

# Utjecaj hiperbarične oksigenacije na plazmatsku razinu angiotenzina II kod Sprague- Dawley štakora s animalnim modelom šećerne bolesti

---

**Bogunović, Helena**

**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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:442753>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-19**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Helena Bogunović**

**UTJECAJ HIPERBARIČNE  
OKSIGENACIJE NA PLAZMATSKU  
RAZINU ANGIOTENZINA II KOD  
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA S  
ANIMALNIM MODELOM ŠEĆERNE  
BOLESTI**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**



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

**Helena Bogunović**

**UTJECAJ HIPERBARIČNE  
OKSIGENACIJE NA PLAZMATSKU  
RAZINU ANGIOTENZINA II KOD  
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA S  
ANIMALNIM MODELOM ŠEĆERNE  
BOLESTI**

**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 27 listova, 2 tablice i 5 slika.

*Zahvaljujem svojem mentoru, doc.dr.sc. Aleksandru Kibelu, dr.med., na susretljivosti i pruženoj pomoći prilikom provođenja eksperimenta i pisanja ovoga rada.*

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

*Posebnu zahvalu upućujem svojoj obitelji koja mi je omogućila ovaj studij i bila oslonac tijekom cijelog školovanja. Mojem Tomislavu najveća hvala za pruženo razumijevanje i potporu u svim trenucima.*

## SADRŽAJ

<b>1.UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Hiperbarična oksigenacija.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Definicija.....	1
1.1.2. Fiziološki učinci hiperbarične oksigenacije.....	1
1.1.3. Primjena hiperbarične oksigenacije.....	2
<b>1.2. Dijabetes melitus.....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Definicija.....	2
1.2.2. Tipovi dijabetesa melitusa.....	3
1.2.3. Animalni modeli dijabetesa melitusa.....	4
1.2.4. Utjecaj dijabetesa melitusa na krvne žile i nastanak ateroskleroze.....	4
<b>1.3. Sustav renin-angiotenzin.....</b>	<b>6</b>
1.3.1. Komponente sustava renin-angiotenzin.....	6
1.3.2. Angiotenzin II u dijabetesu melitusu.....	6
<b>1.4. Utjecaj hiperbarične oksigenacije na komponente sustava renin-angiotenzin.....</b>	<b>7</b>
<b>2. HIPOTEZA.....</b>	<b>9</b>
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>10</b>
<b>4. ISPITANICI I METODE.....</b>	<b>11</b>
4.1. Ustroj studije.....	11
4.2. Eksperimentalne životinje.....	11
4.3. Hiperbarični protokol.....	11
4.4. Uzorkovanje i priprema uzoraka.....	12
4.5. Korišteni reagensi.....	13
4.6. Određivanje koncentracije angiotenzina II ELISA metodom.....	13
4.7. Statističke metode.....	16
<b>5. REZULTATI.....</b>	<b>17</b>
<b>6. RASPRAVA.....</b>	<b>19</b>
<b>7. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>21</b>

<b>8. SAŽETAK</b> .....	22
<b>9. SUMMARY</b> .....	23
<b>10. LITERATURA</b> .....	24
<b>11. ŽIVOTOPIS</b> .....	27



**POPIS KRATICA:**

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

**ACE 2** - 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

**AT I** – receptori angiotenzina I

**AT II** – receptori angiotenzina II

**ATP** – adenzin trifosfat

**DM** – diabetes mellitus

**DNA** - Deoksiribonukleinska kiselina

**EDTA** - Etilendiamintetraoctena kiselina

**ELISA**– Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**HBO** – hiperbarična oksigenacija

**HBOT**–*hyperbaric oxygen treatment*

**HDL** – lipoproteini visoke gustoće (engl. *high-density lipoproteins*)

**IL – 6** – interleukin 6

**KOPB** – kronična opstruktivna plućna bolest

**LDL** - lipoproteini niske gustoće (engl. *low density lipoproteins*)

**NAD+** - Nikotinamid adenin dinukleotid

**NEP** – neutralna endopeptidaza

**NO** – dušikov monoksid

**PARP** - NAD<sup>+</sup> ADP-riboziltransferaza

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

**RAS** – renin-angiotenzin sustav

**VLDL** – lipoproteini vrlo niske gustoće (engl. *very low-density lipoproteins*)

## 1. UVOD

### 1.1. Hiperbarična oksigenacija

#### 1.1.1. Definicija

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 razine atmosferskog tlaka, odnosno 1 bara. (1) Standardni atmosferski tlak definiran je kao srednji tlak na morskoj razini, a iznosi 101325 Pa ili 760 mm Hg. Sama hiperbarična oksigenacija provodi se preko maski ili endotrahealne cijevi u tehnološki sofisticiranom uređaju koji se naziva hiperbarična komora. Ta komora omogućuje boravak osoba ili eksperimentalnih životinja u okruženju povišenog ili sniženog tlaka zraka u odnosu na atmosferski tlak. Hiperbarične komore ne nalaze svoju primjenu samo u medicini, već i u različitim trenažnim postupcima ekstremnih sportova i zanimanja (ronioci, astronauti, piloti, padobranici). Postupak koji je najčešći u današnjoj medicinskoj uporabi (HBO) obuhvaća uzastopna izlaganja u trajanju 90 – 120 minuta pod tlakom od 2 – 2.5 bara (1-3).

#### 1.1.2. Fiziološki učinci hiperbarične oksigenacije

Postupkom hiperbarične oksigenacije kisik u organizam ulazi pod visokim tlakom što posljedično dovodi do porasta arterijskog i tkivnog parcijalnog tlaka kisika ( $pO_2$ ). Sukladno tome, količina kisika otopljenog u plazmi raste i do 20 puta djelovanjem Henryjevog zakona (2). Henryjev zakon upućuje na to kako je pri stalnoj temperaturi količina otopljenog kisika u nekoj tekućini proporcionalna parcijalnom tlaku tog plina (4). Takav učinak porasta otopljenog kisika svoj doprinos daje u stanjima hipoksije (smanjena količina kisika u organizmu), koja su uzrokovana fiziološkim potrebama, anemijama, nedostatkom vitamina B, oštećenjem oksidacijskih enzima ili zbog drugih nemogućnosti dopremanja kisika do stanica i tkiva (5). Jedan od glavnih fizioloških utjecaja HBO-a je vazokonstrikcija, karakterizirana povećanom oksidacijom radikala dušičnog oksida (NO) kojeg proizvodi endotel, što dovodi do gubitka vazorelaksantnog učinka (6). Osim toga, HBO osigurava kisik nužan za stvaranje kolagena važnog pri zarastanju rana, inhibira rast mikroba, deaktivira bakterijske toksine, modulira rad bijelih krvnih stanica u infekcijama i utječe na povećanu funkciju osteoklasta i osteoblasta pri pregradnji kostiju (7). Također, mnogo je faktora koji imaju ulogu u utjecaju

HBO-a na vaskularnu funkciju. Većina učinaka tih faktora nije razjašnjena i u potpunosti istražena. Kao preduvjet za razumijevanje utjecaja HBO-a prvo bi se morao istražiti njezin točan utjecaj na arterijski tlak. Naime, mnogo je istraživanja kod kojih je zbog korištenja različitih protokola, ispitanika ili poremećaja došla do oprečnih rezultata (8).

### 1.1.3. Primjena hiperbarične oksigenacije

Kako bi svi učinci HBO-a bili kontrolirani, praćeni i dodatno istraživani, 70-ih godina prošlog stoljeća osnovana je organizacija koja od 1986. godine nosi ime „Undresea and Hyperbaric Medical Society“, a koja ujedno definira indikacije i kontraindikacije korištenja hiperbarične oksigenacije (9). U skupinu stanja indiciranih za upotrebu HBO-a svrstavaju se dekompresijska bolest, plinska gangrena, zračna embolija, nekrotizirajući fascitis, „crush“ozljede, otrovanje ugljičnim monoksidom ili cijanidom, radijacijska nekroza kosti i mekih tkiva, kronični refraktorni osteomijelitis, aktinomikozu, anemija zbog velikog gubitka krvi te cijeljenje rana i kožnih presađaka (3).

Nakon niza godina eksperimentalne i kliničke primjene HBO-a nisu poznati i definirani točni mehanizmi djelovanja na organizam, stoga je bitno pratiti kontraindikacije za ovakvu vrstu terapije. Apsolutna kontraindikacija za HBO je pneumotoraks, a u druge kontraindikacije ubrajaju se: nekontrolirana hipertenzija, klaustrofobija, zatajivanje srca s ejskijskom frakcijom izbacivanja manjom od 35%, kongenitalna sferocitoza, infekcija gornjih dišnih putova, vrućica, KOPB, ugrađeni pacemaker i sl. (10).

## 1.2. Dijabetes melitus

### 1.2.1. Definicija

Šećerna bolest ili dijabetes, lat. *diabetes mellitus*, kompleksna je, multifaktorska, poligena i kronična bolest koja uzrokuje poremećaje metabolizma, ugljikohidrata, proteina i masti (11). Očituje se povećanjem razine šećera u krvi do koje dolazi kada gušterača potpuno ili djelomično prestane proizvoditi hormon inzulin ili ako periferna tkiva ne reagiraju adekvatno na inzulin. Gušterača, lat. *pankreas*, endokrini je i egzokrini žlijezda u kojoj egzokrine stanice čine 98% tkiva. Endokrini dio gušterače sastoji se od 4 vrste stanica koje su smještene u Langerhansovim otočićima, a to su: alfa-stanice (luče glukagon), beta-stanice

(luče inzulina), D-stanice (luče somatostatin) i PP stanice (luče pankreatični polipeptid (PP)). Alfa-stanice i beta-stanice gušterače imaju oprečno djelovanje, odnosno inzulina beta-stanica snižava razinu šećera u krvi, dok ga glukagon alfa-stanica povisuje (12).

### 1.2.2. Tipovi dijabetesa

Šećerna bolest tip I naziva se još i inzulinska ovisna šećerna bolest ili juvenilni dijabetes. Karakterizira ju postupno uništavanje beta-stanica gušterače s posljedičnim deficitom inzulina, nagli početak bolesti te doživotna terapija inzulinom. Javlja se najčešće do 35. godine života. Od različitih patoloških stanja koja dovode do ove bolesti najznačajniju ulogu ima genetska sklonost ili predispozicija. Na proces razvijanja bolesti utjecaj imaju mnogi agensi iz okoliša kao što su lijekovi, toksini, stres te virusne infekcije. Potpuni ili djelomični prestanak proizvodnje inzulina uzrokuje nemogućnost korištenja glukoze iz krvi, iako su razine glukoze povišene. Kada se stanice nađu u potrebi za glukozom, one počinju proizvoditi glukozu iz ranije stvorenih zaliha u jetri što dodatno povisuje njezinu koncentraciju u krvi (13).

Šećerna bolest tip II najčešće se javlja u odrasloj dobi i otkriva se uglavnom slučajno, prilikom sistematskih pregleda. Bolest često dugo ostaje neprepoznata zbog relativnog manjka inzulina, gdje i niske koncentracije inzulina omogućuju sprječavanje akutnih komplikacija bolesti. Bolest napreduje polagano, a od simptoma koji se javljaju najčešći su: žeđ, pojačano mokrenje, pospanost, zamagljen vid, učestale vaginalne infekcije kod žena, trnci i žarenje u nogama. Taj tip dijabetesa karakterizira pojam inzulinska rezistencija, što znači da periferna tkiva ne reagiraju u dostatnoj mjeri na inzulina pa on ne djeluje pravilno na ulazak glukoze u mišićne i masne stanice. Posljedično smanjenoj osjetljivosti perifernih tkiva na djelovanje inzulina javlja se hiperinzulinemija u cilju održanja normalne koncentracije glukoze u krvi. Ostali čimbenici koji imaju ulogu u smanjenju inzulinske rezistencije jesu adipokini, od kojih je najznačajniji adiponektin, a karakterizira ga snižavanje koncentracija glukoze i slobodnih masnih kiselina u krvi. Utjecaj također pokazuju i IL-6, rezistin te leptin kao hormon zadužen za regulaciju teka (13).

### 1.2.3. Animalni modeli dijabetesa

Animalni modeli široko su zastupljeni u istraživanjima i omogućuju znanstvenicima *in vivo* kontrolu genetskih i okolišnih čimbenika. Animalni modeli dijabetesa započeli su 1880-ih godina i to pankreatektomijom na psima. Međutim, danas su najzastupljeniji animalni modeli dijabetesa na glodavcima kod kojih se stanje hiperglikemije postiže djelomičnim ili potpunim odstranjivanjem gušterače ili ubrizgavanjem jednog od kemijskih spojeva kao što su: aloksan, vakor, ditizon, 8-hidroksikvinolon i streptozocin, korišten u ovom istraživanju (14).

Kod inducirano dijabetesa tipa I potrebno je kemijskim putem razoriti veliki postotak beta-stanica uslijed čega dolazi do male količine endogenog inzulina, hiperglikemije i gubitka tjelesne mase. Takav je način indukcije jednostavan i relativno jeftin, a eksperimentalne životinje potrebno je tretirati 5-7 dana prije samog istraživanja, kako bi bio osiguran razvoj bolesti i hiperglikemije (15). Kod tako inducirano dijabetesa tipa I najčešće se koriste: NOD (non-obese diabetic) miševi, BB (bio breeding) štakori te LETL (Long Evans Tokushima lean) štakori (14). Kako je dijabetes tipa II karakteriziran rezistencijom na inzulin te sukladno tome nedovoljnom produkcijom beta-stanica, takva obilježja bi trebao imati i inducirani animalni model. Najkorisniji modeli kod navedenog tipa dijabetesa pokazali su se kao monogeni pretili modeli (Lep<sup>ob/ob</sup> miševi, Lepr<sup>db/db</sup> miševi, pretili „Zucker“ štakori) te poligeni pretili modeli (KK miševi, OLETF štakori, NZO (New Zealand Obese) miševi) (15).

Streptozocin, (2 – deoksi – 2 - (3 - (metil – 3 – nitrozou Reid) - D - glukopiranoza), uz aloksan, najčešće je korišten za indukciju hiperglikemije. *Streptomyces achromogenes*, gljivica koja sintetizira streptozocin (14) počela se proučavati 50-ih godina prošlog stoljeća kao potencijalni antibiotik (16). Streptozocin nakon intaperitonealne ili intravenozne aplikacije putem Glut-2 transportera ulazi u beta-stanice i uzrokuje alkilaciju DNA. U konačnici, do inhibicije stvaranja i lučenja inzulina dolazi tako što aktivacija PARP-a potiče trošenje NAD<sup>+</sup> i smanjenje staničnog ATP-a (15).

### 1.2.4. Utjecaj dijabetesa melitusa na krvne žile i nastanak ateroskleroze

Aterosklerotske promjene koje se javljaju na krvnim žilama, uzrokujući smanjenje i obustavu protoka krvi ili aneurizmatско proširenje krvnih žila, vodeći su uzrok smrti i invalidnosti u svijetu. Kako se aterosklerotske promjene kod osoba oboljelih od šećerne bolesti javljaju ranije i proširenije su nego kod ostatka populacije, jedan su od glavnih uzroka smrtnosti dijabetičara. Povezanost između šećerne bolesti, nastanka ateroskleroze i razvijanja kardiovaskularnih bolesti potvrdili su 1979. godine Kannel i McGee u Framinghamskoj studiji. U toj je studiji utvrđeno kako šećerna bolest kod muškaraca udvostručuje rizik za razvoj koronarnih bolesti, a u žena utrostručuje (17). Nadalje, stanje hiperinzulinemije dovodi do povećane razine ANG-a II (poglavlje 1.3.) i stimulira signalni put mitogen-aktivirane protein kinaze koja potiče aterogene učinke inzulina. Stvaranju ateroskleroze doprinosi i hiperinzulinemijom povećani ANG II koji zatim inhibira vazodilatacijski učinak inzulina (18).

Hiperglikemija, stanje u kojemu je razina glukoze iznad 7 mmola/L natašte ili 11 mmola/L 2 sata nakon obroka, javlja se kao posljedica šećerne bolesti, a dugoročno utječe na stvaranje kroničnih bolesti na arterijama, živcima i bazalnim membranama. Hiperglikemija zaustavlja stvaranje endotelnih stanica te na taj način koči obnovu endotela krvnih žila. Nadalje, dolazi do povećanja adhezivnosti trombocita neenzimskom glikozilacijom kolagena stjenke žile, potiče se sinteza tromboksana koji je sam po sebi vazokonstriktor, a smanjuje vazodilatator prostaciklin koji sprječava stvaranje trombocitnih ugrušaka. U skupinu rizičnih čimbenika koji utječu na razvoj ateroskleroze u dijabetičara ubrajaju se još dislipoproteinemija, hipertenzija, uricemija, psihološki profil bolesnika, pretilost, neadekvatna prehrana, manjak tjelevoježbe te pušenje. Dislipoproteinemiju, kao najvažnijeg čimbenika, karakteriziraju povišene vrijednosti triglicerida, VLDL-a ili LDL-a, odnosno snižene vrijednosti HDL-a. Vrlo je važno spomenuti i oksidaciju lipoproteina (posebice LDL-a) do koje dolazi glikozilacijom apoproteina B-100 što posljedično dovodi do promjene afiniteta za LDL receptore, povećane osjetljivosti na oksidaciju, fagocitoze te nastanak kompleksa s proteoglikanima u krvnoj žili. Na taj način oksidirani LDL u unutarnjem sloju krvne žile mijenja vazomotoričku aktivnost tako da na vazodilatacijske poticaje odgovori vazokonstrikcijom.

Kako bi se hiperlipoproteinemija držala pod kontrolom vrlo je važno stalno praćenje serumskih lipoproteina, reguliranje glikemije, smanjenje unosa masnoća i povećanje tjelesne aktivnosti (19-21).

## 1.3. Sustav renin-angiotenzin (RAS)

### 1.3.1. Komponente sustava renin-angiotenzin

Jukstaglomerularne stanice bubrega na poticaj sniženog arterijskog tlaka u organizmu počinju izlučivati enzim renin. Renin u krvotoku za svog vremena djelovanja od 30 do 60 minuta počinje djelovati na protein kojeg proizvodi jetra, angiotenzinogen (22). Kao rezultat ove reakcije nastaje dekapeptid (10 aminokiselina) angiotenzin I (ANG I) čija biološka aktivnost nije jaka pa njegova vazokonstriksijska moć ne može izazvati značajnije promjene u tlaku krvi i cirkulaciji. Međutim, ubrzo nakon nastajanja ANG I, pod utjecajem angiotenzin konvertirajućeg enzima (engl. *angiotensin converting enzyme* – ACE) nastaje oktapeptid (8 aminokiselina) angiotenzin II (ANG II) (23). Nastali angiotenzin II u takvom obliku u krvi se zadržava kratko, a njegov je konačni cilj vezati se na receptore, angiotenzin tip I (ATI) i angiotenzin tip II (ATII) (22). Djelovanje angiotenzina II primarno se očituje vazokonstrikcijom, najviše izraženom u manjim ograncima arterija, arteriolama, a manje u venama. Od drugih funkcionalnih učinaka ANG-a II ističu se: lučenje antidiuretskog hormona iz hipofize, aldosterona iz nadbubrežne žlijezde, smanjenje lučenja vode i soli u bubrezima, povećanje lučenja izvanstanične tekućine, stimulacija centara za žeđ, aktivacija simpatikusa, regulacija genske ekspresije i signalnih putova te u konačnici ANG II funkcionira kao fibrozni i proinflamatorni faktor (25,23). U daljnjem metaboličkom putu ANG II posredovanjem angiotenzin konvertirajućeg enzima 2 (ACE2) ili alternativno neutralnom endopeptidazom (NEP) nastaje heptapeptid angiotenzin-(1-7) (ANG-(1-7)) čije djelovanje karakterizira: vazodilatacija, natriureza, antihipertrofični i antifibrotični učinak (23). Nadalje, u procesu razgradnje ANG II mogu sudjelovati i enzimi koji kataliziraju cijepanje N-kraja polipeptida (aminopeptidaze). Takvim procesom nastaju ANG III i ANG IV čije je djelovanje sukladno onom ANG II (23,24).

### 1.3.2. Angiotenzin II u dijabetesu melitusu

Nekoliko organa, osim gušterače, ima ulogu u nastanku i patofiziologiji dijabetesa, a to su jetra, masno tkivo i skeletni mišići. Ti organi imaju vlastiti lokalni RAS sustav koji



može različito djelovati kod dijabetesa tipa II. Takav lokalni RAS sustav reguliran je neovisno o sistemskom RAS-u i koristi druge enzime (kalikrein, tonin, kimazu i tripsin) za nastanak ANG-a II (26).

Dosadašnja istraživanja pokazala su da je angiotenzin II proizveden u različitim tkivima potencijalno uključen u razvoj dijabetesa tipa II i to interakcijama između signalizacije renin-angiotenzin sustava (RAS) i inzulina. Također, istraživanja pokazuju kako upravo ATII i ACE inhibitori poništavaju djelovanje ANG-a II i smanjuju pojavnost dijabetesa tipa II kod visko rizičnih pacijenata za 25%. Inhibicija ANG-a II u nekim studijama na inzulin otpornim modelima glodavaca i pretilim „Zucker“ štakorima očitovala se poboljšanjem inzulinske aktivnosti. Nasuprot tome, istraživanja koja su uključivala akutnu primjenu ANG-a II u ispitanika s normalnom osjetljivošću na inzulin i u ispitanika sa dijabetesom tipa II očitovala su se pojačanom osjetljivošću na inzulin i boljom iskoristivošću glukoze. Nadalje, istraživanja koja su uključivala angiotenzinske receptore pokazala su kako blokada ATI poboljšava funkciju beta-stanica gušterače, ali i štiti organizam od komplikacija koje donosi dijabetes kao što je nefropatija.

ANG II je peptid sa složenim mehanizmom djelovanja te se proizvodi u više različitih organa povezanih s nastankom dijabetesa, a upravo je zbog toga njegova aktivacija tijekom patofizioloških procesa još uvijek nejasna i nedovoljno istražena (26).

### 1.4. Utjecaj hiperbarične oksigenacije na komponente sustava renin-angiotenzin

Dosadašnje studije pokazale su kako učinak na ACE imaju različiti čimbenici pa tako i HBO. Neke od studija donose saznanja kako HBO normalizira aktivnost renina u plazmi kod starijih bolesnika s kroničnim zatajivanjem srca prvog i drugog stupnja. Pretpostavlja se da je uzrok tome poboljšani bubrežni protok krvi (27). Također, neka su istraživanja na živim psima pokazala kako odgovor renina tijekom HBO-a rezultira izrazitom inhibicijom sinteze bubrežnog prostaglandina (28). Nadalje, rezultati jednog istraživanja u kojemu su psima podijeljenima u dvije skupine (jednu izloženu zraku, drugu izloženu HBO-u) injicirani ANG I, ANG II pokazali su značajno povećanje reakcije arterijskog tlaka. Upravo takvi podatci ukazuju na to da HBO povećava sposobnost sustava renin-angiotenzin, da utječe na kardiovaskularnu funkciju (29). Između ostalog, jednim istraživanjem na štakorima dokazana je statistički značajna razlika aktivnosti ACE između dvije skupine zdravih štakora, od kojih

je jedna skupina bila podvrgnuta HBO-u. Takvi rezultati govore u prilog tezi da HBO kod zdravih štakora dovodi do povećanja serumske aktivnosti ACE (30).

Sustav renin-angiotenzin jedan je od mehanizama kojim bubrezi i jetra reguliraju sustav cirkulacije, a prema dosadašnjim istraživanjima jasno je kako je HBO u stanju utjecati na neke komponente tog sustava. Budući da se radi o iznimno kompleksnim mehanizmima djelovanja samih komponenti na organizam, ni utjecaj HBO-a na komponente sustava renin-angiotenzin nije u potpunosti jasan i istražen. Dosadašnja istraživanja dala su dobru podlogu za daljnja ispitivanja na ovom području kako bi se u konačnici u potpunosti shvatio mehanizam djelovanja HBO-a na ovaj sustav (27-30).

### **2. HIPOTEZA**

Hipoteza ovoga rada mogući je utjecaj hiperbarične oksigenacije na promjenu razine angiotenzina II kod Sprague-Dawley štakora s animalnim modelom šećerne bolesti.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su:

- A) Odrediti količinu plazmatskog angiotenzina II kod Sprague-Dawley štakora s animalnim modelom šećerne bolesti pomoću ELISA metode.
- B) Dokazati mijenja li hiperbarična oksigenacija i na koji način plazmatsku razinu angiotenzina II kod ispitanika.

### 4. ISPITANICI I METODE

#### 4.1. Ustroj studije

Eksperimentalna studija na pokusnim životinjama (Sprague-Dawley štakori).

#### 4.2. Eksperimentalne životinje

U istraživanju su korišteni Sprague-Dawley štakori starosti 12-16 tjedana sa standardnom ishranom i stalno dostupnom vodom. Životinje su podijeljene u 2 skupine:

- a) Kontrolna skupina s animalnim modelom šećerne bolesti (DM)
- b) Skupina s animalnim modelom šećerne bolesti podvrgnuta hiperbaričnoj oksigenaciji (DM+HBO)

Na štakorima obaju skupina korišten je animalni model šećerne bolesti tipa 1 izazvan streptozocinom. U životnoj dobi od 6 tjedana ispitanicima je intraperitonealno injeciran streptozocin u količini 60 mg/kg. Kako bi se provjerio učinak tog postupka nakon 7-10 dana ispitanicima je mjerena koncentracija glukoze u krvi glukometrom (One Touch ultra, Life Scan, Inc.). Nadalje, životinje su čuvane pod istim uvjetima još 8 tjedana nakon čega su podvrgnute hiperbaričnoj oksigenaciji (druga skupina) te mjernoj analizi.

Istraživanje je obavljeno uz pozitivno mišljenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (klasa: 602-04/14-08/06, broj: 2158-61-07-14-124, u okviru istraživanja Drenjančević, prof. dr. sc.: „Djelovanje kisika na vaskularnu funkciju u zdravlju i bolesti“), a postupak uzgoja eksperimentalnih životinja proveden je u skladu s Europskom konvencijom o zaštiti kralješnjaka koji se koriste u eksperimentalne i druge znanstvene svrhe (Vijeće Europe br.123, Strasbourg 1985.).

#### 4.3. Hiperbarični protokol

U ovom istraživanju ispitanici su podvrgnuti 100% kisiku u hiperbaričnoj komori tvrtke *Duro Đaković* koja je redovno atestirana (slika 1.). Komora je dizajnirana tako da se sa svake strane nalaze prozori za praćenje ispitanika i unutrašnjosti, a od sigurnosnih ventila sadrži ventile za reguliranje temperature i tlaka te ventile za odvod i dovod plina. U

## 4. ISPITANICI I METODE

unutrašnjosti komore nalazi se još i adsorbens ugljičnog dioksida koji mijenja boju ovisno o istrošenosti.



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

Samom procesu HBO-a štakori se izlažu 4 uzastopna dana, jednom dnevno u trajanju od 2 sata, a svakom procesu prethodi dodatnih 15 minuta kompresije i u konačnici 15 minuta dekompresije. Štakori su podvrgnuti 100% kisiku pod tlakom od 2 bara uz protok 2-3 L/min dan nakon zadnjeg izlaganja HBO-u izvodi se pokus.

### 4.4. Uzorkovanje i priprema uzoraka

Prije pokusa štakorima je intraperitonealno injecirana kombinacija ketamina 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2ml, Pfizer) i midazolama 2,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma) u svrhu anesteziranja. Nadalje,

## 4. ISPITANICI I METODE

štakori su dekapitirani pomoću giljotine te su uzorci njihove krvi skupljeni u spremnike koji sadržavaju EDTA antikoagulans kako bi se iz njih mogla izdvojiti plazma. Uzorci krvi centrifugirani su 20 minuta na 3000 okretaja pri temperaturi od +4 °C. Nakon centrifugiranja patrone potrebne za daljnji rad isprani su prvo s 1 mL metanola, a zatim s 1 mL vode. Zatim su dodana 2 mL plazme u filter patrone i proces ispiranja ponovljen s 1 mL vode. Razrijeđen je apsorbirani angiotenzin s 0,5 mL metanola i u konačnici uparen metanol s 0,5 mL dilucijskog pufera. Tako pripremljeni uzorak još jednom je centrifugiran pri istim uvjetima, a postupak ponovljen sa svim uzorcima krvi.

### 4.5. Potrebni reagensi

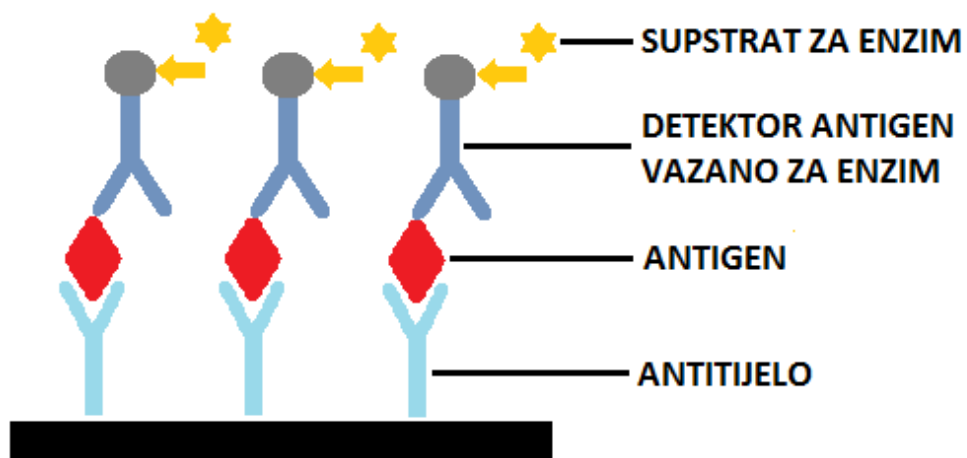
Prije pokusa bilo je potrebno prvo pripremiti sve reagense prema uputama proizvođača. Korišteni su sljedeći reagensi:

1. Dilucijski pufer
2. Angiotenzin II standard – 8 standarda napravljenih prema uputama tablice za razrjeđivanje iz kita.
3. Otopina konjugata
4. Glutaraldehid
5. Borov trimetilamin
6. Otopina supstrata (Ellmanov reagens)
7. Pufer za ispiranje

Dalje je pokus izvođen prema uputama proizvođača (poglavlje 4.6.). Važno je naglasiti da za pravilno i uspješno izvođenje pokusa svi reagensi moraju biti na sobnoj temperaturi, a nastavci korišteni pri pipetiranju redovno mijenjani.

### 4.6. Određivanje koncentracije angiotenzina II ELISA metodom

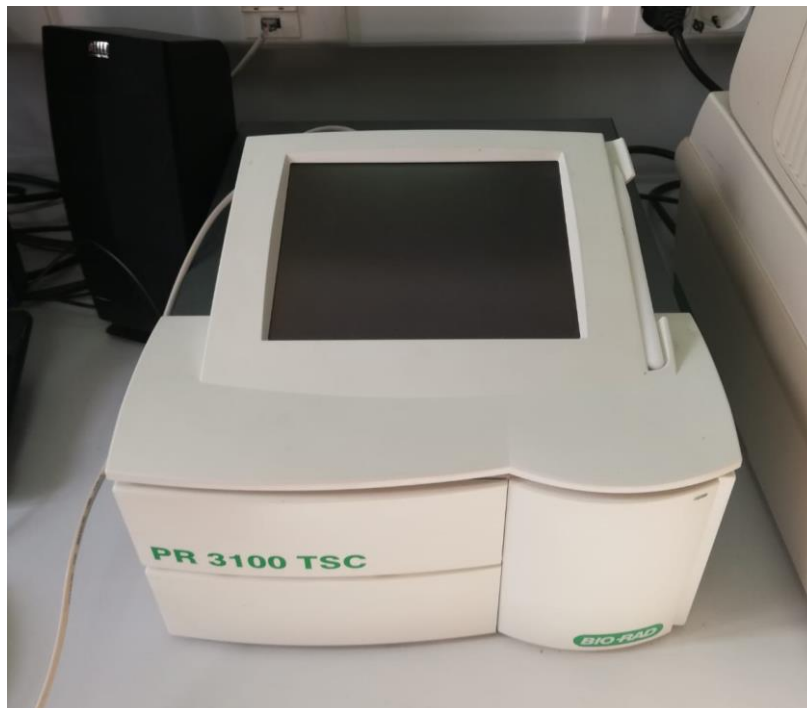
Imunoenzimskim ELISA testom (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; ELISA) određuje se prisutnost i količina antigena. Reakcija se temelji na vezanju antitijela na antigen te spektrofotometrijskom očitavanju nastale reakcije. Samu tehniku karakterizira imobiliziranje jedne ili dvije komponente na čvrstu podlogu. Tako vezana komponenta ne može se izmjeriti bez dodatka detektor antitijela obilježenog enzimom. Potreban je još supstrat za enzim kako bi reakcija rezultirala mjerljivim promjenama intenziteta obojenja (31,32).



**Slika 2.** Prikaz načela ELISA testa.

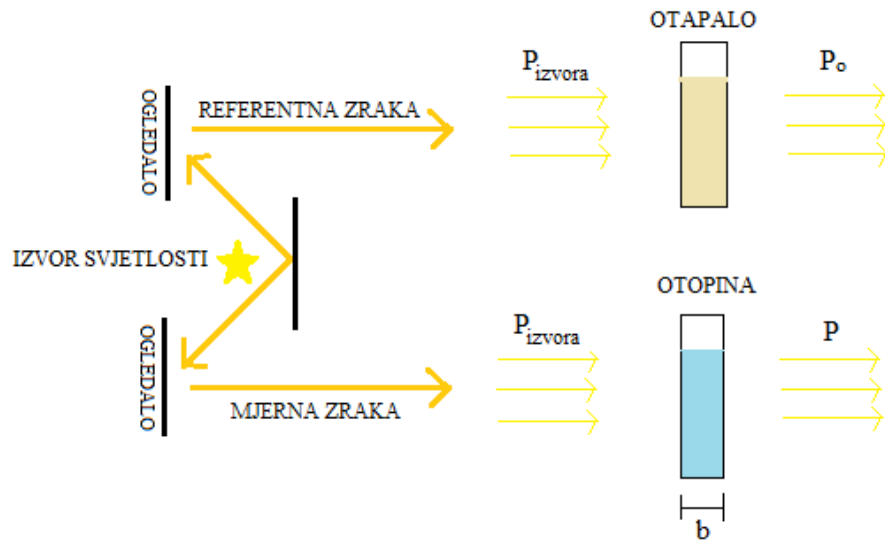
Pri izradi ovog pokusa korišten je komercijalni kit za određivanje angiotenzina II, proizvođača BioVendor (Brno, Republika Češka, Kat.Br.RA05880R). Nakon pripreme svih reagensa započet je postupak analize uzoraka seruma. Za daljnji postupak bila je potrebna mikrotitarska pločica s 96 jažica koja se ispiru 5 puta puferom za ispiranje. Pločica je spremna za izvođenje pokusa nakon što su određene pozicije na koje se dodaju standardi, slijepi probe te uzorci kontrolne i skupine podvrgnute HBO-u. Na mikrotitarskoj pločici nalaze se imobilizirana monoklonska antitijela za angiotenzin II. Nakon ispiranja molekule ANG-a II ostaju kovalentno vezane glutaraldehydom za pločicu. Slijede postupci ispiranja i denaturiranja kako bi se u konačnici na antigen ANG II vezalo monoklonsko antitijelo označeno acetilkolinesterazom (AChE konjugat). Zatim je pločicu potrebno ponovno ispirati i dodati otopinu supstrata (Ellmanov reagens) kako bi se dobio žuti spoj. Intenzitet obojenja toga spoja, odnosno apsorbancija mjeri se spektrofotometrijski na čitaču mikrotitarskih pločica - BioRad 93200 PR3100 TSC Microplate Reader, na valnoj duljini od 414 nm.





**Slika 3.** Čitač mikrotitarskih pločica, *BioRad 93200 PR3100 TSC MicroplateReader.*

Apsorbancija je logaritam omjera intenziteta upadnog zračenja( $P_0$ ) i propuštenog zračenja ( $P$ ) kroz uzorak. Opisuje se Beer-Lambertovim zakonom, prema formuli:  $A = \epsilon bc$ , gdje je ( $\epsilon$ ) molarni apsorpcijski koeficijent svojstven svakoj vrsti i ovisan o valnoj duljini svjetlosti, ( $b$ ) duljina puta svjetlosti kroz uzorak, a ( $c$ ) koncentracija tvari u otopini (15).



**Slika 4.** Shematski prikaz apsorbancije.

Nadalje se prema uputama proizvođača uz razrjeđenja standarda izradi standardna krivulja, pomoću koje se može na temelju apsorbancija odrediti količinu angiotenzina II. Izmjereni intenzitet obojenja proporcionalan je količini nastalog konjugata, odnosno angiotenzina II.

#### 4.7. Statističke metode

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. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Razlika se smatrala statistički značajnom uz  $P < 0.05$ .

## 5. REZULTATI

Sprague-Dawley štakori korišteni u ovom istraživanju podijeljeni su u 2 skupine, prva skupina je kontrolna (DM) i nju čine štakori sa animalnim modelom šećerne bolesti, dok drugu skupinu (DM + HBO) čine štakori sa animalnim modelom šećerne bolesti izloženi HBO. Podatci o masi i koncentraciji glukoze ispitanika nalaze se u tablicama (1. i 2.) ispod odlomka.

**Tablica 1.** *Vrijednosti mase i glukoze Sprague-Dawley štakora sa animalnim modelom šećerne bolesti.*

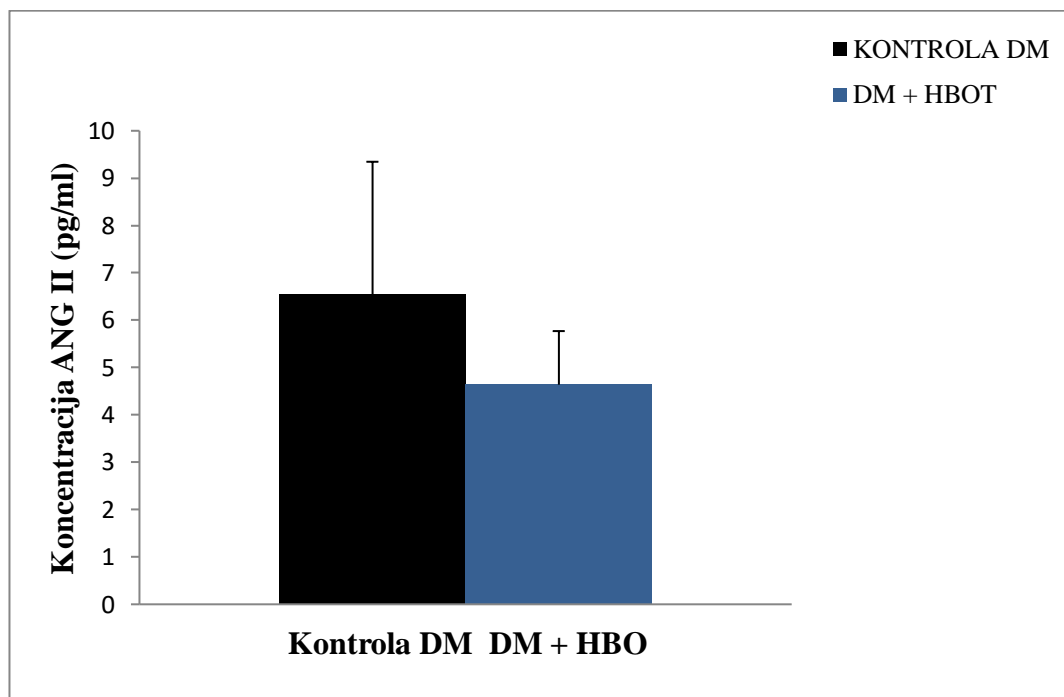
	Masa (g)	Guk (mmol/L)
DM 1	300	31,4
DM 2	242	30
DM 3	285	29,4
DM 4	330	29
DM 5	295	32,3
DM 6	343	28,3
DM 7	357	28,1

**Tablica 2.** *Vrijednosti mase i glukoze Sprague-Dawley štakora s animalnim modelom šećerne bolesti izloženih hiperbaričnoj oksigenaciji*

	Masa (g)	Guk (mmol/L)
DM + HBO 1	236	32,4
DM + HBO 2	364	26,2
DM + HBO 3	302	26,8
DM + HBO 4	305	30,3
DM + HBO 5	330	29,9
DM + HBO 6	260	29,4
DM + HBO 7	320	27,1

## 5. REZULTATI

Koncentracije ANG-a II mjerene su ELISA metodom u kontrolnoj skupini dijabetičnih štakora i u skupini dijabetičnih štakora izloženih HBO. Slika 5. Prikazuje rezultate. Statistička analiza pokazuje da HBO ne mijenja značajno koncentraciju ANG-a II (pg/ml) kod dijabetičnih štakora, odnosno nema statistički značajne razlike između DM skupine (6,541 (2,8)) i HBO DM skupine (4,634 (1,1)). ( $P > 0,05$ , Mann-Whitney U test).



**Slika 5.** Prikaz plazmatske koncentracije ANG II kod kontrolne DM skupine, gdje je  $N=7$  i kod HBO DM skupine,  $N=7$ . Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Statistički nije utvrđena značajna razlika ( $P = 0,122$ , Mann-Whitney U test).

### 6. RASPRAVA

Šećerna bolest (lat. *diabetes mellitus*) bolest je modernog doba koja donosi i drukčije životne i prehrabene navike. Sama bolest karakterizirana je poremećajem metabolizma ugljikohidrata, masti i bjelančevina. Dva su tipa šećerne bolesti, tip I i tip II. Tip I definiran je smanjenom ili potpunom nemogućnošću lučenja inzulina, dok tip II podrazumijeva neosjetljivost perifernih stanica na inzulin (34). Kao kronična bolest dijabetes melitus ostavlja posljedice na kardiovaskularni sustav, odnosno vaskularnu reaktivnost. Dosadašnja istraživanja u kontekstu utjecaja dijabetesa melitusa na krvne žile pokazala su smanjeni odgovor na vazodilatacijske poticaje (35).

Hiperbarična oksigenacija kao terapija 100% kisikom svoj je doprinos dala kod zarastanja rana (posebice u kroničnih dijabetičnih rana) i ishemijskih ulceracija, inhibicije rasta mikroba, deaktivacije bakterijskih toksina, pojačavanja rada bijelih krvnih stanica u infekcijama te općenitog povoljnog utjecaja na organizam (7). Kako sam mehanizam djelovanja HBO-a nije u potpunosti razjašnjen, na temelju dosadašnjih istraživanja pretpostavlja se kako ona odigrava ulogu modulirajući mehanizme vaskularnih reakcija na podražaje vazodilatatora i vazokonstriktora (36,37).

Kako bi se ispitalo utječe li HBO na plazmatsku razinu vazokonstriktora ANG-a II, u ovom radu opisuju se mjerene koncentracije ANG-a II kod Sprague-Dawley štakora s animalnim modelom šećerne bolesti nakon provedbe HBO-a. Jedna grupa ispitanika činila je kontrolu, a druga je bila podvrgnuta procesu HBO-a. U konačnici, plazmatska razina u ispitivanim uzorcima mjerila se ELISA metodom. Rezultati mjerenja i statističke analize nisu pokazali statistički značajnu razliku u povećanju razine ANG-a II između skupina dijabetičnih štakora izloženih i neizloženih HBO-u.

Usprkos tome što ovim istraživanjem nije potvrđena statistički značajna razlika, terapija HBO dosad je pokazala nedvojbene terapijske rezultate kod cijeljenja rana, kroničnih ulkusa, kontrole glikemije i povoljnih utjecaja na razvoj ateroskleroze kod dijabetičara. Također, dosadašnja istraživanja svakako pokazuju konkretne rezultate koji povezuju terapiju HBO i povećanje sposobnosti sustava renin-angiotenzin (27-30). Kako su učinci HBO-a i mehanizmi djelovanja ANG-a II na vaskularnu reaktivnost i razvoj dijabetesa melitusa i dalje u procesu ispitivanja i otkrivanja, svaka nova spoznaja i eksperiment

upotpunjuju sliku djelovanja tih mehanizama u organizmu. Također, važno je napomenuti kako su dobiveni rezultati vrlo važni za unaprjeđenje saznanja i razumijevanja učinaka kisika i HBO-a u cirkulaciji. Podatak da HBO ne mijenja bitno plazmatsku koncentraciju ANG-a II u dijabetičnih jedinki pridonosi boljoj interpretaciji opaženih učinaka HBO-a na vaskularnu funkciju, primjerice na pojačanje vaskularnih odgovora na ANG-(1-7) u animalnom modelu dijabetesa (36). S obzirom na to da bi različita koncentracija ANG II u HBO-u 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, podatci dobiveni ovim istraživanjem uspostavljaju referentne podatke učinka HBO-a na plazmatsku koncentraciju ANG-a II u dijabetičnih životinja za specifični protokol koji se koristi za istraživanje intermitentnog izlaganja HBO-u u Laboratoriju za istraživanje cirkulacije Medicinskog fakulteta u Osijeku. Taj konkretni protokol već je više puta korišten za istraživanja HBO-a. Za brojna buduća istraživanja koja će ga rabiti bit će korisni i referentni dobiveni podatci o ANGI koncentraciji u dijabetičnih Sprague-Dawley štakora, a istovremeno i temelj za interpretaciju budućih rezultata.

### 7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja na Sprague-Dawley štakorima s animalnim modelom šećerne bolesti zaključuje se kako hiperbarična oksigenacija ne utječe na koncentraciju serumskog angiotenzina II.

### 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Cilj je ovog istraživanja dokazati mijenja li i na koji način hiperbarična oksigenacija razinu plazmatskog angiotenzina II kod štakora s animalnim modelom šećerne bolesti.

**Nacrt studije:** Eksperimentalna studija.

**Ispitanici i metode:** U istraživanju su korišteni Sprague-Dawley štakori s animalnim modelom šećerne bolesti uzrokovanim streptozocinom. Eksperimentalne životinje bilo su podijeljene u 2 skupine, jednu kontrolnu (N=7) i drugu podvrgnutu HBO-u (N=7). Izložena skupina bila je podvrgnuta HBO-u 4 uzastopna dana po 2 sata pod tlakom od 2 bara. Štakori su nakon toga (5. dan) anestetizirani i dekapitirani u cilju uzorkovanja krvi iz koje se centrifugiranjem dobila plazma. Iz uzoraka plazme spektrofotometrijskom metodom ELISA izmjerene su koncentracije ANG-a II.

**Rezultati:** Analiza dobivenih podataka pokazuje da nema statistički značajne razlike između kontrolne skupine sa dijabetesom (6,541 (2,8) pg/ml) i skupine dijabetičnih štakora izloženih HBO (4,634 (1,12) pg/ml). ( $P > 0,05$ , Mann-Whitney U test).

**Zaključak:** Hiperbarična oksigenacija u okviru specifičnog korištenog protokola ne mijenja značajno razinu angiotenzina II u plazmi muških Sprague-Dawley štakora s animalnim modelom šećerne bolesti.

**Ključne riječi:** Hiperbarična oksigenacija; angiotenzin II; šećerna bolest; ELISA



### 9. SUMMARY

**Objective:** The aim of this study is to prove whether and how hyperbaric oxygenation alters plasma angiotensin II levels in rats with an animal model of diabetes mellitus.

**Study design:** Experimental study.

**Material and methods:** Sprague-Dawley rats with an animal model of streptozocin-induced diabetes mellitus were used in the study. The experimental animals were divided into 2 groups, one control (N = 7) and the other subjected to HBO (N = 7). The exposed group was subjected to HBO for 4 consecutive days for 2 hours at a pressure of 2 bar. The rats were then (on the 5<sup>th</sup> day) anesthetized and decapitated to sample blood from which plasma was obtained by centrifugation. ANG II concentrations were measured from plasma samples by ELISA spectrophotometry.

**Results:** The analysis of the collected data shows that there are no statistically significant differences between the control groups with diabetes (6,541 pg / ml  $\pm$  2,804) and the group of diabetic rats exposed to the HBO (4,634 (1,12) pg/ml). (P>0,05, Mann-Whitney U test).

**Conclusion:** Hyperbaric oxygenation in the context of the specific protocol that is being used does not significantly alter plasma angiotensin II levels in male Sprague-Dawley rats with an animal model of diabetes mellitus.

**Keywords:** Hyperbaric oxygenation; angiotensin II; diabetes mellitus; ELISA

**10. LITERATURA**

1. Chng J, Low CT, Kang WL. The development of hyperbaric and diving medicine in Singapore. *Singapore Med J.* 2011; 52:901-5.
2. Gill AL, Bell CNA. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM.* 2004;97:385–395.
3. Poliklinika OXY. Hiperbarična oksigenacija (HBOT). Dostupno na adresi: <http://oxy.hr/hiperbaricna-oksigenacija-hbot/lijecenje-kisikom/lijecenje-primjenom-hiperbaricne-oksigenacije>. Datum pristupa: 17.7.2019.
4. Dor M. Avishay; Kevin M. Tenny. Henry's law. StatPearls Publishing LLC. 2019.
5. Cafaro R.P. Hypoxia. Its Causes and Symptoms. 1960; 7(4): 4–8.
6. Goyal A, Chonis T, Cooper J.S. Hyperbaric cardiovascular effects. StatPearls Publishing LLC. 2019.
7. Hyperbarxs. Physiological Effects of Hyperbaric Oxygen Therapy. Dostupno na stranici: <https://hyperbarxs.com/physiological-effects-hyperbaric-oxygen-therapy/>. Datum prijave: 8.8.2019.
8. Nagatomo F, Fujino H, Takeda I, Ishihara A. Effects of hyperbaric oxygenation on blood pressure levels of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens.* 2010; 32:193-7.
9. Undersea & Hyperbaric Medical Society. Undersea & Hyperbaric Medical Society. Dostupno na adresi: <https://www.uhms.org/>. Datum prijave: 23.7.2019.
10. DuBose K.J, Cooper J.S. Hyperbaric patient selection. StatPearls Publishing LLC. 2019.
11. V. Škrabić. Dabetes mellitus – šećerna bolest. Dostupno na adresi: [neuron.mefst.hr>docs>Genetika\\_sec\\_bol\\_nastavni\\_tekst](http://neuron.mefst.hr/docs/Genetika_sec_bol_nastavni_tekst). Datum prijave: 17.7.2019.
12. Cybermed. Anatomija i fiziologija gušterače. Dostupno na adresi: [https://www.cybermed.hr/centri\\_a\\_z/rak\\_gusterace/anatomija\\_i\\_fiziologija\\_gusterace](https://www.cybermed.hr/centri_a_z/rak_gusterace/anatomija_i_fiziologija_gusterace). Datum prijave: 17.7.2019.
13. Tahirović F. H. Šećerna bolest, Medicinski fakultet, Tuzla, 2004; 12,13,19,20,152-154
14. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2005; 22:359-70.

15. King A. The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*. 2012; 166, 877-894.
16. Vavra JJ, Deboer C, Dietz A, Hanka LJ, Sokolski WT. Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiot Annu*. 1959; 7:230-5.
17. Metelko Ž, Babić Z, Pavlič-Renar I. Šećerna bolest i ateroskleroza. *MEDICUS*. 2000. Vol. 9, No. 1, 25 – 33.
18. Smirčić-Duvnjak L. Arterijska hipertenzija i šećerna bolest. *Medix*. 2009; broj 80/81.
19. Verhulst MJL, Loos BG, Gerdes VEA, Teeuw WJ. Evaluating all potential oral complications of Diabetes mellitus. 2019; 18;10:56.
20. Low Wang CC, Hess CN, Hiatt WR, Goldfine AB. Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus: Atherosclerotic Cardiovascular Disease and Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus - Mechanisms, Management, and Clinical Considerations. 2016; 14;133(24):2459-502.
21. Aganović I, Boras J, Car N, Metelko Ž. Dijabetes i koronarna bolest srca. *MEDICUS* 2003. Vol. 12, No. 1, 77 – 83.
22. Guyton AC, Hall, JE. *Medicinska fiziologija*. Jedanaesto izdanje: Medicinska naklada, Zagreb; 2006.
23. Ljutić D, Jeličić I. Lijekovi koji djeluju na rening- angiotenzin- aldosteronski sustav. *Medicus*, No.2. 2010;139-146.
24. Taylor A. Aminopeptidases: structure and function. 1993; 7(2):290-8.
25. Benigni A, Cassis P, Remuzzi G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. 2010; 2(7):247-57.
26. Kwan Yi Chu, Po Sing Leung. Angiotensin II in type II diabetes mellitus. *Current Protein & Peptide Science*. 2009; 10: 75.
27. Khaïdarova GK, 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. 1989; (3):33-5.
28. Walker BR, Hong SK, Mookerjee BK, Krasney JA. Suppressed renin release during hyperoxia in the conscious dog. 1981; 8(3):137-45.
29. Sventek JC, Zambraski EJ. Effects of 100 percent oxygen on the cardiovascular responses to vasoactive compounds in the dog. *Aviat Space Environ Med*. 1985; 56:972-5.

30. 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* 34 Seoul, South Korea, 2016; str. e326-e327
31. Bonwick, G.A., Smith, C.J. Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. *Int. J. Food Sci. Tech.* 2004; 39, 817-827.
32. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
33. Kemijski rječnik. Apsorbancija. Dostupno na stranici:  
<https://glossary.periodni.com/rjecnik.php?hr=apsorbancija>. Datum prijave: 1.8.2019.
34. Vrhovac B, Francetić I, Jakšić B, Labar B, Vucelić B. *Interna medicina*. 11.poglavlje Šećerna bolest. 3 izd. Naknada Ljevak, 2003; str 1264-1284.
35. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RAK, Warnholtz A, Meinerz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzer T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res.* 2001; 88:E14- E22.
36. Kibel A. (2013.) Modulacija vaskularnih odgovora na angiotensin II i angiotenzin (1-7) hiperbaričnom oksigenacijom-uloga CYP enzima. Doktorska disertacija. Osijek: Medicinski fakultet.
37. Unfirer S, Kibel A, Drenjančević-Perić I. The effect of hyperbaric oxygen therapy on blood vessel function in diabetes mellitus. *Medical Hypothesis.* 2008; 71:776-780.

### 11. ŽIVOTOPIS

#### **Osobni podatci:**

Ime i prezime: Helena Bogunović

Adresa: Braće Radića 69, Sibinj 35252, Republika Hrvatska

Mjesto i datum rođenja: Slavonski Brod, 26.12.1995.

Broj telefona: +385 425-924

Broj mobilnog telefona: +385 91 952 9192

E-mail: [bogunovichelena@gmail.com](mailto:bogunovichelena@gmail.com)

#### **Obrazovanje:**

2010. – 2014. Gimnazija “Matija Mesić”, Slavonski Brod

2014. – 2017. Zdravstveno veleučilište, studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike, Zagreb

2017. – Sveučilište Josipa Juraja Strossmayera, Medicinski fakultet, diplomski studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike, Osijek

#### **Radno iskustvo:**

2018. – pripravnički staž, Opća bolnica "Dr. J. Benčević", Slavonski Brod

#### **Posebna znanja i vještine:**

Jezici: engleski (tečno), njemački (osnove)

Računalne vještine: MS Office

Vozačka dozvola: B kategorija