

# Utjecaj hiperbarične oksigenacije na plazmatsku razinu angiotenzina II kod zdravih Sprague- Dawley štakora

---

**Begović, Maja**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:966956>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Maja Begović**

**UTJECAJ HIPERBARIČNE  
OKSIGENACIJE NA PLAZMATSKU  
RAZINU ANGIOTENZINA II KOD  
ZDRAVIH SPRAGUE-DAWLEY  
ŠTAKORA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Maja Begović**

**UTJECAJ HIPERBARIČNE  
OKSIGENACIJE NA PLAZMATSKU  
RAZINU ANGIOTENZINA II KOD  
ZDRAVIH SPRAGUE-DAWLEY  
ŠTAKORA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Katedra za fiziologiju i imunologiju.

Mentor rada: Doc. dr. sc. Aleksandar Kibel, dr. med.

Rad ima 24 lista, 1 tablicu i 4 slike.

*Zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Aleksandru Kibelu, dr.med. na susretljivosti, savjetima i pomoći oko pisanja diplomskog rada.*

*Također zahvaljujem doc. dr. sc. Aniti Matić, dipl.ing. na pomoći oko izrade praktičnog dijela rada..*

*Posebno zahvaljujem svojim roditeljima i obitelji koji su mi omogućili ovaj studij te bili najveća potpora i oslonac tijekom cijelog školovanja.*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Hiperbarična oksigenacija.....	1
1.1.1. Primjena hiperbarične oksigenacije.....	1
1.1.2. Fiziološki mehanizmi djelovanja.....	2
1.2. Sustav renin- angiotenzin.....	3
1.2.1. Komponente sustava renin- angiotenzin.....	3
1.3. Dosadašnje poveznice sustava renin- angiotenzin s hiperbaričnom oksigenacijom.....	5
2. HIPOTEZA.....	7
3. CILJ.....	8
4. MATERIJALI I METODE.....	9
4.1. Ustroj studije.....	9
4.2. Eksperimentalne životinje.....	9
4.3. Protokol hiperbarične oksigenacije.....	9
4.4. Uzorkovanje i priprema uzorka.....	11
4.5. Određivanje plazmatske koncentracije ELISA metodom.....	11
4.6. Statističke metode.....	13
5. REZULTATI.....	14
6. RASPRAVA.....	16
7. ZAKLJUČAK.....	18
8. SAŽETAK.....	19
9. SUMMARY.....	20
10. LITERATURA.....	21
11. ŽIVOTOPIS.....	24

**POPIS KRATICA:**

**ACE** – angiotenzin konvertirajući enzim (eng. *angiotensin converting enzyme*)

**ACE2** - angiotenzin konvertirajući enzim 2 (eng. *angiotensin converting enzyme 2*)

**ANG I** – angiotenzin I

**ANG II** – angiotenzin II

**ANG-(1-7)** – angiotenzin-(1-7)

**ANG III** – angiotenzin III

**ANG IV** – angiotenzin IV

**ELISA** – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**HBO** – hiperbarična oksigenacija

**HBOT** - *hyperbaric oxygen treatment*

**JG stanice** – jukstaglomerularne stanice

**NEP** – neutralna endopeptidaza

**NO** – dušikov monoksid

**PEP** – prolil endopeptidaza

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

**RAS** – renin-angiotenzin sustav

## 1. UVOD

### 1.1. Hiperbarična oksigenacija

Hiperbarična oksigenacija (HBO) ili terapija hiperbaričnom oksigenacijom (eng. *hyperbaric oxygen treatment, HBOT*) medicinska je metoda koja se koristi u terapijske ili eksperimentalne svrhe te podrazumijeva upotrebu 100 % kisika pri tlaku većem od 100 kPa (1 bar) (1). HBO najčešće se provodi u specijaliziranim mono komorama gdje se izlaganje kisiku provodi tako da je cjelokupna unutrašnjost komore ispunjena 100 % kisikom ili u komorama gdje je smješteno više ljudi ili eksperimentalnih životinja istovremeno. U tom slučaju izlaganje kisiku je preko maske ili endotrahealne cijevi uz okolne hiperbarične uvjete. Izlaganja su najčešće pod tlakom od dva do tri bara, dok se medicinski značajni učinci HBO nalaze već i kod tlaka od 1,4 bara. Izlaganja se provode u trajanju od 90 do 120 minuta, a ovisno o indikaciji, mogu se provesti jednom do tri puta dnevno (2 - 5).

Udisanjem hiperbaričnog kisika dobije se čak i do 20 puta više kisika otopljenog u krvi nego li normalnim disanjem te tri do četiri puta više nego udisanjem kisika pri normalnom tlaku. Kako kisik otopljen u krvi lakše difundira i prema najudaljenijim stanicama, tako se velikom brzinom može ispraviti nedostatak kisika u tkivima, odnosno hipoksija (lokalna i/ili opća) (6). Kada se kisik udahne pod povišenim tlakom, on povećava frakciju slobodnog kisika otopljenog u plazmi te ujedno dovodi do povećanja arterijskog i parcijalnog tlaka kisika ( $pO_2$ ). Kako kao takav pokazuje povoljni učinak u hipoksičnim tkivima, metoda hiperbarične oksigenacije primjenjuje se kod stanja u kojima je izravno ili neizravno smanjena količina kisika u stanicama i tkivu, s obzirom na to da ne postoji farmakološki pripravak kojim bi se izravno povisila koncentracija kisika u organizmu. (1, 5).

#### 1.1.1. Primjena hiperbarične oksigenacije

Sredinom 1970-ih formiran je odbor za HBOT koji od 1986. godine postoji pod imenom „Undersea and Hyperbaric Medical Society“ (UHMS) s ciljem donošenja smjernica za primjenu HBO. Ovaj odbor međunarodni je autoritet za HBO i redovito



pregledava istraživanja i kliničke studije o primjeni HBO te daje preporuke o indikacijama i učinkovitosti (7). Danas prihvaćene indikacije za kliničku uporabu HBO uključuju plinsku (zračnu) emboliju, akutno otrovanje ugljičnim monoksidom ili cijanidom, akutne traumatske ishemije (posebno crush i compartment sindrom), dekompresijsku bolest, kronične rane (posebice dijabetične), anemiju uzrokovanu gubitkom krvi, plinsku gangrenu (klostridijsku infekciju), nekrotizirajuće infekcije tkiva kao što su anaerobni celulitis, nekrotizirajući fasciitis ili Fournierova gangrena, kronični refraktorni osteomijelitis, radijacijsku nekrozu kosti i mekih tkiva, poteškoće s cijeljenjem kožnim presadaka, aktinomikozu (5, 8). Osim odobrenih indikacija, klinička korisnost HBO i dalje se ispituje u mnogim područjima. HBO također nalazi svoju široku primjenu u raznim eksperimentalnim istraživanjima na animalnim modelima.

Iako je terapija hiperbaričnim kisikom relativno siguran tretman, i ona nosi neke rizike, a ponajviše zbog povećanog tlaka i moguće hiperoksije. Najčešće komplikacije su barotrauma srednjeg uha i miopija, a može se javiti i bol u sinusima, katarakta, plućna barotrauma, dekompresijska bolest, klaustrofobija. Također, postoji i opasnost od požara, pogotovo u mono komorama ispunjenima kisikom. Jedina apsolutna kontraindikacija za uporabu HBO je neliječeni pneumotoraks te obavezno mora isključiti prije tretmana (4, 9).

### 1.1.2. Fiziološki mehanizmi djelovanja

Primarni mehanizmi djelovanja HBO temelje se na povećanju tlaka okoline i parcijalnog tlaka kisika. Prema Boyleovom zakonu, porast tlaka okoline dovodi do smanjenja volumena plinom ispunjenih prostora, a ovo djelovanje bitno je u liječenju patoloških stanja u kojima su prisutni mjehurići u tijelu pacijenta kao što su dekompresijska bolest i plinska embolija (10). Prema Henryjevom zakonu dolazi do povećanja otopljenog kisika u plazmi što je posljedica povećanog arterijskog parcijalnog tlaka kisika. Ta hiperoksigenacija posebno je važna u liječenju *crush* i *compartment* sindroma te anemije uzrokovane gubitkom krvi (11). Ako se poveća arterijski  $pO_2$ , više kisika može se dostaviti dublje u tkiva, a povećanjem okolnoga tlaka na 2 - 2,5 bara (standardni tlak HBO) povećava se također i kisik otopljen u plazmi. Tako bi se, u teoriji, u plazmi moglo otopiti dovoljno kisika kako bi se zadovoljili normalni zahtjevi tijela u mirovanju bez potrebe za hemoglobinom (10).

Sekundarni mehanizmi djelovanja uključuju vazokonstrikciju, angiogenezu, proliferaciju fibroblasta, inhibiciju toksina i sinergiju antibiotika pa su tako još neki od fizioloških učinaka HBO: snažan učinak na smanjenje otoka jer izaziva stiskanje krvnih žila, poboljšanje cirkulacije krvi i ubrzano stvaranje mreže novih krvnih kapilara, povećanje obrambene sposobnosti organizma jer povećava sposobnost leukocita, zaustavlja rast bakterija i ubija ih, povećanje osjetljivosti stanica zloćudnih tumora na zračenje, potiče čišćenje od otrova i oslobađanje eritrocita od vezanih otrova, potiče cijeljenje kroničnih rana i ubrzava zarastanje kosti i hrskavica te pojačava djelovanje nekih antibiotika i drugih lijekova (6, 11).

## 1.2. Sustav renin-angiotenzin

Sustav renin-angiotenzin (RAS) hormonski je sustav i jedan je od sustava u organizmu koji ima bitnu ulogu u regulaciji arterijskog krvnog tlaka, regulaciji perfuzije tkiva te tjelesnih tekućina i elektrolita (unos natrija i izlučivanje kalija), a pored toga od vitalnog je značaja i u mnogim fiziološkim i patofiziološkim mehanizmima u gotovo svakom organskom sustavu (12 - 14). S druge strane, ukoliko RAS ne funkcionira ispravno, može doći do razvoja hipertenzije, srčane hipertrofije i zatajenja srca (15). Glavna zadaća ovog sustava je stvaranje vazoaktivnog angiotenzina II (ANG II) međudjelovanjem različitih supstanci, s ekspresijom njegovih brojnih djelovanja (12). Istraživanja pokazuju da gotovo svaki organski sustav u ljudskom tijelu posjeduje lokalni (tkivni) RAS. Komponente RAS-a prisutne su u perifernim tkivima kao što su krvne žile, bubrezi, nadbubrežne žlijezde, srce i imunološke stanice, a od kojih sve lokalno proizvode ANG II (14). RAS nije samo endokrini već je i parakrini i intrakrini sustav, s obzirom da postoje također i dokazi o unutarstaničnom RAS-u koji sudjeluje u promjenama tijekom  $Ca^{2+}$  i aktivaciji gena (12).

### 1.2.1. Komponente sustava renin-angiotenzin

Rad renin-angiotenzin sustava započinje biosintezom renina iz jukstaglomerularnih stanica (JG stanice) bubrega (16). Renin je prehormon, a oslobađa se na podražaj sniženja arterijskog tlaka. Osim toga, na otpuštanje renina utječe i aktivacija

simpatičkog živčanog sustava, promjene u izlučivanju NaCl te negativna povratna sprega putem izravnog djelovanja ANG II na JG stanice (12). Renin sam po sebi nije u stanju regulirati arterijski tlak, ali se nakon oslobađanja zadržava u krvi do 60 minuta i potiče stvaranje angiotenzina I (ANG I) iz angiotenzinogena, kojeg u najvećem dijelu sintetizira jetra (17). Dakle, angiotenzinogen se uz pomoću renina pretvara u dekaeptid ANG I, koji se zatim pomoću angiotenzin-konvertirajućeg enzima (eng. angiotensin converting enzyme - ACE), koji se najvećim dijelom nalazi na endotelnim stanicama pluća, pretvara u oktaeptid ANG II (12). ANG II glavna je molekula RAS-a te ima brojne učinke u cirkulaciji i bubrezima. Snažan je vazokonstriktor (posebice u arteriolama), dovodi do povišenja krvnog tlaka, potiče zadržavanje soli te potiče oslobađanje aldosterona iz nadbubrežne žlijezde. Osim toga, potiče proliferaciju, fibrozu i hipertrofiju te proupalnu aktivnost (13).

ANG II djeluje preko dva farmakološki različita podtipa receptora, AT1 i AT2. Oba receptora vezana su za G protein, ali se razlikuju po raspodjeli u tkivima i putevima stanične signalizacije. AT1 receptori zaduženi su za vazokonstrikciju, podizanje tlaka, otpuštanje vazopresina i aldosterona, rast i staničnu proliferaciju. Većina se funkcija ANG II provodi kroz AT1 receptore. AT2 receptori izraženi su najviše u fetalnom razdoblju te oni posreduju vazodilataciju, inhibiciju rasta i staničnu diferencijaciju te proizvodnju dušikovog oksida (12 - 14).

Tkivni ANG II može nastati i alternativno iz ANG I pomoću kimaze, enzima koji se normalno nalazi u mastocitima (12). Također, ANG II može se razgraditi u cirkulaciji pomoću aminopeptidaza što dovodi do nastanka metabolita ANG III i ANG IV. ANG III ima slične učinke kao ANG II, ali manje jačine, dok ANG IV povećava protok krvi u bubrezima i mozgu te tako pokazuje zaštitnu ulogu (13).

Još jedan važan biološki aktivan metabolit ANG II je i heptapeptid angiotenzin-(1-7) (ANG- (1-7)). Nastaje iz ANG II posredstvom angiotenzin konvertirajućeg enzima 2 (ACE2) ili preko endopeptidaza- neutralne endopeptidaze (NEP) i prolil endopeptidaze (PEP). Također pomoću enzima NEP i PEP može direktno nastati i iz ANG I (18 - 20). ANG-(1-7) djeluje suprotno ANG II protiveći se mnogim radnjama koje ANG II stimulira. Djeluje preko Mas receptora oslobađajući pritom NO i prostaglandine te suprotno djelovanju ANG II uzrokuje vazodilataciju i inhibiciju staničnog rasta (21). Također, dovodi do popravljavanja endotelne funkcije te za razliku od ANG II pokazuje antihipertrofični i antifibrotični učinak (12, 21).

### **1.3. Dosadašnje poveznice sustava renin-angiotenzin s hiperbaričnom oksigenacijom**

Utjecaj HBO na komponente sustava renin-angiotenzin proučavan je u nekim dosadašnjim istraživanjima. U jednom manjem istraživanju provedenom na 8 profesionalnih ronioaca ispitivala se razina renina prije, tijekom i nakon izlaganja HBO. Bili su izloženi tlaku od 2,5 bara tijekom 60 minuta te nije zabilježena promjena u razini renina (22). Studija provedena na 54 bolesnika s kroničnim zatajenjem srca prvog i drugog stupnja tijekom HBO pokazala je normalizaciju reninske aktivnosti u plazmi, što može biti povezano s poboljšanim protokom krvi u bubrežima (23). U jednoj studiji u kojoj se određivao ljudski serumski proteomski profil, u uvjetima hiperbaričnog izlaganja mješavini kisika, dušika i argona, deveti dan izmjeren je porast koncentracije ANG II (24). U jednom istraživanju na dijabetičnim štakorima, HBO je značajno pojačao vaskularni odgovor na ANG-(1-7) što bi potencijalno moglo objasniti neke od uočenih pozitivnih učinaka HBO u patološkim stanjima, dok se serumska koncentracija ANG-(1-7) nije značajno promijenila (25). Rezultati još jednog istraživanja provedenog na Medicinskom fakultetu u Osijeku na Sprague-Dawley štakorima sugeriraju da intermitentna izloženost hiperbaričnoj oksigenaciji dovodi do povećanja aktivnosti ACE u serumu zdravih štakora, dok takav učinak nije zabilježen kod štakora s dijabetesom (26). U istraživanju provedenom također na zdravim muškim Sprague-Dawley štakorima, ELISA metodom analiziran je učinak HBO na serumsku razinu ANG-(1-7). Nije bilo statistički značajne razlike između kontrolne i HBO skupine (27). U studiji na novorođenim štakorima sa fibrozom pluća, povišen tlak kisika značajno je povisio razine komponenti sustava renin-angiotenzin, uključujući ANG, ACE, ANG II i AT1 receptore (28). Povišena koncentracija kisika također dovodi do značajnog povećanja RAS komponenata i proizvodnje ANG II u ljudskim fibroblastima pluća (29), dok je u fibroblastima pluća fetusa hiperoksija dovela do sniženja ACE2 (30). U još jednoj studiji na novorođenim štakorima, štakori koji su uzgajani pod hiperoksijom pokazali su značajno višu razinu ANG II, AT1 receptora i ACE od štakora izloženih sobnom zraku (31). Promjene ANG II i ACE mjereni su u različitim tkivima nakon duže izloženosti hiperoksiji. U prvoj grupi štakori su bili izloženi čistom kisiku, šest sati pod tlakom od 2,5 bara te se nakon mjerenja razina ANG II i ACE postupno povećavala, dok su u drugoj grupi bili štakori izlagani kisiku pod istim tlakom, dva uzastopna dana po dva puta dnevno u trajanju od 60 minuta te je izmjereno smanjenje razine ANG II i ACE.

Došlo se do saznanja kako produljena izloženosti kisiku može aktivirati komponente RAS-a (32).

Iz dosadašnjih istraživanja jasno je da hiperbarična oksigenacija može izazvati razne promjene u komponentama sustava renin-angiotenzin. Kako bi se u potpunosti moglo razumjeti djelovanje HBO, što je preduvjet adekvatne kliničke i eksperimentalne uporabe HBO, kao i poznavanje neželjenih učinaka i nuspojava HBO, potrebno je detaljno poznavati stanične i molekularne mehanizme HBO u organizmu. Dio tih mehanizama uključuje potencijalnu interakciju HBO s komponentama sustava renin-angiotenzin. U ovom radu nastojat će se istražiti ima li HBO utjecaj na plazmatsku razinu angiotenzina II kod zdravih Sprague-Dawley štakora.

## **2. HIPOTEZA**

Hipoteza ovog istraživanja je da hiperbarična oksigenacija dovodi do povećanja razine angiotenzina II u plazmi kod zdravih Sprague-Dawley štakora.

### **3. CILJ**

Cilj je ovog istraživanja ispitati utjecaj hiperbarične oksigenacije na plazmatsku razinu angiotenzina II kod zdravih Sprague-Dawley štakora, ELISA metodom.

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Ustroj studije**

Ova je studija ustrojena kao eksperimentalna studija na pokusnim životinjama (Sprague-Dawley štakori).

### **4.2. Eksperimentalne životinje**

Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku. Korišteni su zdravi laboratorijski Sprague- Dawley štakori muškog spola. Svi su štakori uzgojeni u Vivariju pri Medicinskom fakultetu u Osijeku. Uzgajani su u prozirnim kavezima sa standardnom hranom i neograničenom vodom.

Štakori su bili podijeljeni u dvije skupine:

- 1.) Kontrolna skupina (N = 8) - zdravi štakori koji nisu bili izloženi hiperbaričnoj oksigenaciji
- 2.) HBO skupina (N = 8) - štakori izloženi intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji

Postupak čuvanja eksperimentalnih životinja bio je u skladu s Europskom konvencijom o zaštiti kralješnjaka koji se koriste u eksperimentalne i druge znanstvene svrhe (Vijeće Europe br.123, Strasbourg 1985.) te su poduzete sve mjere kako bi se spriječila patnja životinja. Istraživanje je provedeno uz pozitivno mišljenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (klasa: 602-04/14-08/06, broj: 2158-61-07-14-124, u sklopu istraživanja prof.dr.sc. Ines Drenjančević: „Djelovanje kisika na vaskularnu funkciju u zdravlju i bolesti“).

### **4.3. Protokol hiperbarične oksigenacije**

Korištena je istraživačka hiperbarična komora za male eksperimentalne životinje (proizvođač Đuro Đaković, Aparati d.d., Slavonski Brod). Komora je priključena na spremnik stlačenog 100 % kisika pri čemu se za vrijeme izlaganja cjelokupna



unutrašnjost komore ispuni kisikom, uz kontrolu tlaka pomoću ventila i mjernih instrumenata.

U komori se nalazi i apsorpcijsko sredstvo za upijanje izdahnutog CO<sub>2</sub> (Drägesorb 800 Plus, DrägerMedical, Njemačka). Sa svake strane komore nalazi se okrugli prozor kroz koji se može pratiti stanje i ponašanje eksperimentalnih životinja.



**Slika 1.** Hiperbarična komora za eksperimentalne životinje (Laboratorij za fiziologiju cirkulacije, Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku).

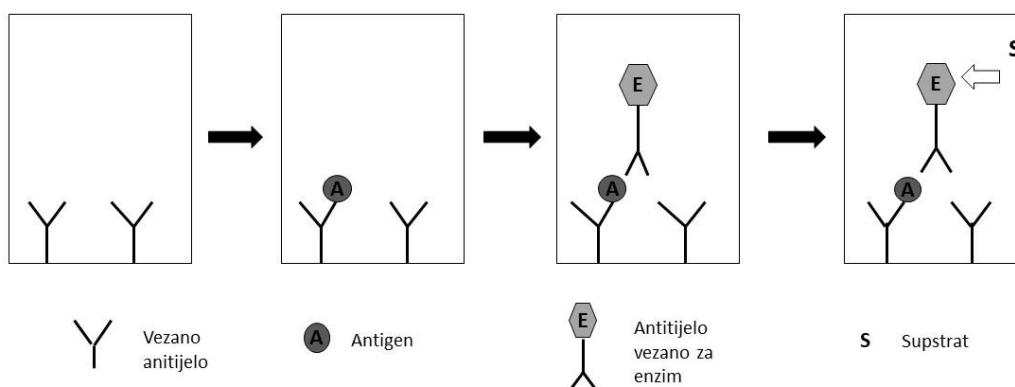
Štakori su bili izloženi djelovanju hiperbarične oksigenacije prema standardiziranom protokolu. Stavljani su u komoru jednom dnevno, četiri dana za redom (intermitentno izlaganje) u trajanju od 120 minuta, uz dodatnih 15 minuta za kompresiju na početku te 15 minuta za dekompresiju na kraju postupka. Izlaganje 100 % kisiku se izvodilo pod tlakom od 2 bara uz protok 2 - 3 L/min.

#### 4.4. Uzorkovanje i priprema uzorka

Štakori su anestetizirani kombinacijom ketamina 75 mg/kg (Ketanest S 25mg/ml, ampule 2ml, Pfizer) i midazolama 2,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma). Nakon djelovanja anestetika, životinje su dekapitirane te su prikupljeni uzorci krvi radi dobivanja plazme. Uzorci su centrifugirani 20 minuta na 3000 okretaja te pohranjeni u hladnjak na  $-80^{\circ}\text{C}$  do provođenja eksperimenta.

#### 4.5. Određivanje plazmatske koncentracije ELISA metodom

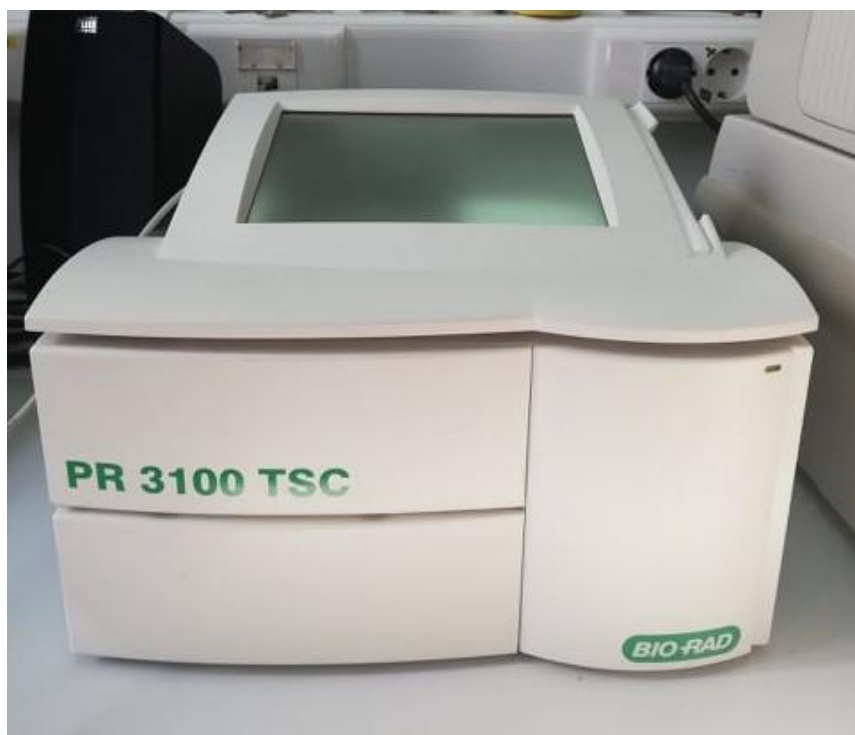
ELISA (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) heterogena je imunoenzimska metoda koji se temelji na interakciji antigen- antitijelo. Metoda zahtjeva čvrstu fazu, a za to se najčešće koriste mikrotitarske pločice. Ovisno koja se ELISA metoda koristi (izravna ili neizravna), na čvrstoj fazi se nalazi poznati antigen ili specifično antitijelo u koje se dodaje uzorak koji se ispituje te antitijelo ili antigen obilježen enzimom. Nakon inkubacije pločica se ispiru puferom kako bi se uklonio višak nevezanog antigena ili antitijela. Zatim se enzim detektira dodavanjem supstrata i spektrofotometrijskim mjerenjem enzimske aktivnosti koja je direktno proporcionalna količini antigena ili antitijela iz uzorka (33).



**Slika 2.** ELISA princip (izradila autorica)

Korišten je ELISA komercijalni kit za određivanje razine angiotenzina II u uzorcima štakorske plazme (BioVendor, Brno, Republika Češka, Kat. Br. RA05880R). Uzorci plazme prikupljeni su i analizirani prema uputi proizvođača, jednako u kontrolnoj i u HBO skupini. Specifično monoklonsko protutijelo za angiotenzin II imobilizirano je za jažice mikrotitarske pločice (pločica s 96 jažica). Nakon imunološke reakcije i ispiranja, molekula angiotenzina je kovalentno vezana glutaraldehidom za pločicu preko amino skupina. Zatim je nakon ispiranja i denaturiranja angiotenzin II ponovno reagirao s monoklonskim antitijelom označenim acetilkolinesterazom (AChE konjugat). Pločica se zatim isprala i u jažice se dodala otopina supstrata (Ellmanov reagens). AChE konjugat djelovao je na otopinu supstrata kako bi se dobio žuti spoj. Intenzitet boje očitana je spektrofotometrijski i proporcionalan je količini konjugata vezanog za jažice, odnosno količini angiotenzina II.

Apsorbancija je očitana na čitaču mikrotitarskih pločica (ELISA) - BioRad 93200 PR3100 TSC Microplate Reader, na valnoj duljini od 414 nm. Pomoću razrjeđenja standarda je prema uputama izrađena koncentracijska krivulja te je pomoću nje iz apsorbancije uzorka i standarda određena koncentracija angiotenzina II iz uzorka.



**Slika 3.** Čitač mikrotitarskih pločica (ELISA)

#### 4.6. Statističke metode

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Korišten je statistički program SigmaPlot 11.2 (Systat Software, Inc.). Normalnost raspodjele (nezavisnih) uzoraka ispitana je Shapiro-Wilk testom. U slučaju normalne raspodjele, razlike između kontrolne i eksperimentalne skupine analizirane su pomoću studentovog t- testa, a u slučaju da raspodjela nije bila normalna upotrijebljen je Mann-Whitney U test. Razlika se smatrala statistički značajnom uz  $P < 0,05$ .

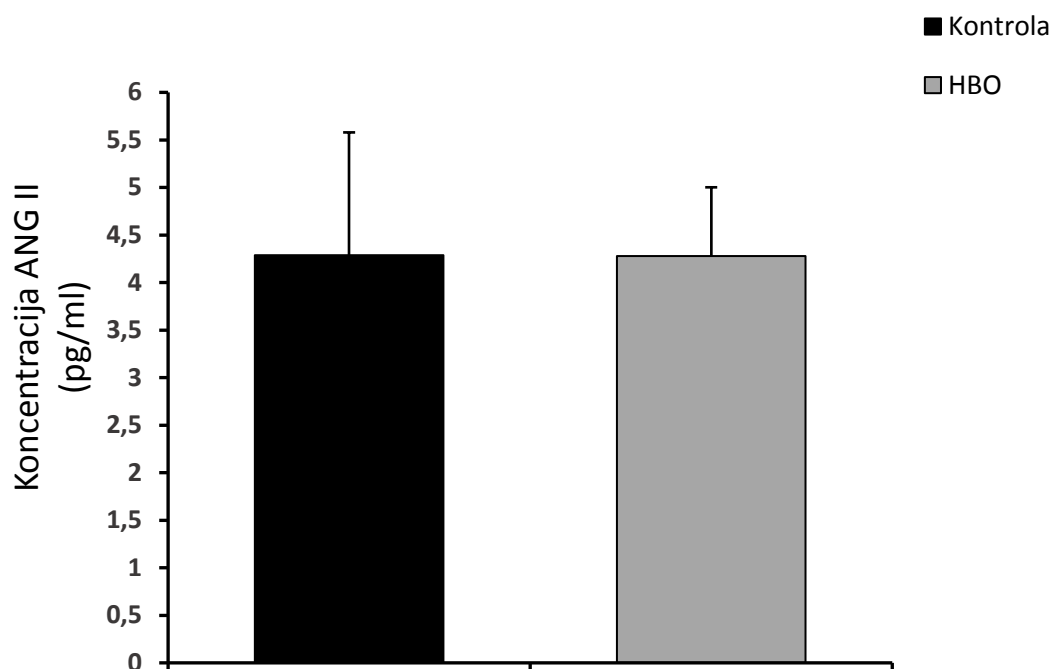
## 5. REZULTATI

U istraživanju su korišteni zdravi muški Sprague-Dawley štakori kojima je prije i nakon izlaganja HBO izmjerena tjelesna masa i GUK. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija.

**Tablica 1.** Tjelesna masa i razina glukoze u krvi (GUK) s obzirom na izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji (HBO).

	Masa (g)	GUK (mmol/L)
Kontrola	372,87 (38)	6 (0,4)
HBO	341,5 (36)	6,063 (0,7)

ELISA metodom analiziran je učinak HBO na plazmatsku koncentraciju ANG II u zdravih štakora. Slika 4. prikazuje rezultate. Nema statistički značajne razlike u koncentraciji ANG II (pg/ml) između kontrolne (4,288 (1,3)) i HBO skupine (4,279 (0,72)) (P = 0,328, Mann Whitney U test).



**Slika 4.** Plazmatska koncentracija ANG II u zdravih štakora, određena ELISA metodom. N [kontrola] = 8, N [HBO] = 8. Stupci označuju aritmetičku sredinu, a okomita crta s graničnikom standardnu devijaciju.

## 6. RASPRAVA

HBO medicinska je metoda koja podrazumijeva upotrebu 100 % kisika pri tlaku iznad razine atmosferskog tlaka, najčešće 2,0 do 2,5 bara te se koristi u terapijske ili eksperimentalne svrhe. Budući da je kisik iznimno reaktivna molekula, pod njegovim utjecajem između ostaloga može doći do promjene izražajnosti različitih enzima te promjene proizvodnje njihovih metaboličkih produkata (34). Kao što je već navedeno, sustav renin-angiotenzin ima ključnu ulogu u regulaciji arterijskog krvnog tlaka, vaskularnoj funkciji te regulaciji homeostaze elektrolita i tjelesnih tekućina, a njegov konačni produkt ANG II ima brojne učinke u cirkulaciji i bubrezima. Iako, unatoč dugogodišnjoj eksperimentalnoj uporabi točna saznanja o mehanizmima djelovanja HBO nisu potpuna, neka dosadašnja istraživanja pokazala su da bi hiperbarični uvjeti mogli dovesti do promjena koncentracije ili učinka nekih komponenti sustava renin-angiotenzin, (22 - 32) što se u ovom radu nastojalo i dodatno istražiti.

Ova studija ispituje utjecaj hiperbarične oksigenacije na plazmatsku razinu ANG II kod zdravih muških Sprague-Dawley štakora. U prvoj skupini bili su zdravi netretirani štakori (kontrola), dok su u drugoj skupini bili štakori izloženi djelovanju intermitentne hiperbarične oksigenacije (HBO skupina). Mjerenje razine ANG II napravljeno je ELISA metodom prema standardiziranom protokolu na uzorcima plazme. Rezultati ELISA metode pokazali su da HBO ne mijenja značajno plazmatsku razinu ANG II kao što je vidljivo na slici 4, nasuprot početnoj hipotezi gdje je predviđeno povećanje razine ANG II. Kao što je već navedeno, prijašnji radovi pokazali su različite rezultate o utjecaju HBO na komponente sustava renin-angiotenzin. Tako je između ostaloga otkriveno kako povišen tlak kisika dovodi do smanjenja razine ANG II i ACE pri izlaganju kisiku dva uzastopna dana, dva puta dnevno u trajanju po 60 minuta, pod tlakom od 2,5 bara (32) te smanjenja razine ACE2 kod izlaganja > 95 % kisiku 72 sata (30), ne mijenja razinu renina, ANG-(1-7) (22, 25, 27) ili dovodi do porasta razine ACE pri istom intermitentnom protokolu kao u ovom radu (26), dovodi do porasta razine ANG II, ACE i AT1 receptora izlaganjem > 95 % kisiku tjedan dana (28, 31) te porasta razine ANG II i ACE pri izlaganju kisiku 6 sati pod tlakom od 2,5 bara (32).

Rezultat ovog istraživanja u kojem HBO značajnije ne mijenja razinu ANG II u plazmi, uzimajući u obzir dobivene oprečne rezultate dosadašnjih istraživanja, pokazuje da u danom eksperimentalnom protokolu (intermitentnog izlaganja na gore opisani način), u zdravih Sprague-Dawley štakora, HBO nije značajnije utjecala na razinu komponenata

sustava renin-angiotenzin (22, 25, 27). Te oprečne rezultate moguće je povezati s korištenjem različitih protokola hiperbarične oksigenacije, odnosno uporabom drukčijeg tlaka kisika, vremena izlaganja ili eksperimentalnih modela i tjelesnih uzoraka uopće. Također, važno je napomenuti kako su dobiveni rezultati vrlo važni za unaprjeđenje saznanja i razumijevanja učinaka HBO u cirkulaciji. Podatak da HBO ne mijenja bitno plazmatsku koncentraciju ANG II pridonosi boljoj interpretaciji opaženih učinaka HBO na vaskularnu funkciju, primjerice na pojačanje vaskularnih odgovora na ANG-(1-7) (25). S obzirom da bi različita koncentracija ANG II u HBO mogla utjecati na vaskularne odgovore na ANG-(1-7), jednaka koncentracija u HBO skupini u odnosu na kontrolnu skupinu sugerira da HBO ima direktan učinak na promjenu same vaskularne reaktivnosti. Nadalje, podaci dobiveni ovim istraživanjem uspostavljaju referentne podatke učinka HBO na plazmatsku koncentraciju ANG II za specifični protokol koji se koristi za istraživanje intermitentnog izlaganja HBO u Laboratoriju za istraživanje cirkulacije Medicinskog fakulteta u Osijeku. Taj konkretni protokol već je više puta korišten za istraživanja HBO te će i za brojna buduća istraživanja koja će koristiti ovaj HBO protokol dobiveni podaci o ANG II koncentraciji biti referentni i time temelj za interpretaciju budućih rezultata.



## **7. ZAKLJUČAK**

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti da hiperbarična oksigenacija ne utječe značajno na plazmatsku razinu angiotenzina II kod zdravih Sprague-Dawley štakora.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Cilj je ovog istraživanja ispitati utjecaj hiperbarične oksigenacije na plazmatsku razinu angiotenzina II kod zdravih Sprague-Dawley štakora.

**Nacrt studije:** Istraživanje je eksperimentalna (pokusna) studija.

**Materijali i metode:** U istraživanje su bili uključeni zdravi laboratorijski Sprague-Dawley štakori muškog spola, podijeljeni u dvije skupine: Kontrolna skupina (N = 8) - zdravi netretirani štakori te HBO skupina (N = 8) - štakori izloženi intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (četiri dana po dva sata, pod tlakom od 2 bara). Nakon anestezije, štakori su dekapitirani te su prikupljeni uzorci krvi i centrifugirani kako bi se dobila plazma. Iz uzoraka plazme spektrofotometrijskom metodom ELISA određena je koncentracija angiotenzina II.

**Rezultati:** Nisu utvrđene statistički značajne razlike u koncentraciji ANG II između kontrolne i HBO skupine.

**Zaključak:** Hiperbarična oksigenacija, u okviru specifičnog korištenog protokola, ne mijenja značajno razinu angiotenzina II u plazmi zdravih muških Sprague-Dawley štakora.

**Ključne riječi:** angiotenzin II; ELISA; hiperbarična oksigenacija

## 9. SUMMARY

### **The effect of hyperbaric oxygenation on plasma angiotensin II levels in healthy Sprague-Dawley rats**

**Objective:** The objective of this study is to determine the effect of hyperbaric oxygenation on plasma angiotensin II levels in healthy Sprague-Dawley rats.

**Study design:** The study is structured as an experimental study.

**Material and methods:** The study included healthy male Sprague-Dawley lab rats, divided into two groups: Control group (N = 8) - healthy untreated rats and HBOT group (N = 8) - rats exposed to intermittent hyperbaric oxygenation (4 days at 2 hours, under pressure of 2 bar). After anesthesia, the rats were decapitated and blood samples were collected and centrifuged to obtain plasma. Plasma samples were determined by the spectrophotometric method ELISA for concentrations of angiotensin II.

**Results:** No statistically significant difference in ANG II concentration were found between the control and HBO groups.

**Conclusion:** Hyperbaric oxygenation, in the context of the specific protocol that has been used, does not significantly alter plasma angiotensin II levels in healthy male Sprague-Dawley rats.

**Keywords:** angiotensin II; ELISA; hyperbaric oxygenation

**10. LITERATURA**

1. Bilić I, Petri NM. Hiperbarična oksigenacija u liječenju infekcija središnjeg živčanog sustava. *Infektološki glasnik*. 2013;33:4,177–181.
2. Barilaro G, Masala IF, Parracchini R, Iesu C, Caddia G, Sarzi- Puttini P i sur. The Role of Hyperbaric Oxygen Therapy in Orthopedics and Rheumatological Diseases. *IMAJ*. 2017;19:429-434.
3. Thom SR. Hyperbaric oxygen – its mechanisms and efficacy. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127:131–141.
4. Gill AL, Bell CNA. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM*. 2004;97:385–395.
5. Marinović M, Fumić N, Reinić B, Barković I, Marcucci E, Brusić J, i sur. Hiperbarična oksigenacija u Kliničkom bolničkom centru Rijeka. *Acta Med Croatica*. 2016;70:83-91.
6. Poliklinika OXY. Hiperbarična oksigenacija (HBOT). Dostupno na adresi: <http://oxy.hr/hiperbaricna-oksigenacija-hbot/lijecenje-kisikom/lijecenje-primjenom-hiperbaricne-oksigenacije>. Datum pristupa: 26.06.2019.
7. Chng J, Low CT, Kang WL. The development of hyperbaric and diving medicine in Singapore. *Singapore Med J*. 2011; 52:901-5.
8. Jacoby I. Emergency medicine: indications for hyperbaric oxygen therapy. *West J Med*. 1987; 146:608.
9. Londahl M. Hyperbaric oxygen therapy as treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012; 28 Suppl 1:78-84.
10. Simsek K, Oter S, Ay H. Hyperbaric oxygen therapy and its mechanisms of action: implication of several molecular processes along with reactive species. *Jeim*. 2011;1(4):205-206.
11. Bhutani S, Vishwanath G. Hyperbaric oxygen and wound healing. *Indian J Plast Surg*. 2012;45(2):316-324.
12. Ljutić D, Jeličić I. Lijekovi koji djeluju na renin- angiotenzin- aldosteronski sustav. *Medicus*. 2010;2:139-146.

13. Benigni A, Cassis P, Remuzzi G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol Med.* 2010;2:247-57.
14. Abadir PM. The Frail Renin- Angiotensin System. *Clin Geriatr Med.* 2011;27(1):53-65.
15. Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirososou M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin System in Kidney Physiology. *Compr Physiol.* 2014;4(3):1201-1228.
16. ATLAS SA. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. *J Manag Care Pharm.* 2007;13:9-20.
17. Guyton AC, Hall, JE. *Medicinska fiziologija*. Jedanaesto izdanje: Medicinska naklada, Zagreb; 2006.
18. de Farias Lelis D, de Freitas DF, Souto Machado A, Soares Crespo T, Sousa Santos SH. Angiotensin-(1-7), Adipokines and Inflammation. *PlumX Metrics.* 2019;95:36-45.
19. Schindler C, Bramlage P, Kirch W, Ferrario CM. Role of vasodilator peptide angiotensin-(1-7) in cardiovascular drug therapy. *Vasc Health Risk Manag.* 2007;3(1):125-137.
20. Santos RA. Angiotensin-(1-7). *Hypertension.* 2014;63:1138-1147.
21. Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, Tapias da Mata Machado L, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) Through Receptor Mas Mediates Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation via Akt-Dependent Pathways. *Hypertension.* 2007;49:185-192.
22. Lund V, Kentala E, Scheinin H, Klossner J, Koskinen P, Jalonen J. Effect of hyperbaric conditions on plasma stress hormone levels and endothelin-1. *Undersea Hyperb Med.* 1999; 26:87-92.
23. Khaidarova G, Borukhova ES, Asinova MI. Effect of hyperbaric oxygenation on the status of the renin-angiotensin-aldosterone system in chronic circulatory insufficiency in elderly patients with ischemic heart disease. *Anesteziol Reanimatol.* 1989:33-5.
24. Pakharukova NA, Pastushkova L, Popova YA, Trifonova OP, Larina IM. Study of normal human serum proteomic profile under conditions of hyperbaric oxygen-nitrogen-argon exposure. *Bull Exp Biol Med.* 2010;149:37-9.
25. Kibel A, Novak S, Ćosić 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;12:33-45.

26. Kibel A, Šerić V, Drenjančević I. Hyperbaric Oxygen Treatment Increases Serum Angiotensin-Converting Enzyme Activity Levels in Healthy but not in Diabetic Rats. *Journal of Hypertension*. 2016;34:326-327.
27. Kibel A. (2013.) Modulacija vaskularih odgovora na angiotensin II i angiotenzin (1-7) hiperbaričnom oksigenacijom-uloga CYP enzima. Doktorska disertacija. Osijek: Medicinski fakultet.
28. Jiang JS, Lang YD, Chou HC, Shih CM, Wu TY, Chen CM i sur. Activation of the renin-angiotensin system in hyperoxia-induced lung fibrosis in neonatal rats. *Neonatology*. 2012;101(1):47-54.
29. Lang YD, Hung CL, Wu TY, Wang LF, Chen CM. The renin-angiotensin system mediates hyperoxia-induced collagen production in human lung fibroblasts. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(1):88-95.
30. Oarhe CI, Dang V, Dang M, Nguyen H, Gopallawa I, Gewolb IH i sur. Hyperoxia downregulates angiotensin-converting enzyme-2 in human fetal lung fibroblasts. *Pediatric Research*. 2015;77:656-662.
31. Chung- Ming C, Hsiu- Chu C. Human mesenchymal stem cells attenuate hyperoxia-induced lung injury through inhibition of the renin-angiotensin system in newborn rats. *Am J Transl Res*. 2018; 10(8):2628–2635.
32. Han CH, Zhang PX, Liu Y, Zheng J, Liu K, Wei D i sur. Changes in angiotensin II and angiotensin-converting enzyme of different tissues after prolonged hyperoxia exposure. *Undersea Hyperb Med*. 2017;44(1):39-44.
33. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
34. Drenjancevic I, Kibel A, Kibel D, Seric V, Cosic 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;40:319-28.

## 11. ŽIVOTOPIS

### **Osobni podaci:**

Ime i prezime: Maja Begović

Datum i mjesto rođenja: 12. 08. 1995., Požega

Adresa: S. Radića 52 Mihaljevci, 34000 Požega

Mobitel: 098 973 3435

E-mail: begovic.maja95@gmail.com

### **Obrazovanje:**

2017. do danas - Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku,

Medicinski fakultet Osijek

Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike

2014. – 2017. Zdravstveno veleučilište Zagreb

Stručni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

2010. – 2014. Gimnazija Požega

### **Posebna znanja i vještine:**

Jezici: engleski

Računalne vještine: MS Office

Vozačka dozvola: B kategorija