

Utjecaj hiperbarične oksigenacije na promjenu serumske koncentracije oksidiranih lipoproteina niske gustoće i naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda kod Sprague-Dawley štakora

Domazet, Ivana

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:152:632889>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-21**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Ivana Domazet

**UTJECAJ HIPERBARIČNE
OKSIGENACIJE NA PROMJENU
SERUMSKE KONCENTRACIJE
OKSIDIRANIH LIPOPROTEINA NISKE
GUSTOĆE I NAPREDNIH
OKSIDIRANIH PROTEINSKIH
PROIZVODA KOD SPRAGUE-DAWLEY
ŠTAKORA**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Ivana Domazet

**UTJECAJ HIPERBARIČNE
OKSIGENACIJE NA PROMJENU
SERUMSKE KONCENTRACIJE
OKSIDIRANIH LIPOPROTEINA NISKE
GUSTOĆE I NAPREDNIH
OKSIDIRANIH PROTEINSKIH
PROIZVODA KOD SPRAGUE-DAWLEY
ŠTAKORA**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

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

Mentor: doc. dr. sc. Anita Matić, dipl. ing.

Rad ima 28 listova, tri (3) tablice i tri (3) slike.

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Aniti Matić, dipl. ing., koja je pratila proces pisanja završnog rada i koja me je svojim znanjem savjetovala i usmjeravala k završetku studija. Zahvaljujem i svojoj obitelji koja mi je pružala podršku i omogućila školovanje te završetak studija.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Terapija hiperbaričnim kisikom (HBO ₂).....	1
1.2. Oksidativni stres	2
1.3. Markeri oksidativnog stresa.....	4
1.3.1. Oksidirani lipoproteini niske gustoće (oxLDL)	4
1.3.2. Napredni oksidirani proteinski proizvodi (AOPP).....	5
2. HIPOTEZA	7
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	8
4. MATERIJALI I METODE.....	9
4.1. Ustroj studije	9
4.2. Eksperimentalni životinjski model	9
4.3. Metode.....	10
4.3.1. Protokoli izlaganja hiperbaričnom kisiku	10
4.3.2. Mjerenje krvnoga tlaka	10
4.3.3. Prikupljanje uzoraka seruma i postupak provođenja ELISA metode	11
4.3.4. Određivanje koncentracije oksidiranih lipoproteina niske gustoće (oxLDL)	12
4.3.5. Određivanje koncentracije naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda (AOPP).....	13
4.4. Statistička obrada podataka	14
5. REZULTATI.....	15
5.1. Serumska koncentracija naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda	16
5.2. Serumska koncentracija oksidiranih lipoproteina niske molekularne gustoće	16
6. RASPRAVA	18
7. ZAKLJUČAK	21
8. SAŽETAK	22
9. SUMMARY	23
10. LITERATURA.....	24
11. ŽIVOTOPIS	28

POPIS KRATICA

4D-HBO ₂	štakori izloženi intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji
AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorid (engl. <i>2,2'-azobis (2-amidinopropane dihydrochloride)</i>)
A-HBO ₂	štakori izloženi akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji
ANG II	angiotenzin II
ANG-(1-7)	angiotenzin-(1-7)
AOPP	napredni oksidirani proteinski proizvod (engl. <i>advanced oxidation protein product</i>)
apo B	apolipoprotein B (engl. <i>apolipoprotein b</i>)
BH ₄	tetrahidrobiopterin (engl. <i>tetrahydrobiopterin</i>)
CAT	katalaza (engl. <i>catalase</i>)
CO ₂	ugljkov (IV) oksid (engl. <i>carbon dioxide</i>)
CYP450	citokrom P450 (engl. <i>cytochrome P450</i>)
EETs	epoksieikozatrienoične kiseline (engl. <i>epoxyeicosatrienoic acids</i>)
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	endotelna NO sintetaza (engl. <i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
FRAP	sposobnost plazme da reducira željezo (engl. <i>ferric reducing ability of plasma</i>)
GPx	glutation peroksidaza (engl. <i>glutathione peroxidase</i>)
H ₂ O ₂	vodikov peroksid (engl. <i>hydrogen peroxide</i>)
HBO ₂	hiperbarični kisik (engl. <i>hyperbaric oxygen</i>)
HClO	hipoklorasta kiselina (engl. <i>hypochlorous acid</i>)
HO	hidroksil (engl. <i>hydroxyl</i>)
HRP	peroksidaza iz hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)

IL-8	interleukin 8 (engl. <i>interleukin 8</i>)
LDL	lipoproteini niske gustoće (engl. <i>low-density lipoprotein</i>)
MDA	malonildialdehid (engl. <i>malondialdehyde</i>)
MM-LDL	minimalno modificirani LDL (engl. <i>minimally modified LDL</i>)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. <i>nicotinamide adenin dinucleotide phosphate</i>)
NO	dušikov (II) oksid (engl. <i>nitric oxide</i>)
O ₂	kisik (engl. <i>oxygen</i>)
O ₂ ⁻	superoksid (engl. <i>superoxide</i>)
ONOO ⁻	peroksinitrit (engl. <i>peroxynitrite</i>)
oxLDL	oksidirani lipoproteini niske gustoće (engl. <i>oxidized low-density lipoprotein</i>)
pCO ₂	parcijalni tlak ugljikovog dioksida (engl. <i>pressure of carbon dioxide</i>)
pO ₂	parcijalni tlak kisika (engl. <i>pressure of oxygen</i>)
RNS	reaktivne dušikove vrste (engl. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
SOD	superoksid dismutaza (engl. <i>superoxide dismutase</i>)
TBARS	reaktivne tvari tiobarbiturne kiseline (engl. <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>)
VEGF	čimbenik rasta vaskularnog endotela (engl. <i>vascular endothelia growth factor</i>)

1. UVOD

1.1. Terapija hiperbaričnim kisikom (HBO₂)

Terapija hiperbaričnim kisikom (HBO₂) medicinski je tretman pri čemu pacijent udiše 100 %-tni kisik pri tlaku većem od 1 atmosfere dok je smješten u tlačnoj komori (1). I do 20 puta više kisika otapa se udisanjem hiperbaričnog kisika u krvi, nego udisanjem zraka, tj. normalnim disanjem ili tri do četiri puta više nego udisanjem kisika pri normalnom tlaku. Kisik se prenosi vezan za hemoglobin (približno 97 %) i otopljen u plazmi (3 %) u normalnim uvjetima. Topljivost kisika u plazmi, njegova doprema do tkiva i oksigenacija tkiva povećava se tijekom hiperbarične oksigenacije u kojoj se povećava parcijalni tlak kisika. S obzirom na to da je kisik visoko reaktivna molekula, dolazi do formiranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) pri visokim parcijalnim tlakovima, kao što je u hiperbaričnoj oksigenaciji (2). Kod HBO₂ povećava se količina otopljenog kisika u plazmi, što olakšava isporuku kisika neovisno o hemoglobinu. To je postignuto uglavnom ponavljajućim hiperbaričnim izlaganjima tijekom 90 do 120 minuta tlaku od 2,0 do 2,5 bara kod ljudi s kliničkim stanjima ili eksperimentalnih životinja (3). Tretmani često uključuju tzv. zračne stanke, gdje pacijent udiše samo zrak 5 minuta jednom ili dva puta tijekom tretmana. Pokazalo se da ta intervencija povećava toleranciju pluća na kisik. Terapijski mehanizmi djelovanja hiperbaričnog kisika temelje se na podizanju parcijalnog tlaka kisika i hidrostatskog tlaka. Podizanjem hidrostatskog tlaka povećava se parcijalni tlak plinova i uzrokuje smanjenje volumena prostora ispunjenih plinovima. Navedeno ima izravan značaj za liječenje patoloških stanja u kojima su prisutni mjehurići plina u tijelu poput arterijske plinske embolije i dekompresijske bolesti. Međutim, većina pacijenata koji se podvrgavaju terapiji hiperbaričnim kisikom ne liječe se zbog ozljeda izazvanih mjehurićima, pa su stoga terapijski mehanizmi povezani s povišenim parcijalnim tlakom kisika. Lokalna i/ili opća hipoksija ispravlja se velikom brzinom difuzijom kisika otopljenog u krvi prema tkivima. Arterijski i tkivni pO₂ povećava se uslijed dopreme kisika pod visokim tlakom, što poboljšava oksigenaciju tkiva i smanjuje oštećenja (2).

HBO₂ smanjuje razine proupalnih citokina u stresnim uvjetima te povećava sintezu mnogih čimbenika rasta u ozlijeđenim tkivima ili izoliranim stanicama. HBO₂ ne mijenja razine inzulina, čimbenika rasta sličnih inzulinu ili proupalnih citokina kod zdravih ljudi.

Također, u ozlijeđenom tkivu HBO_2 povećava sintezu čimbenika rasta vaskularnog endotela (VEGF) koji je najspecifičniji čimbenik rasta neovaskularizacije (2).

Terapija hiperbaričnim kisikom pridonosi cijeljenju ishemičnih ulceracija kod osoba oboljelih od dijabetesa, liječenju odgođenih ozljeda zračenjem (2), poboljšava ishod nakon infarkta miokarda (4), moždanog udara (5), akutne periferne ishemije ekstremiteta kod ljudi (6). HBO_2 može pridonijeti poboljšanju kognitivnog i memorijskog oštećenja kod Alzheimerove bolesti (7), smanjenju oksidativnog stresa kod Parkinsonove bolesti (8) te zaštiti protiv kognitivnog oštećenja uzrokovanog D-galaktozom tako što smanjuje oksidacijsko oštećenje, potiskuje upalne odgovore i regulira ekspresiju gena povezanu sa starenjem (9). Također, HBO_2 koristi se za poboljšavanje liječenja infekcija poput plinske gangrene (10) i meningokokne sepse (11). Nadalje, terapija hiperbaričnim kisikom preporučena je za kliničke indikacije poput trovanja ugljikovim monoksidom, otvorenih prijeloma, dekompresijske bolesti, plinske embolije, bakterijskih infekcija, iznenadne gluhoće, replantacije amputiranog dijela tijela, kroničnog refraktornog osteomijelitisa, opeklina, okluzije središnje arterije mrežnice, bolesti srpastih stanica, intersticijalnog cistitisa, neuroblastome (stadij IV) itd. (12). Sama po sebi ili, ako se koristi samo u poslijeoperativnom razdoblju, HBO_2 često je nedostatan oblik liječenja. Da bi postigla svoju učinkovitost, potrebno je da se terapija hiperbaričnim kisikom koristi sa standardnim kirurškim tehnikama (2).

1.2. Oksidativni stres

Oksidativni stres opisuje neravnotežu između proizvodnje slobodnih kisikovih radikala i njihovog učinkovitog uklanjanja antioksidansima i enzimima (13). Oksidativni stres posljedica je prekomjerne produkcije reaktivnih kisikovih spojeva (oksidansi, radikali) do koje dolazi uslijed poremećaja u ravnoteži oksidacijsko-redukcijskih procesa u biološkim sustavima. Odnosno, u biokemijskim sustavima oksidansi imaju sposobnost predavanja elektrona, dok sposobnost primanja elektrona imaju antioksidansi (reducensi) (14).

Slobodni radikali kemijske su čestice koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj ljusci te imaju visok stupanj reaktivnosti, odnosno brzog spajanja s proteinima, lipidima, nukleinskim kiselinama i ugljikohidratima, što može rezultirati oštećenjem tkiva (14). Reaktivne kisikove vrste (ROS) normalno se proizvode tijekom staničnog disanja i

upalnog obrambenog mehanizma (13). ROS nastaju kao prirodni nusproizvodi metabolizma i uključuju superoksid (O_2^-), vodikov peroksid (H_2O_2), hipoklorastu kiselinu ($HClO$) i hidroksil (HO). ROS se u mnogim organima povećava hiperoksijom. Borba protiv prekomjerne proizvodnje reaktivnih vrsta vrši se uklanjanjem pomoću antioksidanasa (2). Enzimski antioksidansi koji sudjeluju pri neutralizaciji ROS-a su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GPx) te enzim ovisan o selenu. U neenzimske antioksidanse ubrajamo vitamin E, vitamin C, β -karoten i hem vezane proteine (13).

Enzimi koji mogu proizvesti kisikove radikale su ksantin oksidaza, ciklooksigenaza, lipoksigenaza, nevezana endotelna NO sintetaza (eNOS), citokrom P450 i mitohondrijski elektronski lanac. Najvažnije su NADPH oksidaze, koje se ističu kao glavni izvor ROS-a, zato što su jedina poznata obitelj enzima posvećena isključivo proizvodnji ROS-a, dok svi drugi poznati enzimi proizvode ROS kao nusproizvod (15).

ROS posreduju toksičnost O_2 , što za HBO_2 obuhvaća ozljede pluća, učinke središnjeg živčanog sustava i učinke na oči. ROS i reaktivne dušikove vrste (RNS) služe, također, kao signalne molekule u transdukciji ili putevima za različite čimbenike rasta, citokine i hormone. RNS uključuju dušikov (II) oksid (NO) i agense koji nastaju reakcijama između NO, ili njegovih oksidacijskih produkata, i ROS-a. Kao takve, reaktivne vrste mogu proizvesti ili pozitivne ili negativne učinke, ovisno o njihovoj koncentraciji i unutarstaničnoj lokalizaciji (2). Kisikovi radikali smanjuju staničnu razinu NO-a koji ima predominantnu ulogu u vazodilataciji velikih provodnih arterija, povećavaju ekspresiju adhezijskih molekula (P-selektin), lipidnih medijatora upale poput trombocitnog aktivirajućeg čimbenika, leukotriena B4 te citokina (IL-8). Tako dovode do endotelne disfunkcije (13).

ROS izravno smanjuje bioraspoloživost NO-a tako što NO reagira s viškom superoksida formirajući peroksinitrit ($ONOO^-$). ROS indirektno utječu na bioraspoloživost NO-a tako što oksidiraju NOS redoks osjetljivi kofaktor tetrahidrobiopterin (BH_4) i tako mijenjaju svrhu eNOS-a koji onda proizvodi superoksid umjesto NO-a. Također, ROS smanjuju djelovanje NO-a tako što djeluju na NO receptor, topljivu gvanilil ciklazu, oksidirajući hem (15).

Klinička procjena oksidativnog stresa *in vivo* bazirana je na mjerenju stabilnih oksidacijskih produkata modificiranih lipida, proteina, ugljikohidrata i nukleinskih kiselina jer kisikovi radikali imaju vrlo kratko vrijeme poluživota. Najčešće korišteni biljeg oksidativnog stresa, koji nastaje enzimatskom peroksidacijom nezasićenih masnih kiselina, je

malonildialdehid (MDA). Neenzimatskim procesom iz arahidonske kiseline i djelovanjem radikala na membranske fosfolipide dobije se 8-izoprostan koji je izomer F₂-izoprostana. Napredni oksidirani proteinski proizvodi (AOPP) markeri su proteinske oksidacije (16). Također, markeri oksidativnog stresa oksidirani su lipoproteini niske gustoće (oxLDL) (17).

1.3. Markeri oksidativnog stresa

1.3.1. Oksidirani lipoproteini niske gustoće (oxLDL)

Oksidirani lipoproteini niske gustoće (oxLDL) mogu se definirati kao čestice koje su dobivene iz cirkulirajućeg LDL-a, koje mogu imati perokside ili njihove razgradne produkte. OxLDL može sadržavati specifičan oksidacijski proizvod. Najjednostavniji primjer može biti LDL koji je tretiran lipooksigenazom. Lipoprotein koji je podvrgnut tom tretmanu može sadržavati različite količine fosfolipida i hidroperoksida, estera kolesterola (17).

Oksidacija LDL-a složen je proces tijekom kojeg se i proteini i lipidi podvrgavaju oksidativnim promjenama i oblikuju kompleksne proizvode. Primjerice, neenzimske oksidativne promjene u aminokiselinama, kao i proteoliza i križne veze u apo B, mogu rezultirati opsežnim promjenama u sastavu i strukturi proteina. Također, peroksidirani lipidi razgrađuju se stvarajući slobodne i jezgrine aldehide i ketone koji kovalentno modificiraju ε-amino skupine lizinskih ostataka proteina. Navedeno ne samo da stvara Schiffove baze tako da modificiraju naboje na aminokiselinama već, također, rezultira i intramolekularnim i intermolekularnim križnim vezama između preteoliziranog apo B. Nije ni čudno što je onda LDL oštećen do te mjere da ga razgrađuju makrofagi (18).

OxLDL može sadržavati ograničene količine raznih degradiranih oksidiranih lipidnih proizvoda. Za takav kriterij može se kvalificirati minimalno modificirani LDL (MM-LDL). MM-LDL može imati lipidne perokside ili njihove razgradne produkte, ali ne i promijenjene apoproteine, MDA modificirane čestice s MDA koji proizlazi iz trombocita ili drugdje, i drugo (17). MM-LDL, koji je bio minimalno ili blago oksidiran, ima vrlo malo MDA, ali ima proupalna svojstva (18). Postoji i oxLDL koji prepoznaju makrofagi. Iako se dugo vjerovalo da su promjene proteina nužne za prepoznavanje makrofaga, čini se da barem neke studije sugeriraju da oksidirani lipidi mogu posredovati cijeli unos oxLDL-a (17).

Nisu svi oksidacijski mehanizmi usporedivi ili dovode do sličnih proizvoda, čak i u *in vitro* uvjetima. Primjerice, oksidacije posredovane peroksidazom zahtijevaju ko-oksidanse kao što su H₂O₂ ili lipidni peroksidi. Tretiranje LDL-a, primjerice, 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidrokloridom (AAPH), radikalnim generatorom ili peroksinitritom rezultira većom oksidacijom proteina nego peroksidacijom lipida (17).

Masne kiseline imaju glavnu ulogu u stvaranju mnogih proizvoda i oxLDL-a. Polinezasićene masne kiseline pogoduju oksidaciji LDL-a, dok su mononezasićene masne kiseline manje pogodne za stvaranje oxLDL-a. Zatim, proteinska komponenta LDL-a, apo B, može odrediti kako se oksidacija širi unutar čestice. Također, specifične aminokiseline mogu izazvati i propagirati oksidaciju (17).

Reakcije koje su u prirodi oksidativne nisu jednako podložne inhibiciji tradicionalnim antioksidansima. Vitamin E ili jednostavni fenoli, poput tirozina ili estradiola, zapravo pojačavaju oksidaciju LDL-a posredovanu peroksidazom. Slično tome, mnogi tioli zapravo pojačavaju oksidaciju LDL-a ovisno o sadržaju peroksida u LDL-u (17).

Za detekciju minimalno ili terminalno oksidiranog LDL-a koristi se prisutnost i količina MDA. Brojne publikacije zaključile su da je kratkotrajna oksidacija uvijek rezultirala blago oksidiranim LDL-om za razliku od dugoročnih oksidacija. Ipak, enzimske (lipooksigenaza, peroksidaza) reakcije i liječenje peroksinitritom, koji su proizveli manje količine MDA, smatrani su uvijek potpuno oksidiranim LDL-om zbog sposobnosti makrofaga da zahvate takve LDL-ove (17).

1.3.2. Napredni oksidirani proteinski proizvodi (AOPP)

Napredni oksidirani proteinski proizvodi (AOPP) rezultat su djelovanja slobodnih radikala na proteine i mogu djelovati kao upalni medijatori, koji mogu izazvati oksidativna izbijanja neutrofila, monocita i T limfocita, što dovodi do regulacije i pretjerane stimulacije dendritičkih stanica. Zbog poticanja oksidativnog stresa i upale, AOPP mogu ubrzati progresiju ateroskleroze. Detaljnije poznavanje patofiziologije AOPP-a može pružiti informacije o podrijetlu i razvoju ateroskleroze, kao i o odnosu između oksidativnog stresa i podrijetla akutnog koronarnog sindroma. Iz tih razloga, AOPP mogu se koristiti kao prognostički čimbenik za teške oblike bolesti kardiovaskularnog sustava (19). Također,

koncentracija AOPP-a u plazmi povišena je kod bolesnika s uremijom, nedonoščadi, bolesnika s dijabetesom te bolesnika sa sustavnom sklerozom (20). Novija istraživanja pokazala su nakupljanje AOPP-a u plazmi kod ciroze i zatajenja jetre, tako da su AOPP uključeni u oštećenje hepatocita te mogu kasnije sudjelovati u oštećenju jetrene regeneracije (21).

AOPP derivati su oksidacijsko modificiranog albumina te nastaju u uvjetima pojačanog oksidacijskog stresa (22), aktiviranjem kloriranih oksidanasa, uglavnom hipoklorne kiseline i kloramina (nastali posredovanjem mijeloperoksidaze u aktiviranim neutrofilima). Glavni multifunkcionalni protein seruma ljudski je albumin koji je podvrgnut izmjenama u patološkim uvjetima (23). Primjerice, kod dijabetesa stvaranje AOPP-a izazvano je intenzivnim glikooksidacijskim procesima, neuravnoteženim odnosom između oksidanasa i antioksidanasa te prisutnom konstantnom upalom. AOPP pojačava metaboličke poremećaje kod dijabetesa i potiče napredovanje vaskularnih komplikacija. Stoga, koncentracija AOPP-a znatno je viša kod dijabetesa, posebice tipa 2, u odnosu na zdrave osobe. Razina AOPP-a koristan je marker za praćenje razvoja šećerne bolesti i njezinih komplikacija te može pomoći u praćenju primijenjene terapije (22).

ROS uzrokuje agregaciju i fragmentaciju proteina stvarajući ditirozin koji nastaje izravnom oksidacijom aminokiseline tirozin. Proizvodi koji tada nastaju su AOPP. Odnos između AOPP-a i monocita upućuje da AOPP nisu samo marker oksidativnog stresa nego su i marker upalnog odgovora zbog indukcije proupalnih citokina i adhezivnih molekula u prisutnosti AOPP-a (24).

2. HIPOTEZA

Akutno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji dovest će do povećanja razine oksidativnog stresa, dok dugotrajnija (intermitentna) hiperbarična oksigenacija neće dovesti do značajne promjene razine oksidativnog stresa kod *Sprague-Dawley* štakora.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog istraživanja ispitati promjenu serumske koncentracije oksidiranih lipoproteina niske gustoće i naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda u uzorcima seruma *Sprague-Dawley* štakora, koji su podvrgnuti različitim vremenskim tretmanima hiperbarične oksigenacije.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Eksperimentalna studija na pokusnim laboratorijskim životinjama (*Sprague-Dawley* štakorima).

4.2. Eksperimentalni životinjski model

Istraživanje je provedeno na zdravim, muškim *Sprague-Dawley* štakorima starosti 9 – 11 tjedana. Svi su štakori uzgojeni u Vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku te su u dobi od 8 do 9 tjedana prebačeni iz uzgojnog u eksperimentalni dio nastambe radi prilagodbe na novi prostor i smanjenja stresa uzrokovanog premještanjem. Životinje su bile podijeljene u tri skupine:

1) kontrolna skupina (KONTROLA): zdravi štakori koji nisu bili izloženi hiperbaričnoj oksigenaciji

2) štakori izloženi akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (A-HBO₂): štakori izloženi akutnom djelovanju hiperbaričnog kisika u barokomori, odnosno izloženi jednom tretmanu hiperbaričnim kisikom te žrtvovani odmah po izlaganju

3) štakori izloženi intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (4D-HBO₂): štakori izloženi djelovanju hiperbaričnog kisika u barokomori 4 uzastopna dana te žrtvovani 5. dan

U istoj barokomori odvijalo se izlaganje svih štakora hiperbaričnoj oksigenaciji (Rekompresijska komora za eksperimente 110 L, Đuro Đaković, Aparati d.d., Slika 1.).

Sve eksperimentalne postupke odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek (br. 2158/61-02-139/2-06) te Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske i dio su VIF projekta Medicinskog fakulteta Osijek VIF-2018-MEFOS-07, voditeljica: doc. dr. sc. Anita Matić.

4.3. Metode

4.3.1. Protokoli izlaganja hiperbaričnom kisiku

Nakon smještaja životinja u barokomoru, slijedi 15 minuta kompresije na 2,0 atm otvaranjem kompresijskog ventila i puštanjem kisika u komoru. Kad se postigne tlak od 2,0 atm, zatvori se kompresijski ventil te su štakori izloženi djelovanju 100 % kisika 2 sata. Za vrijeme trajanja terapije sa štakorima u komori smještena je i mala količina granula kalcij-hidroksida i natrij-hidroksida te etilvioleta (Draegersorb 800 Plus, DraegerMedical) za upijanje CO₂. Nakon toga slijedi 15 minuta dekompresije otpuštanjem dekompresijskog ventila.



Slika 1. Hiperbarična komora (izvor: original autorice rada)

4.3.2. Mjerenje krvnoga tlaka

Štakori su prije mjerenja krvnoga tlaka anestezirani kombinacijom ketamina (75 mg/kg) i midazolama (2,5 mg/kg). PE-50 kateter uveden je u lijevu femoralnu arteriju. Životinje su ostavljene 10 minuta dok se krvni tlak stabilizirao, a nakon toga krvni tlak mjereno je tijekom 1 minute i zapisivana je vrijednost tlaka svakih 10 sekundi te je srednja vrijednost izračunata iz dobivenih vrijednosti. Vrijednosti tlaka mjerene su pomoću SpacelabsMedical sustava (SpacelabsMedical, Inc., Redmond, WA, USA).

4.3.3. Prikupljanje uzoraka seruma i postupak provođenja ELISA metode

Nakon izmjerenog srednjeg arterijskog tlaka, životinje su dekapitirane te su prikupljeni uzorci seruma u epruvete bez antikoagulansa. Uzorci su centrifugirani 10 min / 3500 rpm i pohranjeni na -80 °C do provođenja pokusa.

Iz prikupljenih uzoraka seruma provelo se mjerenje koncentracije oksidiranih lipoproteina niske gustoće (oxLDL) i naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda (AOPP) komercijalno dostupnim kitovima i prema protokolu proizvođača. Kitovi su ELISA za *in vitro* kvantitativno mjerenje oxLDL-a u serumu, plazmi i ostalim biološkim tekućinama, a AOPP-a u serumu, plazmi i tkivima štakora.

U ovom istraživanju korišten je komercijalni kit za određivanje razine oxLDL-a (Wuhan USCN Business Co., Ltd, Kat. br.SEA527Ra, Kina) i AOPP-a (CUSABIO. Kat. Br. CSB-EQ027429RA, USA). Izmjerene vrijednosti očitane su pomoću čitača mikrotitarskih pločica (ELISA) – BioRad 93200 PR3100 TSC Microplate Reader u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju.



Slika 2. Čitač mikrotitarskih pločica (ELISA) – BioRad 93200 PR3100 TSC (izvor: original autorice rada)

ELISA je enzimimunokemijska metoda pri kojoj je protutijelo vezano za čvrstu fazu. Uzorak s antigenom dodaje se i ostavi da se antigen veže na protutijelo pa se konjugat ispere puferom. Zatim se dodaje drugo protutijelo koje je obilježeno enzimom te s ranije stvorenim kompleksom antigena i prvog protutijela stvara tzv. *sandwich* kompleks. Puferom se ispere nevezani višak obilježenog protutijela te se dodaje supstrat za enzim. Odredi se aktivnost enzima koja je obrnuto proporcionalna koncentraciji antigena.



Slika 3. ELISA pločica na kojoj je vidljiva standardna krivulja (1 i 2) i uzorci (3-6)
(izvor: original autorice rada)

4.3.4. Određivanje koncentracije oksidiranih lipoproteina niske gustoće (oxLDL)

Mikroploča predviđena ovim kitom prethodno je prevučena protutijelima specifičnim za oxLDL. Na mikroploči su standardi i uzorci dodani u prikladne jažice s protutijelima konjugiranim biotinom koja su specifična za oxLDL. Zatim je avidin konjugiran peroksidazom iz hrena (HRP) dodan u svaku jažicu te inkubiran. Nakon što je otopina TMB supstrata dodana, samo su jažice koje sadrže oxLDL, protutijelo konjugirano biotinom i avidin konjugiran enzimom pokazale promjenu u boji. Reakcija enzim – supstrat završena je dodatkom otopine sumporne kiseline te je promjena boje mjerena spektrofotometrijski na

valnoj duljini $450 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$. Koncentracija oxLDL-a u uzorcima određena je usporedbom optičke gustoće uzorka sa standardnom krivuljom.

Postupak: Određene su jažice za razrijeđeni standard, „slijepu probu“ i uzorke. Pripremljeno je 7 jažica za standard i 1 za „slijepu probu“. Dodano je $25 \mu\text{L}$ svakog od razrijeđenog standarda, „slijepa probe“ i uzoraka u prikladne jažice. Nakon inkubacije od 1 sata na $37 \text{ }^\circ\text{C}$, uklonjen je tekući dio iz svake jažice. U svaku je jažicu dodano $25 \mu\text{L}$ radne otopine reagensa A za detekciju te su ponovno inkubirane 1 sat na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Aspirirana je otopina iz jažica i isprane su sa $100 \mu\text{L}$ $1 \times$ pufera za ispiranje. Nakon 1 – 2 minute uklonjen je u potpunosti tekući dio iz svih jažica koristeći apsorbirajući papir. Jažice su u potpunosti isprane tri puta. Nakon posljednjeg ispiranja uklonjeni su i ostatci pufera za ispiranje aspiriranjem ili dekantiranjem te je ponovno korišten apsorbirajući papir. Zatim je u svaku jažicu dodano $25 \mu\text{L}$ radne otopine reagensa B za detekciju te su inkubirane 30 minuta na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Ponovljeni su aspiracija i ispiranje. U svaku je jažicu dodano $25 \mu\text{L}$ otopine supstrata te su inkubirane 10 – 20 minuta na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ i zaštićene od svjetla. Dodatkom otopine supstrata tekućina je promijenila boju u plavu. Dalje je u svaku jažicu dodano $20 \mu\text{L}$ stop otopine te je tekućina promijenila boju u žutu. Na kraju su uklonjene kapljice vode i otisci prstiju na dnu ploče s jažicama. Pokrenut je čitač mikroploče te je odmah provedeno mjerenje na 450 nm .

4.3.5. Određivanje koncentracije naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda (AOPP)

Protutijela specifična za AOPP prethodno su prevučena na mikroploču predviđenu ovim kitom. Standardi i uzorci dodani su u prikladne jažice na mikroploči te je svaki prisutni AOPP vezan imobiliziranim protutijelom. Nakon uklanjanja svih nevezanih tvari, protutijelo konjugirano biotinom specifično za AOPP dodano je u jažice. Nakon ispiranja dodan je avidin konjugiran HRP-om. Ispiranjem je uklonjen nevezani avidin konjugiran enzimom te je u jažice dodana otopina supstrata, što je rezultiralo razvitkom boje proporcionalno s količinom AOPP vezanih u početnom koraku. Intenzitet boje izmjerio se kada se boja prestala razvijati.

Postupak: Pripremljeni su reagensi, uzorci i standardi prema protokolu proizvođača. Dodano je $100 \mu\text{L}$ standarda i uzoraka u prikladne jažice. Nakon inkubacije od 2 sata na $37 \text{ }^\circ\text{C}$, uklonjen je tekući dio iz svake jažice. Dodano je $100 \mu\text{L}$ protutijela konjugiranog biotinom u svaku jažicu koje su onda inkubirane 1 sat na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Aspiriran je tekući dio iz

svake jažice te su jažice isprane tri puta puferom za ispiranje. Zatim je dodano 100 μL avidina konjugiranog HRP-om u svaku jažicu. Nakon inkubacije od 1 sata na 37 °C ponovno je aspiriran tekući dio iz svake jažice te su jažice isprane pet puta puferom za ispiranje. Dalje je u svaku jažicu dodano 90 μL TMB supstrata te su inkubirane 15 – 30 minuta na 37 °C i zaštićene od svjetla. Na kraju je u svaku jažicu dodano 50 μL stop otopine. Određena je optička gustoća za svaku jažicu unutar 5 minuta koristeći čitač mikroploče na kojem je provedeno mjerenje na 450 nm.

4.4. Statistička obrada podataka

Za statističku analizu upotrijebljena je Sigma Plot v.12 (Systat Software, Inc, Chicago,USA). Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između svih ispitivanih grupa (3 eksperimentalne grupe) nezavisnih skupina testirane su analizom varijance (ANOVA), a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Kruskal-Wallisovim testom. Razlike između grupa dodatno su testirane Tukey post hoc testom. Razina statističke značajnosti određena je s $p < 0,05$. Pomoću Sigma Plot v11.0 programa izračunali smo veličinu uzorka te ona za snagu testa od 0,6, p vrijednost manju od 0,05 i uz minimalnu očekivanu razliku od 0,25 iznosi 6 uzoraka (životinja) po grupi.

5. REZULTATI

U istraživanje je uključeno 20 muških *Sprague-Dawley* štakora, starosti 9 – 11 tjedana. Životinje su slučajnim odabirom podijeljene u 3 skupine (6 – 7 životinja po skupini). Štakorima je izmjerena tjelesna masa na završetku protokola te iz dobivenih rezultata nije utvrđena značajna razlika (KONTROLA 337 (10); A-HBO₂ 336 (12); 4D-HBO₂ 330 (12), p = 0,508; analiza varijance (ANOVA)) (Tablica 1.)

Nadalje, mjerio se srednji arterijski tlak po formuli $1/3$ (sistolički tlak – dijastolički tlak) + dijastolički tlak. Također nije utvrđena ni razlika u vrijednostima srednjeg arterijskog tlaka između ispitivanih skupina ((KONTROLA 107 (5); A-HBO₂ 112 (9); 4D-HBO₂ 109 (3), p = 0,354; analiza varijance (ANOVA)) (Tablica 1.), što je pokazatelj kako hiperbarična oksigenacija nema utjecaj i ne mijenja značajno krvni tlak.

Tablica 1. Aritmetička sredina izmjerenih vrijednosti tjelesne mase i srednjeg arterijskog tlaka

Pokusna skupina	Broj životinja po skupini	Aritmetička sredina (standardna devijacija)		Aritmetička sredina (standardna devijacija)	
		Tjelesna masa (g)	p	Srednji arterijski tlak (mmHg)	p
KONTROLA	7	337 (10)		107 (5)	
A-HBO ₂	7	336 (12)	0,508	112 (9)	0,354
4D-HBO ₂	6	330 (12)		109 (3)	

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i aritmetička sredina
p < 0,05 analiza varijance (ANOVA)

A-HBO₂ – akutna hiperbarična oksigenacija

4D-HBO₂ – intermitentna hiperbarična oksigenacija

5.1. Serumska koncentracija naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda

Tablica 2. prikazuje aritmetičku sredinu izmjerenih vrijednosti koncentracije naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda u uzorcima seruma. Statističkom metodom analize varijance (ANOVA) utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji AOPP-a između svih ispitivanih skupina $p = 0,007$. Dodatnim testiranjem razlika između skupina Tukey post hoc testom utvrđeno je značajno povećanje koncentracije AOPP u A-HBO₂ (56 (17)) skupini u odnosu na KONTROLNU ((26 (18), $p=0,011$) te 4D-HBO₂ skupinu (29 (16), $p=0,021$).

Tablica 2. Vrijednosti serumske koncentracije naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda (nmol/ml) u ispitivanim skupinama (rezultati su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, $p < 0,05$ razina je statističke značajnosti)

Pokusna skupina	Broj životinja po skupini	Aritmetička sredina (standardna devijacija)	p	p*	p**
		Serumska koncentracija AOPP (nmol/ml)			
KONTROLA	7	26 (18)			
A-HBO ₂	7	56 (17)	0,007	0,011	
4D-HBO ₂	6	29 (16)			0,021

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i aritmetička sredina

p – $p < 0,05$ analiza varijance (ANOVA)

p* – $p < 0,05$ KONTROLA vs. A-HBO₂ (Tukey post hoc test)

p** – $p < 0,05$ 4D-HBO₂ vs. A-HBO₂ (Tukey post hoc test)

A-HBO₂ – akutna hiperbarična oksigenacija

4D-HBO₂ – intermitentna hiperbarična oksigenacija

5.2. Serumska koncentracija oksidiranih lipoproteina niske molekularne gustoće

U Tablici 3. prikazana je aritmetička sredina serumske koncentracije oxLDL-a te pripadajuća vrijednost standardne devijacije za sve ispitivane skupine. Iz dobivenih vrijednosti (KONTROLA 158 (36); A-HBO₂ 132 (51); 4D-HBO₂ 146 (42)) uočeno je kako

nema statistički značajne razlike između ispitivanih skupina te da hiperbarična oksigenacija nije prouzrokovala promjenu u serumskoj koncentraciji oxLDL-a ($p = 0,551$; analiza varijance (ANOVA)).

Tablica 3. Izmjerene vrijednosti serumske koncentracije oksidiranih lipoproteina niske molekularne gustoće (pg/ml) u ispitivanim skupinama (rezultati su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, $p < 0,05$ razina je statističke značajnosti)

Pokusna skupina	Broj životinja po skupini	Aritmetička sredina (standardna devijacija)	p*
		Serumska koncentracija oxLDL (pg/ml)	
KONTROLA	7	158 (36)	
A-HBO ₂	7	132 (51)	0,551
4D-HBO ₂	6	146 (42)	

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i aritmetička sredina

* analiza varijance (ANOVA)

6. RASPRAVA

Terapija hiperbaričnom oksigenacijom, engl. *hyperbaric oxygen therapy* (HBO₂), tretman je koji se koristi u mnogim stanjima sa smanjenom i nedovoljnom tkivnom oksigenacijom i perfuzijom. Poznato je kako hiperbarična oksigenacija pridonosi cijeljenju ishemičnih ulceracija u bolesnika s dijabetesom mellitusom te poboljšava ishod moždanog udara, infarkta miokarda, akutne periferne ishemije ekstremiteta u ljudi, a smanjuje i aterosklerotske plakove u pokusima na životinjskim modelima (5, 6, 25, 26).

Osim pozitivnih učinaka, dokumentirani su i štetni učinci djelovanja kisika prvenstveno zbog povećanog oksidativnog stresa, odnosno povećanog stvaranja reaktivnih kisikovih čestica (ROS). Toksičnost kisika očituje se kada osoba udiše čisti kisik ili kisik visokog postotka pod povišenim tlakom. To se događa pri hiperbaričnoj terapiji, ali i kod ronjenja s bocom, međutim postoje propisani protokoli kojih se uključeni pojedinci moraju pridržavati kako bi se rizik od toksičnosti smanjio. Posljedice se različito očituju na staničnom, tkivnom ili organskom nivou i mogu pogoditi svako tkivo. Neke od njih uključuju oštećenja staničnih membrana, kolaps alveola i povrede mrežnice.

Na Katedri za fiziologiju i imunologiju prethodno se proučavao utjecaj hiperbarične oksigenacije na vaskularnu funkciju makro i mikrocirkulacije. Jedna od studija istraživala je promijenjene mehanizme dilatacije kod dijabetičnih štakora pod utjecajem hiperbarične oksigenacije. Tom je studijom dokazano kako hiperbarična oksigenacija uzrokuje aktivaciju CYP450 epoksigenazog puta i povećanu produkciju EETs-a kod dijabetičnih životinja izlaganih HBO₂ (27). Nadalje, studija koja je uslijedila, pokazala je promijenjeni relaksacijski odgovor na ANG II i ANG-(1-7) pod utjecajem HBO₂ kod zdravih životinja, gdje također povezuje promijenjeni mehanizam i poboljšanu relaksaciju nakon HBO₂ uz aktivaciju CYP450 i sintezu EETs-a (28, 29). Dodatna studija na zdravim životinjama pokazala je da akutno izlaganje hiperbaričnom kisiku snižava dijastolički krvni tlak, pH i pCO₂, a povećava pO₂ arterijske krvi (30). Dr. Mihaljević (31) potom je u svom istraživanju pratila utjecaj hiperbarične oksigenacije na zdrave životinje. To je važno zato što je u novije vrijeme povećana upotreba hiperbarične oksigenacije kako u zdravstvene tako i u kozmetičke svrhe te je bitno znati kakve promjene, pozitivne ili negativne, HBO₂ može izazvati. Ta je studija upućivala na to da se ponavljano izlaganje hiperbaričnom kisiku i vrijeme između dviju terapija može promatrati kao intermitentna pseudohipoksija te je moguće zbog povećanog

nastalog oksidativnog stresa da se aktiviraju dodatni obrambeni mehanizmi kao što su antioksidativni mehanizmi koji dugotrajnijim izlaganjem terapiji dovode sustav u ravnotežu.

Stanični metabolizam uglavnom ovisi o kisiku (oksidativnom ili aerobnom metabolizmu), pri čemu je isporuka kisika ključni čimbenik. U normalnim uvjetima, kisik se prenosi vezan na hemoglobin (približno 97 %) i otopljen u plazmi (3 %). Povećanjem parcijalnog tlaka kisika, kao što je tijekom hiperbarične oksigenacije, topljivost kisika u plazmi, njegova doprema do tkiva i oksigenacija tkiva povećava se. Međutim, kisik je visoko reaktivna molekula zbog čega pri visokim parcijalnim tlakovima, kao u hiperbaričnoj oksigenaciji, dolazi do formiranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) (2).

Posljedice prevelike koncentracije ROS-a u stanici višestruke su. Oni (posebice hidroksilni radikal) mogu reagirati sa svim makromolekulama u stanici (mastima, bjelančevinama, nukleinskim kiselinama, ugljikohidratima) i narušiti njihovu strukturu te tako dovesti do oštećenja ili čak smrti stanice. Najopasniji dio tih učinaka je što početna reakcija pokreće lančanu reakciju te se posljedice ne osjete samo na jednoj makromolekuli, nego se one šire i na druge molekule. Molekule koje su najpodložnije takvom napadu su polinezasićene masne kiseline. Njihove dvostruke veze čine ih prilično nestabilnima, pa su zbog toga podložne lipidnoj peroksidaciji (32). Lipidna peroksidacija počinje inicijacijom, tako što reaktivna čestica (najčešće hidroksilni radikal) dolazi do masne kiseline i oksidira je, stvarajući tako lipidni radikal. Lipidni radikal i sam je reaktivna molekula, pa se tijekom propagacije povezuje s molekularnim kisikom, stvarajući peroksilni radikal masne kiseline. Taj radikal još uvijek nije stabilan, pa reagira sa slobodnom masnom kiselinom, tvoreći novi lipidni radikal i lipidni peroksid. Tako se lančana reakcija prenosi na druge molekule, te i druge molekule postaju radikali. Reakcija će se nastavljati sve dok radikal napada slobodnu masnu kiselinu (ili neku drugu molekulu), a zaustavit će se tek kada radikal reagira s drugim radikalom.

Ako se u stanici u kratko vrijeme odvije velik broj takvih lančanih reakcija, a stanica ih nije u stanju zaustaviti, može doći do velikih oštećenja. Prije svega, narušava se struktura stanične membrane jer se membrana sastoji od fosfolipida, a oni su podložni peroksidaciji. Također, narušava se i struktura bjelančevina, kao i nukleinskih kiselina. Osim tih izravnih posljedica ROS-a, negativne posljedice mogu uslijediti i zbog produkata koji nastaju u tim reakcijama. Krajnji produkt lipidne peroksidacije, malondialdehid (MDA), koji je indikator

oksidativnog stresa, reaktivna je i mutagena molekula (33). On može reagirati s dva proteina, povezujući ih i čineći kovalentne adukte, koji se još nazivaju i daljnji krajnji produkti peroksidacije. MDA može reagirati i s deoksiadenozinom i deoksiguanozinom, i povezati ih u kovalentne adukte, uzrokujući time mutacije.

Kod različitih modela hiperbarične oksigenacije dokazan je povećani oksidativni stres određivanjem markera oksidativnog stresa TBARS (mjera oksidativnog stresa) i FRAP (antioksidativni kapacitet), gdje je pokazano kako jedna terapija hiperbaričnim kisikom značajno povećava mjeru lipidne peroksidacije, ali ne mijenja razinu antioksidativnog kapaciteta (31). Također, mjerenjem genskog izražaja antioksidativnih enzima u aortama i cerebralnim arterijama štakora, pokazano je da su pojedini antioksidativni enzimi značajno sniženi kod akutnog izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji te da intermitentno izlaganje ponovno povećava izražaj antioksidativnih enzima te tako dovodi razinu oksidativnog stresa u ravnotežu (31, 34).

U našoj studiji, mjerili smo novije markere oksidativnog stresa koji su možebitno i specifičniji te u literaturi nema podataka o navedenim parametrima i kod našeg modela. Pokazalo se kako jedno izlaganje hiperbaričnoj terapiji značajno povećava razinu AOPP-a, dok ne dovodi do promjene koncentracije oxLDL-a u odnosu na druge ispitivane skupine. AOPP se pokazao kao osjetljiviji test na promjene nastale razine ROS-a. Jednaki rezultati dobiveni su i na drugim modelima, poput modela u kojem su životinje konzumirale hranu s visokim koncentracijama NaCl-a (4 %) ili primale supresorske doze ANG II te se također AOPP vrijednost pokazala značajno povećanom u uvjetima visokih koncentracija soli. Možebitno je za promjene koncentracije oxLDL-a potrebno duže razdoblje povećane neravnoteže između antioksidativnih enzima i slobodnih radikala kako bi se uočila značajna promjena.

U nastavku istraživanja pravih uzročnika nastanka oksidativnog stresa kod akutnog izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji potrebno je uključiti što je više moguće specifičnije markere koji će pokazati prave razloge nastanka ROS-a te na koji način i kojim mehanizmima dugotrajnije izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji vraća sustav u normalu.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1) Hiperbarična oksigenacija (akutna ili intermitentna) nema značaju ulogu na promjenu tjelesne mase i krvnog tlaka životinja.

2) Akutno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji značajno povećava serumsku razinu AOPP-a u odnosu na preostale ispitivane skupine.

3) Intermitentna hiperbarična terapija snižava serumsku koncentraciju AOPP-a do razine izmjerene u kontrolnoj skupini.

4) Serumsku koncentraciju oxLDL-a nije se značajno mijenjalo primjenom različitih tretmana hiperbarične oksigenacije.

5) AOPP se pokazao kao osjetljiviji marker za određivanje nastalog oksidativnog stresa.

8. SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA: Cilj ovog istraživanja bio je ispitati promjenu serumske koncentracije naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda (AOPP) i oksidiranih lipoproteina niske gustoće (oxLDL) u uvjetima akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije kod zdravih *Sprague-Dawley* štakora.

USTROJ ISTRAŽIVANJA: Eksperimentalna studija na laboratorijskim životinjama.

MATERIJALI I METODE: *Sprague-Dawley* štakori, starosti 9 – 11 tjedana, nasumično su podijeljeni u tri eksperimentalne skupine (N = 6 – 7): kontrola (netretirana skupina), akutna skupina (A-HBO₂, štakori izloženi jednom tretmanu hiperbarične oksigenacije te žrtvovani odmah po izlaganju) i intermitentna skupina (4D-HBO₂, štakori izloženi djelovanju hiperbaričnog kisika u barokomori 4 uzastopna dana te žrtvovani 5. dan). Tretman hiperbarične oksigenacije provodio se tijekom 2 sata pri tlaku od 2 bara u Rekompresijskoj komori za eksperimente 110 L, Đuro Đaković, Aparati d.d. Nakon provedenog tretmana hiperbarične oksigenacije životinje su izvagane, uspavane te im je izmjeren krvni tlak. Potom su dekapitirane, nakon čega su prikupljeni uzorci krvi iz kojih su izdvojeni serumi za utvrđivanje koncentracije oxLDL i AOPP ELISA metodom.

REZULTATI: Tretmani hiperbarične oksigenacije nisu imali utjecaja na promjenu tjelesne mase i krvnog tlaka životinja. Akutno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji značajno je povećalo serumsku koncentraciju naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda (AOPP) u odnosu na kontrolnu i intermitentnu skupinu. Serumska razina oxLDL-a nije se značajno promijenila među ispitivanim skupinama.

ZAKLJUČAK: Akutno izlaganje hiperbaričnom kisiku značajno povećava serumsku koncentraciju AOPP-a u odnosu na preostale ispitivane skupine te tako potvrđuje povećanu razinu oksidativnog stresa koja nastaje jednim izlaganjem hiperbaričnoj terapiji bez značajne promjene u koncentraciji oxLDL-a.

KLJUČNE RIJEČI: AOPP, hiperbarična terapija, oksidativni stres, oxLDL, *Sprague-Dawley* štakor

9. SUMMARY

Influence of hyperbaric oxygenation on changes in serum concentrations of low density oxidized lipoproteins and advanced oxidized protein products in Sprague-Dawley rats

OBJECTIVE: The aim of this research was to examine the change in serum concentrations of advanced oxidized protein products (AOPP) and low density oxidized lipoproteins (oxLDL) in the conditions of acute and intermittent hyperbaric oxygenation in healthy Sprague-Dawley rats.

STUDY DESIGN: Experimental research on laboratory animals conducted as case control study.

MATERIALS AND METHODS: Sprague-Dawley rats, 9 to 11 weeks old, were randomly divided into three experimental groups (N = 6 to 7): control (untreated group), acute group (A-HBO₂, rats exposed to one hyperbaric oxygenation treatment and sacrificed immediately after the exposure) and intermittent group (4D-HBO₂, rats exposed to hyperbaric oxygen in the chamber for 4 consecutive days and sacrificed 5th day). The hyperbaric oxygenation treatment was carried out for 2 hours at a pressure of 2 bar in the Recompression chamber for experiments 110 L, Đuro Đaković, Aparati d.d. After the hyperbaric oxygenation treatment, the animals were weighed, sedated and their blood pressure was measured. After they were decapitated, blood samples were collected and serums were extracted to determine oxLDL and AOPP concentrations by ELISA method.

RESULTS: Hyperbaric oxygenation treatment did not affect changes in body weight and blood pressure in animals. Acute exposure to hyperbaric oxygenation significantly increased the serum concentration of advanced oxidized protein products (AOPP) in regards to the control and intermittent groups. Serum levels of oxLDL did not change significantly in the observed groups.

CONCLUSION: Acute exposure to hyperbaric oxygen significantly increased AOPP serum concentration in regards to the remaining study groups and thus confirms the increased level of oxidative stress produced by one exposure to hyperbaric therapy without a significant change in the oxLDL concentration.

KEY WORDS: AOPP, hyperbaric therapy, oxidative stress, oxLDL, Sprague-Dawley rat

10. LITERATURA

1. Hampson NB, ed. Hyperbaric Oxygen Therapy. 1999 Committee report. Kesington MD, Undersea and Hyperbaric Medical Society. 1999.
2. Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J Appl Physiol.* 2009;106(3):988-995.
3. Drenjancevic I, Kibel A. Restoring vascular function with hyperbaric oxygen treatment: recovery mechanisms. *J Vasc Res.* 2014;51(1):1-13.
4. Dotsenko EA, Nikulina NV, Salivonchik DP, Lappo OG, Gritsuk AI, Bastron AS. Low doses of hyperbaric oxygenation effectively decrease the size of necrotic zone in rats with experimental myocardial infarction. *Bull Exp Biol Med.* 2015;158(6):732-734.
5. Yin W, Badr AE, Mychaskiw G, Zhang JH. Down regulation of COX-2 is involved in hyperbaric oxygen treatment in a rat transient focal cerebral ischemia model. *Brain Res.* 2002;926:165–171.
6. Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in wound healing-more than a nutrient. *World J Surg.* 2004;28(3):294-300.
7. Zhang LD, Ma L, Zhang L, Dai JG, Chang LG, Huang PL, i sur. Hyperbaric Oxygen and Ginkgo Biloba Extract Ameliorate Cognitive and Memory Impairment via Nuclear Factor Kappa-B Pathway in Rat Model of Alzheimer's Disease. *Chin Med J.* 2015;128(22):3088-3093.
8. Pan X, Chen C, Huang J, Wei H, Fan Q. Neuroprotective effect of combined therapy with hyperbaric oxygen and madopar on 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease in rats. *Neurosci Lett.* 2015;600:220-225.
9. Chen X, Li Y, Chen W, Nong Z, Huang J, Chen C. Protective Effect of Hyperbaric Oxygen on Cognitive Impairment Induced by D-Galactose in Mice. *Neurochem Res.* 2016;41(11):3032-3041.
10. Korhonen K, Klossner J, Hirn M, Niinikoski J. Management of clostridial gas gangrene and the role of hyperbaric oxygen. *Ann Chir Gynaecol.* 1999;88(2):139-142.

11. Takac I, Kvolik S, Divkovic D, Kalajdzic-Candrlic J, Puseljc S, Izakovic S. Conservative surgical management of necrotic tissues following meningococcal sepsis: case report of a child treated with hyperbaric oxygen. *Undersea Hyperb Med.* 2010;37(2):95-99.
12. Mathieu D, Marroni A, Kot J. Tenth European Consensus Conference on Hyperbaric Medicine: recommendations for accepted and non-accepted clinical indications and practice of hyperbaric oxygen treatment. *Diving Hyperb Med.* 2017;47(1):24-32.
13. Crimi E, Ignarro LJ, Napoli C. Microcirculation and oxidative stress. *Free Radical Research.* 2007;41(12):1364-1375.
14. Puljak A, Perko G, Mihok D, Radašević H. Antioksidansi i oligoelementi u starijih osoba. *Medix.* 2004;10(52):98-102.
15. Armitage ME, Wingler K, Schmidt HH, La M. Translating the oxidative stress hypothesis into the clinic: NOX versus NOS. *J Mol Med.* 2009;87(11):1071-1076.
16. Gürdöl F, Cimşit M, Öner-İyidoğan Y, Körpınar Ş, Yalçinkaya S, Koçak H. Early and late effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress parameters in diabetic patients. *Physiol Res.* 2008;57(1):41-47.
17. Parthasarathy S, Raghavamenon A, Garelnabi MO, Santanam N. Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Methods Mol Biol.* 2010;610:403-417.
18. Jiang X, Yang Z, Chandrakala AN, Pressley D, Parthasarathy S. Oxidized Low Density Lipoproteins-Do We Know Enough About Them?. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2011;25(5):367-377.
19. Škvarilova M, Bulava A, Stejskal D, Adamovska S, Bartek J. Increased level of advanced oxidation products (AOPP) as a marker of oxidative stress in patients with acute coronary syndrome. *Biomed. Papers.* 2005;149(1):83-87.
20. Selmeçi L, Seres L, Antal M, Lukacs J, Regöly-Merei A, Acsady G. Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(3):294-297.

21. Sun S, Xie F, Xu X, Cai Q, Zhang Q, Cui Z, i sur. Advanced oxidation protein products induce S-phase arrest of hepatocytes via the ROS-dependent, β -catenin-CDK2-mediated pathway. *Redox Biol.* 2018;14:338-353.
22. Piwowar A. Advanced oxidation protein products. Part II. The significance of oxidation protein products in the pathomechanism of diabetes and its complications. *Pol Merkur Lekarski.* 2010;28(165):227-230.
23. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, i sur. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996;49(5):1304-1313.
24. Kural A, Toker A, Seval H, Döventas Y, Basinoglu F, Koldas M, i sur. Advanced Glycation End-Products and Advanced Oxidation Protein Products in Patients with Insulin Dependent Diabetes Mellitus and First Degree Relatives. *Bakirköy Tıp Dergisi.* 2011;7(4):130-135.
25. Camporesi EM. Hyperbaric oxygen therapy: committee report of the Undersea and Hyperbaric Medical Society. MD: Kensington; 1996. p. 74.
26. Kudchodkar BJ, Wilson J, Lacko A, Dory L. Hyperbaric oxygen reduces the progression and accelerates the regression of atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1637–1643.
27. Unfirer S, Mihalj M, Novak S, Kibel A, Cavka A, Mihaljevic Z, i sur. Hyperbaric oxygenation affects the mechanisms of acetylcholine-induced relaxation in diabetic rats. *Undersea Hyperb Med.* 2016;43(7):787-803.
28. Kibel A, Novak S, Cosic A, Mihaljevic Z, Falck JR, Drenjancevic I, i sur. 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.
29. Kibel A, Cavka A, Cosic A, Falck JR, Drenjancevic I. Effects of hyperbaric oxygenation on vascular reactivity to angiotensin II and angiotensin-(1-7) in rats. *Undersea Hyperb Med (Bethesda, Maryland, USA).* 2012;39(6):1053-1066.

30. Drenjančević I, Kibel A, Kibel D, Šerić V, Čosić 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.
31. Mihaljević Z, Matic 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. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2018;2018.
32. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993;57(5):715S-724S.
33. Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.* 1999;424(1-2):83-95.
34. Šušnjara, P. Utjecaj hiperbarične oksigenacije na genski izražaj antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora. Završni rad - diplomski/integralni studij.

11. ŽIVOTOPIS

IME I PREZIME: Ivana Domazet

DATUM I MJESTO ROĐENJA: 20. 2. 1996., München, Njemačka

ADRESA: Petra Zoranića 17, Tenja 31207

KONTAKT: ivana.brina@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2017. – : Medicinski fakultet Osijek, Sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

4.12.2017. – 3.12.2018. : Medicinsko biokemijski laboratorij Brankica Bojčić i Mato Vlanić, Stručno osposobljavanje

2014. – 2017.: Medicinski fakultet Osijek, Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

2010. – 2014.: I. gimnazija, Osijek

2002. – 2010.: Osnovna škola Tenja, Tenja