

# Utjecaj hiperbarične oksigenacije na ulogu TRP ionskih kanala u mehanizmima vaskularne reaktivnosti kod zdravih Spargue-Dawley štakora

---

Marković, Patricija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:409492>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-19**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Patricija Marković**

**UTJECAJ HIPERBARIČNE**  
**OKSIGENACIJE NA ULOGU TRP**  
**IONSkih KANALA U MEHANIZMIMA**  
**VASKULARNE REAKTIVNOSTI KOD**  
**ZDRAVIH SPRAGUE-DAWLEY**  
**ŠTAKORA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**



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

**Patricija Marković**

**UTJECAJ HIPERBARIČNE**  
**OKSIGENACIJE NA ULOGU TRP**  
**IONSКИH KANALA U MEHANIZMIMA**  
**VASKULARNE REAKTIVNOSTI KOD**  
**ZDRAVIH SPRAGUE-DAWLEY**  
**ŠTAKORA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

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

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

Rad ima 30 listova i 7 slika.

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Ivani Jukić, dr. med., na iznimnoj pomoći, utrošenom vremenu i udijeljenim savjetima. Zahvaljujući njezinom razumijevanju i strpljenju te konstantnoj potpori obitelji i prijatelja, još je jedno poglavlje školovanja u mome životu uspješno završeno.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Kisik i njegova reaktivnost .....	1
1.2. Izloženost hiperbaričnoj oksigenaciji .....	2
1.3. Endotel i čimbenici relaksacije endotela .....	3
1.4. Mehanizam protokom potaknute dilatacije .....	4
1.5. O endotelu-ovisna hiperpolarizacija i kalcij-ovisna signalizacija .....	5
1.6. Uloga TRP ionskih kanala u vazodilataciji .....	6
2. HIPOTEZA .....	9
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	10
4. MATERIJALI I METODE .....	11
4.1. Eksperimentalni životinjski model .....	11
4.2. Protokoli za izlaganje hiperbaričnom kisiku .....	11
4.3. Priprema središnje moždane arterije.....	12
4.4. Određivanje protokom potaknute dilatacije i aktivnosti TRP ionskih kanala .....	13
4.5. Statističke metode.....	15
5. REZULTATI.....	16
5.1. Odgovor središnje moždane arterije kontrolne skupine na primjenu antagonista i agonista TRPV4 kanala.....	16
5.2. Odgovor središnje moždane arterije eksperimentalne skupine podvrgnute akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji nakon primjene agonista TRPV4 kanala.....	17
5.3. Odgovor središnje moždane arterije eksperimentalne skupine podvrgnute četverodnevnom izlaganju hiperbaričnoj oksigenaciji nakon primjene antagonista TRPV4 kanala.....	18
6. RASPRAVA.....	20
7. ZAKLJUČCI.....	22
8. SAŽETAK.....	23
9. SUMMARY .....	24
10. LITERATURA.....	26
11. ŽIVOTOPIS .....	30

## POPIS KRATICA

**TRP kanal** – kanalni receptor prolaznog potencijala (engl. *transient potential receptor channel, TRP channel*)

**TRPC kanal** – kanonski kanalni receptor prolaznog potencijala (engl. *canonical TRP channel*)

**TRPV kanal** – vaniloidni kanalni receptor prolaznog potencijala (engl. *vanilloid TRP channel*)

**TRPM kanal** – melastatinski kanalni receptor prolaznog potencijala (engl. *melastatin TRP channel*)

**TRPA kanal** – ankirinski kanalni receptor prolaznog potencijala (engl. *ankyrin TRP channel*)

**TRPML kanal** – mukolipidni kanalni receptor prolaznog potencijala (engl. *mucoipin TRP channel*)

**TRPP kanal** – policistinski kanalni receptor prolaznog potencijala (engl. *polycystin TRP channel*)

**ROS** – slobodni kisikovi radikali (engl. *reactive oxygen species*)

**RNS** – reaktivni dušikovi spojevi (engl. *reactive nitrogen species*)

**HBO<sub>2</sub>** – hiperbarična oksigenacija

**HBOT** – terapija hiperbaričnim kisikom (engl. *hyperbaric oxygen therapy*)

**SD štakori** – Sprague-Dawley štakori

**pCO<sub>2</sub>** – parcijalni tlak ugljikovog dioksida

**pO<sub>2</sub>** – parcijalni tlak kisika

**NO** – dušikov oksid (engl. *nitric oxide*)

**NOS** – dušik-oksida sintaza (engl. *nitric-oxide synthase*)

**eNOS** – endotelna dušik-oksida sintaza

**iNOS** – inducibilna dušik-oksida sintaza

**nNOS** – neuronalna dušik-oksida sintaza

**EDRF** – endotelni čimbenici relaksacije (engl. *endothelium-derived relaxing factors*)

**EDHF** – endotelni hiperpolarizirajući čimbenik (engl. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*)

**EDCF** – endotelni čimbenici kontrakcije (engl. *endothelium-derived contraction factors*)

**EET** – epoksieikozatrienoična kiselina (engl. *epoxyeicosatrienoic acid*)

**OONO<sup>-</sup>** – peroksinitrit

**FID** – protokom potaknuta dilatacija (engl. *flow-induced dilation*)



**EDH** – hiperpolarizacija ovisna o endotelu (engl. *endothelium-dependent hyperpolarization*)

**Ca<sup>2+</sup>** – kalcij

**K<sup>+</sup>** – kalij

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** – intracelularni ionizirani kalcij

**SK<sub>Ca</sub>** – mali kalijevi kanali koji provode kalcij

**IK<sub>Ca</sub>** – intermedijarni kalijevi kanali koji provode kalcij

**K<sub>Ca</sub>** – o kalciju ovisni kalijevi kanali

**K<sub>IR</sub>** – unutarnji ispravljajući kalijev kanal (engl. *inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels*)

**PGI<sub>2</sub>** – prostaglandin I<sub>2</sub> (prostaciklin)

**IP receptor** – receptor za prostaciklin

**4α-PDD** – 4α-forbol didekanoat (engl. *4α-phorbol didecanoate*)

**RT-PCR** – lančana reakcija polimeraze pomoću reverzne transkriptaze (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*)

**WT** – divlji tip, nemutirani (engl. *wild-type*)

**CTRL skupina** – kontrolna skupina štakora

**A-HBOT skupina** – skupina štakora podvrgnuta djelovanju akutne hiperbarične oksigenacije

**4D-HBOT skupina** – skupina štakora podvrgnuta djelovanju četverodnevne (intermitentne) hiperbarične oksigenacije

**PSS otopina** – fiziološka slana otopina (engl. *physiological salt solution*,)

**MCA** – središnja moždana arterija (engl. *middle cerebral artery*)

## 1. UVOD

### 1.1. Kisik i njegova reaktivnost

Usljed povećanog djelovanja fotosinteze cijanobakterija, prije otprilike 2,5 milijardi godina, došlo je do povećane koncentracije molekularnog kisika ( $O_2$ ) u atmosferi. Takav je proces doveo do razvoja aerobnog disanja te, shodno tome, složenih eukariotskih organizama (1). Kisik je ključni element koji sudjeluje u provođenju metaboličke reakcije, poput sinteze i razgradnje metabolita u aerobnim organizmima. Upravo zbog svoje dvojne uloge u životnim procesima, može djelovati kao održivi i razarajući faktor. Molekularni kisik sadrži dva nesparena elektrona i stoga se može reducirati, odnosno može primiti elektrone (2). Primanje elektrona, to jest popunjavanje vanjskih orbitala s nesparenim elektronom, odvija se prilikom stupanja u reakcije s proteinima, lipidima, ugljikohidratima te se na taj način oštećuju navedene strukture i ujedno nastaju slobodni radikali. Oni predstavljaju kemijski nestabilne i silno reaktivne spojeve, od kojih su najznačajniji slobodni kisikovi radikali (ROS). Skupini slobodnih kisikovih radikala pripadaju hidroperoksilni, superoksidni te hidroksilni radikal, kao i vodikov peroksid, hipoklorit i dušikov oksid koji se smatraju neradikalima (3).

Na niskim do umjerenim koncentracijama, ROS i RNS (reaktivni dušikovi spojevi) djeluju stimulatивно na stanične odgovore i imunološku funkciju. Oni su neophodni za staničnu signalizaciju i sazrijevanje staničnih struktura, staničnu homeostazu, održavanje arhitekture tkiva i funkcionalni integritet stanice. S druge strane, kada su prisutni u visokim koncentracijama, dolazi do stvaranja oksidativnog stresa (4). On je rezultat gomilanja molekula koje su oštećene utjecajem radikala, nedostatne proizvodnje antioksidansa ili prekomjerne proizvodnje tvari koje pridonose oksidaciji (5). Oksidativni stres igra važnu ulogu u razvitku kroničnih i degenerativnih bolesti, poput: raka, artritisa, starenja, autoimunih poremećaja, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti. Također, studije su dokazale kako razvoj obaju tipova dijabetesa u podlozi krije fenomen oksidativnog stresa, u smislu da njegova prisutnost ometa unos glukoze u masno tkivo i mišiće i dovodi do smanjenog lučenja hormona inzulina iz  $\beta$ -stanica gušterače. Nadalje, dokazano je i da je oksidativni stres „kamen temeljac“ visokom krvnom tlaku i aterosklerozi (5, 6).

Ljudsko je tijelo, kao odgovor na takvo stanje, razvilo biološki mehanizam za suzbijanje oksidativnog stresa, a to je stvaranje antioksidansa koji se spontano proizvode u organizmu ili se unose putem hrane i dodataka prehrani. Antioksidans jest tvar koja može spriječiti, smanjiti ili popraviti oksidativna oštećenja ciljane makromolekule te je sposobna ukloniti ili neutralizirati ROS/RNS i njihove posrednike. Te tvari u svojoj strukturi imaju jedan elektron

viška koji im daje sposobnost sparivanja s elektronom vanjske orbitale slobodnog radikala, što posljedično dovodi do njegove neutralizacije (4). Postoji nekoliko vrsta antioksidansa - stanični (superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, katalaza, askorbinska kiselina), izvanstanični (transferin, ceruloplazmin, haptoglobin, itd.) i membranski ( $\alpha$  i  $\beta$ -tokoferol). Takva ciljana raspodjela antioksidansa štiti svaku strukturu organizma.

### **1.2. Izloženost hiperbaričnoj oksigenaciji**

Hiperbarična oksigenacija ( $\text{HBO}_2$ ) podrazumijeva svaku medicinsku i eksperimentalnu primjenu čistog (100 %-tnog) kisika pri tlaku većem od atmosferskog tlaka. Terapija hiperbaričnom oksigenacijom (HBOT) koristi se za brojne klasične indikacije, a neke od njih su: plinska gangrena, dekompresijska bolest, trovanje ugljikovim monoksidom i sl. Nadalje, posljednjih se godina pokazalo da  $\text{HBO}_2$  blagotvorno djeluje u raznim stanjima s vaskularnom patologijom (7). Najdojmljiviji učinak hiperbarične oksigenacije odnosi se na liječenje ishemijskih ulceracija kod pacijenata koji boluju od dijabetesa, ali postoje i studije koje govore o poboljšanju neurološkog stanja nakon moždanog udara, o oporavku od infarkta miokarda, akutne periferne ishemije te o smanjenju aterosklerotskih plakova na žilama (8, 9).

Kako je kisik visoko reaktivna molekula, pri visokim parcijalnim tlakovima koji se primjenjuju prilikom terapije hiperbaričnom oksigenacijom, može doprinijeti povećanom stvaranju slobodnih kisikovih radikala i utjecati na hemodinamiku organizma i krvožilnu funkciju (10). Vrlo ozbiljno stanje do kojega može doći zbog  $\text{HBO}_2$  jest akutno trovanje kisikom koje je praćeno konvulzijama i komom. Rizik od takvog stanja povećava se s većim tlakovima kisika, a pogotovo s onima iznad 4 atmosfere. Takvo je akutno stanje obilježeno i simptomima poput mučnine, vrtoglavice, trzanja mišića, poremećaja vida, dezorijentacije i sl. S druge strane, kod kroničnog trovanja kisikom, do kojeg može doći i nakon 12 sati izloženosti kisiku od 1 atmosfere, razvijaju se simptomi začepjenja dišnog sustava, plućni edem i atelektaza (11).

Međutim, novija istraživanja govore o tome kako pitanje hoće li slobodni kisikovi radikali biti proizvedeni, ovisi o hiperbaričnom protokolu koji se primjenjuje prilikom terapije. Mihaljević i suradnici u svome su istraživanju došli do zaključka da terapija akutnom hiperbaričnom oksigenacijom narušava vazorelaksaciju ovisnu o endotelu te da je takav narušeni odgovor obnovljen uz pomoć uklanjanja superoksida. Također, doznajemo da je proizvodnja superoksida bila povećana kod tretmana akutnom hiperbaričnom oksigenacijom, ali kod intermitentnog izlaganja nije bilo nikakve promjene u vrijednostima istih. Ekspresija antioksidativnih enzima, kao što je i iNOS (inducibilna dušik-oxid sintaza), bila je povišena

kod intermitentne terapije hiperbaričnom oksigenacijom i, zbog tog povećanog antioksidativnog kapaciteta, intermitentna primjena HBO<sub>2</sub> pokazala je blagotvoran efekt i očuvanje vaskularne relaksacije (10).

### **1.3. Endotel i čimbenici relaksacije endotela**

Endotel predstavlja monosloj stanica koji pokriva unutarnju površinu krvnih žila, čija je ukupna površina kod ljudi procijenjena na oko 350 m<sup>2</sup>. Dinamični je organ koji služi kao funkcionalna i strukturna barijera između krvi i stijenki krvnih žila, a ujedno ima širok spektar uloga u kontroli vaskularne reaktivnosti (12). Jedna od glavnih uloga endotela jest propusnost, odnosno kontrola prijenosa otopljenih tvari i makromolekula iz krvi putem stijenki krvnih žila u organe i prienos istih iz organa u krv. Dvije vrste propusnosti krvnih žila koje razlikujemo jesu bazalna i inducirana propusnost. Bazalna se očituje na razini kapilara, koje je glavno mjesto izmjene tvari u krvožilnom sloju, a inducirana je propusnost povezana s upalom i odnosi se na postkapilarne venule (13).

Stanice koje čine endotel, endotelne stanice, glavni su regulator vaskularne homeostaze zbog njihove interakcije s cirkulirajućim stanicama iz krvi i onim stanicama koje se nalaze u vaskularnoj stijenci, a to su uglavnom stanice glatkog mišićja. One upravljaju protokom krvi, kontroliraju propusnost komponenti plazme i utječu na adheziju i agregaciju trombocita i leukocita (12). Osim navedenoga, one mogu biti aktivatori brojnih čimbenika koji održavaju ravnotežu između vazodilatacije i vazokonstrikcije, kao što su amini, nukleotidi, lipoproteini, polipeptidni hormoni, razgradni produkti arahidonske kiseline i reaktivni kisikovi spojevi (14). Endotelne stanice posjeduju sposobnost sinteze i lučenja velikog spektra tvari koje sprječavaju nastanak ateroskleroze, od kojih je najvažniji dušikov oksid (NO).

Nerazmjer u proizvodnji kontrakcijskih i relaksacijskih čimbenika te čimbenika koji sudjeluju u koagulaciji krvi, posljedica su oscilacija u regulatornim funkcijama endotela i ujedno uzrok njegovog oštećenja (15). Takav se gubitak fiziološke funkcije endotela naziva „disfunkcija endotela“. Navedeno je stanje obilježeno smanjenjem biorasploživosti NO-a zbog smanjene proizvodnje tog spoja prilikom smanjene aktivnosti dušik-oksida sintaze (NOS) i/ili zbog ubrzanog stvaranja ROS-a. Glavne karakteristike takvog promijenjenog stanja endotela jesu: smanjena vazodilatacija, protrombotička i proupalna stanja (16). Zbog toga nam poremećaj endotelne funkcije može ukazati na brojna kardiovaskularna i metabolička oboljenja, kao što su: srčana kongestija, dijabetes, arterijska hipertenzija te je ustanovljeno i da se javlja zajedno sa starenjem organizma i kao posljedica primjene kemoterapeutika i onečišćenog okoliša (17).

Mnogi endotelni čimbenici relaksacije (EDRF) posljednjih su godina kemijski okarakterizirani i zaključeno je da se većina otpušta kao odgovor na povećanu koncentraciju unutarstaničnog kalcija. Neki od njih jesu: dušikov oksid, prostaciklin, endotelni hiperpolarizirajući čimbenik (EDHF), epoksieiokozatrienoična kiselina (EET) te vodikov peroksid. S druge strane, endotelni čimbenici kontrakcije (EDCF) jesu: endotelin-1, tromboksan A<sub>2</sub>, isoprostani, superoksidni anion i angiotenzin II (17, 19). Navedene dvije skupine endotelnih medijatora zajedno djeluju ne samo na procese važne za angiogenezu, nego i na procese kojima se obnavljaju oštećenja endotelne sluznice stijenki krvnih žila (18). Od nabrojanih EDRF, najznačajniji su: dušikov oksid, prostaciklin i EDHF.

Dušik-oksida sintaza (NOS) jest enzim odgovoran za sintezu NO-a na način da pretvara aminokiselinu L-arginin i kisik u NO i L-citrulin (19). Postoje tri izoforme navedenog enzima: eNOS, nNOS i iNOS, a eNOS je izoforma koja je najviše izražena u endotelnim stanicama (16). Izoformen NOS i eNOS sveprisutni su enzimi u stanicama gdje trebaju neprestano proizvoditi NO, ali u vrlo malim vrijednostima. Podražaj koji djeluje kao stimulans brzom proizvodnji NO-a je povećana koncentracija ioniziranog kalcija unutar stanice (20). U fiziološkim uvjetima endotelna stimulacija utječe na stvaranje i oslobađanje NO-a koji do okolnih tkiva i stanica dopire difuzijom i na taj način djeluje kao zaštitni čimbenik kardiovaskularnog sustava. To čini na način da opušta stanice glatkog mišićja, sprječava adheriranje leukocita i trombocita, proliferaciju mišićnih stanica te agregiranje i stvaranje adhezijskih molekula (21). Budući da se NO biosintetizira unutar stanica, on može reagirati s nekoliko vrsta molekula unutar ili izvan nje. Njegov poluživot u krvi nakon formiranja jako je kratak i to zahvaljujući superoksidnom anionu koji ima izrazito visok afinitet za njega. Poznato je da je superoksidni anion slobodni kisikov radikal, koji u vanjskoj ljusci posjeduje nesparene elektrone koji, u ovom slučaju, imaju visoki afinitet za dušikov oksid, što posljedično dovodi do smanjenja biodostupnosti NO-a i stvaranja reaktivnih dušikovitih spojeva. Peroksinitrit (OONO-) najčešći je RNS koji nastaje tim procesom, a odgovoran je za apoptozu potaknutu peroksinitritom koja je okidač za nastanak stanja poput bakterijskih infekcija te brojnih neurodegenerativnih bolesti, a smatra se i da djeluje kao pokretač procesa koji dovode do dijabetesa tipa II (22).

#### **1.4. Mehanizam protokom potaknute dilatacije**

Protokom potaknuta dilatacija (FID) jest o endotelu ovisni mehanizam koji je važan za osiguravanje homeostaze krvožilja i perfuzije tkiva (23). Prilikom strujanja krvi, dolazi do povećanja smicanja koje stimulira otpuštanje endotelnih vazoaktivnih tvari, kao što su NO, prostaciklini te EDHF (16). Kako je već navedeno u prethodnom tekstu, određena su

istraživanja dokazala da upravo NO ima najvažniju ulogu prilikom održavanja dilatacije krvnih žila, no povećani oksidativni stres može smanjiti razinu NO-a kojom organizam raspolaže i na taj način narušiti razinu protokom potaknute dilatacije (24). Značajno smanjenje biodostupnosti NO-a potiče endotel na aktivaciju kompenzatornih fizioloških putova te se, u takvom slučaju, o endotelu ovisna dilatacija koja je narušena, uspije održati zbog proizvodnje i oslobađanja vazodilatatora, poput prostanoida ( $\text{PGI}_2$ ) i ostalih endotel hiperpolarizirajućih faktora (EDHFs) (16).

Budući da je protokom potaknuta dilatacija u uzajamnom odnosu s funkcijom endotela, smanjeni odgovor protoka u žilama odražava oštećenje funkcije endotelne stanice koje se pogoršava zajedno s godinama. Također, signalizacija unutarstaničnim ioniziranim kalcijem ključna je za funkciju endotelne stanice i dilataciju žila. Povećanje njegove koncentracije izaziva sintezu i otpuštanje endotelne vazodilatatora iz stanice koje zatim djeluju na glatku muskulaturu dovodeći do dilatacije krvožilja (25).

U završnom radu rađenom u sklopu Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek, u kojem se istraživao utjecaj hiperbarične oksigenacije na protokom potaknutu dilataciju kod zdravih SD štakora, navedena su saznanja da akutno izlaganje  $\text{HBO}_2$  značajno smanjuje protokom potaknutu dilataciju (26). Istraživanja koja su prethodno provedena ustvrdila su da takvo izlaganje  $\text{HBO}_2$  dovodi do povećane razine oksidativnog stresa (10), a upravo je on uzrok narušenoj protokom potaknutoj dilataciji. Nadalje, ispitujući endotelnu ulogu u mehanizmu FID-a, primjenom acetilkolina (koji djeluje na vazodilataciju endotelnim putem) i natrijevog nitroprusida (koji djeluje na vazodilataciju neovisno o endotelu, izravno donirajući NO), dokazana je bitna razlika u dilataciji nakon primjene acetilkolina, a koja nije postignuta primjenom natrijevog nitroprusida, što govori o važnosti endotela u tom mehanizmu (26). Ranije studije koje su također istraživale stanja koja karakterizira stvaranje oksidativnog stresa (npr. visokosлана dijeta), došle su do zaključka kako povećana razina oksidativnog stresa ima značajnu ulogu na krvožilnu funkciju i smanjenje vaskularnog odgovora (23).

### **1.5. O endotelu-ovisna hiperpolarizacija i kalcij-ovisna signalizacija**

Istraživanjima je utvrđeno kako o endotelu ovisni hiperpolarizirajući faktor (EDHF) ima jak vazodilatatorni utjecaj u arterijama malog otpora i stoga se pokazao i kao važan modulator krvnog tlaka i protoka. Kao što ime upućuje, prvenstveno se mislilo da EDHF predstavlja difuzni čimbenik koji potiče hiperpolarizaciju glatkih mišića. Međutim, dokazano je da EDHF može djelovati paralelno sa širenjem hiperpolarizacijske struje iz endotelne stanice u glatke

mišiće krvnih žila. Takav se put hiperpolarizacije naziva hiperpolarizacija ovisna o endotelu (EDH). Do njezine aktivacije dolazi kada dođe do povećane koncentracije endotelnog intracelularnog kalcija ( $[Ca^{2+}]_i$ ) koji potiče rad dvaju kalijevih kanala osjetljivih na kalcij –  $SK_{Ca}$  (mali kalijevi kanali koji provode kalcij) i  $IK_{Ca}$  (intermedijarni kalijevi kanali koji provode kalcij). Te kanale možemo pronaći u endotelnim mikrodomenama, a posebno unutar izbočenja prema susjednom glatkom mišićju, u kojemu su gusto raspoređeni  $IK_{Ca}$  kanali koji su blizu interendotelnih uskih konektora (eng. *gap junctions*) gdje prevladaju  $SK_{Ca}$  kanali. Aktiviranjem o kalciju ovisnih kalijevih kanala ( $K_{Ca}$ ) dolazi do hiperpolarizacije endotelnih stanica, a protok kalijevih iona ( $K^+$ ) kroz iste može djelovati kao difuzni čimbenik na način da  $K^+$  ioni stimuliraju  $Na^+/K^+$ -ATPazu glatkih mišića krvnih žila i  $K_{IR}$  (unutarnji ispravljajući kalijev kanal). Paralelno s tim, hiperpolarizirajući se impuls širi od endotela do glatkog mišića kroz spojeve mioendotelnih uskih konektora smještenih na izbočenjima endotelnih stanica (27). Kanalni receptori prolaznog potencijala (TRP kanali, eng. *transient receptor potential channels*), koji su propusni za katione, dozvoljavaju ulazak ionima kalcija u stanicu i upravo se za njih pokazalo da potiču EDH-posredovanu vazodilataciju u malim arterijama (28).

Prostaciklin ( $PGI_2$ ) jest vazoaktivna molekula i ujedno jedan je od glavnih metabolita arahidonske kiseline dobivene uz posredovanje ciklooksigenaze. Aktivacijom IP receptora glatkog mišićja,  $PGI_2$  dovodi do opuštanja krvnih žila. U nekim slučajevima, prostaciklin uzrokuje hiperpolarizaciju arterije otvarajući jedan ili nekoliko vrsta kalijevih kanala. Shodno tome, relaksacija potaknuta  $PGI_2$  može biti posljedica aktivacije kalijevih kanala aktiviranih naponom, kalijevih kanala ovisnih o kalciju i ATP-kontroliranih kalijevih kanala (16).

### **1.6. Uloga TRP ionskih kanala u vazodilataciji**

U posljednja dva desetljeća otkriće i proučavanje kanalnih receptora prolaznog potencijala (TRP kanali) nove superobitelji  $Ca^{2+}$  propusnih kationskih kanala, omogućilo je uvid u nove mehanizme ulaska kalijevih iona u endotelne i ostale nepobudljive vrste stanica. Takvi su TRP kanali uključeni u različite endotelne funkcije, kao što su kontrola vaskularnog tonusa i vaskularne permeabilnosti, odgovaranje na mehaničke podražaje i slično (29).

Genom sisavaca kodira 28 različitih članova iz TRP superobitelji, a na temelju homologije slijeda aminokiselina, TRP kanali grupirani su u šest podvrsta – kanonski (TRPC), vaniloidni (TRPV), melastatinski (TRPM), ankirinski (TRPA), mukolipinski (TRPML) i policistinski (TRPP). Oni fiziološki održavaju kontrolu nad membranskim potencijalom te reguliraju signaliziranje ioniziranim kalcijem ( $Ca^{2+}$ ) u endotelnim stanicama i stanicama glatkih mišića

krvnih žila (30). Kod sisavaca je do danas identificirano više od 20 TRP kanala i većina njih, osim podvrste TRPML, mogu se pronaći u endotelnim stanicama krvožilja. Ustanovljeno je da se ekspresija TRP kanala razlikuje između vrsta organizama i između vaskularnih sustava unutar organizma, ali i da su neke vrste TRP kanala, pogotovo one iz TRPC, TRPV i TRPM podvrsta, izražene i u vaskulaturi glatkog mišićja, kao i u endotelnim stanicama (29).

Karakteristično svojstvo kanala iz TRP obitelji jest polimodalnost njihovih aktivatora. Dakle, istraživanja su izvijestila da TRPV4 kanali mogu biti aktivirani putem različitih fizioloških, mehaničkih i kemijskih stimulansa, kao što su: hipotoničnost, elastičnost membrane, sila smicanja, nizak pH, nizak intravaskularni tlak ili umjerena toplina ( $> 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Aktivacija kanala može se potaknuti i metabolitima arahidonske kiseline, kao što su 5,6-epoksieikozatrienoična kiselina (5,6-EET) te 8,9-EET i 11,12 EET. Isto tako, postoje i sintetički razvijeni modulatori kanala pa tako razlikujemo agoniste kanala, a to su  $4\alpha$ -forbol 12,13-didekanoat ( $4\alpha$ -PDD) i GSK1016790A te njegove antagoniste HC-067047, RN-1734 (31).

Kanali koji se pretežno eksprimiraju u endotelnim stanicama jesu TRPV4 kanali. Mendoza i suradnici su, koristeći imunohistokemijsku analizu i RT-PCR, na modelu TRPV4 knockout miševa (TRPV4<sup>-/-</sup>, gen za TRPV4 kanal inaktiviran) i miševa divljeg tipa (engl. *wild type*, WT) koji predstavljaju tip gena bez prisutnosti mutacije, dokazali da postoji izrazita ekspresija TRPV4 proteina i mRNA u endotelu *in situ* i u endotelnim stanicama svježe izoliranih iz mišjih malih mezenteričnih arterija (32).

Nadalje, ustanovljeno je da ulazak  $\text{Ca}^{2+}$  kroz endotelne TRPV4 kanale pokreće vazodilataciju ovisnu o NO-u u karotidama štakora i NO- i EDHF-ovisnu vazodilataciju malih nježnih arterija. Kanali su također uključeni u mehaničko-podražajni odgovor endotela na vazodilataciju uzrokovanu smicajnom silom, tako da bi mogli imati i važnu ulogu u endotelnoj mehanotransdukciji. Primjena agonista TRPV4 kanala –  $4\alpha$ -PDD-a u karotidnim arterijama i malim nježnim arterijama štakora uzrokovala je povećanje endotelne intracelularne koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  i posljedično dovela do snažne vazodilatacije, a TRPV4 antagonist – rutenij red značajno je inhibirao vazodilataciju uzrokovanu smicajnom silom. Zbog navedenog se smatra da su endotelni TRPV4 kanali nova „meta“ farmakologa u liječenju hipertenzije (29, 33).

U studiji koju su proveli Minami i suradnici, razjašnjavani su osnovni fiziološki efekti  $\text{HBO}_2$  na modelu kroničnog cistitisa koji je potaknut intravezikalnim ubrizgavanjem vodikovog peroksida. U njihovom je slučaju  $\text{HBO}_2$  dovela je do značajne inhibicije submukoznog edema,



upale i fibroze u oštećenom mjehuru i istovremeno je poboljšala ekspresiju dušik-oxid sintetaze. Ono što je bitno za ovaj diplomski rad jest da je terapija hiperbaričnom oksigenacijom značajno smanjila submukoznu ekspresiju TRP ionskih kanala (točnije TRPV1 i TRPV4 kanala) koja je povezana s hiperaktivnošću i boli mjehura (34). Zbog navedenog, vođeni tim i svim prethodnim rezultatima navedenih istraživanja, htjeli smo konkretno istražiti utjecaj hiperbarične oksigenacije na ulogu TRP ionskih kanala u mehanizmima vaskularne reaktivnosti na modelu središnje moždane arterije kod zdravih SD štakora, znajući da je to područje još uvijek neistraženo.

## **2. HIPOTEZA**

Osnovna hipoteza ovog istraživanja jest da hiperbarična oksigenacija utječe na aktivnost TRP ionskih kanala uključenih u mehanizme vaskularne reaktivnosti.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Ciljevi ovog istraživanja jesu:

- 1) odrediti ulogu TRP ionskih kanala u mehanizmu protokom potaknute dilatacije (FID);
- 2) odrediti utjecaj akutne hiperbarične oksigenacije na aktivnost TRP ionskih kanala u mehanizmu protokom potaknute dilatacije;
- 3) odrediti utjecaj intermitentne hiperbarične oksigenacije na aktivnost TRP ionskih kanala u mehanizmu protokom potaknute dilatacije.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Eksperimentalni životinjski model

Ovaj je diplomski rad proveden kao eksperimentalna studija u sklopu Laboratorija za fiziologiju cirkulacije koji je dio Medicinskoga fakulteta u Osijeku. U istraživanju je korišteno 24 zdravih muških Sprague-Dawley štakora koji su bili u dobi od 9 do 11 tjedana starosti te je svaki od njih uzgojen u Vivariju Medicinskog fakulteta Osijek.

Štakori su bili podijeljeni u tri skupine:

- 1) CTRL skupina – kontrolna skupina štakora koja podrazumijeva zdrave, netretirane štakore (N = 12);
- 2) A-HBOT skupina – štakori izloženi akutnom djelovanju hiperbarične oksigenacije u barokomori koji bivaju žrtvovani neposredno nakon izlaganja (Rekompresijska komora za eksperimente 110L, Đuro Đaković, Aparati d.d., Slavonski Brod, *Slika 1.*), (N = 6);
- 3) 4D-HBOT skupina – štakori koji su bili izloženi hiperbaričnoj oksigenaciji u barokomori kroz 4 dana te su žrtvovani 5. dan; (N = 6).

### 4.2. Protokoli za izlaganje hiperbaričnom kisiku

Poštujući standardizirani protokol, eksperimentalne su životinje bile podvrgnute terapiji akutnom hiperbaričnom oksigenacijom (35). Nakon što smo životinje smjestili u barokomoru, uslijedila je kompresija na 2,0 atm u trajanju od 15 minuta uz otvoreni kompresijski ventil ( ventil je za dekompresiju za to vrijeme bio zatvoren) te puštanje kisika u barokomoru. U trenutku kada je tlak dosegnuo 2,0 atm, ventil za kompresiju smo zatvorili i životinje smo tog trenutka izložili djelovanju 100 %-tnog kisika. Taj je postupak trajao dva sata uz protok 2-3 l/min. Granule natrij-hidroksida, kalcij-hidroksida i etilvioleta (Draegersorb 800 Plus, Draeger Medical), koje su bile postavljene u komori, imale su zadaću upijanja ugljikovog dioksida koji izdahnu životinje. Nakon što su protekla dva sata, 15 minuta smo otpuštali dekompresijski ventil, odnosno izvršili smo dekompresiju. Životinje smo žrtvovali odmah po završetku postupka.

Četverodnevno (intermitentno) izlaganje hiperbaričnom kisiku obuhvaćalo je dnevnu izloženost 100 %-tnom kisiku koja se izvršavala u približno isto vrijeme kao i prethodnog dana, pri istim uvjetima koji su omogućeni i kod akutnog izlaganja i to četiri dana za redom. Životinje su bile žrtvovane peti dan.

Kroz svaki od protokola, životinjama je bila omogućena hrana te su iste bile pri svijesti.



*Slika 1. Rekompresijska komora za eksperimente – Đuro Đaković (izvor: original autorice rada)*

#### **4.3. Priprema središnje moždane arterije**

Nakon primijenjene terapije hiperbaričnim kisikom, slijedilo je vaganje životinje, a potom anesteziranje. Anesteziranje se izvršavalo kombiniranjem midazolama u količini od 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma) i ketamina u količini od 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2 ml, Pfizer). Nakon što smo životinje dekapitali, uz mikrokirurški pribor i operacijski mikroskop, izolirali smo središnju moždanu arteriju koju smo očistili od vezivnog tkiva te ju postavili na staklene mikropipete. Slika izolirane žile bila je prikazivana se na zaslonu sustava tlačnog miografa (The Myograph System, DMT, *Slika 2.*), a ona nam ujedno predstavlja i model za mjerenje protokom potaknute dilatacije (postupak objašnjen u daljnjem tekstu).



*Slika 2. Sustav tlačnog miografa – DMT (izvor: original autorice rada)*

#### **4.4. Određivanje protokom potaknute dilatacije i aktivnosti TRP ionskih kanala**

Između dviju staklenih mikropipeta kojima je vanjski promjer  $\sim 100\text{-}200\ \mu\text{m}$  postavili smo središnju moždanu arteriju. Unutrašnjost komorice, u kojoj su se nalazile staklene mikropipete s izoliranom žilom, ispunjavala je fiziološka slana otopina (PSS,  $\text{pH} = 7.4 \pm 0.05$ ; sastava (u mM/l): 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.17 MgSO<sub>4</sub>, 1.6CaCl<sub>2</sub>, 1.18 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 0.026 EDTA

i 5.5 glukoze) temperature 37 °C (Slika 3.). Smjesa plinova kojom se neprestano oksigenirao sustav tlačnog miografa sastojao se od 21 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> i balansa N<sub>2</sub>.



**Slika 3. Komorica sa žilom (izvor: original autorice rada)**

Nakon što smo žilu postavili u komoricu, inkubirali smo je 60 minuta pri tlaku od  $\Delta 80$  mmHg (P1 je 80 mmHg, P2 0 mmHg), kako bismo mogli procijeniti osnovni (bazalni) promjer. Žila je cijelo vrijeme bila snimana infracrvenom kamerom te se slika prikazivala na zaslonu sustava te su se bilježile promjene promjera žile. Nakon inkubacije, krvna žila je zatim bila izložena protoku koji se postiže istodobnim promjenama ulaznog (*inflow*) i izlaznog (*outflow*) tlaka (tlačni gradijenti  $\Delta 10$ ,  $\Delta 20$ ,  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$  i 100 mmHg). Nastali gradijent tlaka rezultirao je nastankom protoka pripremljene PSS otopine kroz postavljenu krvnu žilu. Nakon što smo odredili bazalne vrijednosti promjera izolirane krvne žile, mjerili smo odgovor krvne žile na pojedine agoniste/antagoniste TRPV4 kanala koje smo stavljali u komoricu te inkubirali 20-30

minuta. Nakon inkubacije, ponavljali smo mjerenje promjera krvne žile ovisno o tlačnim gradijentima. Nakon bazalnog odgovora, kontrolnoj skupini je bio mjeren FID u prisutnosti agonista (GSK1016790A, 300nM/L, Sigma Aldrich) i antagonista (RN-1734, 20 $\mu$ M/L, Sigma Aldrich) TRPV4 kanala, dok je kod izoliranih žila A-HBOT skupine FID mjeren u prisutnosti agonista TRPV4 kanala (GSK1016790A, 300nM/L, Sigma Aldrich), a izoliranim žilama iz 4D-HBOT skupine u prisutnosti antagonista TRPV4 kanala (RN-1734, 20 $\mu$ M/L, Sigma Aldrich).

Na kraju eksperimentalnog protokola, krvne žile smo izložili otopini PSS bez otopine Ca<sup>2+</sup> kako bismo izmjerili maksimalni promjer krvne žile. Podaci krvnih žila koje nisu pokazivale značajnu razinu aktivnog tonusa (oko 50 %) izuzimali smo iz obrade.

Istraživački su postupci bili usklađeni s Europskim smjernicama za dobrobit laboratorijskih životinja korištenih u istraživanjima (Direktiva 210/63/EU). Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku (Klasa: 602-04/20-08/07, Ur.br. 2158-61-07-20-75) i Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske.

#### **4.5. Statističke metode**

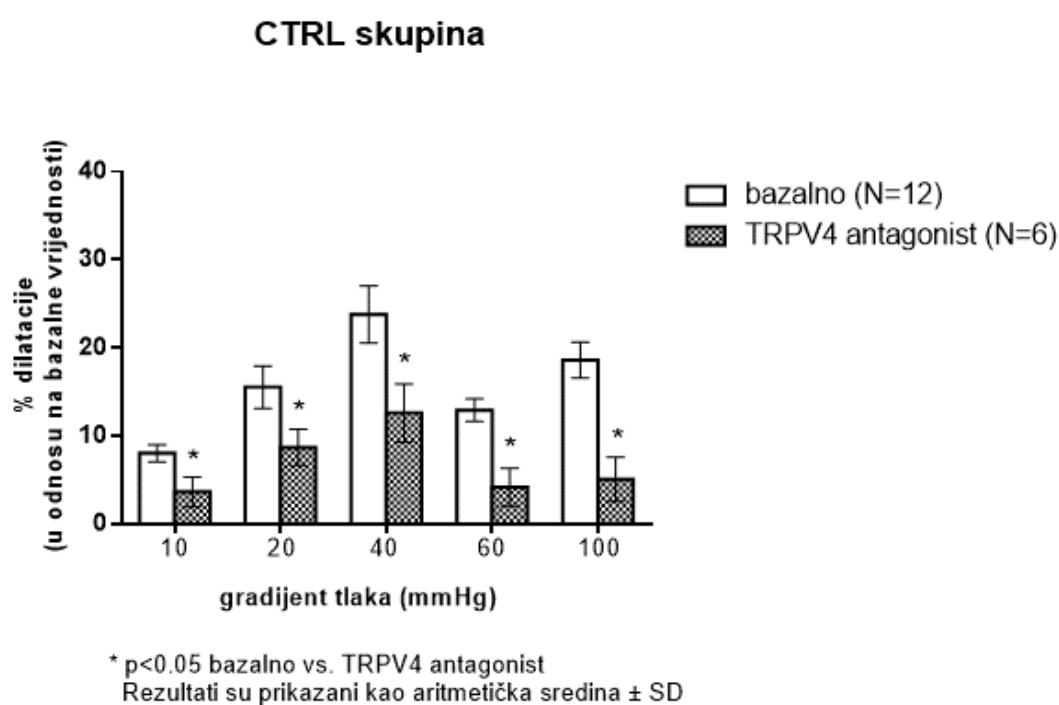
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (engl. mean  $\pm$  standard deviation (SD)). Za prikazivanje rezultata korišteni su statistički programi SigmaPlot 11.2 (Systat Software, Inc.) te GraphPad Prism 5. Mjerena dilatacija koja je rezultat protoka izražena je u postotku u odnosu na osnovne vrijednosti dobivene mjerenjem pri  $\Delta 0$  mmHg. Odgovor na protok analiziran je s Two-Way ANOVA testom za ponavljane uzorke (engl. repeated measures ANOVA) kako bi se moglo odrediti djelovanje postupka na odgovor analizirane krvne žile. Razina statističke značajnosti postavljena je na  $P < 0.05$ .



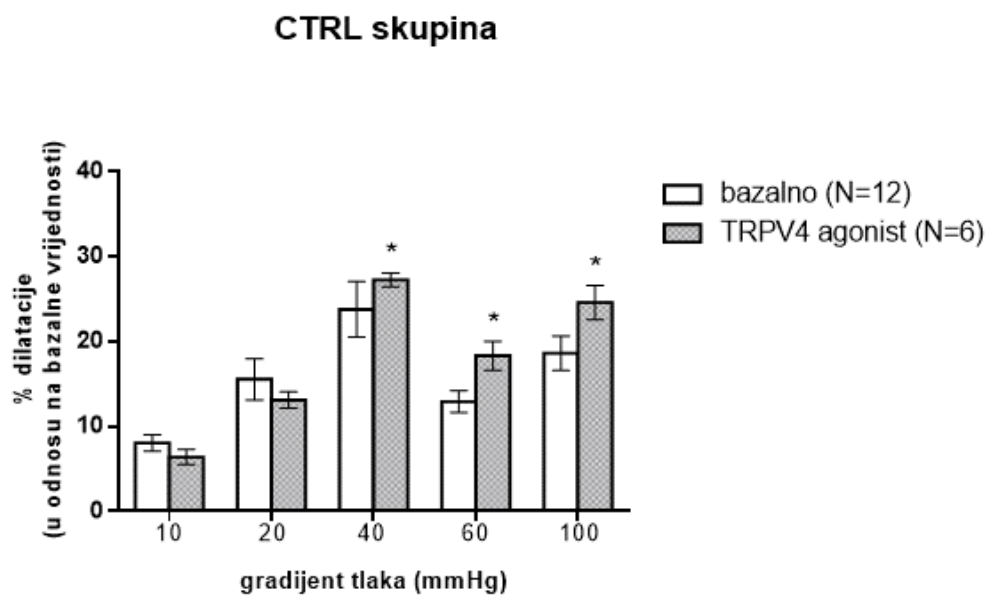
## 5. REZULTATI

### 5.1. Odgovor središnje moždane arterije kontrolne skupine na primjenu antagonista i agonista TRPV4 kanala

Kod kontrolne skupine životinja RN-1734, antagonist TRPV4 kanala, značajno smanjuje FID pri svakom gradijentu tlaka u usporedbi s bazalnim odgovorom bez primijenjenog antagonista (Slika 1.). Nakon primjene agonista, GSK1016790A, FID je povećan u odnosu na bazalne vrijednosti (bez agonista) pri gradijentima tlakova  $\Delta 40$  mmHg,  $\Delta 60$  mmHg i  $\Delta 100$  mmHg (Slika 2.).



*Slika 1. Odgovor središnje moždane arterije kontrolne netretirane (CTRL) skupine (N=12) prije i poslije (N=6) primjene antagonista TRPV4 kanala, RN-1734, uslijed promjene gradijenta tlaka, izražen kao udio (%) dilatacije, obzirom na bazalnu vrijednost.*



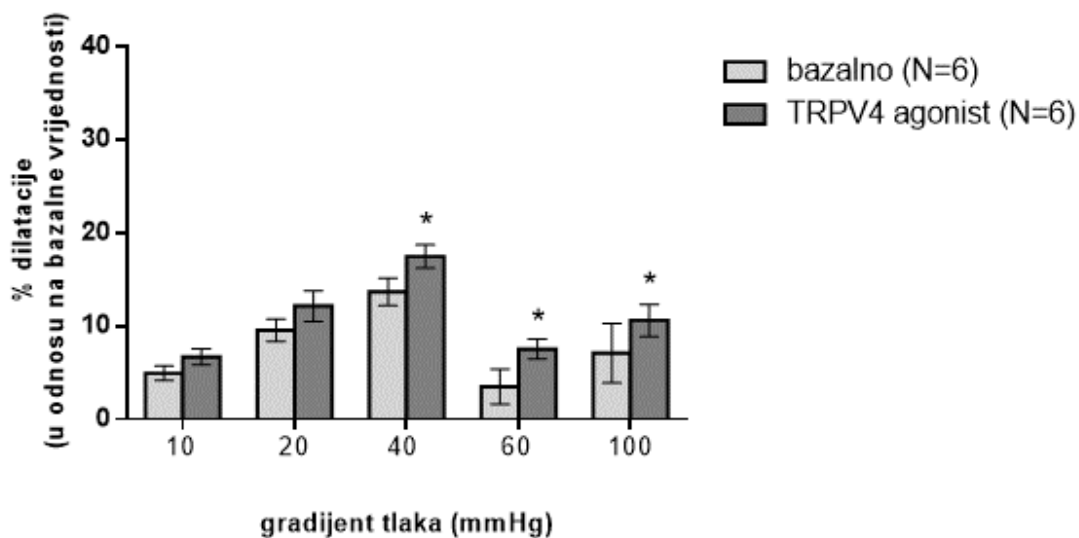
\*  $p < 0.05$  bazalno vs. TRPV4 agonist  
 Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD

*Slika 2. Odgovor središnje moždane arterije kontrolne netretirane (CTRL) skupine (N = 12) prije i poslije (N = 6) primjene agonista TRPV4 kanala, GSK1016790A uslijed promjene gradijenta tlaka, izražen kao udio (%) dilatacije, obzirom na bazalnu vrijednost.*

### **5.2. Odgovor središnje moždane arterije eksperimentalne skupine podvrgnute akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji nakon primjene agonista TRPV4 kanala**

Protokom potaknuta dilatacija A-HBOT skupine nakon primjene agonista TRPV4 kanala, GSK1016790A, značajno je obnovljena pri razini gradijenata tlakova  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$  i  $\Delta 100$  mmHg, u odnosu na bazalni odgovor A-HBOT skupine (Slika 3.).

### A-HBOT skupina



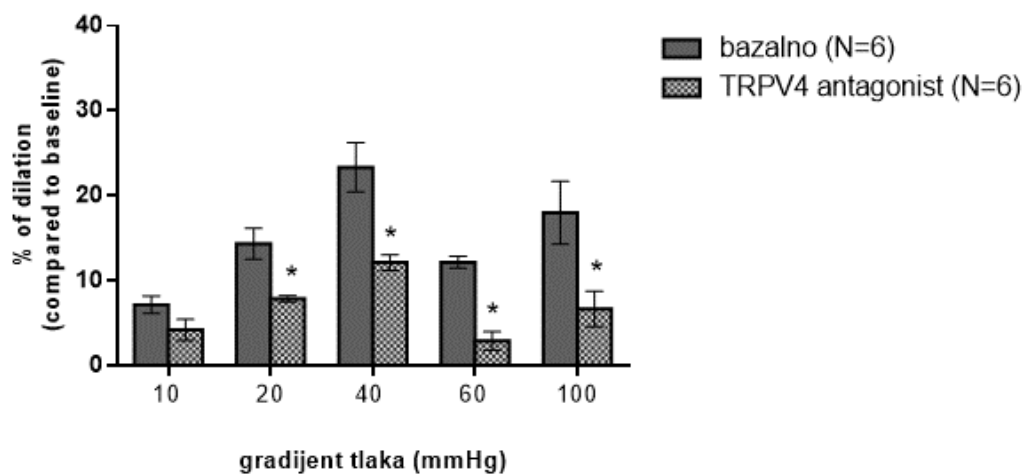
\*  $p < 0.05$  bazalno vs. TRPV4 agonist  
 Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD

*Slika 3. Odgovor središnje moždane arterije eksperimentalne skupine životinje podvrgnute akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (A-HBOT) i primjeni agonista TRPV4 kanala, GSK1016790A, u odnosu na bazalni odgovor prilikom promjene gradijenta tlaka, izražen kao udio (%) dilatacije, obzirom na bazalnu vrijednost.*

### 5.3. Odgovor središnje moždane arterije eksperimentalne skupine podvrgnute četverodnevnom izlaganju hiperbaričnoj oksigenaciji nakon primjene antagonista TRPV4 kanala

Kod skupine koja je bila izložena četverodnevnoj terapiji HBO<sub>2</sub> (4D-HBOT skupina), primjena antagonista TRPV4 kanala, RN-1734, značajno je smanjila protokom potaknutu dilataciju pri razini gradijenata tlakova  $\Delta 20$ ,  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$  i  $\Delta 100$  mmHg.

4D-HBOT skupina



\*  $p < 0.05$  bazalno vs. TRPV4 antagonist  
 Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD

*Slika 4. Odgovor središnje moždane arterije eksperimentalne skupine životinje podvrgnute četverodnevnom izlaganju hiperbaričnoj oksigenaciji (4D-HBOT) i primjeni antagonista TRPV4 kanala – RN-1734, u odnosu na bazalni odgovor prilikom promjene gradijenta tlaka, izražen kao udio (%) dilatacije, obzirom na bazalnu vrijednost.*

## 6. RASPRAVA

U ovome se istraživanju ispitivao utjecaj hiperbarične oksigenacije na ulogu TRP ionskih kanala u mehanizmima vaskularne reaktivnosti kod zdravih muških Sprague-Dawley štakora. Zbog dvojne prirode kisika i njegove istaknute reaktivnosti, treba biti vrlo oprezan prilikom primjene hiperbarične oksigenacije. Nedavna su istraživanja u našem laboratoriju dovela do zaključaka da se utjecaj hiperbarične oksigenacije na vaskularnu reaktivnost izoliranih žila razlikuje ovisno o primijenjenom protokolu i dužini izlaganja čistom kisiku u barokomori (10, 26).

Kako je već spomenuto, TRPV4 ionski kanali koji se nalaze na staničnoj membrani endotelnih stanica smatraju se ključnim za ulazak  $\text{Ca}^{2+}$  u stanicu, za kojeg se zna da potiče vazodilataciju ovisnu o endotelu (34). Uzimajući u obzir navedene informacije, kontrolnu netretiranu (CTRL) skupinu izložili smo djelovanju antagonista (RN-1734) i agonista (GSK1016790A) TRPV4 kanala. Nakon primjene antagonista, FID je smanjen pri svakom gradijentu tlaka u usporedbi s bazalnim odgovorom netretirane skupine. Primjena agonista dovela je do povećanog FID-a pri gradijentima tlakova  $\Delta 40$  mmHg,  $\Delta 60$  mmHg i  $\Delta 100$  mmHg, u odnosu na bazalne vrijednosti skupine koja nije tretirana GSK1016790A te smo stoga zaključili kako TRP ionski kanali imaju značajnu ulogu u mehanizmu protokom potaknute dilatacije.

Nadalje, na SD štakorima koji su bili akutno i intermitentno izloženi hiperbaričnoj oksigenaciji htjeli smo provjeriti postoji li veza s primjenom različitih protokola hiperbarične oksigenacije i aktivnosti TRP kanala koji su uključeni u vaskularnu reaktivnost. Kako doznajemo iz uvoda, akutna hiperbarična oksigenacija narušava protokom potaknutu dilataciju (26), te smo na ovaj način htjeli doznati hoće li primjenom agonista TRPV4 kanala, GSK1016790A, doći do obnove protokom potaknute dilatacije narušene akutnom primjenom hiperbarične oksigenacije. Rezultati govore u prilog tome da je došlo do obnavljanja odgovora protokom potaknute dilatacije na razini gradijenata tlakova  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$  i  $\Delta 100$  mmHg, u odnosu na bazalni odgovor A-HBOT skupine netretirane agonistom pa, stoga, zaključujemo kako TRPV4 kanali imaju značajnu ulogu u regulaciji dilatacije krvnih žila, a da akutna hiperbarična oksigenacija zapravo dovodi do smanjenja aktivnosti navedenih kanala. Također, Minami i suradnici su, istražujući utjecaj hiperbarične oksigenacije na modelu kroničnog cistitisa izazvanog intravezikalnim ubrizgavanjem vodikovog peroksida u miša, došli do zaključka da se aktivacija i ekspresija pojedinih podtipova TRP kanala, koja je potaknuta vodikovim peroksidom, značajno smanjuje kod primjene  $\text{HBO}_2$  (34).

Mihaljević i suradnici su utvrdili da podvrgavanje aortalnih prstenova intermitentnoj HBO<sub>2</sub> ima blagotvoran učinak na njihovu vazorelaksaciju (ostala je očuvana nakon tretmana zbog povećanog antioksidativnog kapaciteta) te vođeni tom mišlju, naša je istraživačka skupina htjela utvrditi hoće li doći do smanjenja protokom potaknute dilatacije nakon primjene antagonista TRPV4 kanala (10). Naime, gledajući odnos bazalnih vrijednosti protokom potaknutne dilatacije te vrijednosti nakon primjene antagonista RN-1734 kod 4D-HBOT skupine, vidljivo je kako je primjena istog narušila protokom potaknutu dilataciju na razini gradijenata tlakova od  $\Delta 20$ ,  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$  i  $\Delta 100$  mmHg te smo zaključili da TRP kanali imaju značajnu ulogu u posredovanju FID-a kod intermitentne hiperbarične oksigenacije.

## 7. ZAKLJUČCI

Sukladno rezultatima dobivenim u sklopu provedenog istraživanja, može se zaključiti sljedeće:

- 1) TRP ionski kanali imaju značajnu ulogu u mehanizmu protokom potaknute dilatacije (FID);
- 2) akutna hiperbarična oksigenacija smanjuje aktivnost TRP ionskih kanala u mehanizmu protokom potaknute dilatacije;
- 3) TRP kanali imaju značajnu ulogu u posredovanju protokom potaknute dilatacije kod intermitentne hiperbarične oksigenacije.

## 8. SAŽETAK

**Ciljevi:** Odrediti ulogu TRP ionskih kanala u mehanizmu FID-a te djelovanje akutne i intermitentne HBO<sub>2</sub> na njihovu aktivnost u navedenom mehanizmu.

**Nacrt studije:** Eksperimentalna studija na životinjama.

**Materijali i metode:** Zdravi SD štakori (N = 24) podijeljeni su u 3 skupine – kontrolnu (CTRL, N = 12), A-HBOT (N = 6) i 4D-HBOT (N = 6). A-HBOT smo podvrgnuli akutnoj HBO<sub>2</sub> (100 % O<sub>2</sub>, 2h/2 bara), a 4D-HBOT četverodnevnoj HBO<sub>2</sub>. Štakore smo anestezirali (midazolam – 0,5 mg/kg, ketamin – 75 mg/kg) i dekapitali, a iz mozga je izolirali središnju moždanu arteriju, inkubirali je u sustavu pri tlaku od  $\Delta$ 80 mmHg zbog procjene bazalnog promjera. Žilu smo izložili protoku PSS otopine, mjerili bazalne vrijednosti promjera žile i odgovor žile na pojedine agoniste/antagoniste pri tlačnim gradijentima. Nakon bazalnog odgovora, kontrolnoj smo skupini mjerili FID žile u prisutnosti antagonista (RN-1734, 20 $\mu$ M/L, Sigma Aldrich)) i agonista (GSK1016790A, 300nM/L, Sigma Aldrich)) TRPV4 kanala, A-HBOT skupini u prisutnosti agonista, 4D-HBOT skupini u prisutnosti antagonista u istim koncentracijama. PSS smo otopinu na kraju zamijenili PSS Ca-free otopinom (mjerenje maksimalnog promjera arterije).

**Rezultati:** Kod kontrolne je skupine RN-1734 doveo do smanjenog FID-a pri svakom gradijentu tlaka, a GSK1016790A do povećanja FID-a pri gradijentima tlakova od  $\Delta$ 40 mmHg,  $\Delta$ 60 mmHg i  $\Delta$ 100 mmHg u odnosu na bazalne vrijednosti. FID A-HBOT skupine s agonistom značajno je obnovljen na razini gradijenata tlakova  $\Delta$ 40,  $\Delta$ 60 i  $\Delta$ 100 mmHg u odnosu na bazalni odgovor netretirane A-HBOT skupine. Primjena antagonista kod 4D-HBOT skupine narušila je FID pri razini gradijenata tlakova  $\Delta$ 20,  $\Delta$ 40,  $\Delta$ 60 i  $\Delta$ 100 mmHg u odnosu na bazalni odgovor netretirane 4D-HBOT skupine.

**Zaključak:** TRP ionski kanali imaju značajnu ulogu u bazalnom posredovanju protokom potaknute dilatacije, te u posredovanju FID-a nakon akutnog i intermitentnog izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji.

**Ključne riječi:** protokom potaknuta dilatacija; hiperbarična oksigenacija; TRP ionski kanali, RN-1734, GSK1016790A.



## 9. SUMMARY

### **The effect of hyperbaric oxygenation on the role of TRP ion channels in the mechanisms of vascular reactivity in healthy Sprague-Dawley rats**

**Objectives:** The aim of this study is to determine the role of TRP ion channels in mechanism of flow-induced dilation and the impact of acute and intermittent hyperbaric oxygenation on activity of TRP ion channels in mechanism of flow-induced dilation.

**Study design:** Experimental study on laboratory animals

**Materials and methods:** Healthy SD rats (N=24) were divided into 3 groups – control (CTRL, N=12), A-HBOT (N=6) and 4D-HBOT (N=6). A-HBOT group was subjected to acute HBO<sub>2</sub> in specialized chamber (100% O<sub>2</sub>, 2h/2bars) and 4D-HBOT group was exposed to intermittent HBO<sub>2</sub> (exposure for 4 days in a row). After the protocol, rats were anesthetized (ketamine – 75mg/kg, midazolam – 0,5 mg/kg) and subsequently decapitated, MCA was isolated and incubated for 1 hour in the pressure myograph system (where P1 was  $\Delta$ 80 mmHg and P2  $\Delta$ 0 mmHg) so that basal diameter can be measured. The vessel was exposed to the flow of PSS solution. The basal values of the vessel diameter and the response of the vessel to individual agonists (GSK1016790A, 300nM/L, Sigma Aldrich) and antagonists (RN-1734, 20 $\mu$ M/L, Sigma Aldrich) at pressure gradients were measured. After the basal response, FID of the vessels of the control group in presence of antagonist and agonist of TRPV4 channel, FID of vessels of A-HBOT group in the presence of agonist and the FID of vessels of 4D-HBOT group in the presence of antagonist were measured. The PSS eventually changes to PSS Ca-free for the purpose of measuring the maximum artery diameter.

**Results:** In the control group, use of RN-1734 led to a decrease in FID at each of the pressure gradients and GSK1016790A led to an increase in FID at level of  $\Delta$ 40 mmHg,  $\Delta$ 60 mmHg i  $\Delta$ 100 mmHg pressure gradients according to basal values. The FID of the A-HBOT group with the agonist applied was significantly restored at the level of  $\Delta$ 40,  $\Delta$ 60 i  $\Delta$ 100 mmHg pressure gradients according to the basal response of the untreated A-HBOT group (FID disrupted). Application of antagonist in the 4D-HBOT group disrupted FID at the level of  $\Delta$ 20,  $\Delta$ 40,  $\Delta$ 60 i  $\Delta$ 100 mmHg pressure gradients according to the basal response of the untreated 4D-HBOT group (FID preserved).

**Conclusion:** TRP ion channels play a significant role in basal mediation of flow-induced dilatation, and in mediation of FID after acute and intermittent exposure to hyperbaric oxygenation

**Key words:** flow-induced dilation; hyperbaric oxygenation; TRP ion channels, RN-1734, GSK1016790A

**10. LITERATURA**

1. Krumova K, Cosa G. Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences. Chapter 1: Overview of Reactive Oxygen Species. 2016; 1:1-21.
2. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Medicinska naklada. 3. izd. Zagreb; 2009. str. 360-363.
3. Tripathy S, Kumar Mohanty P. Reactive oxygen species (ROS) are boon or bane. IJPSR, 2017; 8(1): 1-16.
4. Santo A, Zhu H, Li YR. (2016). Free Radicals: From Health to Disease. ROS. 2016; 2(4): 245–263.
5. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: Are view. Journal of biochemical and molecular toxicology. 1. izd. 2003; str. 24-38.
6. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, i sur. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J Clin Invest. 2004; 114(12): 1752–1761.
7. Kibel A, Novak S, Čosić A, Mihaljević Z, Falck JR, Drenjančević I. Hyperbaric oxygenation modulates vascular reactivity to angiotensin-(1-7) in diabetic rats: potential role of epoxyeicosatrienoic acids. Diab Vasc Dis Res. 2015; 12(1): 33-45.
8. Kudchodkar BJ, Pierce A and Dory L. Chronic hyperbaric oxygen treatment elicits an anti-oxidant response and attenuates atherosclerosis in apoE knockout mice. Atherosclerosis 2007; 193: 28–35.
9. Bakker DJ. Hyperbaric oxygen therapy and the diabetic foot. Diabetes Metab Res Rev 2000; 16(1): 55–58.
10. Mihaljević Z, Matić A, Stupin A, Barić L, Jukić I, Drenjančević I. Acute hyperbaric oxygenation, contrary to intermittent hyperbaric oxygenation, adversely affects vasorelaxation in healthy Sprague- Dawley rats due to increased oxidative stress. Oxid Med Cell Longev. 2018 Apr 29; 2018: 7406027.
11. Drenjančević I, Kibel A. Restoring vascular function with hyperbaric oxygen treatment: recovery mechanisms, J. Vasc. Res. 2014; 51(1): 1–13.

12. Poggesi A, Pasi M, Pescini F, Pantoni L, Inzitari D. Circulating biologic markers of endothelial dysfunction in cerebral small vessel disease: A review. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016; 36(1): 72-94.
13. Sandoo A, van Zanten JJ, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *The Open Cardiovasc Med J.* 2010; 4: 302-312.
14. Félétou M. The Endothelium, Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. U: Granger N, Granger JP, urednici. *Colloquium Series in Integrated System Physiology: From Molecule to Function to Disease.* San Rafael: Morgan & Claypool Life Sciences; 2011.
15. Gonçalves DR, Negrão CE, Krieger MH. Nitric Oxide and the Cardiovascular System: Cell Activation, Vascular Reactivity and Genetic Variant. *Arq Bras Cardio* 2011; 96(1): 68-75.
16. Ćosić A. (2016.) Uloga oksidativnog stresa u razvoju poremećenog vaskularnog odgovora pod utjecajem visokog unosa natrijeva klorida kod Sprague-Dawley štakora. Doktorska disertacija. Osijek: Medicinski fakultet.
17. Da Luz P, Libby P, Laurindo F, Chaga A. Endothelium and Cardiovascular Diseases: Vascular Biology and Clinical Syndromes, Chapter 9 – Vasoconstrictor Substances Produced by the Endothelium. 1. izd. Cambridge: Academic Press; 2018.
18. Flammer AJ, Lüscher TF. Three decades of endothelium research. From the detection of nitricoxide to the everyday implementation of endothelial function measurements in cardiovascular diseases. *Swiss Med Wkly* 2010; 140: w13122.
19. Malinski T. The vital role of nitricoxide; *Oakland university Journal.* 2016;47-58.
20. Michel T, Feron O. Nitricoxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest.* 1997; 100: 2146-52.
21. Taddei S, Ghiadoni L, Viridis A, Versari D, Salvetti A. Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies. *Curr Pharm Des.* 2003; 9: 2385–2402.
22. Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA i sur. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1411(2-3): 385-400.

23. Ćosić A. i sur. Attenuated flow-induced dilatation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet. *J Physiol*. 2016; 594(17): 4917-31.
24. Koller A, Huang A. Impaired nitricoxide-mediated flow-induced dilation in arterioles of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1994; 74: 416-421.
25. Du, J. i sur. Increasing TRPV4 expression restores flow-induced dilation impaired in mesenteric arteries with aging. *Sci Rep*. 2016; 6:1-11.
26. Marković P. (2018.) Utjecaj akutne hiperbarične oksigenacije na protokom potaknutu dilataciju kod zdravih Sprague-Dawley štakora. Završni rad. Osijek: Medicinski fakultet.
27. Garland CJ, Dora KA. EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017; 219(1) :152-161.
28. Kwang-Seok H, Man-Gyoon L. Endothelial Ca<sup>2+</sup> signaling-dependent vasodilation through transient receptor potential channels. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2020; 24(4): 287–298.
29. Zhang DX, Gutterman DD. TRP channel activation and endothelium-dependent dilation in the systemic circulation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011; 57(2): 133–139.
30. Earley S, Brayden JE. Transient Receptor Potential Channels in the Vasculature. *Physiol Rev*. 2015; 95(2): 645-90.
31. Hill-Eubanks DC, Gonzales AL, Sonkusare SK, Nelson MT. Vascular TRP channels: performing underpressure and going with the flow. *Physiology (Bethesda)*. 2014; 29(5): 343-360.
32. Mendoza SA, Fang J, Gutterman DD, Wilcox DA, Bubolz AH, Li R, et al. TRPV4-mediated endothelial Ca<sup>2+</sup> influx and vasodilation in response to shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 298(2): 466-476.
33. Köhler R, Heyken WT, Heinau P, Schubert R, Si H, Kacik M, et al. Evidence for a functional role of endothelial transient receptor potential V4 in shear stress-induced vasodilatation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26(7): 1495-1502.
34. Minami A, Tanaka T, Otoshi T, Kuratsukuri K, Nakatani T. Hyperbaric oxygen significantly improves frequent urination, hyperalgesia, and tissue damage in a mouse long-

lasting cystitis model induced by an intravesical instillation of hydrogen peroxide. *Neurourol Urodyn.* 2019; 38(1): 97–106.

35. Drenjančević I, Kibel A, Kibel D, Šerić V, Ćosić A. Blood pressure, acid-base and blood gas status and indicators of oxidative stress in healthy male rats exposed to acute hyperbaric oxygenation. *Undersea Hyperb Med.* 2013; 40(4): 319-328.

## 11. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Patricija Marković

**Datum i mjesto rođenja:** 6. rujna 1996., Zagreb, Republika Hrvatska

**Adresa:** Kolodvorska 74 A, Novi Jankovci, 32241 Stari Jankovci

**Telefon:** 099/738 81 80

**e-pošta:** markpatricija@gmail.com

### **Obrazovanje:**

2003.–2011. Osnovna škola Stari Jankovci, Stari Jankovci

2011.–2015. Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci

2015.–2018. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2018.–danas. Diplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku