. Hipoksija može potaknuti brojne stanične i metaboličke promjene koje promiču daljnje pogoršanje navedenih kliničkih entiteta, a jedan od oblika hipoksije koji može imati pozitivne i negativne učinke na tijelo je intermitentna hipoksija (IH) (1-3). Jedan od ključnih mehanizama koji se aktiviraju je visoki izražaj i/ili aktivacija molekula koje preusmjeravaju signalni put iskoristivosti kisika, a među njima centralno mjesto zauzimaju HIF molekule, hipoksijom potaknuti čimbenici (od engl. hypoxia inducible factors, HIFs) (4). Hipoksija označava vrijednost kisika ispod fizioloških vrijednosti koja narušava normalno funkcioniranje stanice odnosno tkiva (5). No, hipoksija ne uzrokuje nužno samo patološke učinke na tijelo. Njeni pozitivni učinci poznati su kod profesionalni sportaša koji vrlo često provode visinske treninge upravo radi pozitivnih učinaka koji se očituju kroz prilagodbu tijela na manjak dostupnog kisika. Kada je tijelo izloženo umjereno niskim razinama kisika, kratkoročno dolazi do povećanog oksidativnog stresa, povećanog gubitka plazme i time smanjenog srčanog minutnog volumena i povećane ventilacije pluća. U svrhu kompenzacije navedenih promjena, dolazi do povećanja koncentracije eritrocita i hemoglobina u krvi zbog pojačane eritropoeze, povećava se aktivnost antioksidativnih enzima, te volumen mitohondrija i iskorištavanje slobodnih masnih kiselina, kao i gustoća kapilara što zajedno dovodi do učinkovitijeg transporta kisika u tijelu (6).

Patofiziološki učinci hipoksije pojavljuju se kada razina hipoksije nadmaši kompenzatorne mehanizme organizma te dovodi do oštećenja tkiva i organa. Takvi učinci nastaju kada stanica nema dovoljno energije za održavanje elektrolitne i osmotske ravnoteže što dovodi do nekroze stanica. Postoje mnogobrojna stanja u kojima hipoksija ima patološko djelovanje ili

očitovanje dovodeći do spomenutih poremećaja. Jedno od takvih kliničkih stanja je i infarkt miokarda pri čemu dolazi do prestanka cirkulacije kroz dio miokarda radi tromboembolijskog događaja, nakupljanja laktata s posljedičnim stanjem acidoze u zahvaćenom tkivu te na kraju nekroze kardiomiocita. Drugi eklatantni primjer je ishemijski moždani udar pri čemu živčane stanice odumiru već nakon nekoliko minuta izloženosti hipoksiji uslijed velike osjetljivosti moždanog tkiva na hipoksiju (7). Hipoksija ima važnu ulogu i u tumorskom rastu praćeno angiogenezom, a povezana je i s bolestima bubrega, endometriozom, preeklampsijom, aterosklerozom, plućnim bolestima, nealkoholnom masnom promjenom jetre, zacjeljivanju tkiva i drugim bolestima i patofiziološkim stanjima (8,9). No, hipoksija u manjim dozama i kraćim intervalima ostvaruje svoje protektivne učinke mehanizmima koji se već intenzivno istražuju. Primjeri takvog zaštitnog učinka mogu se naći kod profesionalnih sportaša (6), pacijenata sa zatajivanjem srca (10), kod zacjeljivanja tkiva, dijabetesa (11), bolesti živčanog sustava i drugih, a IH je oblik hipoksije kojim se potvrđuju njeni protektivni učinci (3).

IH označava stanje u kojem se ciklički izmjenjuju periodi smanjene koncentracije kisika u krvi i periodi normalne ili fiziološke razine kisika, drugim riječima cikličko izmjenjivanje perioda hipoksije i normoksije. IH se pokazala protektivnom u brojnim stanjima kao nefarmakološko sredstvo kojim se ostvaruju zaštitni učinci na mnoge organske sustave i tkiva. U kliničkim uvjetima, često se opisano stanje naziva i intermitentno hipoksijsko kondicioniranje (IHC) koje se provodi kod pacijenata sa moždanim ili srčanim udarom, multiplom sklerozom, ozljedama leđne moždine, metaboličkim sindromom i drugim bolestima, a sastoji se od izazivanja kratkih epizoda hipoksije kako bi se potaknuli zaštitni mehanizmi te njihov terapijski učinak (12).

2. SVRHA RADA

Svrha ovog preglednog rada je prikazati i opisati učinke i modele intermitentne hipoksije, razlučiti i obrazložiti mehanizme kojima se ostvaruje protektivni stanični fenotip te kritički sagledati imunometaboličke pokazatelje kao molekularne posrednike koji oblikuju i karakteriziraju takav stanični profil.

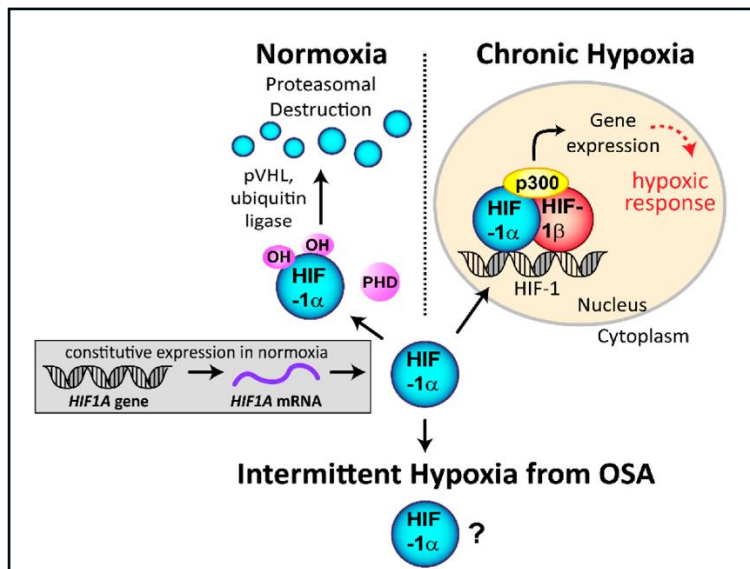
3. PREGLED LITERATURE NA ZADANU TEMU

3.1. Signalni put prepoznavanja kisika (od engl. oxygen sensing pathway, OSP)

Oksigenacija kao fiziološki pojam označava proces dodavanja ili vezanja kisika (13) u ljudskom tijelu i podrazumijeva proces izdvajanja kisika u plućima iz atmosferskog zraka, njegov prijenos krvnim žilama do tkiva (14) te difuziju u ciljnom tkivu putem mreže sitnih kapilara odnosno mikrocirkulacijom (15). „Normalna“ tj. fiziološka razina kisika u tkivu koja bi se definirala kao „normoksična“ razina jest često generalizirana i standardizirana na vrijednosti 160 mmHg ili 21,22 kPa što označava udio kisika od 20-21% u tkivu (16). Mjerenja parcijalnog tlaka kisika (pO_2) u raznim tkivima ljudskog organizma pokazala su uvelike različite vrijednosti, pa tako vrijednost kisika varira od 3,2-9,5% (24-72 mmHg) u različitim organima, primjerice u mozgu te se vrijednosti kreću oko 4,4% (33,8 mmHg) (17), zbog čega je uveden termin „physioxia“ koja označava fiziološke vrijednosti pO_2 u određenom tkivu izmjerenog *in situ* (18).

Ključnu ulogu u kontroli metabolizma stanice u stanjima hipoksije ima transkripcijski faktor HIF-1 α koji potiče prepisivanje gena potrebnih za prilagodbu stanice na hipoksiju. Aktivnost HIF-1 α u stanjima normoksije je negativno regulirana s proteinom protil hidrosilazom (od engl. prolyl hydroxylase domain protein, PHD) koji hidrosilira HIF protein i omogućava vezanje von Hippel-Lindau (VHL) proteina s E3 ubikvitin ligaza kompleksom na HIF-1 α čime ga označava za proteasomsku degradaciju (19), uz to VHL protein u stanici ima

fiziološku funkciju tumor supresora čija mutacija dovodi do VHL sindroma kojeg obilježava nastanak brojnih benignih i malignih tumora (20). U stanjima hipoksije manjak kisika sprječava aktivnost PHD enzima čime HIF-1 α ostaje stabilan te se prenosi u jezgru gdje se spaja sa HIF-1 β podjedinicom čime nastaje HIF transkripcijski čimbenik (**slika 1.**).



Slika 1. HIF-1 α signalni put u uvjetima normoksije, kronične hipoksije i intermitentne hipoksije.

U **normoksičnim** uvjetima postoji konstantan izražaj HIF-1 α molekule koja je hidroksilirana i proteasomski degradirana. U uvjetima **kronične hipoksije**, dolazi do inhibicije hidroksilacije što omogućava HIF-1 α molekuli premještanje u jezgru i stvaranje HIF transkripcijskog čimbenika i izražaj gena. U uvjetima **intermitentne hipoksije** HIF-1 α je pod znakom upitnika što označava da je njegova uloga još nedovoljno istražena i definirana.

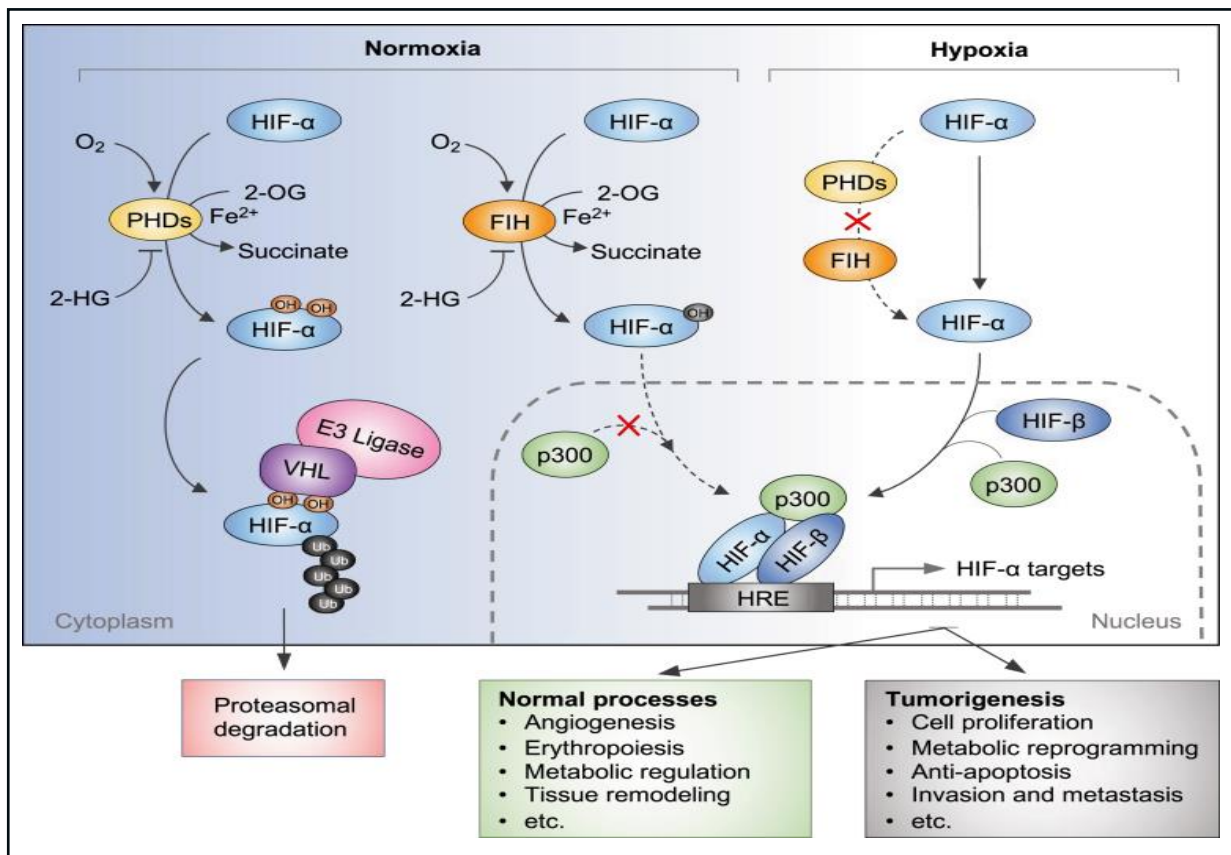
Preuzeto iz: Martinez CA, Kerr B, Jin C, Cistulli PA, Cook KM. Obstructive Sleep Apnea Activates HIF-1 in a Hypoxia Dose-Dependent Manner in HCT116 Colorectal Carcinoma Cells. Int J Mol Sci. 2019 Jan 21;20(2):445. <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/2/445>

Za potpunu aktivnost i prepisivanje gena potrebni su dodatni transkripcijski koaktivatori poput p300 i CREP-vezajućeg proteina (od engl. CREP-binding protein, CBP) (21). Iz svega navedenog razvidno je kako HIF-1 α potiče izražaj brojnih gena koji dovode do prilagodbe stanice na manjak kisika. Primjerice kod eritropoeze i metabolizma željeza hipoksija povećava izražaj gena za hormon eritropoetin (EPO) te druge proteine uključene u prijenos željeza poput transferina i njegovog receptora, ceruloplazmina i drugih. HIF-1 α povećava izražaj gena za metabolizam glukoze, odnosno svih enzima uključenih u glikolitičke procese te glukozne transportere. Nadalje, povećava izražaj gena uključenih u angiogenezu i

vaskularne promjene poput vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (od engl. vascular endothelial growth factor, VEGF), dušične oksid sintetaze (NOS), hem oksigenaze (HO) i drugih. Važni su i učinci na gene koji potiču preživljavanje stanica i proliferaciju poput inzulinu-sličnog čimbenika rasta i transformirajućeg čimbenika rasta (od engl. transforming growth factor β , TGF- β) (22).

3.1.1. Stanični senzori kisika

Molekularni senzori kisika u stanici su spomenuti enzimi prolil hidroksilaze. Trenutno su poznata 3 homologna enzima PHD1-3. Sva tri enzima doprinose regulaciji HIF aktivnosti, no PHD2 enzim je prisutan u najvećem omjeru i glavni je posrednik u HIF staničnom putu (23). Ovi enzimi pripadaju skupini 2-oksoglutarat (2-OG)-ovisnim dioksidazama čija je aktivnost opisana na **slici 2**.



Slika 2. Shematski prikaz HIF-ovisnog signalnog puta prepoznavanja kisika.

U normoksičnim uvjetima HIF-1 α podjedinica hidroksilirana je na prolinim mjestima od strane PHD enzima, koji omogućava vezanje VHL-E3 ligaza kompleksa i poliubikvitinaciju, a potom proteasomsku degradaciju HIF-1 α molekule. Uz to, HIF1 inhibicijski faktor (od engl. factor inhibiting HIF1, FIH1) katalizira hidroksilaciju asparaginskih ostataka čime onemogućava vezanje transkripcijskih koaktivatora p300/CBP i HIF transkripcijsku aktivnost. PHD i FIH enzimi pripadaju skupini 2-oksoglutarat(2-OG)-ovisnih dioksigenaza sa dvovalentnim ionom željeza u središtu koje koriste kisik i 2-OG za reakciju hidroksilacije uz stvaranje sukcinata kao nusprodukta. U stanjima hipoksije, aktivnost PHD i FIH1 enzima je značajno smanjena zbog manjka kisika u stanici te HIF-1 α postaje stabilan, premješta se u jezgru gdje se spaja s HIF- β podjedinicom stvarajući HIF transkripcijski faktor koji uz p300/CBP koaktivatore dovodi do prepisivanja brojnih staničnih gena.

Preuzeto iz: Liao C, Zhang Q. Understanding the Oxygen-Sensing Pathway and Its Therapeutic Implications in Diseases. *Am J Pathol.* 2020 Aug;190(8):1584-95. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.04.003.

Ako u stanici nema dovoljno kisika, ne postoji potreban supstrat za hidroksilaciju i sama aktivnost enzima se smanjuje (21). 2-OG je važan međuprodukt ciklusa limunske kiseline (od engl. tricarboxylic acid cycle, TCA) odnosno Krebsovog ciklusa, koji predstavlja jedan od najvažnijih staničnih metaboličkih procesa, stoga bi mogao biti poveznica između signalnih puteva vezanih za hipoksiju u okviru staničnog metabolizma (24). Nadalje, unutar prikazanog signalnog puta značajna je uloga sukcinata kao produkta aktivacije PHD-a u regulaciji HIF-1 α . Višak reaktivnih kisikovih radikala (od engl. reactive oxygen species, ROS) u uvjetima hipoksije inhibira enzim sukcinat dehidrogenazu u mitohondriju što dovodi do nakupljanja sukcinata u stanici, pri čemu njegov suvišak kompetitivno inhibira PHD enzime što posljedično aktivira HIF-1 α (25).

Drugi vrlo važan enzim koji također pripada skupini 2-OG dioksigenaza te regulira HIF-1 aktivnost je HIF1 inhibicijski faktor (od engl. factor inhibiting HIF1, FIH1). U uvjetima normoksije, FIH1 hidroksilira HIF-1 α molekulu i onemogućava aktivnost transkripcijskog koaktivatora p300/CBP. FIH enzimi pokazuju manju osjetljivost na hipoksiju u odnosu na PHD, što znači da će se u slučaju hipoksije prvo aktivirati PHD enzimi, a FIH tek u slučajevima intenzivnije hipoksije (21). Iako je FIH manje osjetljiv na manjak kisika,

pokazalo se da je FIH osjetljiviji na ROS, koji se pretjerano stvaraju u stanjima hipoksije, u odnosu na PHD (24).

Ostali dokazani senzori kisika u stanici su enzimi koji pripadaju epigenetičkim modulatorima, posebice skupina lizin-specifičnih histonskih demetilaza (od engl. histone demethylases, HDM) koje sadrže katalitički aktivan ion željeza sposoban vezati 2-OG. Nekoliko enzima iz skupine HDM dokazano imaju senzorsku funkciju za koncentraciju kisika i ulogu u prepisivanju gena koji dovode do promjena u staničnom ciklusu HIF-neovisnim putem odnosno izravnim reprogramiranjem kromatina. Postoje još brojni drugi enzimi čija struktura omogućava potencijalno senzorsku funkciju vezanu uz koncentraciju kisika u stanici, no njihova uloga u imunometaboličkoj prilagodbi stanice na hipoksiju još nije u potpunosti razjašnjena (21).

3.2. Akutna/kronična/intermitentna hipoksija

3.2.1. Akutna i kronična hipoksija

Hipoksiju možemo kategorizirati ovisno o razini saturacije kisikom ili njegovim parcijalnim tlakom (pO_2) u tkivu kao i dužini trajanja hipoksije te o naglom ili postepenom razvoju stanja hipoksije. S obzirom na navedene parametre razlikuje se akutna (trenutna), kronična (prolongirana) i intermitentna (periodična, ciklička ili naizmjenična) hipoksija. Akutna hipoksija nalazi se u podlozi brojnih bolesti, poput srčanog ili moždanog udara, plućnih bolesti, karcinoma, sepse, visinske bolesti i drugih. Akutna hipoksija traje u rasponu od nekoliko minuta do nekoliko sati te se u literaturi navodi kao *perfuzijski ograničena hipoksija* jer se najčešće radi o ograničenom protoku krvi kroz tkivo. Tijekom kronične hipoksije, stanice se nalaze u hipoksijskim uvjetima duži period odnosno više od 24 sata pa se karakterizira kao *difuzijski ograničena hipoksija* zbog slabije difuzije kisika kroz tkivo gdje uzrok može biti generiran unutar samog tkiva (npr. tumorsko tkivo) ili praćen smanjenom

koncentracijom kisika u okviru primarnog uzroka (npr. plućne bolesti) (26). Kronična hipoksija najčešće se spominje u kontekstu kroničnih plućnih bolesti poput kronične opstruktivne bolesti pluća te kod populacije ljudi koja živi na visokim nadmorskim visinama (27). Istraživanja su pokazala da HIF-1 α brže dostiže svoju maksimalnu koncentraciju tijekom hipoksije u odnosu na HIF-2 α , no i brže opada nakon 4-8 sati, a nestaje u potpunosti nakon 18-24 sata. Za razliku od njega, HIF-2 α ostaje stabilan tijekom dužeg vremenskog perioda te se zbog toga smatra da ima ključnu ulogu u kroničnoj hipoksiji. Nekoliko je razloga zašto dolazi do tog obrata u staničnom odgovoru, a prvi od njih je enzim ubikvitin ligaza, protein toplinskog šoka od 70-kilodaltona (od engl. heat shock protein 70, HSP70)/CHIP protein povezan s C terminalnim dijelom Hsc70 (od engl. C terminus of Hsc70-interacting protein, CHIP), kompleks koji u stanjima prolongirane hipoksije dovodi do ubikvitinacije i proteasomske degradacije HIF-1 α molekule, dok na HIF-2 α nema učinka. Nadalje, druga ubikvitin ligaza poznata kao faktor povezan s hipoksijom (od engl. hypoxia-associated factor, HAF) ima jednak učinak kao prethodni enzim odnosno dovodi do degradacije samo HIF-1 α molekule. Ulogu unutar opisanog staničnog odgovora imaju i male nekodirajuće RNA molekule koje dovode do destabilizacije HIF-1 α RNA molekule i posljedično manje sinteze proteina. Dodatne promjene odnose se na onaj dio kromatina koji kodira HIF-1 α molekulu čime je sinteza glasničke RNA molekule manja u stanjima kronične hipoksije (26).

U kroničnoj hipoksiji važna je aktivacija mitogen-aktiviranih protein kinaza (od engl. mitogen-activated protein kinase, MAPK) u kaskadi koju pokreće unutarstanični porast iona kalcija (Ca²⁺) ili povećano stvaranje ROS-a. Kaskada započinje s p38 proteinskom podjedinicom ERK-MAPK izvanstaničnim-signalom reguliranom kinazom (od engl. extracellular signal-regulated kinase, ERK), a završava aktivacijom c-Jun i JunB enzima koji potiču izražaj proliferativnih i proupalnih gena. MAPK kaskadni put potiče aktivnost i

nakupljanje HIF-1 α u jezgri te njegovu interakciju s p300 koaktivatorom, a dodatno p38 MAPK fosforilacijom HIF-1 α povećava stabilnost HIF molekule (28).

3.2.2. Intermitentna hipoksija (IH)

3.2.2.1. Kronična intermitentna hipoksija (K-IH)

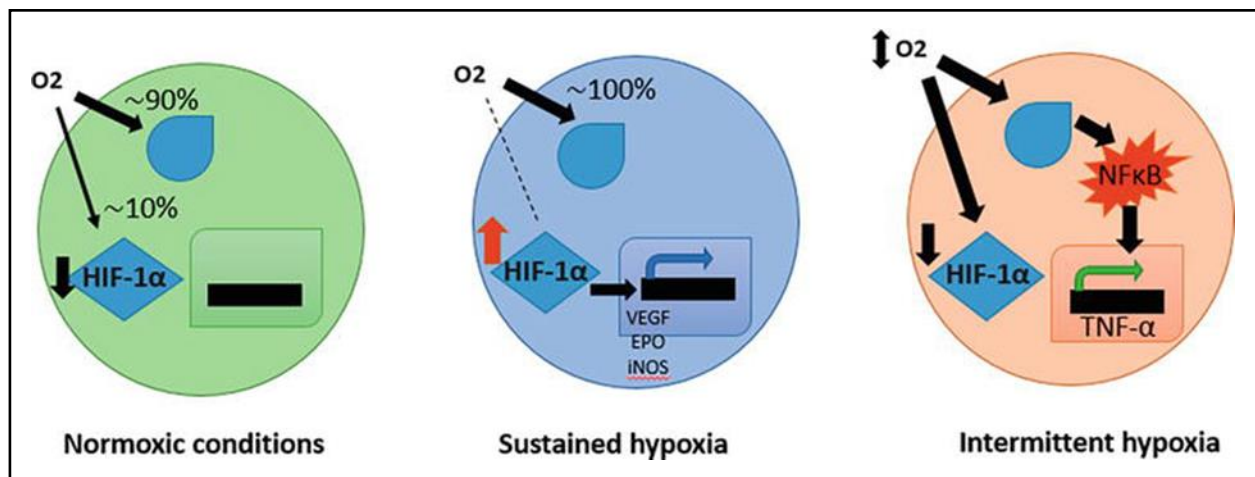
IH dijeli zajedničke stanične metaboličke puteve s akutnom i kroničnom hipoksijom, no zbog svoje karakteristike periodičnosti uključuje dodatne stanične mehanizme i signalne puteve. Ovisno o trajanju i jačini IH, ona može imati pozitivan i negativan učinak na ljudsko tijelo, pa se tako njeni pozitivni učinci odražavaju na većinu organskih sustava ako su primijenjeni intervali kratki (3-10 minuta) s malim brojem ciklusa (3-15 ciklusa dnevno) uz kraće sveukupno trajanje (4-24 tjedna) uz blagi ili srednje jaki intenzitet hipoksije (9-16% udio udahnutog O₂) (10, 29). Patološka IH se najbolje prikazuje kroz kliničko stanje opstruktivne apneje u spavanju (od engl. obstructive sleep apnea, OSA) gdje postoji velik broj ciklusa (48-2400) te jak intenzitet hipoksije (3-8% udio udahnutog O₂), a trajanje je kronično (30, 31). Stanični putevi uključeni u patofiziološke posljedice K-IH su temeljito istraživani radi njihove potencijalne uloge u nastanku OSA-e i karcinoma. Glavnu ulogu u staničnom metabolizmu K-IH-e ima HIF molekula gdje dolazi do višestrukog porasta HIF-1 α molekule, a pada HIF-2 α što je slično staničnom odgovoru u stanjima akutne hipoksije. Glavni pokretači signalnih puteva u K-IH-u jesu ROS molekule. Postoje brojni izvori ROS-a, a među glavnima jesu nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat (NADPH) oksidaza enzimi (od engl. NADPH oxidase, NOX), ksantin oksidaza (od engl. xanthine oxidase, XO) te mitohondrijski kompleksi lanca transporta elektrona (28). Dosadašnja istraživanja pokazuju da je XO prvi enzim kojeg K-IH aktivira, a koji stvara velike količine ROS-a (32). Pod utjecajem hipoksije (i drugih podražaja poput citokina kao medijatora upale) proteasomskom pretvorbom ksantin dehidrogenaza se pretvara u enzim XO koja koristi elementarni kisik za pretvorbu ksantina i hipoksantina u urate, a tijekom te reakcije dolazi do stvaranja ROS-a. Upravo zbog

spomenutog obrasca cikličnosti kod intermitentne hipoksije s izmjenjujućim periodima normoksije i hipoksije, u periodima hipoksije dolazi do stvaranja enzima ksantin oksidaze, a onda tijekom perioda reoksigenacije i ponovne prisutnosti kisika XO ima potreban supstrat reakcije kojom dolazi do stvaranja ROS-a (33). Povećana koncentracija ROS-a aktivira fosfolipazu C (od engl. phospholipase C, PLC), odnosno PLC γ koja stvara inozitol trifosfat (od engl. inositol trisphosphate, IP3) i diacilglicerol (od engl. diacylglycerol, DAG) koji mobiliziraju Ca²⁺ iz staničnih organela u citoplazmu (34). Povišena unutarstanična razina Ca²⁺ aktivira protein kinazu C (od engl. protein kinase C, PKC) koja fosforilira podjedinice NOX enzima i dodatno povećava stvaranje ROS-a (35). PKC aktivira važan metabolički put ciljne molekule rapamicina u sisavaca (od engl. mammalian target of rapamicin, mTOR) koji povećava sintezu i translaciju HIF-1 α molekule. U periodima reoksigenacije, PDH enzimi vrlo brzo postaju ponovno aktivni te bi slijedom uobičajenih zaključaka trebali dovesti do pada koncentracije HIF-1 α proteina, no pokazano je da se razina HIF-1 α ne smanjuje tijekom reoksigenacije i da je za taj fenomen zaslužan mTOR signalni put (36). Povišena razina unutarstaničnog Ca²⁺ aktivira kalcij-kalmodulin kinazu (od engl. calcium/calmodulin-dependent protein kinase, CaMK) koja povećava transkripcijsku aktivnost faktora HIF-1 α (37). Povišena koncentracija Ca²⁺ dovodi i do spomenutog pada u razini HIF-2 α molekule aktivacijom kalpaina, proteaza ovisnim o kalciju, koje dovode do selektivne proteasomske degradacije HIF-2 α molekule. To ima važan učinak na stvaranje ROS-a zbog toga što HIF-2 α potiče izražaj antioksidativnih enzima poput superoksid dismutaze (SOD), dok HIF-1 α potiče izražaj NOX enzima koji stvaraju ROS zbog čega neravnoteža HIF-1 α i HIF-2 α ima važnu ulogu u patogenezi K-IH (38). Tijekom K-IH, aktiviraju se i HIF-neovisni putevi, poput epigenetičkih modulatora, a povećava se i aktivnost i količina HDM enzima koji potom povećavaju HIF1A gensku ekspresiju (39).

3.2.2.2. Akutna intermitentna hipoksija (A-IH)

Akutna intermitentna hipoksija se najčešće spominje u okviru intermitentnog hipoksijskog kondicioniranja (IHC) zbog kliničkih implikacija u brojnim bolestima. Nekoliko je kinaza unutar ranije spomenutih signalnih puteva uključeno u procese koji posreduju protektivne učinke tijekom IHC-a. Jedan od važnih zaštitnih mehanizama je bolja regulacija koncentracije kalcijevih iona koja je posredovana protein kinazom A (od engl. protein kinase A, PKA), PKC i CaMK signalnim putevima. Fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI3K) i protein kinaza B (od engl. protein kinase B) u okviru PI3K/Akt signalnog puta sudjeluje u kardioprotektivnim učincima aktivacijom endotelne dušikove sintetaze (od engl. endothelial nitric oxide synthase, eNOS), aktivacijom PKC- ϵ i inhibicijom glikogen sintetazne kinaze (od engl. glycogen synthase kinase, GSK)-3 β (40). Inhibicija GSK-3 β enzima dovodi do nakupljanja transkripcijskog faktora β -katenina koji poboljšava preživljenje kardiomiocita i smanjuje veličinu ishemijske lezije nakon srčanog udara (41). Dokazana je povećana aktivnost i koncentracija HIF-1 α molekule u IHC koja pored kardioprotektivnih posreduje i neuroprotektivne učinke. U mozgu povećanje HIF-1 α tijekom A-IH uzrokuje aktivacija P2X7 receptora za purine. Aktivacija P2X7 receptora posebno je izražena kod astrocita, potpornih stanica u mozgu koje imaju važnu ulogu održavanja homeostaze, gdje blokiranje P2X7 receptora sprječava nastanak ovih zaštitnih mehanizama. Smatra se da HIF-1 α aktivacija ovisna o P2X7 receptoru nije posredovana manjkom kisika već aktivacijom PI3K/Akt signalnog puta (42). U prilog toj tvrdnji navodi se činjenica da farmakološko blokiranje P2X7 receptora i izlaganje hipoksiji ne dovodi do porasta koncentracije HIF-1 α u astrocitima, već samo u neuronima. No, za razliku od astrocita razina HIF-1 α u neuronima brzo se smanjuje te je dokazano da neuroprotekcija u mozgu nije primarno posredovana neuronima, već astrocitima (43). Ulogu u neuroprotekciji ima i faktor tumorske nekroze (od engl. tumor

necrosis factor, TNF) čija je aktivacija prikazana na **slici 3.**, koji kod IHC-a svoje protektivno djelovanje ostvaruje preko TNF 2 receptora (TNF-2R).



Slika 3. Utjecaj normoksije, prolongirane hipoksije i intermitentne hipoksije na izražaj HIF-1 α .

U stanjima **normoksije** dolazi do degradacije HIF-1 α molekule i ne dolazi do izražaja HIF-ovisnih gena. U stanjima **prolongirane hipoksije**, visoke razine HIF-1 α molekule dovode do prepisivanja HIF-ovisnih gena poput vaskularnog endotelnog čimbenika rasta, eritropoetina i inducibilne dušikove sintetaze (iNOS). U uvjetima **intermitentne hipoksije** dolazi do aktivacije nuklearnog faktora κ B (NF- κ B) i aktivacije gena za faktor tumorske nekroze α (TNF α) koji posreduje protektivne učinke posredstvom svojih receptora.

Preuzeto iz: Munir F, Islam N, Hassan Nasir M, Anis Z, Bano S, Naeem S, et al. Impact of Hypoxia on Astrocyte Induced Pathogenesis. U: Heinbockel T. Neurophysiology - Networks, Plasticity, Pathophysiology and Behavior. IntechOpen [Internet]; 2022. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.106263>

TNF-2R u okviru PI3K/Akt signalnog puta potiče stvaranje anti-apoptotičkih faktora i poboljšava preživljenje neurona. Velika količina TNF-2R se nalazi na pericitima, stanicama koje okružuju krvne žile u mozgu i doprinose održavanju krvno-moždane barijere, stoga se pretpostavlja da svoje zaštitne učinke TNF ostvaruje kroz bolju regulaciju krvno-moždane barijere (44).

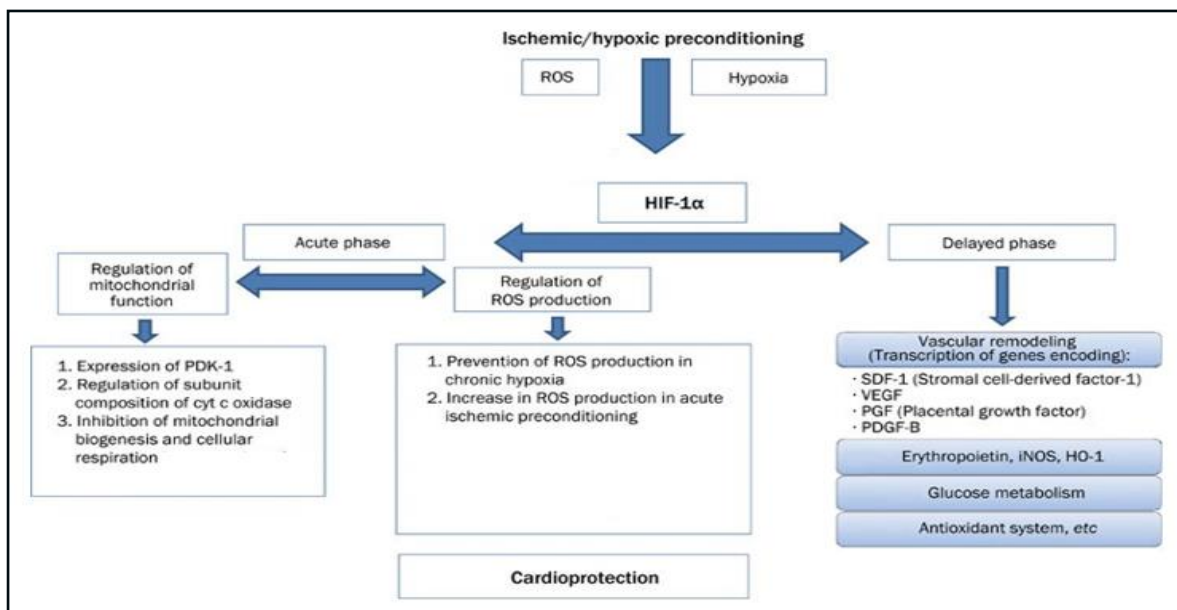
Drugi mehanizam koji povećava aktivnost HIF-1 α nastaje kroz aktivaciju adenozin monofosfatom (AMP)-aktivirane protein kinaze s Hsp70 povezanog (AMPK)/HSP70) signalnog puta (45). U stanjima hipoksije zbog povišene koncentracije Ca²⁺ dolazi do aktivacije CaMK kinaze B (CaMKKB) i posljedično aktivacije enzima histonska deacetilaza 5 (HDAC5) koja istoimenim mehanizmom deacetilira Hsp protein što ubrzava sazrijevanje

HIF-1 α i naposljetku dolazi do akumulacije zrelog oblika HIF-1 α u jezgri. Ako je deacetilacija blokirana, nezreli oblik HIF-1 α ne prolazi kroz proces maturacije i biva degradiran (46).

3.2.3. Modeli intermitentne hipoksije

3.2.3.1. Klinički modeli intermitentne hipoksije

IHC se može klinički provoditi direktnim ishemijskim kondicioniranjem ciljnog organa, terapijski djelujući na sve organe te udaljenim kondicioniranjem jednog organa ili dijela tijela s ciljem zaštite drugog udaljenog organa. Farmakološko kondicioniranje provodi se lijekovima poput adenoizina, bradikinina, opioda, noradrenalina, općih anestetika i drugim. IHC se može podijeliti u tri grupe ovisno o vremenu kondicioniranja i nastanka prave nokse odnosno štetnog događaja. Prva grupa se naziva hipoksijsko prekondicioniranje (HPreC) kod kojeg se kondicioniranje događa prije štetnog događaja. Klinička istraživanja su pokazala najbolju učinkovitost u zaštiti ako se kondicioniranje provodi prije nastanka štetnog događaja. Smatra se da nastaju dva vremenska prozora tijekom prekondicioniranja odnosno rani period zaštite koji traje 4-6 sati te kasni koji počinje 12 sati nakon intervencije i traje do 72 sata poslije (slika 4.).



Slika 4. Kardioprotektivni učinci ishemijskog prekondicioniranja.

Hipoksija i veliko stvaranje ROS-a uzrokuje aktivaciju HIF-1 α molekule koja posreduje rane odnosno akutne zaštitne učinke regulacijom mitohondrijske funkcije i sprječavanjem ROS-posredovanog oštećenja stanice. U kasnijem periodu dolazi do pregradnje krvnih žila raznim čimbenicima rasta, poticanjem izražaja eritropoetina, hem oksignaze, vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF), antioksidativnih gena te prilagodbom metabolizma glukoze.

Preuzeto iz: Tekin D, Dursun AD, Xi L. Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and cardioprotection. Acta Pharmacol Sin. 2010 Sep;31(9):1085-94. doi: 10.1038/aps.2010.132.

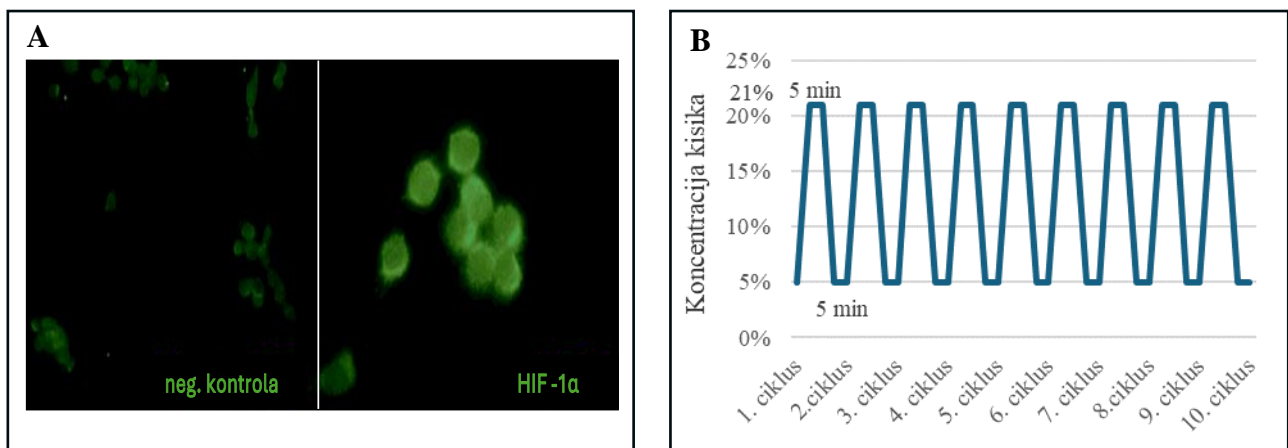
No, u hitnim kliničkim slučajevima teško je reagirati na vrijeme i prepoznati da će se u kratkom vremenu dogoditi nekakav štetni događaj, za razliku od planiranih zahvata i procedura kada se zna da će nastati ishemijsko oštećenje poput operacija na srcu, zahvata na ekstremitetima, arterijskih premoštavanja i drugih (47). Druga grupa je hipoksijsko perikondicioniranje (HPeriC) odnosno kondicioniranje koje se odvija istovremeno sa štetnim događajem koje se pokazalo kod farmakološkog i fizičkog kondicioniranja kao terapijska metoda koja smanjuje ishemijsku ozljedu. Hipoksijsko postkondicioniranje (HPostC) se odvija nakon štetnog događaja te je prihvatljivije za kliničare jer se odvija nakon štetnog događaja pa se izbjegavaju moguće komplikacije. Također, HPostC može služiti kao metoda dugotrajne rehabilitacije i multiorganske zaštite (48). Udaljeno ishemijsko kondicioniranje (od engl. remote ischemic conditioning, RIC) označava spomenutu tehniku kondicioniranja jednog organa s ciljem zaštite drugog udaljenog organa što je u kliničkoj praksi najoptimalniji način provođenja ovakve terapije zbog svoje neinvazivnosti i jednostavnosti (49).

RIC se koristi za brojne indikacije, a jedna od njih je primarna koronarna intervencija (od engl. primary coronary intervention, PCI) čiji protokol se provodi i u Kliničkom bolničkom centru Rijeka. Svi oblici ishemijskog kondicioniranja sastoje se od kratkih intervala hipoksije na ciljanom ili udaljenom organu te perioda reoksigenacije. U kliničkoj provedbi u KBC Rijeka koristi se protokol HPreC koji se sastoji od 10 ciklusa u kojima se izmjenjuju intervali od 5 minuta hipoksije i 5 minuta reoksigenacije po svakom ciklusu.

3.2.3.2. Stanični modeli intermitentne hipoksije

Kako bi se spoznajno produbili i potvrdili mehanizmi koji posreduju stanične učinke IH potrebno je razvijati istraživanja na odgovarajućim staničnim kulturama. U tu svrhu uvode se brojni alati poput korištenja hipoksijske komore za izazivanje uvjeta IH na ciljanim staničnim linijama. Unutar izazova koji prate uspostavu takvih modela dominira postizanje odgovarajuće istovjetne dinamike u izmjeni perioda normoksije i hipoksije koji bi simulirali identične promjene u ljudskom tijelu te sukladno kliničkim modelima koji koriste kratke intervale normoksije i hipoksije odnosno svega nekoliko minuta po intervalu. Naizmjenično izmjenjivanje plinova unutar komore na jednako opisani način pokazalo se tehnički vrlo zahtjevnim i neizvedivim do mjere nereprezentativnosti dobivenih rezultata zbog toga što svaki period normoksije ili hipoksije ne traje dovoljno dugo da bi plin iz komore difuzijom prešao u stanični medij. Drugim riječima, proces difuzije plina iz komore u medij traje predugo te zbog toga stanice nikada ne postignu željene koncentracije kisika. Iz navedenih razloga, razvile su se druge tehnike pa tako jedna od njih koristi već pripremljeni hipoksični ili normoksični medij koji se tijekom eksperimenta izmjenjuju u staničnoj kulturi umjesto transmisije samog okolnog plina. Ali, i takav model nudi mane radi tehničke izvedivosti te stresa kojeg stanice dožive tijekom čestih izmjena medija. Model koji se pokazao najboljim jest model koji koristi plinski propusne ploče za razvoj stanica gdje se plin ispušta direktno u medij sa dna ploče pa se hipoksični i normoksični uvjeti izmjenjuju praktički trenutačno. No, takve ploče su najčešće vrlo male pa je potrebno provesti više pokusa u cilju postizanja reprezentativnih rezultata (50). Drugi izazov je definiranje hipoksičnih i normoksičnih uvjeta, što je već ranije spomenuto, jer različita istraživanja različito definiraju razinu pO_2 kojima se postiže hipoksično, odnosno normoksično stanje (51). Eksperimentalni stanični model koji se razvija na Medicinskom fakultetu u Rijeci koristi hipoksijsku komoru s naizmjeničnim promjenama u smjesi plinova kojima se postižu testni uvjeti na staničnoj liniji BV-2

mikroglia stanica. Istraživanje se temelji na saznanjima koja su pokazala kako mikroglije zadobivaju protektivni protuupalni M2 fenotip u uvjetima ishemijskog kondicioniranja(52), praćen smanjenjem ekscitotoksičnosti, održavanjem krvno-moždane barijere, modulacijom upalnog odgovora te održavanjem cjelokupne homeostaze tkiva (53). Hipoksijski model na BV-2 staničnoj liniji već je uspostavljen ranije u eksperimentalnom laboratoriju Zavoda za fiziologiju, Medicinskog fakulteta u Rijeci gdje je potvrđeno da hipoksija u trajanju od 6-24 sata uzrokuje snažnu aktivaciju BV-2 mikroglija i povećan izražaj HIF-1 α molekule čime se stanični model akutne i kronične hipoksije smatrao uspostavljenim (Kučić i sur.) s ciljem daljnjeg istraživanja moguće uloge mikroglije u neuroprotekciji (**slika 5A**). Da bi se postigli uvjeti koji bi odgovarali kliničkom modelu intermitentne hipoksije, pokušavamo dizajnirati eksperimentalni stanični model intermitentnog hipoksijskog prekondicioniranja prikazan i opisan na **slici 5B**.



Slika 5A. Izražaj HIF-1 α proteina u hipoksičnim BV-2 mikroglia stanicama prikazana metodom imunofluorescence in-situ.

Slika prikazuje pozitivan izražaj HIF-1 α molekule u BV-2 mikroglia stanicama nakon izazivanja hipoksije u hipoksijskoj komori 6-24 sata po hipoksiji čime potvrđuje uspostavu in-vitro modela akutne i kronične hipoksije u BV-2 mikroglia stanicama.

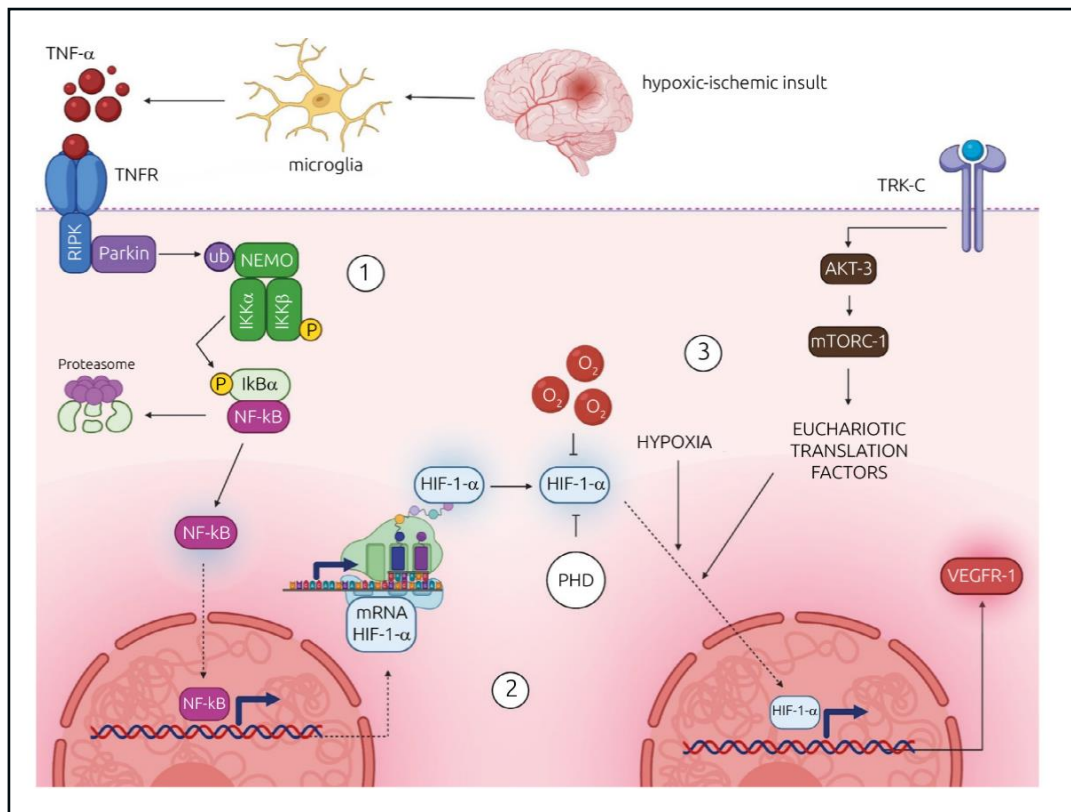
Slika 5B. Eksperimentalni model staničnog prekondicioniranja ciklusima intermitentne hipoksije.

Uspostava eksperimentalnog modela sastoji se od 10 ciklusa izmjenjivanja smjese plinova s 21% kisika u normoksičnoj fazi i smjesi plinova s 5% kisika u hipoksičnoj fazi gdje svaka faza u ciklusu traje pet minuta. Eksperiment bi se provodio u hipoksijskoj komori s praćenjem koncentracije kisika u komori kako bi se osigurali točno određeni uvjeti hipoksije i normoksije.

Nakon uspostave ovog eksperimentalnog modela, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se rasvijetlili mehanizmi koji stoje u pozadini protektivnog fenotipa IH na staničnim modelima kardiomiocita i mikroglia stanica koji bi predstavljali stanične korelate odgovarajućim kliničkim entitetima u srcu i mozgu. U konačnici, razumijevajući značajke IH, bili bismo bliže smjernicama koje rukovode primjenu IH u terapijske svrhe.

3.3. Hipoksija kao prototip stresa i sterilne upale

Hipoksija i upala su dva usko povezana stanja gdje hipoksija dovodi do upale, ali i sama upala može dovesti do tkivne hipoksije. U brojnim patološkim stanjima se hipoksija i upala isprepliću, poput ateroskleroze, karcinoma, reumatoidnog artritisa, ishemijske bolesti srca i drugih (54). Dokazi da hipoksija uzrokuje upalu u organizmu su brojni, tako je dokazana povećana razina faktora upale u stanjima hipoksije poput interleukina 6 (IL-6), C reaktivnog proteina (CRP-a), Toll-u sličnog receptora 4 (od engl. Toll-like receptor 4, TLR4) (1), interleukina 1 (IL-1) i receptora za IL-1 (IL-1R) (55). Stupanj hipoksije uvjetuje način aktivacije upalnih signalnih puteva, odnosno u slučaju jake hipoksije dolazi do nekroze stanica i otpuštanja unutarstaničnog sadržaja koji potiče nastanak upale. U slučaju blaže hipoksije koja ne dovodi do smrti stanica, dolazi do stvaranja drugih molekula poput dušikovog oksida (NO), sumporovodične kiseline (H₂S), ROS-a, sukcinata i drugih metabolita koji potiču nastanak upale (56). Stanični mehanizmi koji posreduju ovakvu vrstu upale uzrokovane hipoksijom uključuju HIF-ovisne i HIF-neovisne stanične puteve (54). Nuklearnim faktorom-κB (NF-κB) posredovan signalni put jedan je od glavnih upalnih puteva u organizmu koji regulira izražaj proupalnih citokina, kemokina, adhezijskih molekula, brojnih drugih proteina te enzima. Aktivnost NF-κB je negativno regulirana sa inhibitornom komponentom κB (IκB) što sprječavaju interakciju NF-κB i DNA molekule u jezgri stanice što je prikazano na **slici 6.** (57).



Slika 6. Hipoksijska aktivacija NF-κB signalnog puta.

Tijekom hipoksije dolazi do otpuštanja proupalnih molekula poput faktora tumorske nekroze α koji aktiviraju membranske receptore i dovode do aktivacije inhibitornih I κ B kinaza B (IKKB). IKKB enzimi fosforiliraju I κ B čime ga označavaju za proteasomsku razgradnju i omogućavaju premještanje NF- κ B u jezgru i prepisivanje proupalnih gena, uključujući gen za HIF-1 α . HIF-1 α u stanjima hipoksije ostaje stabilan radi inhibicije prolin hidroksilaza i aktivacijom protein kinaza B signalnog puta što omogućuje prepisivanje HIF-ovisnih gena, uključujući gen za vaskularni endotelni čimbenik rasta i njegov receptor.

Preuzeto s: Ghirelli EA, Silva FPGD, Oricil AGG, Paula CBV, Nagashima S, Oldenburg Neto CF, et al. Role of the NF- κ B/parkin/vegfr-1 pathway associated with hypoxic-ischemic insult in germinal matrix samples of newborn infants. *Rev Paul Pediatr.* 2023;41:e2022034. doi: 10.1590/1984-0462/2023/41/2022034.

Hipoksija aktivira HIF neovisni- NF- κ B signalni put porastom unutarstanične koncentracije iona Ca^{2+} što aktivira CaMK2 i TGF- β -aktiviranu kinazu 1 (od engl. TGF- β -activated kinase 1, TAK1) koja je neophodna za aktivaciju inhibitornih I κ B (IKK) enzima (58). TAK1 ima ulogu integriranja brojnih signalnih puteva koji prepoznaju strane antigene u organizmu (59). Porast unutarstanične razine Ca^{2+} nastaje zbog depolarizacije stanica u stanjima hipoksije što aktivira kalcijeve kanale i omogućava prelazak kalcija iz izvanstaničnog prostora u stanicu. Endoplazmatski retikulum (ER) je drugi izvor povećane unutarstanične razine Ca^{2+} koji u stanjima hipoksije pojačano propušta ione Ca^{2+} (60).

Za razliku od prethodno navedenih, nekoliko je HIF-ovisnih signalnih puteva koji interferiraju s NF- κ B. Dokazana je interakcija HIF-2 α podjedinice s NF- κ B regulatornom podjedinicom IKK- γ (od engl. NF- κ B essential modulator, NEMO) koji je potreban za aktivaciju NF- κ B gotovo bilo kojim podražajem (61). Potencijalnu ulogu imaju PHD enzimi jer je uočeno da IKKB sadrži odgovarajući hidroksilacijski obrazac kojeg PHD enzimi mogu hidroksilirati i posljedično uzrokovati promjene u NF- κ B putu. No, potrebna su dodatna istraživanja da se otkrije potpuna uloga PHD enzima u hipoksijskoj upali. Istraživanja su pokazala da FIH enzimi hidroksiliraju brojne komponente NF- κ B puta poput p105 podjedinice i I κ B α te ushodne regulacijske faktore, no njihova uloga se tek mora razjasniti (62). Adaptorski protein RANK receptora 6 (od engl. tumour necrosis factor receptor associated factor 6, TRAF6) je vrlo važan signalni medijator koji integrira više proupalnih puteva, a sudjeluje u regulaciji urođene i adaptivne imunosti te metabolizmu i razvoju organizma. TRAF6 aktivira NF- κ B put preko već spomenutog TAK1 kompleksa i time aktivira proupalne puteve. Dokazano je da TRAF6 dodatno regulira izražaj i aktivnost HIF-1 α molekule odnosno povećava njegovu stabilnost i aktivnost zbog čega TRAF6 predstavlja komunikacijski kanal između NF- κ B i HIF signalnog puta (63). Važnu ulogu u imunološkom odgovoru i tumorskom rastu ima TGF- β koji svoje učinke posreduje preko TRAF6 i TRAF4 receptora. TGF- β potiče razvoj tumorskih stanica te kolagenih vlakana u tumorskom tkivu, a u fiziološkim uvjetima služi kao tumor supresor i inhibitor staničnog ciklusa. Nadalje, zna se da posreduje protuupalne učinke aktivacijom protuupalnog fenotipa makrofaga i T-regulacijskih limfocita. Poznato je da hipoksija potiče izražaj TGF- β , no njegovi zaštitni učinci kod intermitentne hipoksije tek trebaju biti potvrđeni (64).

NF- κ B ima važnu ulogu u poticanju i posredovanju zaštitnih mehanizama intermitentne hipoksije jer njegova farmakološka blokada poništava učinke kondicioniranja u mozgu i srcu, odnosno ne dolazi do pojave neuroprotekcije i kardioprotekcije nakon IHC-a (65). Još 1999.

istraživanja su pokazala da je NF- κ B ključna molekula za razvoj kardioprotekcije te da su za aktivaciju NF- κ B nužni NOS, povećana količina ROS-a, PKC i tirozinske kinaze (TRK) (66). No, postoje određena oprečna mišljenja temeljena na istraživanjima koja pokazuju da IHC inhibira NF- κ B i time sprječava ishemijsku ozljedu jetre. Istraživanje Sun Ya-Wei et al. (2021.) je pokazalo da tijekom IHC-a dolazi do povećane sinteze glutamatnog transportera 1 (GLT1), koji uvjetuje nastanak neuroprotekcije nakon IHC-a eliminacijom glutamata iz sinaptičke pukotine i sprječavanjem njegove ekscitotoksičnosti, aktivacijom p38 MAPK kinaze i NF- κ B puta (65). Neuroprotektivni učinci RIC-a posredovani su NF- κ B aktivacijom Notch signalnog puta, koji u fiziološkim okolnostima ima ulogu u razvoju i obnavljanju živčanih stanica. NF- κ B potiče izražaj antiapoptotskih gena poput Bcl-2 te smanjuje izražaj proapoptotskog gena Bax čime doprinosi neuroprotektivnom učinku IHC-a (67). Ključnu ulogu u ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi mozga imaju TLR4 koji aktivacijom mijeloidnog faktora diferencijacije 88 (od engl. myeloid differentiation primary response 88, MyD88) i NF- κ B dovodi do upale u moždanom tkivu poticanjem stvaranja i otpuštanja proupalnih medijatora poput IL-1 β , TNF- α i drugih faktora. Primjena HPeriC i HPostC smanjuje razinu TLR4 receptora te ekspresiju MyD88 i NF- κ B, a razina proupalnih medijatora IL-1 β , IL-6 i TNF- α je snižena uz klinički smanjenu veličinu ishemijske lezije, manji moždani edem i bolju kliničku sliku (68). IL-1 β je snažan aktivator već spomenutog TRAF6 proteina koji ima bitno proupalno djelovanje. Inhibicijom PHD enzima, odnosno oponašanjem hipoksijskih uvjeta pokazalo se da aktivnost IL-1 β pada kao i njegovog signalnog puta, što je u skladu i s manjim razinama IL-1 β u krvi u tako izazvanim uvjetima (69). Glavni element u protuupalnom djelovanju intermitentne hipoksije je inhibicija proinflammatoryh signalnih puteva ovisnih o NF- κ B smanjenom sintezom proteina NOD-u sličnog receptora 3 (od engl. NOD-like receptor protein 3, NLRP3) inflammosoma (70). NLRP3 je proteinski kompleks kojeg aktiviraju razni upalni medijatori i signalni putevi, a uloga mu je pokretanje glavnih

proupalnih signalnih puteva u stanici aktiviranjem prokaspaze 1 čime dolazi do stvaranja aktivnih proupalnih citokina (71). IHC smanjuje količinu proteina visoke pokretljivosti iz skupine 1 (od engl. high mobility group box one protein, HMGB1) koji pokreće sekreciju proupalnih citokina preko I κ B ili ERK enzima vežući se za TLR4 receptore ili receptore za krajnje proizvode usmjerene glikacije (od engl. Receptor for Advanced Glycation Endproducts, RAGE). IHC smanjuje plazmatsku razinu HMGB1, ali i ekspresiju RAGE proteina na membrani, no mehanizmi u pozadini te inhibicije još nisu poznati. IHC dodatno smanjuje aktivnost mijeloperoksidaze, enzima koji u normalnim okolnostima povećava migraciju neutrofila u upaljeno područje, stoga njegova inhibicija smanjuje dolazak imunskih stanica u područje upale pa tako i monocita uslijed smanjenog lučenja monocitnog kemokina (od engl. monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1). Smatra se da endokanabinoidni receptori imaju ulogu u IHC posredovanoj zaštiti jer aktivirajući CB1/CB2 endokanabinoidne receptore smanjuju produkciju ROS-a, aktivaciju upalnih stanica, tjelesnu temperaturu te uzrokuju vazodilataciju koronarnih i cerebralnih krvnih žila (70). Iz svega navedenog proizlazi kako IHC djeluje pozitivno na upalu i imunološki odgovor, no potrebna su dodatna istraživanja kako bi se u potpunosti razumio utjecaj IHC-a na stanični odgovor u uvjetima upale.

3.4. Oksidacijski status kao prilagodba na hipoksiju

Homeostaza staničnog oksidativnog metabolizma mora biti očuvana kako bi svi stanični procesi mogli nesmetano funkcionirati. U normoksičnim uvjetima, postoji ravnoteža između stvaranja kisikovih radikala, najviše tijekom procesa oksidativne fosforilacije u mitohondrijima, i njihove eliminacije kroz stanični antioksidativni sustav kojeg uglavnom čine SOD i glutation reduktaza (GR). U stanjima akutne hipoksije dolazi do povećanog stvaranja ROS-a i smanjenja aktivnosti antioksidativnih enzima što vodi prema oksidaciji lipida, proteina i nukleinskih kiselina te posljedično do oštećenja DNA molekule,

nefunkcionalnih proteina i enzima, poremećaja u metabolizmu i smrti stanice (72). Važno je spomenuti da velike količine ROS-a uzrokuju citotoksične efekte, no male količine potiču adaptivne mehanizme koji štite stanicu, štoviše farmakološka deplecija ROS-a sprječava nastanak kardioprotekcije i neuroprotekcije nakon IHC-a (40). IHC primarno aktivira antioksidacijske sustave i time sprječava oštećenje neurona i kardiomiocita zbog suviška ROS-a (70). Glavni medijator oksidativne zaštite nakon IHC-a je nuklearni faktor 2 povezan s eritroidnim faktorom 2 (od engl. nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) koji je najvažniji stanični signalni put prepoznavanja ROS-a i transkripcijski faktor koji regulira izražaj antioksidativnih gena. IHC aktivira PI3K/Akt signalni put te time dovodi do aktivacije Nrf2 faktora koji potiče izražaj mnogih gena uključujući gen za HO-1, antiapoptotske gene te druge antioksidativne enzime poput glutationa i SOD (73). HO-1 enzim oksidira molekulu hema, koja nastaje uslijed oštećenja stanice i stvara veliku količinu ROS-a (74), stvarajući bilirubin, ugljični monoksid (CO) i dvovalentni ion željeza. Bilirubin se potom pretvara u biliverdin, no obje molekule dokazano imaju antioksidativno i protuupalno djelovanje. Zbog svoje karakteristike lipofilnih molekula, ugrađuju se u membrane staničnih organela te ih tako štite od oštećenja. Smatra se da CO može smanjiti unutarstaničnu produkciju ROS-a inhibicijom aktivnosti NOX enzima te da ima vazodilatacijsko, antiapoptotsko i protuupalno djelovanje (75). Nrf2 dodatno smanjuje razinu oksidativnih enzima NOX i XO time što smanjuje sintezu nitrotirozina, katalitičke podjedinice potonjih enzima (70). NO je važna molekula koja može uzrokovati brojne patološke i protektivne učinke što uvelike ovisi o njegovoj koncentraciji. Ako je koncentracija prevelika dolazi do lipidne peroksidacije, oštećenja DNA molekule te aktivacije proapoptotskih puteva. Ipak, u umjerenim koncentracijama NO ima zaštitne učinke te je njegova prisutnost neophodna za IHC posredovanu neuroprotekciju i kardioprotekciju. Postoje tri tipa NOS, enzima koji stvara NO, odnosno endotelna NOS (eNOS) koja ima protektivne stanične učinke, zatim neuralna NOS

(nNOS) koja uzrokuje oštećenje i smrt neurona te inducibilna (iNOS) koja može imati dvojake, patološke i protektivne učinke. eNOS ima protektivne učinke zbog svog vazodilatacijskog djelovanja na cerebralne krvne žile, inhibicije stvaranja trombocitnog čepa, smanjenja upalnog odgovora te antiapoptotskog djelovanja. Smatra se da je za aktivaciju eNOS zaslužan već spomenuti PI3K/Akt signalni put jer Akt enzim fosforilira eNOS u neuronima i endotelnim stanicama čime ga aktivira (76). Arginin predstavlja supstrat za NOS enzime odnosno molekulu iz koje nastaje NO. Suplementacija argininom se pokazala kao terapijska mogućnost za brojne bolesti poput hipertenzije, ateroskleroze, hiperkolesterolemije, ishemijske bolesti srca, srčanog i bubrežnog zatajenja te u brojnim drugim bolestima (77). U stanjima hipoksije, povećana je razina arginina kao adaptivni odgovor organizma (78). No, istraživanja su pokazala da IHC smanjuje dostupnost arginina NOS enzimima kako bi se spriječila pretjerana produkcija NO koji može biti štetan za stanice, stoga se uloga arginina intenzivno istražuje (79).

3.5. Metabolička prilagodba na hipoksiju

Učinci hipoksije odražavaju se brojnim metaboličkim promjenama koje se najbolje očituju u energetske statusu stanice povezanog s metaboličkim procesima koji usmjeravaju stanicu na prelazak iz oksidativne fosforilacije, uz upotrebu kisika, u metabolizam anaerobne glikolize bez kisika koja je znatno manje učinkovita u proizvodnji adenozin trifosfata (ATP), poznatog kao glavna energetska molekula stanice (80). Takav metabolički odgovor stanice kao rezultat anaerobnog glikolitičkog metabolizma vodi ka povećanju razine laktata koji se stvara iz piruvata. Istraživanja su pokazala da je porast laktata u korelaciji s porastom razine monokarboksilnog transportera 4 (od engl. monocarboxylate transporter 4, MCT4) za transport laktata (81). Hipoksična stanica na genskoj razini povećava razinu glukoznih transportera (od engl. glucose transporter, GLUT) te enzima glikolize, posebice laktat dehidrogenaze (LDH) (80). Središnju ulogu u oksidativnom katabolizmu aminokiselina i

ugljikohidrata imaju mitohondriji u kojima se događaju procesi TCA i oksidativne fosforilacije. TCA se sastoji od osam kemijskih reakcija koje započinju sintezom citrata iz acetil koenzima A (CoA) i oksaloacetata, a završavaju stvaranjem ponovno oksaloacetata. Niz tih kemijskih reakcija stvara energiju u obliku ATP-a, nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) i flavin adenin dinukleotida (FADH₂) uz niz međuprodukata (82). U stanjima hipoksije dokazano je da dolazi do obrata ciklusa limunske kiseline i stvaranja citrata iz α -ketoglutarata i glutamina, koji je potreban za stvaranje masnih kiselina. Osim toga, povećava se unos izvanstaničnih masnih kiselina i triglicerida putem membranskih transportera i procesom endocitoze odnosno uvrtnjem stanične membrane i stvaranjem unutarstaničnih mjehurića kojeg razlažu stanični enzimi (83). Smanjuje se i katabolizam masnih kiselina, što vodi prema iskorištavanju masnih kiselina za energetske potrebe (84). Cijeli proces promjene staničnog metabolizma iz oksidativne fosforilacije u anaerobni glikolitički put reguliran je isključivo HIF-1 α molekulom. HIF-1 α potiče izražaj svih važnih enzima glikolitičkog puta poput aldolaze, enolaze, MCT4 transportera, GLUT transportera, LDH i drugih te sprječava ulazak metabolita u TCA kako bi se smanjio nastanak ROS-a. Smanjen ulazak metabolita u TCA posredovan je HIF-1 α potaknutim povećanim izražajem piruvat dehidrogenaze kinaze 1 (PDK1) enzima koji fosforilira piruvat dehidrogenazu i time sprječava pretvorbu piruvata u acetil CoA što zajedno s povećanim izražajem LDH smanjuje ulazak metabolita u TCA. Također, HIF-1 α inducira mitohondrijsku autofagiju i smanjuje izražaj citokrom oksidaze čime se smanjuje stvaranje ROS-a i oksidativna fosforilacija (80).

Jedan od najvažnijih staničnih adaptivnih učinaka koji poboljšava preživljenje stanica nakon IHC-a je optimizacija staničnog metabolizma i energije (85). Intermitentna hipoksija potiče prilagodbe koje poboljšavaju respiratorni kapacitet stanice s povećanom produkcijom ATP-a i smanjenom potražnjom za ATP-om tijekom ishemijskih događanja. IHC uzrokuje stvaranje zaliha glikogena kod kardiomiocita koje se kasnije mogu iskoristiti i omogućiti stanici da

duže preživi (40). Nadalje, IHC povećava ekspresiju glukoznih transportera GLUT1 i GLUT3, enzima fosfofruktokinaze i LDH (86). Tijekom ishemijskih događanja zbog anaerobnog glikolitičkog metabolizma dolazi do hipermetabolizma glukoze i tzv. 'hiperglikolize' koja vodi ka povećanoj proizvodnji ROS-a i laktične acidoze što dovodi do još većeg moždanog oštećenja. Moždane stanice imaju vlastiti adaptivni mehanizam koji regulira ovaj fenomen, a on se naziva pentoza-fosfatni put (PPP). PPP koristi glikolitičke produkte kako bi stvarao citoplazmatski NADPH koji predstavlja nužni redoks supstrat za regeneraciju reduciranog glutaciona koji služi kao snažni antioksidans. IHC ima supresivan učinak na hiperglikolizu te višak glukoze usmjerava u PPP povećanjem ekspresije enzima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze koja regulira ulazak glukoze u PPP. Ovaj učinak IHC-a dovodi do povećane antioksidativne aktivnosti glutaciona i manjeg oštećenja stanice. U prilog tome govori činjenica da su razine glutamina i glicina, koji su potrebni za sintezu glutaciona, u cerebrospinalnom likvoru snižene nakon IHC-a (87). Uz aktivaciju glikolitičkog puta, IHC potiče aktivaciju alternativnih izvora energije prvenstveno ketonskih tijela i laktata. Dokazana je povećana razina β -hidroksibutirata u plazmi i moždanom tkivu nakon IHC-a čime se stvara više energije i sprječava hiperglikoliza (88). Astrociti imaju bitnu ulogu u adaptivnim promjenama nakon IHC-a jer pojačano luče laktat u izvanstanični prostor kojeg onda neuroni preuzimaju i iskorištavaju za svoje metaboličke potrebe. Ezrogeni laktat dokazano uzrokuje neuroprotekciju, stoga pojačano stvaranje i transfer laktata iz astrocita u neurone potiče opisane zaštitne mehanizme (87).

3.6. HIF-1 α kao ključni i sveobuhvatni regulator imunometaboličkog odgovora na hipoksiju

Glavni regulatorni imunometabolički put stanične prilagodbe u hipoksijskim uvjetima jest aktivacija HIF signalnog puta. HIF protein sastoji se od 2 podjedinice α i β u obliku heterodimera. β podjedinica je konstantno prisutna, dok je α podjedinica prisutna samo u

stanjima hipoksije (89). Trenutno se zna za postojanje tri α podjedinice nazvane HIF-1 α , HIF-2 α i HIF-3 α . HIF-1 α i HIF-2 α imaju sličnu funkciju, strukturu i pokazuju slično ponašanje u uvjetima hipoksije gdje se oba proteina vežu za HIF- β podjedinicu te aktiviraju gene povezane s hipoksijom (od engl. hypoxia responsive elements. HRE). Unatoč sličnosti, HIF-1 α prisutan je u gotovo svim stanicama ljudskog tijela, dok je HIF-2 α tkivno specifičan odnosno njegova ekspresija ograničena je na endotel, bubrege, pluća, srce i tanko crijevo. Također, određeni transkripcijski faktori potiču aktivnost jedne podjedinice, dok na drugu nemaju učinka (90). HIF-3 α dijeli strukturu i ponašanje u uvjetima hipoksije sa HIF-1 α i HIF-2 α , no njegova funkcija je najmanje istražena vezano uz uvjete hipoksije. Istraživanja su pokazala da inhibira aktivnost HIF-1 α i HIF-2 α podjedinice kompetitivnim vezivanjem za HIF- β podjedinicu, a s obzirom da HIF-3 α ne sadrži transkripcijski aktivnu domenu ne dolazi do izražaja HRE gena u jezgri (91).

HIF-1 α ima centralnu ulogu u regulaciji staničnih funkcija i održavanja homeostaze kisika. Ovaj transkripcijski kompleks zaslužan je za izražaj nekoliko stotina gena koji uključuju gene za angiogenezu, vaskularnu reaktivnost, energijski metabolizam stanice, eritropoezu, neurogenezu, upalu, regulaciju pH i željeza te proliferaciju i preživljenje stanica. HIF-1 α glavni je medijator kardioprotektivnih i neuroprotektivnih učinaka čije su koncentracije u stanjima intermitentne hipoksije povišene, dok primjena HIF-1 α antagonista blokira nastanak zaštitnih mehanizama (70, 92). Smatra se da HIF-1 α stvara akutne kardioprotektivne učinke primarno djelujući na mitohondrijsku funkciju i stanični metabolizam ekspresijom PDK-1 enzima, inhibicijom mitohondrijske respiracije i aktivacijom glikolize i PPP. Kasne kardioprotektivne učinke HIF-1 α omogućuje ekspresijom raznih čimbenika rasta i enzima poput VEGF-a, EPO, iNOS, HO-1 i drugih (92). VEGF je snažan induktor angiogeneze koji se u stanjima hipoksije pojačano luči te uzrokuje remodelaciju krvnih žila. U kardioprotekciji igra važnu ulogu s poticanjem razvoja kolateralnih krvnih žila i kapilara koje sprječavaju

nastanak ishemijskih ozljeda (93). Također, razine EPO dokazano su povišene nakon intermitentne hipoksije i regulirane HIF-1 α kompleksom. EPO uz svoju glavnu funkciju poticanja eritropoeze, ima brojne druge pozitivne učinke kojima ispoljava svoje zaštitne učinke. Njegova protektivna uloga povezana je s antiapoptotskim i protuupalnim učinkom. Kao snažan antioksidans pomaže neuronima u boljoj regulaciji oksidacijskog metabolizma, a svoje antiapoptotske učinke ostvaruje povećavanjem ekspresije antiapoptotskih proteina iz Bcl-2 obitelji, dok smanjuje izražaj i otpuštanje proapoptotskih mitohondrijskih faktora poput citokroma c i kaspaze 3 (72). HIF-1 α ima ključnu ulogu kao stanični senzor dostupnosti kisika, a HIF-1 α inducirana genska ekspresija predstavlja osnovu za razvoj zaštitnih staničnih mehanizama protiv hipoksije. Intermitentna hipoksija omogućava aktivaciju HIF-1 α u dozi koja nije letalna za stanicu, ali omogućava razvoj svih adaptivnih mehanizama koji naposljetku štite stanicu od pravih ishemijskih događaja poput akutnog koronarnog sindroma ili moždanog udara. Regulacijom staničnog energijskog metabolizma, HIF-1 α aktivira glikolitičke enzime, alternativne izvore energije i načine iskorištavanja energije poput PPP puta i ketonskih tijela, smanjenjem mitohondrijske respiracije i stvaranjem glikogenskih zaliha, čime dolazi do boljeg odgovora stanice na hipoksiju. Kroz gensku regulaciju oksidativnih enzima i mitohondrija, HIF-1 α umanjuje oksidacijsko oštećenje stanice te povećava antioksidativne kapacitete stanice (40, 70, 92, 94). HIF-1 α ima vrlo važnu ulogu u nastanku upalnih procesa te aktivira NF- κ B, jedan od najvažnijih staničnih upalnih signalnih puteva koji je neizostavan faktor u razvoju protektivnih učinaka (95). HIF-1 α regulira izražaj proteina važnih za preživljenje stanice odnosno potiče sintezu antiapoptotičkih proteina poput Bcl-2 i Bcl-xL, dok smanjuje izražaj proapoptotskih proteina poput Bid, Bax i Bak faktora (70). HIF-1 α kroz različite spomenute stanične procese regulira odgovor i adaptaciju stanice na hipoksiju, što dovodi do brojnih zaštitnih učinaka koji se nalaze u pozadini razumijevanja hipoksijskog kondicioniranja.

3.6.1. Stanični fenotip u uvjetima intermitentne hipoksije

Intermitentna hipoksija kroz brojne mehanizme prilagodbe ostvaruje specifičan stanični fenotip koji omogućava otpornost stanice na buduće hipoksijske događaje. Taj fenotip posredovan je aktivacijom specifičnih signalnih puteva poput HIF-1 α i NF- κ B. HIF-1 α najviše utječe na stanični fenotip koji prati intermitentnu hipoksiju, a prvenstveno promjenom staničnog energijskog metabolizma koji je prepoznatljiv po glikolitičkom fenotipu, odnosno po visokom izražaju glikolitičkih enzima, transportera (GLUT1 i GLUT3), LDH, MCT4 transportera, PDK1 enzima te aktivacijom PPP puta (85, 87). Dodatni učinak IH ima u sprječavanju apoptoze kroz smanjenje otvaranja mitochondrijskih pora (od engl. mitochondrial permeability transition pores, MPTP) koji otpuštaju citokrom c dovodeći do apoptoze stanice (40). U nastanku protektivnih učinaka, važnu ulogu ima regulacija elektrolita i njihovih transportera, pa je dokazano da intermitentna hipoksije potiče visok izražaj Na⁺/Ca²⁺ izmjenjivača (od engl. Na⁺/Ca²⁺ exchanger, NCX), odnosno NCX1 i NCX3 koji osiguravaju homeostazu Ca²⁺ (96). Fenotip se nadalje povezuje s visokim izražajem kalretikulina koji se pod utjecajem ICH povećava, a to je protein koji veže Ca²⁺ i time sprječava porast razine Ca²⁺ u stanici (40). Upalni signalni medijatori oblikuju imunološki odnosno upalni odgovor na IH. U suvišku proupalnih molekula poput interleukina i adhezijskih molekula koji nastaju kada je doza hipoksije prevelika dolazi do upalnog oštećenja stanica. Ipak, IH potiče izražaj protuupalnih staničnih puteva i smanjuje razinu proupalnih molekula u tijelu što dovodi do preživljavanja stanica i protuupalnog odgovora stanice (70). Fenotipski izražaj stanice u uvjetima IH povezan je s visokom razinom oksidativnog metabolizma, odnosno IH potiče izražaj antioksidativnih enzima što ponajviše ovisi o Nrf2 faktoru. Nrf2 omogućava visoku razinu HO-1 enzima, glutationa, SOD i CO u stanici, dok smanjuje izražaj NOX oksidativnih enzima (73). IH obilježava visok izražaj NOS enzima posebno eNOS i iNOS koji posreduju protektivne učinke u mozgu i srcu (40). Također, fenotipski postoji visok izražaj čimbenika

rasta poput VEGF i EPO koji su posredovani HIF-1 α te drugih poput neurotrofnog čimbenika rasta (od engl. brain-derived neurotrophic factor, BDNF), kojeg aktivira povećana količina ROS-a, a on potiče izražaj HIF-1 α i Nrf2 (70). Stoga, fenotipski izražaj IH mogao bi se okarakterizirati kao *glikolitički, protuupalni, antioksidativni, pro-regeneracijski i antiapoptotski fenotip*.

4. RASPRAVA

Intermitentna hipoksija predstavlja potencijalno snažan terapijski alat koji je primjenjiv i pristupačan na jednostavan klinički način velikom broju pacijenata. Ipak, učinak kronične IH koju nalazimo u OSA-i kao patofiziološku podlogu bolesti naglašava da intermitentna hipoksija može imati vrlo negativne odnosno patološke posljedice u organizmu. Iako klinički jednostavan terapijski model, mehanizmi koji stoje u pozadini IH su kompleksni zbog činjenice da u određenim uvjetima ispoljava negativne učinke na tijelo, dok u drugim uvjetima vrlo pozitivne i protektivne. Kao svaka farmakološka terapija, tako i IH ima svoju terapijsku dozu te se u literaturi to naglašava kao najbitniji element o kojem ovisi kakve učinke će izazvati IH. Analiza protokola IH korištenih u brojnim kliničkim istraživanjima pokazala je da patološke efekte izazivaju visoke doze IH s udjelom 2-8% O₂ u smjesi plinova te 48-2400 ciklusa na dan, dok protektivne učinke stvaraju niske doze IH s udjelom 9-16% O₂ u smjesi plinova te 3-15 ciklusa na dan (29). Centralnu ulogu u regulaciji staničnog odgovora na IH ima HIF-1 α čija aktivnost potiče razvoj adaptivnih mehanizama u odgovoru na IH. HIF-1 α ima važnu ulogu u nastanku OSA-e, ali je neizostavan faktor u nastanku protektivnih mehanizama potaknutih s IH (9). Važan doprinos ima i NF- κ B signalni put čija aktivnost je dokazana u pozitivnim i negativnim učincima IH. Nastanak protektivnih učinaka uvelike ovisi o aktivaciji protuupalnih signalnih puteva ovisnih o NF- κ B, a inhibiciji proupalnih, dok u kroničnim uvjetima poput OSA-e nastaje aktivacija proupalnih puteva. HIF-1 α i Nrf2

reguliraju metabolički i oksidativni odgovor na IH, stoga nastanak protektivnih ili patoloških učinaka ovisi o kapacitetu antioksidativnog sustava stanice koji se suprotstavlja povećanom nastanku ROS-a. Stanica se brojnim metaboličkim procesima prilagođava na manjak kisika, što djeluje povoljno i protektivno na stanicu sve dok uspijeva kompenzirati manjak kisika (70, 86). U trenutku kada oksidativni procesi nadvladaju antioksidativni sustav te kada se istroše kompenzacijski metabolički mehanizmi u stanici, tada nastaje oštećenje stanice i patološki učinci IH. Brojni signalni putevi posreduju ove učinke, stoga je važno razlikovati one puteve koji posreduju protektivne, a koji patološke učinke, kako bi se mogle razvijati terapijske mogućnosti koje će djelovati na ciljne molekule unutar tih signalnih puteva. Iz tog razloga, potrebni su reprezentativni klinički i stanični modeli IH, kako bi se spoznali stanični procesi koji posreduju IH te utjecaj komponenti njenog protektivnog profila na cijeli organizam.

5. ZAKLJUČCI

- Hipoksija uzrokuje značajne stanične promjene i adaptacije koje mogu biti letalne, ali i vrlo korisne za stanicu.
- Nedovoljno istražena intermitentna hipoksija ima bitne učinke na stanične mehanizme koji reguliraju prilagodbu na manjak kisika.
- Aktivacijom brojnih signalnih puteva, uključujući HIF-1 α i NF- κ B, intermitentna hipoksija stvara specifičan stanični fenotip koji je otporniji na stanje hipoksije.
- HIF-1 α ima ključnu ulogu u regulaciji genske ekspresije proteina i enzima važnih za prilagodbu stanice na nedostatak kisika.
- Intermitentna hipoksija ima širok spektar pozitivnih i zaštitnih učinaka na stanicu koji omogućavaju stanici da preživi puno značajnije hipoksične epizode.

- Klinički modeli IH pokazuju značajne terapijske i protektivne učinke na mnogobrojne organske sustave, dok nam stanični modeli pružaju osnovu za bolje razumijevanje svih mehanizama koji dovode do tih učinaka.
- Bolje razumijevanje svih staničnih odgovora na intermitentnu hipoksiju pruža osnovu za razvoj novih terapijskih mogućnosti i kliničkih implikacija koje će omogućiti bolje ishode liječenja.

6. SAŽETAK

Hipoksija je stanje koje je obilježeno nedostatkom kisika u stanicama i tkivima koje ima bitnu ulogu u brojnim patološkim stanjima. Ključni mehanizam koji regulira stanične procese u uvjetima hipoksije jest aktivacija hipoksijom potaknutih čimbenika (HIF). HIF aktiviraju osjetljivi stanični senzori kisika, a sam HIF regulira kompleksnu mrežu staničnih signalnih puteva koji kontroliraju adaptivne odgovore na hipoksiju. Kategorizirane su tri vrste hipoksije i karakterizirani parametri akutne, kronične te intermitentne hipoksije. Intermitentna hipoksija (IH) označava cikličko izmjenjivanje perioda hipoksije s periodima reoksigenacije. IH se pojavljuje u nekim patološkim stanjima poput opstruktivne apneje u spavanju, dok se u drugim stanjima pokazala kao vrlo protektivan čimbenik koji značajno poboljšava klinički ishod. Intermitentna hipoksija posreduje neuroprotektivne i kardioprotektivne učinke kroz modulaciju upalnog odgovora djelujući na nuklearni faktor κ B (NF- κ B) signalni put, povećanjem aktivnosti antioksidativnog sustava, prilagodbom energijskog metabolizma stanice prema anaerobnoj glikolizi, sprječavanjem apoptoze te aktivacijom drugih adaptivnih signalnih puteva i gena. Za pojavu zaštitnih mehanizama intermitentne hipoksije zaslužni su brojni signalni putevi, no glavni medijatori su HIF-1 α , nuklearni faktor 2 povezan s eritroidnim faktorom 2, NF- κ B, eritropoetin, vaskularni endotelni čimbenik rasta i drugih čija je uloga objašnjena u ovom radu.

Ključne riječi: HIF1 α , intermitentna hipoksija, ishemijsko kondicioniranje, klinički i stanični modeli

7. SUMMARY

Hypoxia is a condition characterized by a lack of oxygen in cells and tissues that plays a crucial role in numerous pathological conditions. The key mechanism that regulates cellular processes in hypoxic conditions is the activation of hypoxia-inducible factors (HIFs). HIF is activated by sensitive cellular oxygen sensors, while activated HIF regulates a complex network of cellular signaling pathways that control adaptive responses to hypoxia. There are categorised three types of hypoxia and it's parameters for acute, chronic, and intermittent hypoxia. Intermittent hypoxia (IH) involves cyclic shifts between hypoxic periods and reoxygenation periods. IH is present in specific pathological conditions like obstructive sleep apnea, while in other cases, it is a significant protective factor that notably enhances clinical outcomes. Intermittent hypoxia mediates neuroprotective and cardioprotective effects through modulating the inflammatory response by acting on the nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling pathway, increasing the activity of the antioxidant system, adjusting cellular energy metabolism towards anaerobic glycolysis, preventing apoptosis, and activating other adaptive signaling pathways and genes. Various signaling pathways contribute to the development of protective mechanisms of intermittent hypoxia, with the primary mediators being HIF-1 α , nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NF- κ B, erythropoietin, vascular endothelial growth factor, and others whose roles are elucidated in this thesis.

Key words: clinical and cellular models, HIF1 α , intermittent hypoxia, ischemic conditioning

8. LITERATURA

1. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* [Internet]. 2011 Feb 17 [citirano 23.6.2024.];364(7):656-65. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21323543/>
2. Cassavaugh J, Lounsbury KM. Hypoxia-mediated biological control. *J Cell Biochem* [Internet]. 2011 Mar [citirano 23.6.2024.];112(3):735-44. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21328446/>
3. Burtscher J, Mallet RT, Burtscher M, Millet GP. Hypoxia and brain aging: Neurodegeneration or neuroprotection. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2021 Jul [citirano 23.6.2024.];68:101343. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33862277/>
4. Semenza GL. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol* [Internet]. 2014 [citirano 23.6.2024.];9:47-71. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23937437/>
5. Höckel M, Vaupel P. Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. 2001 Feb 21 [citirano 23.6.2024.];93(4):266–76. Dostupno na: <https://academic.oup.com/jnci/article/93/4/266/2906460>
6. Sinex JA, Chapman RF. Hypoxic training methods for improving endurance exercise performance. *Journal of Sport and Health Science* [Internet]. 2015 Dec [citirano 23.6.2024.];4(4):325–32. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095254615000836>
7. Michiels C. Physiological and pathological responses to hypoxia. *The American Journal of Pathology* [Internet]. 2004 Jun [citirano 23.6.2024.]; 164(6):1875–82. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1615763/>

8. Chen PS, Chiu WT, Hsu PL, Lin SC, Peng IC, Wang CY, et al. Pathophysiological implications of hypoxia in human diseases. *J Biomed Sci* [Internet]. 2020 May 11 [citirano 23.6.2024.]; 27(1):63. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32389123/>
9. Della Rocca Y, Fonticoli L, Rajan TS, Trubiani O, Caputi S, Diomede F, et al. Hypoxia: molecular pathophysiological mechanisms in human diseases. *J Physiol Biochem* [Internet]. 2022 Nov [citirano 23.6.2024.];78(4):739-52. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35870078/>
10. Zhang Q, Zhao W, Li S, Ding Y, Wang Y, Ji X. Intermittent Hypoxia Conditioning: A Potential Multi-Organ Protective Therapeutic Strategy. *Int J Med Sci* [Internet]. 2023 [citirano 23.6.2024.];20(12):1551-61. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37859700/>
11. Hohenauer E. Physiological Adaptions to Acute Hypoxia. U: Ferraz R, Neiva H, Marinho AD, Teixeira EJ, Forte P, Branquinho L. *Exercise Physiology*. IntechOpen [Internet]; 2022 [ažurirano 7.1.2022.; citirano 23.6.2024.]. Dostupno na: <https://www.intechopen.com/chapters/80341>
12. Rivers RJ, Meininger CJ. The Tissue Response to Hypoxia: How Therapeutic Carbon Dioxide Moves the Response toward Homeostasis and Away from Instability. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Mar 8 [citirano 23.6.2024.];24(6):5181. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36982254/>
13. Cambridge Dictionary. oxygenation [Internet]. @CambridgeWords. [ažurirano 2022.; citirano 23.6.2024.]. Dostupno na: <https://dictionary.cambridge.org/dictionary/english/oxygenation>
14. Popel AS. Theory of oxygen transport to tissue. *Crit Rev Biomed Eng* [Internet]. 1989 [citirano 23.6.2024.];17(3):257-321. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2673661/>

15. Goldman D. Theoretical models of microvascular oxygen transport to tissue. *Microcirculation* [Internet]. 2008 Nov [citirano 23.6.2024.];15(8):795-811. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18608981/>
16. McKeown SR. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours—implications for treatment response. *The British Journal of Radiology* [Internet]. 2014 Mar [citirano 23.6.2024.]; 87(1035):20130676. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24588669/>
17. Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2011 Jun [citirano 23.6.2024.];15(6):1239-53. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21251211/>
18. Rosafio K, Pellerin L. Oxygen tension controls the expression of the monocarboxylate transporter MCT4 in cultured mouse cortical astrocytes via a hypoxia-inducible factor-1 α -mediated transcriptional regulation. *Glia* [Internet]. 2014 Mar [citirano 23.6.2024.]; 62(3):477-90 Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24375723/>
19. Palmer BF, Clegg DJ. Oxygen sensing and metabolic homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2014 Nov [citirano 23.6.2024.];397(1-2):51-8. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25132648/>
20. Varshney N, Kebede AA, Owusu-Dapaah H, Lather J, Kaushik M, Bhullar JS. A Review of Von Hippel-Lindau Syndrome. *J Kidney Cancer VHL* [Internet]. 2017 [citirano 23.6.2024.];4(3):20-9. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28785532/>
21. Li L, Shen S, Bickler P, Jacobson MP, Wu LF, Altschuler SJ. Searching for molecular hypoxia sensors among oxygen-dependent enzymes. *Elife* [Internet]. 2023 Jul 26 [citirano 23.6.2024.];12:e87705. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37494095/>

22. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* [Internet]. 2006 Nov [citirano 23.6.2024.];70(5):1469-80. Dostupno na:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16887934/>
23. Wilson JW, Shakir D, Batie M, Frost M, Rocha S. Oxygen-sensing mechanisms in cells. *FEBS J* [Internet]. 2020 Sep [citirano 23.6.2024.];287(18):3888-906. Dostupno na:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32446269/>
24. Ratcliffe PJ. Oxygen sensing and hypoxia signalling pathways in animals: the implications of physiology for cancer. *J Physiol* [Internet]. 2013 Apr 15 [citirano 23.6.2024.];591(8):2027-42. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23401619/>
25. Mallet RT, Burtscher J, Pialoux V, Pasha Q, Ahmad Y, Millet GP, et al. Molecular Mechanisms of High-Altitude Acclimatization. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Jan 15 [citirano 23.6.2024.]; 24(2):1698. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36675214/>
26. Saxena K, Jolly MK. Acute vs. Chronic vs. Cyclic Hypoxia: Their Differential Dynamics, Molecular Mechanisms, and Effects on Tumor Progression. *Biomolecules* [Internet]. 2019 Aug 3 [citirano 23.6.2024.];9(8):339. Dostupno na:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31382593/>
27. West JB. Physiological Effects of Chronic Hypoxia. *N Engl J Med* [Internet]. 2017 May 18 [citirano 23.6.2024.];376(20):1965-71. Dostupno na:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28514605/>
28. Korbecki J, Simińska D, Gąssowska-Dobrowolska M, Listos J, Gutowska I, Chlubek D, et al. Chronic and Cycling Hypoxia: Drivers of Cancer Chronic Inflammation through HIF-1 and NF- κ B Activation: A Review of the Molecular Mechanisms. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Oct 2 [citirano 23.6.2024.];22(19):10701. Dostupno na:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34639040/>

29. Navarrete-Opazo A, Mitchell GS. Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2014 Nov 15 [citirano 23.6.2024.];307(10):R1181-97. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25231353/>
30. Timon R, Martinez-Guardado I, Brocherie F. Effects of Intermittent Normobaric Hypoxia on Health-Related Outcomes in Healthy Older Adults: A Systematic Review. *Sports Med Open* [Internet]. 2023 Feb 26 [citirano 23.6.2024.];9(1):19. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36843041/>
31. Le QT, Courter D. Clinical biomarkers for hypoxia targeting. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2008 Sep [citirano 23.6.2024.];27(3):351-62. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18483785/>
32. Nanduri J, Vaddi DR, Khan SA, Wang N, Makerenko V, Prabhakar NR. Xanthine oxidase mediates hypoxia-inducible factor-2 α degradation by intermittent hypoxia. *PLoS One* [Internet]. 2013 [citirano 23.6.2024.];8(10):e75838. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24124516/>
33. Meneshian A, Bulkley GB. The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation* [Internet]. 2002 Jul [citirano 23.6.2024.];9(3):161-75. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12080414/>
34. González-Pacheco FR, Caramelo C, Castilla MA, Deudero JJ, Arias J, Yagüe S, et al. Mechanism of vascular smooth muscle cells activation by hydrogen peroxide: role of phospholipase C gamma. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2002 Mar [citirano 23.6.2024.];17(3):392-8. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11865083/>
35. Nanduri J, Vaddi DR, Khan SA, Wang N, Makarenko V, Semenza GL, et al. HIF-1 α activation by intermittent hypoxia requires NADPH oxidase stimulation by xanthine oxidase.

PLoS One [Internet]. 2015 [citirano 23.6.2024.];10(3):e0119762. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25751622/>

36. Yuan G, Nanduri J, Khan S, Semenza GL, Prabhakar NR. Induction of HIF-1 α expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. J Cell Physiol [Internet]. 2008 Dec [citirano 23.6.2024.];217(3):674-85. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18651560/>

37. Yuan G, Nanduri J, Bhasker CR, Semenza GL, Prabhakar NR. Ca²⁺/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia. J Biol Chem [Internet]. 2005 Feb 11 [citirano 23.6.2024.];280(6):4321-8. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15569687/>

38. Sunderram J, Androulakis IP. Molecular mechanisms of chronic intermittent hypoxia and hypertension. Crit Rev Biomed Eng [Internet]. 2012 [citirano 23.6.2024.];40(4):265-78. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23140119/>

39. Martinez CA, Jiramongkol Y, Bal N, Alwis I, Nedoboy PE, Farnham MMJ, et al. Intermittent hypoxia enhances the expression of hypoxia inducible factor HIF1A through histone demethylation. J Biol Chem [Internet]. 2022 Nov [citirano 23.6.2024.];298(11):102536. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36174675/>

40. Mallet RT, Manukhina EB, Ruelas SS, Caffrey JL, Downey HF. Cardioprotection by intermittent hypoxia conditioning: evidence, mechanisms, and therapeutic potential. Am J Physiol Heart Circ Physiol [Internet]. 2018 Aug 1 [citirano 23.6.2024.];315(2):H216-H232. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29652543/>

41. Li J, Xuan W, Yan R, Tropak MB, Jean-St-Michel E, Liang W, et al. Remote preconditioning provides potent cardioprotection via PI3K/Akt activation and is associated with nuclear accumulation of β -catenin. Clin Sci (Lond) [Internet]. 2011 May [citirano 23.6.2024.];120(10):451-62. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21143191/>

42. Hirayama Y, Ikeda-Matsuo Y, Notomi S, Enaida H, Kinouchi H, Koizumi S. Astrocyte-mediated ischemic tolerance. *J Neurosci* [Internet]. 2015 Mar 4 [citirano 23.6.2024.]; 35(9):3794-805. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25740510/>
43. Hirayama Y, Koizumi S. Hypoxia-independent mechanisms of HIF-1 α expression in astrocytes after ischemic preconditioning. *Glia* [Internet]. 2017 Mar [citirano 23.6.2024.]; 65(3):523-30. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28063215>
44. Lee JC, Park CW, Shin MC, Cho JH, Lee HA, Kim YM, et al. Tumor necrosis factor receptor 2 is required for ischemic preconditioning-mediated neuroprotection in the hippocampus following a subsequent longer transient cerebral ischemia. *Neurochem Int* [Internet]. 2018 Sep [citirano 23.6.2024.];118:292-303. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29777731>
45. Dong P, Li Q, Han H. HIF-1 α in cerebral ischemia (Review). *Mol Med Rep* [Internet]. 2022 Feb [citirano 23.6.2024.];25(2):41. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34878158/>
46. Chen S, Yin C, Lao T, Liang D, He D, Wang C, et al. AMPK-HDAC5 pathway facilitates nuclear accumulation of HIF-1 α and functional activation of HIF-1 by deacetylating Hsp70 in the cytosol. *Cell Cycle* [Internet]. 2015 Aug 3 [citirano 23.6.2024.];14(15):2520-36. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26061431/>
47. Kumar K, Singh N, Jaggi AS, Maslov L. Clinical Applicability of Conditioning Techniques in Ischemia-Reperfusion Injury: A Review of the Literature. *Curr Cardiol Rev* [Internet]. 2021 [citirano 23.6.2024.];17(3):306-18. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33109063/>
48. Galle AA, Jones NM. The neuroprotective actions of hypoxic preconditioning and postconditioning in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res*

[Internet]. 2013 Mar 1 [citirano 23.6.2024.];1498:1-8. Dostupno na:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23274537/>

49. Przyklenk K, Whittaker P. Remote ischemic preconditioning: current knowledge, unresolved questions, and future priorities. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* [Internet]. 2011 [citirano 23.6.2024.];16(3-4):255-9. Dostupno na:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21821525/>

50. Minoves M, Morand J, Perriot F, Chatard M, Gonthier B, Lemarié E, et al. An innovative intermittent hypoxia model for cell cultures allowing fast Po₂ oscillations with minimal gas consumption. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2017 Oct 1 [citirano 23.6.2024.];313(4):C460-C468. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28747336/>

51. Hunyor I, Cook KM. Models of intermittent hypoxia and obstructive sleep apnea: molecular pathways and their contribution to cancer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2018 Oct 1 [citirano 23.6.2024.];315(4):R669-R687. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29995459/>

52. Teo JD, Morris MJ, Jones NM. Hypoxic postconditioning reduces microglial activation, astrocyte and caspase activity, and inflammatory markers after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Pediatr Res* [Internet]. 2015 Jun [citirano 23.6.2024.];77(6):757-64. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25751571/>

53. McDonough A, Weinstein JR. The role of microglia in ischemic preconditioning. *Glia* [Internet]. 2020 Mar [citirano 23.6.2024.];68(3):455-71. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31386233/>

54. Taylor CT, Doherty G, Fallon PG, Cummins EP. Hypoxia-dependent regulation of inflammatory pathways in immune cells. *J Clin Invest* [Internet]. 2016 Oct 3 [citirano 23.6.2024.];126(10):3716-24. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27454299/>

55. Montgomery ST, Mall MA, Kicic A, Stick SM. Hypoxia and sterile inflammation in cystic fibrosis airways: mechanisms and potential therapies. *Eur Respir J* [Internet]. 2017 Jan [citirano 23.6.2024.];49(1):1600903. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28052955/>
56. Taylor CT, Colgan SP. Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2017 Dec [citirano 23.6.2024.];17(12):774-85. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28972206/>
57. Moynagh PN. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci* [Internet]. 2005 Oct 15 [citirano 23.6.2024.];118(Pt 20):4589-92. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16219681/>
58. Culver C, Sundqvist A, Mudie S, Melvin A, Xirodimas D, Rocha S. Mechanism of hypoxia-induced NF-kappaB. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2010 Oct [citirano 23.6.2024.];30(20):4901-21. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20696840/>
59. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2017 [citirano 23.6.2024.];2:17023-. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29158945/>
60. Toescu EC. Hypoxia sensing and pathways of cytosolic Ca²⁺ increases. *Cell Calcium* [Internet]. 2004 [citirano 23.6.2024.];36(3-4):187-99. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15261475/>
61. Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ. Activity of hypoxia-inducible factor 2alpha is regulated by association with the NF-kappaB essential modulator. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Apr 8 [citirano 23.6.2024.];280(14):14240-51. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15653678/>
62. D'Ignazio L, Batie M, Rocha S. Hypoxia and Inflammation in Cancer, Focus on HIF and NF-κB. *Biomedicines* [Internet]. 2017 May 9 [citirano 23.6.2024.];5(2):21. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28536364/>

63. Bandarra D, Rocha S. Tale of two transcription factors: NF- κ B and HIF crosstalk. *OA Molecular and Cell Biology* [Internet]. 2013 [citirano 23.6.2024.];1(1):1–7. Dostupno na: <https://discovery.dundee.ac.uk/en/publications/tale-of-two-transcription-factors-nf-%D0%BAAb-and-hif-crosstalk>
64. Mallikarjuna P, Zhou Y, Landström M. The Synergistic Cooperation between TGF- β and Hypoxia in Cancer and Fibrosis. *Biomolecules* [Internet]. 2022 Apr 25 [citirano 23.6.2024.];12(5):635. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35625561/>
65. Sun YW, Zhang LY, Gong SJ, Hu YY, Zhang JG, Xian XH, et al. The p38 MAPK/NF- κ B pathway mediates GLT-1 up-regulation during cerebral ischemic preconditioning-induced brain ischemic tolerance in rats. *Brain Res Bull* [Internet]. 2021 Oct [citirano 23.6.2024.];175:224-33. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34343641/>
66. Xuan YT, Tang XL, Banerjee S, Takano H, Li RC, Han H, et al. Nuclear factor-kappaB plays an essential role in the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Circ Res* [Internet]. 1999 May 14 [citirano 23.6.2024.]; 84(9):1095-109. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10325247/>
67. Liang W, Lin C, Yuan L, Chen L, Guo P, Li P, et al. Preactivation of Notch1 in remote ischemic preconditioning reduces cerebral ischemia-reperfusion injury through crosstalk with the NF- κ B pathway. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2019 Sep 16 [citirano 23.6.2024.]; 16(1):181. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31526384/>
68. Lv J, Yan W, Zhou J, Pei H, Zhao R. Per- and post-remote ischemic conditioning attenuates ischemic brain injury via inhibition of the TLR4/MyD88 signaling pathway in aged rats. *Exp Brain Res* [Internet]. 2021 Aug [citirano 23.6.2024.];239(8):2561-7. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34185099/>
69. Scholz CC, Cavadas MA, Tambuwala MM, Hams E, Rodríguez J, von Kriegsheim A, et al. Regulation of IL-1 β -induced NF- κ B by hydroxylases links key hypoxic and inflammatory

- signaling pathways. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2013 Nov 12 [citirano 23.6.2024.];110(46):18490-5. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24145445/>
70. Baranova K, Nalivaeva N, Rybnikova E. Neuroadaptive Biochemical Mechanisms of Remote Ischemic Conditioning. Int J Mol Sci [Internet]. 2023 Dec 1 [citirano 23.6.2024.];24(23):17032. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38069355/>
71. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. Int J Mol Sci [Internet]. 2019 Jul 6 [citirano 23.6.2024.]; 20(13):3328. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31284572/>
72. Coimbra-Costa D, Garzón F, Alva N, Pinto TCC, Aguado F, Torrella JR, et al. Intermittent Hypobaric Hypoxic Preconditioning Provides Neuroprotection by Increasing Antioxidant Activity, Erythropoietin Expression and Preventing Apoptosis and Astrogliosis in the Brain of Adult Rats Exposed to Acute Severe Hypoxia. Int J Mol Sci [Internet]. 2021 May 17 [citirano 23.6.2024.];22(10):5272. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34067817/>
73. Yin X, Wang X, Fan Z, Peng C, Ren Z, Huang L, et al. Hyperbaric Oxygen Preconditioning Attenuates Myocardium Ischemia-Reperfusion Injury Through Upregulation of Heme Oxygenase 1 Expression: PI3K/Akt/Nrf2 Pathway Involved. J Cardiovasc Pharmacol Ther [Internet]. 2015 Jul [citirano 23.6.2024.];20(4):428-38. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25604781/>
74. Immenschuh S, Vijayan V, Janciauskiene S, Gueler F. Heme as a Target for Therapeutic Interventions. Front Pharmacol [Internet]. 2017 [citirano 23.6.2024.];8:146. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28420988/>
75. Kishimoto Y, Kondo K, Momiyama Y. The Protective Role of Heme Oxygenase-1 in Atherosclerotic Diseases. Int J Mol Sci [Internet]. 2019 Jul 24 [citirano 23.6.2024.];20(15):3628. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31344980/>

76. Peng B, Guo QL, He ZJ, Ye Z, Yuan YJ, Wang N, et al. Remote ischemic postconditioning protects the brain from global cerebral ischemia/reperfusion injury by up-regulating endothelial nitric oxide synthase through the PI3K/Akt pathway. *Brain Res* [Internet]. 2012 Mar 22 [citirano 23.6.2024.];1445:92-102. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22325092/>
77. Kurhaluk N. The Effectiveness of L-arginine in Clinical Conditions Associated with Hypoxia. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 May 3 [citirano 23.6.2024.];24(9):8205. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37175912/>
78. Varghese T, Dasgupta S, Anand G, Rejish Kumar VJ, Sahu NP, Pal AK, et al. Dietary arginine attenuates hypoxia- induced HIF expression, metabolic responses and oxidative stress in Indian Major Carp, *Cirrhinus mrigala*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* [Internet]. 2022 [citirano 23.6.2024.];259:110714. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35026416/>
79. Zhou J, Kim DD, Peluffo RD. Nitric oxide can acutely modulate its biosynthesis through a negative feedback mechanism on L-arginine transport in cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2010 Aug [citirano 23.6.2024.];299(2):C230-9. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20505044/>
80. Kierans SJ, Taylor CT. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *J Physiol* [Internet]. 2021 Jan [citirano 23.6.2024.];599(1):23-37. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33006160/>
81. Semenza GL. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2009 Feb [citirano 23.6.2024.];19(1):12-6 Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19114105/>

82. Haddad A, Mohiuddin SS. Biochemistry, Citric Acid Cycle. StatPearls Publishing [Internet]; Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [ažurirano 1.5.2023.; citirano 23.6.2024.]. Dostupno na: <https://ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541072/>
83. Cooper GM, Hausman RE. STANICA- Molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
84. Mylonis I, Simos G, Paraskeva E. Hypoxia-Inducible Factors and the Regulation of Lipid Metabolism. Cells. 2019 Mar 3 [citirano 23.6.2024.];8(3):214. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30832409/>
85. Tregub PP, Kulikov VP, Ibrahimli I, Tregub OF, Volodkin AV, Ignatyuk MA, et al. Molecular Mechanisms of Neuroprotection after the Intermittent Exposures of Hypercapnic Hypoxia. Int J Mol Sci [Internet]. 2024 Mar 25 [citirano 23.6.2024.];25(7):3665. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38612476/>
86. Li S, Hafeez A, Noorulla F, Geng X, Shao G, Ren C, et al. Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to ischemia. Prog Neurobiol [Internet]. 2017 Oct [citirano 23.6.2024.];157:79-91. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28110083/>
87. Liang J, Han R, Zhou B. Metabolic Reprogramming: Strategy for Ischemic Stroke Treatment by Ischemic Preconditioning. Biology (Basel) [Internet]. 2021 May 11 [citirano 23.6.2024.];10(5):424. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34064579/>
88. Geng J, Zhang Y, Li S, Li S, Wang J, Wang H, et al. Metabolomic Profiling Reveals That Reprogramming of Cerebral Glucose Metabolism Is Involved in Ischemic Preconditioning-Induced Neuroprotection in a Rodent Model of Ischemic Stroke. J Proteome Res [Internet]. 2019 Jan 4 [citirano 23.6.2024.];18(1):57-68. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30362349/>

89. Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2001 Apr [citirano 23.6.2024.];13(2):167-71. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11248550/>
90. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. *Mol Cells* [Internet]. 2010 May [citirano 23.6.2024.];29(5):435-42. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20396958/>
91. Yang SL, Wu C, Xiong ZF, Fang X. Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review). *Mol Med Rep* [Internet]. 2015 Aug [citirano 23.6.2024.];12(2):2411-6. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25936862/>
92. Tekin D, Dursun AD, Xi L. Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and cardioprotection. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2010 Sep [citirano 23.6.2024.];31(9):1085-94. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20711226/>
93. Martin C, Yu AY, Jiang BH, Davis L, Kimberly D, Hohimer AR, et al. Cardiac hypertrophy in chronically anemic fetal sheep: Increased vascularization is associated with increased myocardial expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1998 Mar [citirano 23.6.2024.];178(3):527-34. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9539521/>
94. Martin-Puig S, Tello D, Aragonés J. Novel perspectives on the PHD-HIF oxygen sensing pathway in cardioprotection mediated by IPC and RIPC. *Front Physiol* [Internet]. 2015 [citirano 23.6.2024.];6:137. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26042040/>
95. Halligan DN, Murphy SJ, Taylor CT. The hypoxia-inducible factor (HIF) couples immunity with metabolism. *Semin Immunol* [Internet]. 2016 Oct [citirano 23.6.2024.];28(5):469-77. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27717536/>

96. Zhang L, Zhou X, Zhao J, Wang X. Research hotspots and frontiers of preconditioning in cerebral ischemia: A bibliometric analysis. *Heliyon* [Internet]. 2024 Feb 15 [citirano 23.6.2024.];10(3):e24757. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38317957/>

Slikovni prikazi:

Slika 1. Martinez CA, Kerr B, Jin C, Cistulli PA, Cook KM. Obstructive Sleep Apnea Activates HIF-1 in a Hypoxia Dose-Dependent Manner in HCT116 Colorectal Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Jan 21 [citirano 23.6.2024.];20(2):445. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30669593/>

Slika 2. Liao C, Zhang Q. Understanding the Oxygen-Sensing Pathway and Its Therapeutic Implications in Diseases. *Am J Pathol* [Internet]. 2020 Aug [citirano 23.6.2024.];190(8):1584-95. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32339495/>

Slika 3. Munir F, Islam N, Hassan Nasir M, Anis Z, Bano S, Naeem S, et al. Impact of Hypoxia on Astrocyte Induced Pathogenesis. U: Heinbockel T. *Neurophysiology - Networks, Plasticity, Pathophysiology and Behavior*. IntechOpen [Internet]; 2022. [ažurirani 4.7.2022.; citirano 23.6.2024.] Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.106263>

Slika 4. Tekin D, Dursun AD, Xi L. Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and cardioprotection. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2010 Sep [citirano 23.6.2024.];31(9):1085-94. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20711226/>

Slika 6. Ghirelli EA, Silva FPGD, Oricil AGG, Paula CBV, Nagashima S, Oldenburg Neto CF, et al. Role of the NF-kB/parkin/vegfr-1 pathway associated with hypoxic-ischemic insult in germinal matrix samples of newborn infants. *Rev Paul Pediatr* [Internet]. 2023 [citirano 23.6.2024.]; 41:e2022034. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37132761/>

9. ŽIVOTOPIS

Alen Šarić rođen je 1. rujna 1999. godine u Požegi gdje je pohađao osnovu školu, a nakon toga prirodoslovno-matematičku gimnaziju Požega. Nakon završetka srednjoškolskog obrazovanja 2018. godine upisuje integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij medicine na Medicinskom fakultetu u Rijeci. Uz redovito obavljanje obveznih dužnosti i zadaća vezanih uz studij, bavio se s drugim izvannastavnim aktivnostima. U sklopu toga obnašao je pet godina dužnost demonstratora na Zavodu za anatomiju, dvije godine je bio predsjednik organizacijskog odbora projekta Tjedan mozga Rijeka te je osnivač i predsjednik Studentske sekcije za neurokirurgiju. Sudjelovao je na brojnim studentskim i znanstvenim kongresima, od kojih 11 pasivno i 3 aktivno za što je dobio nagradu za najbolju oralnu prezentaciju 2022. na 6. Kongresu Hitne medicine i 2023. na 12. Studentskom kongresu Neuroznanosti s internacionalnim sudjelovanjem te nagradu za jedan od tri najbolja sažetka na istom kongresu. Uz volontiranje na Klinici za neurokirurgiju KBC-a Rijeka tijekom srpnja i kolovoza 2021. godine, sudjelovao je na međunarodnim razmjenama, pa je tako 2022. godine proveo više od 2 mjeseca u Njemačkoj na Erasmus praksi te 2023. 30 dana na Hyogo University of Medicine u Japanu u sklopu bilateralnog ugovora.