

UTJECAJ AKUTNE I INTERMITENTNE HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA REAKTIVNOST KRVNIH ŽILA KOD ZDRAVIH SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA

Mihaljević, Zrinka

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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:152:223321>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET

Zrinka Mihaljević, prof.

**UTJECAJ AKUTNE I INTERMITENTNE HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA
REAKTIVNOST KRVNIH ŽILA KOD ZDRAVIH SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET

Zrinka Mihaljević, prof.

**UTJECAJ AKUTNE I INTERMITENTNE HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA
REAKTIVNOST KRVNIH ŽILA KOD ZDRAVIH SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2018.

Mentor rada: prof.dr.sc. Ines Drenjančević, dr.med.

Rad ima 84 stranice

Ovaj je rad napravljen u okviru znanstveno-istraživačkog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta broj: 219-2160133-2034. Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije, Laboratoriju za kliničku i molekularnu imunologiju i u Laboratoriju za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku te na Institutu za Biotehnologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Pečuhu.

„Surround yourself with the dreamers and the doers, the believers and the thinkers, but most of all, surround yourself with those who see greatness within you, even when you don't see it in yourself.“ (Edmund Lee)

Puno hvala prof.dr.sc. Ines Drenjančević i svim članovima Katedre za fiziologiju i imunologiju koji su mi pomogli u radu.

Posebno hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju!

Sadržaj

| | |
|--|-----|
| Popis kratica korištenih u doktorskoj disertaciji..... | III |
| Popis tablica..... | VI |
| Popis slika..... | VII |
| 1.Uvod | 1 |
| 1.1. Terapija hiperbaričnim kisikom (HBO ₂)..... | 1 |
| 1.2. Građa krvnih žila i hijerarhija | 2 |
| 1.3. Fiziološki mehanizmi vazodilatacije | 3 |
| 1.4. Sinteza dušik (II) - oksida (NO)..... | 3 |
| 1.5. Metabolizam arahidonske kiseline..... | 4 |
| 1.6. Čimbenici hiperpolarizacije endotelnog podrijetla (EDHF)..... | 5 |
| 1.7. Kisik, kisikovi radikali i oksidativni stres..... | 5 |
| 1.8. Antioksidativni mehanizmi i uloga TEMPOL-a..... | 6 |
| 1.9. Hipoksijom inducirani faktor – 1 alfa (HIF-1 α)..... | 9 |
| 2. Hipoteza | 11 |
| 3. Ciljevi istraživanja | 12 |
| 4. Materijali i metode | 13 |
| 4.1. Protokoli za izlaganje hiperbaričnom kisiku..... | 13 |
| 4.2. Mjerenje krvnoga tlaka..... | 13 |
| 4.3. Skupljanje arterijskih uzoraka krvi i torakalnih aorti..... | 14 |
| 4.4. Pokusi na izoliranim aortalnim prstenima..... | 14 |
| 4.4.1. Relaksacija aortnih prstenova ovisna o endotelu..... | 15 |
| 4.4.2. Relaksacija neovisna o endotelu..... | 16 |
| 4.4.3. Relaksacija aortnih prstenova ovisna o endotelu uzrokovana hipoksijom..... | 16 |
| 4.5. Određivanje koncentracije HIF-1alfa inhibitora i relativnog izražaja proteina Western blot metodom..... | 17 |
| 4.6. Mjerenje oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta..... | 18 |
| 4.7. Određivanje razine superoksida <i>in situ</i> metodom fluorescencije..... | 18 |
| 4.8. Relativni izražaj gena određen PCR metodom u realnom vremenu..... | 19 |
| 4.9. Statističke metode..... | 20 |
| 5. Rezultati | 21 |
| 5.1. Masa štakora i srednji arterijski tlak..... | 21 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2. Razina oksidativnog stresa (TBARS) i antioksidativni kapacitet (FRAP) u serumu i tkivu aorte..... | 21 |
| 5.3. Mjerenje razine superoksida metodom fluorescencije <i>in situ</i> | 24 |
| 5.4. Rezultati na aortnim prstenima..... | 28 |
| 5.4.1. Bazični odgovor na ACh..... | 28 |
| 5.4.2. Endotel-neovisna relaksacija..... | 29 |
| 5.4.3. Odgovor aortnih prstena na ACh nakon primjene inhibitora..... | 30 |
| 5.4.4. Hipoksijom uzrokovana relaksacija ovisna o endotelu..... | 38 |
| 5.5. Relativni izražaj mRNA u tkivu aorte..... | 43 |
| 5.6. Relativni izražaj proteina u tkivu aorte..... | 46 |
| 6. Rasprava | 49 |
| 6.1. Uloga HBO ₂ i oksidativnog stresa na mehanizme relaksacije..... | 49 |
| 6.2. Uloga HBO ₂ i HIF-1 α na mehanizme relaksacije..... | 54 |
| 7. Zaključci | 57 |
| 8. Sažetak | 58 |
| 9. Summary | 60 |
| 10. Literatura | 62 |
| 11. Životopis | 76 |

Popis kratica

| | |
|-----------------------|---|
| AA | arahidonska kiselina |
| ACh | acetilkolin |
| ADMA | asimetrični dimetil arginin |
| AOPP | napredni oksidirani proteinski proizvodi (prema engl. <i>Advanced Oxidation Protein Products</i>) |
| ADP | adenozin difosfat |
| Ang II | angiotenzin II |
| ATP | adenozin trifosfat |
| BH₄ | tetrahidrobiopterin |
| cAMP | ciklički adenozin-monofosfat |
| CAT | katalaza (prema engl. <i>catalase</i>) |
| cGMP | ciklički gvanozin monofosfat |
| COX | enzim ciklooksigenaza |
| COX-1 | enzim ciklooksigenaza-1 |
| COX-2 | enzim ciklooksigenaza-2 |
| CTRL | kontrolna grupa |
| CuZn SOD/ | |
| SOD1 | bakar-cink superoksid dismutaza, izoforma 1 |
| CYP450 | citokrom p450 |
| DHE | dihidroetidium |
| EC SOD/ | |
| SOD3 | izvanstanični oblik superoksid dismutaze, izoforma 3 |
| ED | endotelna disfunkcija |
| EDHF | endotelni čimbenici hiperpolarizacije (prema engl. <i>Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors</i>) |
| EDTA | etilendiamintetraoctena kiselina (prema engl. <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>) |
| EDRF | endotelni čimbenici relaksacije (prema engl. <i>Endothelium-Derived Relaxing Factors</i>) |
| EETs | epoksieikozatrienoična kiselina (prema engl. <i>Epoxyeicosatrienoic Acid</i>) |
| eNOS | endotelna dušik-oksid sintetaza (prema engl. <i>Endothelial Nitric-Oxide Synthase</i>) |
| FAD | flamin adenin dinukleotid |

| | |
|-----------------------------------|--|
| FMN | flavin mononukleotid |
| FRAP | antioksidativni kapacitet plazme (prema engl. <i>Ferric Reducing Ability of Plasma</i>) |
| GPx | glutation peroksidaze |
| GPx1 | glutation peroksidaza 1 |
| GPx4 | glutation peroksidaza 4 |
| H₂O₂ | vodikov peroksid |
| HBO₂ | terapija hiperbaričnim kisikom |
| A-HBO₂ | akutno izložena grupa hiperbaričnoj oksigenaciji |
| 24H-HBO₂ | grupa analizirana 24h nakon jednog izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji |
| 4D-HBO₂ | grupa izlagana 4 dana hiperbaričnoj oksigenaciji i analizirana 5.dan |
| HCIO | hiperklorična kiselina |
| 20-HETE | 20-hidroksieikozatrienoična kiselina |
| HIF-1 | hipoksijom inducirani čimbenik transkripcije-1 |
| HIF-1α | hipoksijom inducirani čimbenik transkripcije-1 alfa podjedinica |
| HIF-1β | hipoksijom inducirani čimbenik transkripcije-1 beta podjedinica |
| HO • | hidroksilni radikal |
| HPRT | hipoksantin - guanin phosphoribozil transferazeza |
| IL-8 | interleukin 8 |
| INDO | indometacin |
| iNOS | inducibilna dušik-oksid sintetaza (prema engl. <i>Inducible Nitric-Oxide Synthase</i>) |
| LDL | lipoproteini male gustoće (prema engl. <i>Low Density Lipoprotein</i>) |
| L-NAME | L-nitro-arginine metil ester |
| MDA | malondialdehid |
| Mn SOD/ | |
| SOD2 | mangan superoksid dismutaza, izoforma 2 |
| mRNA | glasnička ribonukleinska kiselina (prema engl. <i>messenger Ribonucleic Acid</i>) |
| mtNOS | mitohondrijska dušik (II)- oksid sintetaza |
| NA | noradrenalin |
| NADPH | nikotinamid adenin dinukleotid fosfat |
| NaCl | natrijev klorid |
| NO | dušik (II)- oksid (prema engl. <i>Nitric Oxide</i>) |
| NOS | dušik - oksid sintetaza (prema engl. <i>Nitric-Oxide Synthase</i>) |

| | |
|----------------------------------|---|
| nNOS | neuronalna dušik (II)- oksid sintetaza |
| O₂⁻ | superoksidni anion |
| ONOO⁻ | peroksinitrit |
| PAF | čimbenik aktivacije trombocita (prema engl. <i>Platelet Activating Factor</i>) |
| PEG-SOD | pegilirani oblik superoksid dismutaze |
| PGI₂ | prostaglandin I ₂ (prostaciklin) |
| PHD | prolil hidroksilaza |
| PHD1 | prolil hidroksilaza 1 |
| PHD2 | prolil hidroksilaza 2 |
| PHD3 | prolil hidroksilaza 3 |
| PSS | fiziološka slana otopina (prema engl. <i>Physiological Salt Solution</i>) |
| ROS | slobodni kisikovi radikali (prema engl. <i>Reactive Oxygen Species</i>) |
| RT-PCR | lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (prema engl. <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>) |
| SD | Sprague-Dawley štakori |
| SDS-PAGE | natrijev dodecil sulfat - poliakril amidna gel elektroforeza (prema engl. <i>Sodium Dodecil Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>) |
| SEM | standardna pogreška srednje vrijednosti (prema engl. <i>Standard Error of the Mean</i>) |
| SNP | natrijev nitroprusid (prema engl. <i>Sodium-nitroprusside</i>) |
| SOD | superoksid dismutaza |
| TBARS | reaktivne čestice tiobarbituratne kiseline (prema engl. <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>) |
| TE | Trolox |
| TEMPOL | 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl - SOD mimetik, hvatač superoksidnih radikala |
| TXA₂ | tromboksan A ₂ |
| VEGF | čimbenik rasta endotela krvnih žila (prema engl. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>) |
| VHL | von Hippel-Lindau |
| ω-hidroksilaza | omega hidroksilaza |

Popis tablica

| | |
|--|----|
| Tablica 5.1.1. Vrijednosti tjelesne mase i krvnog tlaka u kontrolnoj i testiranim grupama štakora..... | 21 |
| Tablica 5.5.1. Relativni izražaj mRNA <i>SOD1</i> , 2 i 3 izoformi u tkivu aorte kontrolne i testiranih grupa..... | 43 |
| Tablica 5.5.2 Relativni izražaj mRNA katalaze (<i>CAT</i>) i glutation peroksidaza 1 i 4 (<i>GPx1</i> , <i>GPx4</i>) u tkivu aorte kontrolne i testiranih grupa..... | 44 |
| Tablica 5.5.3. Relativni izražaj ciklooksigenaza 1 i 2 (<i>COX1</i> i 2) te dušik oksid sintaza u tkivu aorte kontrolne i testiranih grupa..... | 44 |
| Tablica 5.5.4. Relativni izražaj mRNA <i>HIF-1α</i> , <i>VEGF</i> , <i>CYP2C11</i> , te sastavnih dijelova NADPH oksidaze <i>p47phox</i> i <i>gp91phox</i> u tkivu aorte..... | 45 |

Popis slika

| | |
|--|--------|
| Slika 4.4.1. Sustav za izolirane aortalne prstenove..... | 15 |
| Slika 4.5.1. Rezultati određivanja potrebne koncentracije HIF- α inhibitora..... | 18 |
| Slika 5.2.1. Serumska razina oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta izmjerenih iz uzoraka arterijske krvi..... | 22 |
| Slika 5.2.2. Razina oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta izmjerena u uzorcima tkiva aorte..... | 23 |
| Slika 5.3.1. Grafički prikaz razina superoksida u testiranim grupama određenih <i>in situ</i> metodom fluorescencije bazično i nakon primjene TEMPOL-a..... | 24 |
| Slika 5.3.2. Grafički prikaz <i>in situ</i> određivanja razine superoksida metodom fluorescencije u kontrolnoj i testiranim skupinama uz primjenu inhibitora..... | 25, 26 |
| Slika 5.3.3. <i>In situ</i> fluorescencija superoksida u tkivu aorte prije i nakon inkubacije s TEMPOL-om u kontrolnoj i testiranim grupama..... | 27 |
| Slika 5.4.1. Bazični odgovor aortalnih prstenova u kontrolnoj i testiranim grupama na primjenu acetilkolina..... | 28 |
| Slika 5.4.2. Reaktivnost aortalnih prstenova na primjenu SNP-a..... | 29 |
| Slika 5.4.3.1. Odgovor aortalnih prstena kontrolne grupe štakora na acetilkolin u bazalnim uvjetima nakon primjene inhibitora..... | 30 |
| Slika 5.4.3.2. Odgovor aortalnih prstena A-HBO ₂ grupe štakora na acetilkolin u bazalnim uvjetima te nakon primjene inhibitora..... | 31 |
| Slika 5.4.3.3. Odgovor aortalnih prstena 24H-HBO ₂ grupe štakora na acetilkolin u bazalnim uvjetima te nakon primjene inhibitora..... | 32 |
| Slika 5.4.3.4. Odgovor aortalnih prstenova 4D-HBO ₂ grupe štakora na acetilkolin u u bazalnim uvjetima te nakon primjene inhibitora..... | 33 |
| Slika 5.4.3.5. Odgovor aortalnih prstenova na acetilkolin nakon primjene inhibitora L-NAME-a u kontrolnoj i testiranim grupama..... | 34 |
| Slika 5.4.3.6. Odgovor aortalnih prstenova na acetilkolin nakon primjene TEMPOL-a u kontrolnoj i testiranim grupama..... | 35 |
| Slika 5.4.3.7. Odgovor aortalnih prstenova na acetilkolin nakon primjene inhibitora indometacinu kontrolnoj i testiranim grupama..... | 36 |
| Slika 5.4.3.8. Odgovor aortalnih prstenova na acetilkolin nakon primjene inhibitora MS-PPOH-au kontrolnoj i testiranim grupama..... | 37 |

| | |
|---|-------|
| Slika 5.4.4.1. Bazični odgovor aortnih prstenova u kontrolnoj i testiranim grupama na hipoksiju..... | 38 |
| Slika 5.4.4.2. Odgovor aortnih prstena kontrolne grupe štakora na hipoksiju u bazalnim uvjetima te nakon primjene inhibitora..... | 39 |
| Slika 5.4.4.3. Odgovor aortnih prstena A-HBO ₂ grupe štakora u bazalnim uvjetima te nakon primjene inhibitora..... | 40 |
| Slika 5.4.4.4. Odgovor aortnih prstena 24H-HBO ₂ grupe štakora na hipoksiju u bazalnim uvjetima te nakon primjene inhibitora..... | 41 |
| Slika 5.4.4.5. Odgovor aortnih prstena 4D-HBO ₂ grupe štakora na hipoksiju u bazalnim uvjetima te nakon primjene inhibitora..... | 42 |
| Slika 5.6.1. Relativni izražaj COX-1, COX-2, iNOS, HIF-1 α , VEGF i CYP2c11 proteina u tkivu aorte..... | 46-48 |

1.UVOD

1.1. Terapija hiperbaričnim kisikom (HBO₂)

Terapija hiperbaričnim kisikom (HBO₂) medicinski je tretman pri čemu je pacijent smješten u tlačnoj komori te udiše 100% kisik pri tlaku većem od 1 atmosfere (1). Udisanjem hiperbaričnog kisika u krvi otapa se i do 20 puta više kisika, nego udisanjem zraka (normalno disanje) ili tri do četiri puta više nego udisanjem kisika pri normalnom tlaku. Difuzijom kisika otopljenog u krvi prema tkivima, velikom brzinom se ispravlja lokalna i/ili opća hipoksija (nedostatak kisika u tkivima). HBO₂ je dodatna terapija za neka stanja u kojima je oksigenacija tkiva smanjena i ne odgovara metaboličkim potrebama. Doprema kisika pod visokim tlakom povećava arterijski i tkivni pO₂ i zato poboljšava oksigenaciju tkiva i smanjuje oštećenja. Kisik je visoko reaktivna molekula koja, pri visokim parcijalnim tlakovima (kao u HBO₂), može pridonijeti povećanom stvaranju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) (2) i utjecati na hemodinamiku i vaskularnu funkciju. Međutim, novija istraživanja pokazuju da produkcija ROS ovisi o hiperbaričnom protokolu (3-8). Na primjer, naša je prethodna studija pokazala da je akutna izloženost HBO₂ povećala oksidacijski stres u plazmi (mjerenjem produkata lipidne peroksidacije), smanjen sistolički i dijastolički krvni tlak, snižen pH i pCO₂ u arterijskoj krvi i povećan pO₂ u zdravih SD štakora (9). S druge strane, intermitentno izlaganje HBO₂ obnavlja vaskularnu relaksaciju (10) i mijenja metaboličke puteve uključene u vazorelaksaciju kod zdravih i dijabetičnih životinja (11-13). Zaključno, HBO₂ može utjecati na funkcionalne i strukturne značajke krvnih žila, ovisno o protokolima aplikacije.

Nove studije pokazuju da HBO₂ pridonosi cijeljenju ishemičnih ulceracija kod dijabetičnih bolesnika te poboljšava ishod nakon moždanog udara (14, 15), infarkta miokarda (16), akutne periferne ishemije ekstremiteta kod ljudi (17) te, također, smanjuje aterosklerotske plakove u animalnim modelima (18). Hiperbarična oksigenacija (HBO₂) također se koristi za poboljšanje liječenja infekcija, kao što su meningokokna sepsa i plinska gangrena (19, 20) pa čak i nekih neurodegenerativnih poremećaja (21-23). Eksperimentalni (11) i klinički podaci upućuju na to da intermitentna HBO₂ (24) smanjuje edem tkiva, povećava sintezu dušikovog oksida (NO), mijenja vaskularnu reaktivnost na stimulaciju (12) i inhibira izražaj neuroinflamatornih čimbenika i apoptotičke putove (25). Iako su navedeni povoljni učinci HBO₂-a dokumentirani, u literaturi se raspoloživo malo podataka o mehanizmima putem kojih HBO₂ posreduje svoj učinak poboljšanja tkivne oksigenacije. Poznato je da su različiti

metaboliti arahidonske kiseline (prostaglandini, EETs, HETEs) te NO iznimno važni u posredovanju vaskularnih reakcija na vazodilatatore i vazokonstriktore (26-30), uključujući podražaje hipoksijom i hiperoksijom (31). U uvjetima smanjenog krvnog protoka primjena HBO₂-a može značajno povećati tkivnu oksigenaciju. Vrlo je malo studija rađenih na zdravim životinjama ili ispitanicima te su oskudni podaci o tome kako hiperbarična oksigenacija utječe na mehanizme vazodilatacije zdravih životinja. U našim prethodnim istraživanjima ispitivani su utjecaji hiperbarične oksigenacije na mehanizme dilatacije kod dijabetičnih životinja i ispitivane su razlike u odnosu na zdrave životinje (11-13). Dr.Unfirer istraživala je promijenjene mehanizme dilatacije kod dijabetičnih štakora pod utjecajem hiperbarične oksigenacije. Ona je dokazala da hiperbarična oksigenacija uzrokuje aktivaciju CYP450 epoksigenazog puta i povećanu produkciju EETs-a kod dijabetičnih životinja izlaganih HBO₂ (12). Nadalje, dr.Kibel je pokazao promijenjeni relaksacijski odgovor na ANGII 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 (11, 13). Ova doktorska disertacija sistematično ispituje samo utjecaj na zdrave životinje. To je važno iz razloga 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.

1.2. Građa krvnih žila i hijerarhija

Žilni se sustav dijeli obzirom na promjer krvnih žila na mikro i makrocirkulaciju (žile promjera većeg od 0,1 mm) (32). Krvne žile većeg promjera građene su od unutarnjeg (endotelnog) sloja i središnjeg (mišićnog sloja) te vanjskog sloja (adventicije). Unutarnji sloj svih krvnih žila čini endotel (lat. *tunica intima*) građen od endotelnih stanica i subendotelnog vezivnog tkiva. Mišićni je sloj (lat. *tunica media*) građen od koncentrično poredanih glatkih mišićnih stanica te kolagena, elastina, proteoglikana te glikoproteina. Arterije imaju najdeblju stijenku od svih krvnih žila, te je mišićni sloj arterija deblji od mišićnog sloja vena iste veličine. Arteriole imaju tanji mišićni sloj, nedostaje im unutrašnja elastična membrana u usporedbi s arterijama i završavaju završnim arteriolama (tzv. metaarteriole) koje nemaju kontinuirani mišićni sloj. Kapilare prosječnog promjera od 7 do 9 μm građene su od jednog sloja endotelnih stanica i debele bazalne membrane koju izlučuje sam endotel. Kapilarno korito napuštaju venule koje su veće od arteriola, ali imaju manji mišićni sloj. Venule se nastavljaju u vene koje su, također, veće od pripadajućih arterija, imaju manji tanji mišićni

sloj, ali puno deblji sloj adventicije (lat. *tunica adventitia*) koja je građena od longitudinalno poredanih kolagenih vlakana. Endotelne stanice imaju brojne funkcije: čine pasivnu barijeru između krvi i okolnog tkiva, aktivno reguliraju izmjenu hranjivih tvari, plinova, hormona i makromolekula. Metabolizam endotelnih stanica utječe na vaskularnu reaktivnost (vazodilataciju i vazokonstrikciju), hemostazu, upalni odgovor te angiogenezu (32).

1.3. Fiziološki mehanizmi vazodilatacije

Dva su osnovna mehanizma vazodilatacije prisutna u krvnim žilama u normalnim fiziološkim uvjetima: vazodilatacija ovisna o endotelu i vazodilatacija neovisna o endotelu. Vazodilatacija ovisna o endotelu posredovana je s tri različite vrste medijatora dušik (II) - oksidom (NO, engl. *nitric oxide*), prostanooidima te čimbenicima hiperpolarizacije endotelnog podrijetla (engl. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*, EDHF) (33). Vazodilatacija neovisna o endotelu nastaje živčanom stimulacijom najčešće kolinergičnim putem (acetilkolin) te egzogenom primjenom izravnih NO (eng. *nitric oxide*, dušik (II)-oksid) donora kao što je natrij-nitroprusid (34, 35).

1.4. Sinteza dušik (II) - oksida (NO) kao vazoaktivne tvari

Dušik (II) - oksid (NO) nastaje iz aminokiseline L-arginina putem enzima NO-sintetaze (NOS). NOS je enzim iz obitelji oksidoreduktaza, a postoji u tri izoforme kao endotelna (eNOS), neuronalna (nNOS) te inducibilna (iNOS). eNOS je enzim ovisan o kalciju što znači da mu je potreban kompleks kalcij-kalmodulina za aktivaciju te još nekoliko kofaktora za samu sintezu NO-a: nikotin amid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinukleotid (FAD), flavin mononukleotid (FMN), ion željeza i tetrahidrobiopterin (BH₄) (34). Aktivaciju eNOS-a uzrokuju brojni agonisti G-protein vezanih receptora (npr. acetilkolin) i fiziološki poticaji (mehanički podražaj samim krvnim protokom, engl. *shearstress*) (36, 37). Nastali NO difuzijom dolazi u glatku mišićnu stanicu gdje aktivira enzim gvanilil ciklazu i povećava količinu cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP) (38). cGMP zatim povećava izlazak kalcijevih iona iz glatke mišićne stanice te se ona opušta i dolazi do vazodilatacije. cGMP također uzrokuje fosforilaciju kalijevih kanala što dovodi do hiperpolarizacije membrane glatke mišićne stanice s posljedičnom vazodilatacijom (39). Egzogeni L-arginin povećava sintezu NO-a te time povećava vazodilataciju ovisnu o NO (40). NO sudjeluje u brojnim fiziološkim funkcijama u mitohondrijima. U kompetenciji je s

kisikom za interakciju s citokromoksidazom i djeluje kao inhibitor respiratornog lanca u mitohondriju. Pri većim koncentracijama NO ulazi u interakciju s kompleksom II i kompleksom III te ireverzibilno blokira respiraciju i sintezu ATP-a. Također, reagira sa superoksidom i formira peroksinitrit koji potom aktivira protein kinazu C, otvara mitohondrijske kalijске kanale ovisne o ATP-u (41). Lacza i suradnici (41) dokazali su postojanje četvrte izoforme NOS enzima, mitohondrijsku NOS (mtNOS). To je enzim potpuno ovisan o kalmodulinu, molekularne težine 140 kDa. Također su pokazali da se aktivnost mtNOS-a značajno povećava tijekom hipoksije. Stvaranje veće količine superoksida tijekom hipoksije u mitohondrijskom respiratornom lancu uzrok je oštećenju stanica (41). Sve je više dokaza koji upućuju na to kako $O_2^{\cdot-}$ igra središnju ulogu u smanjenoj raspoloživosti NO-a. Ovaj visoko reaktivni metabolit kisika oksidira iz endotela nastali NO i time ometa njegovo djelovanje na tonus krvnih žila (42 - 44). Povećana razina $O_2^{\cdot-}$ je povezana s različitim patološkim stanjima, uključujući hipertenziju, ishemijsko-reperfuzijske ozljede i dijabetes (45, 46).

1.5. Metabolizam arahidonske kiseline

Osim NO-a vazodilatacijski učinak imaju i metaboliti arahidonske kiseline. Tri su puta pomoću kojih endotelna stanica metabolizira arahidonsku kiselinu: CYP450 enzimi (omega-hidroksilaza te epoksigenaze) ciklooksigenaza i lipooksigenaza, te nenezimatska razgradnja arahidonske kiseline u prisutnosti slobodnih kisikovih radikala na isoprostane (47). Epoksigenaza je enzim iz citokrom P450 obitelji koji u endotelnoj stanici stvara 4 izomera epoksieikozatrinoične kiseline (EETs) od kojih su 14,15-EETs i 11,12-EETs glavni aktivni metaboliti. Nema dokaza produkcije EETs-a u glatkoj mišićnoj stanici. Citokrom P450 (ω -hidroksilaza) u glatkoj mišićnoj stanici potiče proizvodnju 20-hidroksieikozatrinoične kiseline (20-HETE) koji je vazokonstriktor. Ciklooksigenaza (COX) je enzim koji sudjeluje u sintezi prostanoida iz arahidonske kiseline (AA). Postoje dvije izoforme COX-1 i COX-2. Nastali prostanoidi djeluju oprečno, jedni uzrokuju vazodilataciju (prostaglandin D_2 , prostaglandin E_2 i prostaciklin I_2), a drugi vazokonstrikciju (prostaglandin $F_{2\alpha}$ i tromboxan A_2). Hipoksija aktivira COX pri čemu većinom nastaje prostaciklin, PGI_2 , a on, potom, difuzijom ulazi u glatku mišićnu stanicu u kojoj aktivira enzim adenilil ciklazu i povećava se količina cikličkog adenzin-monofosfata (cAMP). cAMP potiče otvaranje više vrsta kalijevih kanala pri čemu nastaje hiperpolarizacija membrane glatke mišićne stanice s posljedičnom vazodilatacijom.

Lipooksigenaza je enzim koji iz AA stvara 12- i 15-hidroksi eikozatrinoinčne kiseline (HETEs) kao glavne aktivne metabolite u endotelnoj stanici (47).

1.6. Čimbenici hiperpolarizacije endotelnog podrijetla (EDHF)

Na vazodilataciju utječu i tzv. čimbenici hiperpolarizacije endotelnog podrijetla (EDHF). Nekoliko različitih molekula pripada među EDHF: ioni kalija, vodikov peroksid (H_2O_2) i epoksieikozatrinoinčna kiselina (EET-s) (48-51). Smatra se da neki od njih mogu uzrokovati hiperpolarizaciju putem tzv. mioendotelnih tijesnih spojeva. U većini se slučajeva vazodilatacija događa kada na određeni podražaj endotelne stanice dolazi do ulaska iona kalcija u nju i otvaranja više vrsta kalijevih kanala na endotelnoj i na glatkoj mišićnoj stanici. H_2O_2 aktivira topljivu gvanilil-ciklazu i tako dovodi do vazodilatacije. EET-s nastaje iz arahidonske kiseline aktivacijom enzima citokrom P450-epoksigenaze. EET-s zatim uzrokuje hiperpolarizaciju glatke mišićne stanice otvaranjem velikih konduktivnih kalcijem aktiviranih kalijevih kanala (49), hiperpolarizacija inhibira kalcijeve voltažne kanale i tako sprječava ulazak iona kalcija u glatku mišićnu stanicu čime nastaje vazodilatacija (49). EDHF igraju veću ulogu u vazodilataciji u manjim otporničkim arterijama, nego u velikim provodnim arterijama (48-52).

1.7. Kisik, kisikovi radikali i oksidativni stres

Stanični metabolizam pretežno 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 se povećava. Međutim, kisik je visoko reaktivna molekula zbog čega pri visokim parcijalnim tlakovima, kao u hiperbaričnoj oksigenaciji, dolazi do formiranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) (2).

Kisik sudjeluje na substaničnoj (enzimatskoj) razini u mnogim biokemijskim reakcijama npr. biosintezi adenozin tri fosfata (ATP), aerobnoj glikolizi, β -oksidaciji masnih kiselina i oksidativnoj fosforilaciji. U slučaju ozljede tkiva aktivira se NADPH-oksigenaza (enzim kojem je, također, potreban kisik za djelovanje) koja će u leukocitima proizvoditi veliku količinu oksidanata koji, potom, služe za prevenciju infekcije u oštećenom tkivu. Kisik također sudjeluje u proliferaciji fibroblasta te sintezi kolagena koji se pojačano stvara u

oštećenom tkivu (17). Oksidativni stres je stanje neravnoteže između produkcije slobodnih kisikovih radikala te njihova uklanjanja putem antioksidanasa i enzima. Antioksidansi su vitamin A, vitamin C, β - karoten i hem vezani proteini dok su enzimi koji sudjeluju u uništavanju kisikovih radikala superoksid dismutaza (SOD), katalaza i glutation peroksidaza (53). Kisikovi radikali direktno smanjuju raspoloživost NO-a tako što NO reagira sa superoksidom i formira peroksinitrit (ONOO^-). Indirektno utječu na bioraspoloživost NO-a tako što oksidiraju BH_4 i time mijenjaju svrhu eNOS koja umjesto NO-a proizvodi superoksid. Radikali, također, djeluju na NO receptor- topljivu gvanilil-ciklazu oksidirajući hem i time smanjuju djelovanje NO-a. Enzimi odgovorni za proizvodnju kisikovih radikala su: ksantin oksidaza, COX, lipooksigenaza, nevezana eNOS, citokrom p450, mitohondrijski elektronski lanac, ali najvažnija je NADPH oksidaza. Kisikovi radikali su: superoksid (O_2^-), hidroksil radikal ($\text{HO}\cdot$), hidrogen peroksid (H_2O_2), hiperklorična kiselina (HClO) i peroksinitrit (ONOO^-) (37). Kisikovi radikali smanjuju staničnu razinu NO-a, utječu na povećano izražavanje adhezijskih molekula (P-selektin), povećavaju razinu trombocitnog aktivirajućeg faktora (eng. Platelet activating factor; PAF), leukotriena B4 te citokina (IL-8). Sve to dovodi do endotelne disfunkcije (53). Kisikovi radikali reagiraju s LDL-om, takav LDL ometa endotelnu proizvodnju NO-a tako što smanjuje izražaj eNOS-a, smanjuje unos L-arginina u endotelnu stanicu te povećava razinu asimetričnog dimetil arginina (ADMA) što dovodi do endotelne disfunkcije (53). NO ima predominantnu ulogu u vazodilataciji velikih provodnih arterija, dok EDHF ima predominantnu ulogu u vazodilataciji otporničkih arterija. Također je povećana uloga EDHF-a u vazodilataciji provodnih arterija u stanjima poremećene aktivnosti NO-a (53).

Budući da kisikovi radikali imaju kratko vrijeme poluživota, klinička je procjena oksidativnog stresa *in vivo* bazirana na mjerenju stabilnih oksidacijskih produkata. Malonildialdehid je najčešće korišten biljeg oksidativnog stresa koji nastaje enzimatskom peroksidacijom nezasićenih masnih kiselina. 8-izoprostan je izomer F_2 -izoprostana, a dobije se neenzimatskim procesom iz arahidonske kiseline i djelovanjem radikala na membranske fosfolipide. Markeri proteinske oksidacije nazivaju se napredni oksidirani proteinski proizvodi (engl. *Advanced oxidation protein products*, AOPP) (54).

1.8. Antioksidativni mehanizmi i uloga TEMPOL-a

Antioksidativni sustav suprotstavlja se oštećenju uzrokovanom ROS-om. To uključuje antioksidativne enzime, poput glutation-peroksidaze (GPx), superoksid dismutaze (SOD) ili

katalaze (CAT) (55). Glutation peroksidaze (GPx) su grupa od 8 (GPx1 - 8) enzima koji su važni za prevođenje i smanjenje razine H_2O_2 . GPx su selenocistein enzimi koji koriste glutation kao redukcijsko sredstvo i zahtijevaju selen za svoje antioksidativno djelovanje (56, 57). Glutation peroksidaza i katalaza učinkovitije smanjuju razinu vodikovog peroksida zajedničkim djelovanjem u usporedbi sa samostalnim djelovanjem (58).

Postoje tri SOD izoforme: bakar-cink SOD (CuZn SOD ili SOD1) i mangan SOD (MnSOD ili SOD2) koje su lokalizirane u mitohondrijima te izvanstanični oblik, EC-SOD ili SOD3. Iako je subcelularni položaj svake izoforme SOD jedinstven, tek nedavno su se pojedina istraživanja počela fokusirati na funkcionalnu važnost pojedinih SOD izoformi unutar stijenki krvnih žila u normalnim uvjetima ili tijekom poremećaja krvožilja. Izražaj i aktivnost SOD-a vjerojatno imaju veliki utjecaj na odgovor vaskularnih stanica na akutni i kronični oksidativni stres (59, 60).

Izoforma CuZn SOD (SOD1), prema dosadašnjim istraživanjima, izražena je u relativno visokoj razini u svim stanicama, uključujući krvne žile gdje prevladava kao SOD izoforma (kad je izražaj izražen kao postotak ukupnog SOD djelovanja). Na primjer, u normalnoj aorti miša i kod CuZn SOD-deficitarnih miševa pokazalo se kako aktivnost CuZn SOD čini 50% do 80% od ukupne SOD aktivnosti (61, 62). MnSOD (SOD2) predstavlja oko 2% do 12% od ukupnog vaskularnog SOD dok EC-SOD predstavlja ostatak (63, 64). Povećane razine vaskularnog superoksida i peroksinitrita smanjuju razinu CuZn-SOD što povećava miogeni ton, pojačava vazokonstriktorski odgovor te smanjuje o endotelu ovisnu (NO posredovana) dilataciju velikih arterija i u mikrocirkulaciji (62, 65, 66). Promjene u izražaju CuZn-SOD također mogu utjecati na vaskularnu strukturu. Na primjer, nedostatak CuZn-SOD uzrokuje hipertrofiju moždanih arteriola (67).

MnSOD (SOD2) se smatra prvom linijom obrane protiv oksidativnog stresa zbog svoje substancične lokalizacije što potkrepljuje otkriće da miševi s potpunim deficitom MnSOD umiru u roku od nekoliko tjedana nakon rođenja i pokazuju različite fenotipove (ovisno o genetskoj podlozi) uključujući degeneraciju živaca, srčane abnormalnosti i opsežna mitohondrijska oštećenja (59). Vaskularni izražaj i / ili aktivnost MnSOD mogu biti promijenjene u nekoliko fizioloških i patofizioloških stanja. Na primjer, MnSOD je posebno osjetljiv i reagira na povećani oksidativni stres. Promotorske regije gena MnSOD sadrže elemente odgovorne za redoks-osjetljive transkripcijske čimbenike aktivator protein-1 (AP-1) i nuklearni čimbenik-kB (NF-κB), koji su izuzetno važni u regulaciji različitih upalnih srodnih gena (68). Bolesti povezane s vaskularnim oksidativnim stresom također izazivaju promjenu izražaja MnSOD. Na primjer, u vaskularnom tkivu, lipopolisaharidi i proupalni

citokini povećavaju superoksida i izražaj MnSOD (68 - 72). Vaskularni izražaj mRNA CuZn-SOD i Mn-SOD se mijenja tijekom ateroskleroze ovisno o vremenu promatranja (početno povećanje onda s vremenom smanjeni izražaj) (73, 74). U većini slučajeva, funkcionalni značaj tih razlika za vaskularni izražaj ili aktivnost MnSOD nisu u potpunosti poznati. Studije na MnSOD heterozigotnim deficitarnim miševima su pokazale kako MnSOD štiti od oštećenja vaskularnog mitohondrija i od razvoja ateroskleroze (75), kao i od inducirane DNA fragmentacije oksidiranim LDL-om te od aktivacije kaspaze u vaskularnom mišiću (61). Pojačani izražaj MnSOD upotrebom virusnog i liposomalnog prijenosnog gena proizvela je korisne učinke kod nekoliko modela bolesti krvnih žila. Korištenjem ovog pristupa, pojačani izražaj MnSOD smanjuje razinu superoksida i poboljšava funkciju endotela kod hiperkolesterolemije, dijabetesa i modela hipertenzije s niskim reninom (76 - 78) uz istodobno sprječavanje nastanka hiperglikemijom - induciranih reaktivnih kisikovih spojeva u endotelu (79).

EC-SOD (SOD3) je jedina SOD izoforma koja je izražena izvan stanice, vezana na tkivo putem svojih heparin-vezujućih domena koje imaju afinitet prema proteinu za heparan sulfat proteoglikan na površini stanice u bazalnim membranama i u izvanstaničnom matriksu (80, 81). SOD3 je lokaliziran u stijenci krvne žile, posebice između endotela i vaskularnih mišića (81, 82). Izražaj EC-SOD u vaskularnim stanicama i unutar stijenci krvnih žila može se mijenjati kao odgovor na različite podražaje, uključujući vježbanje, faktore rasta, citokine, vazoaktivne stimulanse uključujući Ang II i NO te homocisteine, kao i tijekom hipertenzije, ateroskleroze i dijabetesa (63, 82-89).

Katalaza (CAT, H_2O_2 – oksidoreduktaza) je unutarstanični enzim čije se najviše koncentracije u sisavaca mogu naći u eritrocitima, jetri i povremeno u bubregu (90). Ima dominantnu ulogu u kontroli koncentracije H_2O_2 (91, 92), a time i štiti stanice od oštećenja s H_2O_2 . Katalaza je enzim vrlo velike aktivnosti, jedna molekula katalaze može reducirati ≈ 6 milijuna molekula H_2O_2 do vode i kisika, u jednoj minuti. U uvjetima oksidacijskog stresa ovaj enzim predstavlja neophodnu komponentu antioksidacijskog sustava. Osim katalaznog, enzim može imati i peroksidacijsko djelovanje koje prevladava pri fiziološkim koncentracijama vodikovog peroksida ($<10^{-6}$ M) (93). Niska aktivnost katalaze zabilježena je kod pacijenata sa shizofrenijom, aterosklerozom (94) i dijabetesom (95, 96).

S druge strane, postoji i neenzimatski unutarstanični i izvanstanični antioksidativni obrambeni sustav (97) koji uključuje različite kemijske grupe, npr. vitamini, karotenoidi, aminokiseline i peptidi uspostavljene u različitim staničnim strukturama. Svi antioksidativni čimbenici u tijelu, bilo unutarstanični enzimi ili antioksidativni spojevi (neenzimski

čimbenici), nazivaju se ukupnim antioksidativnim kapacitetom. U studiji koju su proveli Winston i sur., otkriveno je da glutation, askorbinska kiselina (vitamin C), mokraćna kiselina i vitamin E čine 70% ukupnog antioksidativnog kapaciteta tijela (98). Trenutno, samo nekoliko ispitivanja ispitalo je učinak HBO₂ na antioksidativni obrambeni kapacitet (55, 99-101) koji može biti važan modulator različitih učinaka akutne i kronične hiperoksigenacije.

TEMPOL (4 - hydroxy - 2, 2, 6, 6 - tetramethyl piperidine - 1 - oxy) pripada u obitelj nitroksidnih spojeva koji u *in vitro* uvjetima oponaša djelovanje SOD (kao SOD „mimetic“), odnosno djeluje kao „hvatač“ superoksidnih radikala. Luo i suradnici (102) pokazali su kako je učinak TEMPOLA u kataliziranju metabolizma staničnog O₂⁻ vrlo sličan nativnom SOD i samo neznatno manji od stanice permeabilizirane pegiliranim oblikom SOD (PEG-SOD). Usporedbom učinkovitosti TEMPOLA u metaboliziranju stanične O₂⁻, H₂O₂ ili u zaštiti oštećenja stanica uzrokovanih hidroksilnim radikalima (•OH) pokazana je osjetljivost TEMPOLA najveća za •OH, nešto manja za H₂O₂ i najmanja za O₂⁻. TEMPOL je djelotvoran u kataliziranju i sprječavanju nastanka •OH iz H₂O₂ u prisutnosti prijelaznih metala (103, 104). Nadalje, TEMPOL smanjuje medijalnu migraciju vaskularnih stanica glatkog mišića i vaskularno remodeliranje u ozlijeđenim arterijama (105), sprječava učinke visokih koncentracija glukoze sprječavajući oksidaciju i inaktivaciju kalcij adenozin-trifosfataze sarkoplazmatskog / endoplazmatskog retikuluma koja posreduje inhibitorске učinke NO na staničnu migraciju (106).

1.9. Hipoksijom inducirani faktor – 1 alfa (HIF-1α)

Povezanost hiperbarične oksigenacije i HIF-1α relativno je dobro istražena i opisana u mehanizmu djelovanja hiperbaričnog kisika na cijeljenje rana (dijabetičko stopalo, postradijacijske ozljede) koji uključuje neovaskularizaciju posredovanu transkripcijskim čimbenikom HIF-1α (engl. *hypoxia inducible factor 1 alpha*) djelovanje na metabolizam i staničnu proliferaciju te povećanje mobilizacije progenitorskih endotelnih stanica iz koštane srži (107, 108). Hipoksija i ROS / RNS mogu potaknuti stabilizaciju HIF-1α što dovodi do aktivacije hipoksijom izazvanog staničnog signalnog puta (109).

Hipoksijom inducirani čimbenik transkripcije - 1 (HIF-1) je heterodimerni kompleks koji se sastoji od dviju podjedinica: hipoksično inducibilne podjedinice HIF-1α i konstitutivno izražene podjedinice HIF-1β. Postoje tri izoformna oblika HIF-α, pri čemu su HIF-1α i HIF-2α međusobno vrlo slična i oba sposobna djelovati s elementima odgovora na hipoksiju (HRE) i inducirati transkripciju (110). Eksperimenti upućuju da aktivacija HIF-1 uključuje

redoks ovisnu stabilizaciju HIF-1 α proteina (111). U uvjetima hipoksije HIF-1 α se translocira u jezgru i heterodimerizira s β podjedinicom te formira HIF-1 kompleks (112). U uvjetima dostatne količine kisika dolazi do razgradnje HIF-1 α podjedinice. Identificirane su dvije odvojene domene unutar HIF-1 α podjedinice, koje su odgovorne za mehanizam kojim stanični kisik regulira HIF-1 aktivnost. Razgradna domena ovisna o kisiku (ODD) HIF-1 α sadrži dva prolilna ostatka (Pro 402 i Pro 564) i posreduje interakciju s von Hippel-Lindau (VHL) E3 ligaznim kompleksom. Prolilni ostaci se hidroksiliraju specifičnim HIF prolil - hidroksilazama (PHD1, PHD2, PHD3) i na taj se način HIF-1 α degradira (112). Drugi mehanizam utječe na C-terminalnu aktivacijsku domenu (CAD), hidroksilirajući asparaginski ostatak te je taj čimbenik inhibicije nazvan FIH-1 (113). HIF prolil hidroksilaze i FIH-1 služe kao senzori za kisik u putevima odgovornim za hipoksiju (114). HIF hidroksilaze su Fe(II) ovisne dioksidaze koje imaju veliku sposobnost vezanja kisika čime omogućuju stabilnost HIF-a u hipoksičnim uvjetima. Jedan od važnih gena povezanih s HIF-om je i čimbenik rasta endotela krvnih žila (VEGF) koji se u stanjima hipoksije također snažno luči. Kada u hipoksičnim uvjetima dođe do dimerizacije HIF-1 α i HIF-1 β molekule, ovaj se kompleks veže za elemente odgovora na hipoksiju na 5' - kraju VEGF gena i aktivira njegovu transkripciju (115). O ulozi HIF-1 α i njegovih ciljnih gena na vaskularnu funkciju u stanjima povišenog oksidativnog stresa i pri izlaganju hiperbaričnoj oksigenaciji ima malo podataka. Stoga je svrha ovog rada bila istražiti mijenja li se izražajnost HIF-1 α u tkivu aorte pod utjecajem hiperbarične oksigenacije.

2. HIPOTEZA

Hipoteza je ovog doktorata da akutno izlaganje hiperbaričnom kisiku dovodi do povećanog oksidativnog stresa što dovodi do poremećaja vaskularnog odgovora posredovanog endotelom, za razliku od učinaka intermitentnog izlaganja.

Postoji razlika u jačini i mehanizmima vaskularnog odgovora na različite vazorelaksirajuće podražaje pri akutnom i intermitentom izlaganju HBO₂ u sistemske cirkulaciji.

Akutno izlaganje HBO₂ povećava izražaj HIF-1 α u krvnim žilama sistemske cirkulacije.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj je doktorske disertacije odrediti djelovanje HBO₂ na vaskularnu reaktivnost ovisnu o endotelu kod zdravih štakora izloženih akutnom i intermitentnom djelovanju HBO₂ u usporedbi s netretiranim zdravim štakorima.

Drugi cilj je identificirati specifične mehanizme kojima HBO₂ utječe na vazodilataciju potaknutu acetilkolinom i hipoksijom kod zdravih štakora u sistemskej cirkulaciji.

Nadalje, cilj je utvrditi izražaj gena za HIF-1 α ovisno o eksperimentalnom protokolu.

4. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije, Laboratoriju za kliničku i molekularnu imunologiju i u Laboratoriju za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku te na Institutu za Biotehnologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Pečuhu.

Korišteni su Sprague-Dawley (SD) muški štakori, u dobi od 9 - 11 tjedana starosti. Svi su štakori iz vlastitog uzgoja Vivarija pri Medicinskom fakultetu u Osijeku.

Štakori su bili podijeljeni u 4 grupe: grupa 1 (KONTROLA, CTRL) - zdravi netretirani štakori, grupa 2 (A-HBO₂) - štakori izloženi akutnom djelovanju hiperbaričnog kisika u barokomori žrtvovani odmah po izlaganju (Rekompresijska komora za eksperimente 110L, Đuro Đaković, Aparati d.d.), grupa 3 (24H-HBO₂) - štakori akutno izloženi djelovanju hiperbaričnog kisika i žrtvovani 24h nakon izlaganja u barokomori i grupa 4 (4D-HBO₂) - zdravi štakori izloženi djelovanju hiperbaričnog kisika u barokomori kroz 4 uzastopna dana i žrtvovani 5. dan. Izlaganje hiperbaričnom kisiku (HBO₂) podrazumijeva jedno izlaganje dnevno otprilike u isto vrijeme prema slijedećem protokolu.

4.1. Protokoli za izlaganje hiperbaričnom kisiku

Nakon smještaja životinja u barokomoru, slijedi 15 minuta kompresije na 2,0 atm otvaranjem kompresijskog ventila (dekompresijski je ventil pri tome zatvoren) i puštanjem kisika u komoru. Kad se postigne tlak od 2,0 atm, zatvori se kompresijski ventil te su štakori izloženi djelovanju 100% kisika u trajanju od 2 sata uz protok 2 - 3 l/min. Za vrijeme trajanja terapije zajedno sa štakorima u komori je smještena i mala količina granula kalcij-hidroksida i natrij-hidroksida te etilvioleta (Draegersorb 800 Plus, DraegerMedical) za upijanje izdahnutog CO₂. Slijedi 15 minuta dekompresije otpuštanjem dekompresijskog ventila.

4.2. Mjerenje krvnoga tlaka

Štakori su anestetizirani kombinacijom ketamina (75 mg/kg) i midazolama (2,5 mg/kg). PE-50 kateter uveli smo u lijevu femoralnu arteriju. Životinje su ostavljene 10 minuta dok se krvni tlak stabilizirao, a nakon toga je krvni tlak mjeren 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) (9). Srednji je arterijski tlak izračunat iz dobivenih vrijednosti kao zbroj sistoličkog i dvostrukog dijastoličkog tlaka te podijeljen s tri. Kao kontrolne vrijednosti tlaka uzete su vrijednosti izmjerene kod životinja A-HBO₂ grupe neposredno prije izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji. Kateter je po završetku mjerenja potkožno provučen do vratnog dijela životinje i zatvoren na tom kraju. Odmah nakon dekompresije, životinje su po potrebi dodatno anestetizirane i ponovljeno je mjerenje tlaka (A-HBO₂). Životinjama iz 24H-HBO₂ grupe krvni je tlak mjeran 24h nakon izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji, a životinjama 4D-HBO₂ grupe tlak je mjeran 5. dan 24h nakon 4 dana terapije.

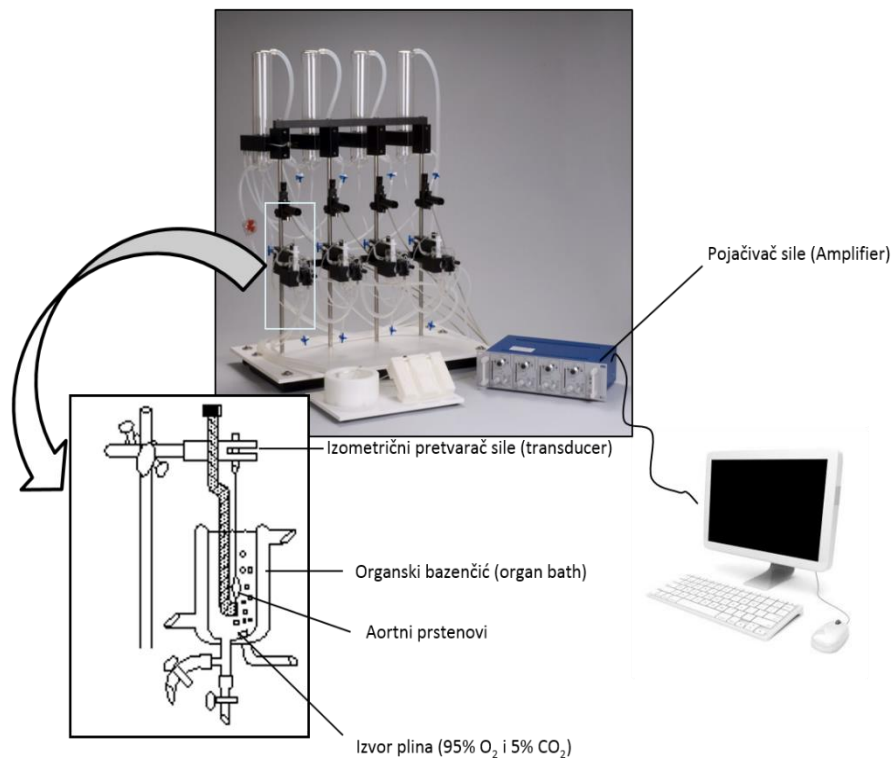
4.3. Skupljanje arterijskih uzoraka krvi i torakalnih aorti

Nakon izmjerenog krvnog tlaka, kroz kateter je uzet uzorak arterijske krvi u epruvetu bez antikoagulansa kako bismo dobili uzorak seruma. Krv je centrifugirana 10 min na 3500 rpm te je potom odvojen serum od krvnih stanica i pohranjen u hladnjaku na -80 °C do upotrebe u svrhu određivanja parametara oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta (TBARS i FRAP). Također, izolirana je i torakalna aorta za određivanje relativnog izražaja gena primjenom kvantitativnog PCR u realnom vremenu (RT PCR). Odmah po izolaciji aorte su prebačene u Petrijevu zdjelicu s hladnom fiziološkom otopinom, očišćene od vezivnog i masnog tkiva te smrznute u tekućem dušiku i nakon toga pohranjene na -80°C do analize.

4.4. Pokusi na izoliranim aortalnim prstenima

Kao uzorak za aortalne prstene korištena je torakalna aorta štakora. Nakon anestezije kombinacijom ketamina 75 mg/kg i midazolama 0,5 mg/kg napravljena je torakotomija te potom izolirana i izvađena torakalna aorta. Aorta je potom stavljena u preparativnu Petrijevu zdjelicu s hladnom i oksigeniranom Krebs - Henseleitovom otopinom (sastav otopine u mmol/L: 120 NaCl; 4,8KCl; 1,2 KH₂PO₄; 2,5 CaCl₂; 1,2 MgSO₄; 25,5 NaHCO₃; 10 glukoza i 0,02 EDTA) (11 - 13, 116). Nakon čišćenja masnog i vezivnog tkiva, aorta je izrezana na prstene širine 3 - 4 mm. Prsteni su potom stavljeni u organske bazenčice (10 ml zapremine) s Krebs-Henseleitovom otopinom koja je stalno grijana i oksigenirana (t = 37°C, pH = 7,4) na način da su dvije paralelne čelične žice provučene kroz lumen prstena, potom je jedna žica učvršćena na dno držača koji se uranja u bazenčić s kupelji, a druga je povezana na pretvarač vlačne sile preko kojeg je mjeran tonus žilnog prstena. Pretvarač sile je spojen na pojačalo i

na analogno / digitalni pretvarač gdje je praćen grafički prikaz tijeka pokusa na ekranu računala (Slika 4.4.1.).



Slika 4.4.1. Sustav za izolirane aortalne prstenove

Nakon ispiranja i stabilizacije u trajanju sat vremena prsteni su prekontrahirani jednom dozom noradrenalina 10^{-7} M. Kada je postignut stabilni plato kontrakcije, dodan je acetilkolin 10^{-5} M u svrhu provjere očuvanosti endotela. Bazencići su isprani 3 puta svakih 10 minuta nakon čega je napravljen test maksimalne kontrakcije tako što je u bazenčić dodan KCl (60 mM) i NA (10^{-7} M). Nakon toga je slijedilo ispiranje tri puta svakih 10 minuta te su prstenovi ostavljeni da se stabiliziraju kroz 30 minuta nakon čega su slijedili protokoli acetilkolinom posredovane vazorelaksacije ili hipoksijom posredovani protokoli sa ili bez inhibitora.

4.4.1. Relaksacija aortalnih prstenova ovisna o endotelu

Acetilkolinom posredovana dilatacija određena je tako da su prstenovi nakon provjere očuvanosti endotela i testa maksimalne prekontrakcije pomoću KCl-a i NA te razdoblja stabilizacije nakon ispiranja prekontrahirani noradrenalinom (NA 10^{-7} M) i nakon toga je dodavan ACh u koncentracijama od 10^{-9} M do 10^{-5} M u razmaku od dvije minute kao provjera

produkcije NO-a i bazičnog odgovora na acetilkolin. Potom je slijedilo razdoblje ispiranja tri puta svake dvije minute i nakon toga 20 minutna inkubacija s ciljanim inhibitorom te je potom ponovljen isti protokol s prekontrakcijom pomoću NA i relaksacija s ACh u koncentracijama od 10^{-9} M do 10^{-5} M. Acetilkolinom izazvana relaksacija aortnih prstenova mjerila se u odsutnosti i prisutnosti: a) inhibitora NO sintaze (NOS), N ω -nitro-L-arginin metil estera (L-NAME, (300 μ M); b) inhibitora ciklooksigenaze, indometacina (INDO, 10 μ M); c) selektivnog inhibitora CYP450 epoksidaze, MS-PPOH (10 μ M) i d) "hvatača" superoksidnih radikala, TEMPOLA (100 μ M).

4.4.2. Relaksacija neovisna o endotelu

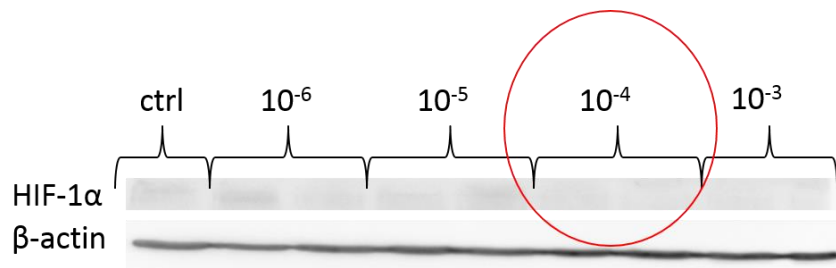
Nakon prekontrakcije noradrenalinom dodan je natrijev nitroprusid (SNP, Sodium Nitroprusside Dihydrate, 25g, Fluka) (izravni donor NO-a) u dozi od 10^{-10} M do 10^{-4} M pri čemu je provjeren vazodilatacijski odgovor neovisan o endotelu.

4.4.3. Relaksacija aortnih prstenova ovisna o endotelu uzrokovana hipoksijom

Nakon provjere očuvanosti funkcije endotela i stabilizacije aortni prstenovi su prekontrahirani noradrenalinom te je tada zamijenjena oksigenacija Krebsove otopine u bazenčićima s aortnim prstenovima s 95% O $_2$ + 5% CO $_2$ na 0% O $_2$ i 5% CO $_2$ kroz 20 minuta te nakon toga opet prebačena na 95% O $_2$ + 5% CO $_2$ kroz 5 minuta radi reoksigenacije. Nakon toga je slijedilo ispiranje po 3 puta svake 2 minute, 10 minuta stabilizacije te potom inkubacija s ciljanim inhibitorom 20 minuta. Potom je slijedila prekontrakcija noradrenalinom i ponovljen je protokol hipoksije (zamijene plinova, tj. oksigenacije Krebs-Hensenleitove otopine u bazenčićima s aortnim prstenovima). Isti inhibitori kao i za testiranje acetilkolinom izazvane relaksacije korišteni su i u protokolima hipoksijom izazvane vazorelaksacije aortnih prstenova (L-NAME, (300 μ M), INDO (10 μ M), MS-PPOH (10 μ M) i TEMPOL (100 μ M). Dodatno je korišten LW6 inhibitor transkripcijskog faktora HIF - 1 alfa (HIF - 1 α inhibitor, 10 mg, Calbiochem, 10^{-4} M). Potrebna koncentracija HIF-1 α inhibitora određena je Western blot metodom.

4.5. Određivanje koncentracije HIF - 1 alfa inhibitora i relativnog izražaja proteina Western blot metodom

U svrhu određivanja potrebne koncentracije HIF -1 α inhibitora za protokol hipoksijom posredovane relaksacije Western blot metodom napravljeno je utvrđivanje inhibicije HIF-1 alfa transkripcijskog faktora u tkivu aorte nakon stimulacije hipoksijom. Svježe izolirani uzorci aorte pripremljeni su kao za pokuse na izoliranim žilama, korištena su sva 4 prstena za jedan uzorak za određivanje izražajnosti proteina (Western blot). Western blot je rađen prema uhodanoj metodi našeg laboratorija, opisanoj u radu doc. dr. sc. Aleksandra Kibela sa suradnicima (11). Aortni prstenovi su 30 minuta inkubirani s pripremljenim koncentracijama HIF - 1 α inhibitora (10^{-3} – 10^{-6} M) te podvrgnuti hipoksiji na način da je zamijenjena oksigenacija s 95% O₂ + 5% CO₂ na 0% O₂ + 5% CO₂ kroz 20 minuta, žile su nakon toga prebačene u tekući dušik i nakon toga na -80°C do analize. Za homogeniziranje tkiva korišten je homogenizacijski pufer (1 mM EDTA, 10 mM Tris (FisherScientific, Belgija), 0,4% SDS (AcrosOrganics, SAD), koktel inhibitora proteaza 0,4 μ l/100 μ l (SigmaAldrich)) uz dodatak 1 mM kobaltovog klorida. Smrznuto tkivo usitnjeno je do praha u tekućem dušiku, izvagano i dodano je 1 ml homogenizacijskog pufera na 100 mg tkiva. Sve je dobro izmućkano na mješalici (vortexu) i dodatno homogenizirano uz pomoć mehaničkog homogenizatora (IKA Thurax). Nakon mehaničkog homogeniziranja uslijedilo je centrifugiranje uzoraka 30 minuta na 17 000 x g na temperaturi od 4°C. Otpipetiran je supernatant koji će se koristiti za daljnju analizu. Slijedila je priprema uzoraka za jednodimenzionalnu SDS-PAGE elektroforezu. Uzorci su u omjeru 1:1 prokuhani na 95°C 5 minuta Laemmli puferom, kratko centrifugirani (engl. *spin-down*) te naneseni na gel. Nakon elektroforeze, uzorci su preneseni na PVDF membranu te nakon toga inkubirani primarnim protutijelom preko noći. Sljedeći dan, membrana je inkubirana odgovarajućim sekundarnim protutijelom 2h na sobnoj temperaturi te je nakon toga slijedilo slikanje kemiluminiscencijskom metodom koristeći Pierce ECL Western BlottingSubstrate (ThermoScientific) prema uputama proizvođača na Fuji LAS 4000 Luminescence Image Analyzer uređaju na Institutu za imunologiju i biotehnologiju Medicinskog fakulteta u Pečuhu. Isti je protokol upotrijebljen i za analizu izražaja COX-1, COX-2, iNOS, HIF-1 α , VEGF i CYP2c11 proteina u tkivu aorte. Kao kontrola nanošenja uzoraka i za normalizaciju određen je izražaj β -aktina. Rezultati su pokazali da koncentracija 10^{-4} M uzrokuje inhibiciju HIF-1 α . (Slika 4.5.1.)



Slika 4.5.1. Rezultati određivanja potrebne koncentracije HIF- α inhibitora

4.6. Mjerenje oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta

Mjerenje oksidativnog stresa napravljeno je na uzorcima krvi (serum) i u tkivu aorte štakora metodom TBARS (engl. *thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assay*) temeljenom na reakciji između malondialdehida (koji je krajnji produkt peroksidacije lipida) i tiobarbituratne kiseline (117). Spoj malondialdehida i tiobarbituratne kiseline ima absorbanciju na 532 nm što se mjeri putem UV- spektrofotometra (NanoPhotometer® P-Class P330-30, Implen, Germany). Mjerenje antioksidativnog kapaciteta plazme koja se mjeri FRAP metodom (engl. *Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay*) pri čemu se događa redukcija Fe^{3+} u Fe^{2+} te nastaje kompleks koji ima absorbanciju na 593 nm, što se također mjeri spektrofotometrom (116, 118).

Uzorcima aorte za određivanje oksidativnog stresa usitnjeni su do praha u tekućem dušiku, nakon čega je dodano 1 ml 1,15% KCl na 100 mg praha te centrifugirano na 20000 g, 20 minuta na 4°C. Supernatant je korišten za daljnja mjerenja.

4.7. Određivanje razine superoksida *in situ* metodom fluorescencije

Za određivanje bazičnih vrijednosti superoksida aortni prstenovi pripremljeni su kao za pokuse na izoliranim aortnim prstenovima i ostavljeni su u bazenčićima 1h te nakon toga prebačeni u Eppendorf tubicu s HEPES puferom (137 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 4,2 mM $NaHCO_3$; 3 mM Na_2HPO_4 ; 0,4 mM KH_2PO_4 ; 0,5 mM $MgCl_2 \times 6H_2O$; 0,8 mM $MgSO_4 \times 7H_2O$; 10 mM glukoza; 20 mM HEPES i 1,2 mM $CaCl_2 \times H_2O$) koji sadrži DHE (Dihydroethidium, Santa CruzBiotechnology) boju (20 μ M). Tubice su omotane folijom i držane u CO_2 inkubatoru na konstantnoj temperaturi 37 °C, nakon 45 minuta inkubacije, žile

su isprane svježim HEPES puferom 2 puta svake 4 minute te nakon toga slikane na ZeissAxioskop MOT2 mikroskopu, pomoću Olympus DP70 kamere uz Zeiss filter set 15 (546 nm valna duljina za ekscitaciju i 590 nm za emisiju uz razdjeljivač snopa na 580 nm). Za utvrđivanje djelovanja TEMPOL-a, L-NAME-a i ACh na razinu superoksida, aortni su prstenovi pripremljeni kao i za određivanje bazičnih razina, s tim da je 30 minuta nakon stavljanja u organske bazenčiće, dodan TEMPOL (10 μ M), L-NAME (300 μ M) te je inkubacija trajala narednih 30 minuta, ACh (10^{-5} M) je dodan 2 minute prije isteka sat vremena. Aortni prstenovi su zatim prebačeni u Eppendorf tubice s HEPES puferom i bojom te je nakon 45 minuta inkubacije i ispiranja slijedilo slikanje. Intenzitet boje proporcionalan je razini superoksida (119) i određen je pomoću ImageJ programa(National Institute of Health) (120, 121).

4.8. Relativni izražaj gena određen PCR metodom u realnom vremenu

U zasebnoj grupi pokusa na životinjama kojima je mjeran krvni tlak i uziman uzorak arterijske krvi izolirana je i torakalna aorta za određivanje relativnog izražaja gena primjenom kvantitativnog PCR u realnom vremenu (RT PCR). Odmah po izolaciji aorte su prebačene u Petrijevu zdjelicu s hladnom PSS otopinom, očišćene od vezivnog i masnog tkiva te smrznute u tekućem dušiku inakon toga pohranjene na -80°C do analize. Homogenizacija uzorka i ukupna RNA je ekstrahirana pomoću TRI reagensa (Life Technologies, USA) prema protokolu od strane Chomczynski i sur. (1987) (122). Koncentracija RNA i čistoća uzoraka određivana je pomoću Nanophotometer P300 UV/VIS, IMPLN, a potvrda postojanosti i prisutnosti RNA povedena je postavljanjem uzoraka na 1%-tnom agaroznom gelu. Pročišćavanje uzoraka i dobivanja cDNA je provedeno prema uputama proizvođača: Sigma-Aldrich i Applied Biosystems.

Određen je izražaj gena: izoforme superoksid dizmutaze 1, 2 i 3 (*Cu/Zn SOD – SOD1, Mn SOD – SOD2, EC SOD – SOD3*), hipoksijom inducirani faktor - 1 alfa (*HIF-1 α*), ciklooksigenaze 1 i 2 (*COX-1 i COX-2*), katalaza (*CAT*), glutation peroksidaze 1 i 4 (*GPx1 i GPx4*), vaskularni endotelni faktor rasta (*VEGF*), inducibilna dušik oksid sintaza (*iNOS*), endotelna dušik oksid sintaza (*eNOS*), NADPH oksidaza (*gp91x, p47phox*) te *CYP2c11*. Izražaj gena normaliziran je u odnosu na izražaj gena hipoksantin - guanin fosforibozil transferaze (engl. *hipoksantin - guanin phosphoribosyl transferase (HPRT)*). Određivanje izražaja svih navedenih gena izmjeren je na uređaju PCR-u u realnom vremenu Bio Rad CFX96.

4.9. Statističke metode

Svi su rezultati prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška srednje vrijednosti (engl. *Mean* \pm *SEM*). Relaksacija uzrokovana acetilkolinom i natrijev-nitroprusidom, izražena je u postotku u odnosu na maksimalnu kontrakciju. Odgovor na ACh i SNP analiziran je putem dvosmjerne ANOVE s post hoc Bonferoni testom. Za usporedbu rezultata genskog izražaja i rezultata hipoksijom posredovane relaksacije aortnih prstenova korišten je test za jednosmjernu analizu varijanci za nezavisne uzorke (One-Way ANOVA) ili u slučaju neravnomjerne distribucije dobivenih podataka Holm-Sidak ili Kruskal-Wallis test. Kod pojedinih rezultata, utvrđivanje međusobne razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih grupa koristio se Studentov t-test, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U test. Za statističku je analizu uporabljen SigmaPlot v.12 (Systat Software, Inc, Chicago,USA) i GraphPadInstat i GraphPadPrism, verzija 5.00 za Windows, GrafPad Software (San Diego, CA, USA).

5. REZULTATI

5.1. Masa štakora i srednji arterijski tlak

U studiju su bili uključeni zdravi, normotenzivni muški Spraque-Dawley štakori u starosti od 9 do 11 tjedana. Svakoj je životinji mjerena tjelesna masa te krvni tlak. Nisu utvrđene značajne razlike u tjelesnoj masi štakora. Akutno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji statistički značajno uzrokuje sniženje krvnog tlaka u usporedbi s kontrolom i ostalim skupinama.

Tablica 5.1.1. Vrijednosti tjelesne mase i krvnog tlaka u kontrolnoj i testiranim grupama štakora

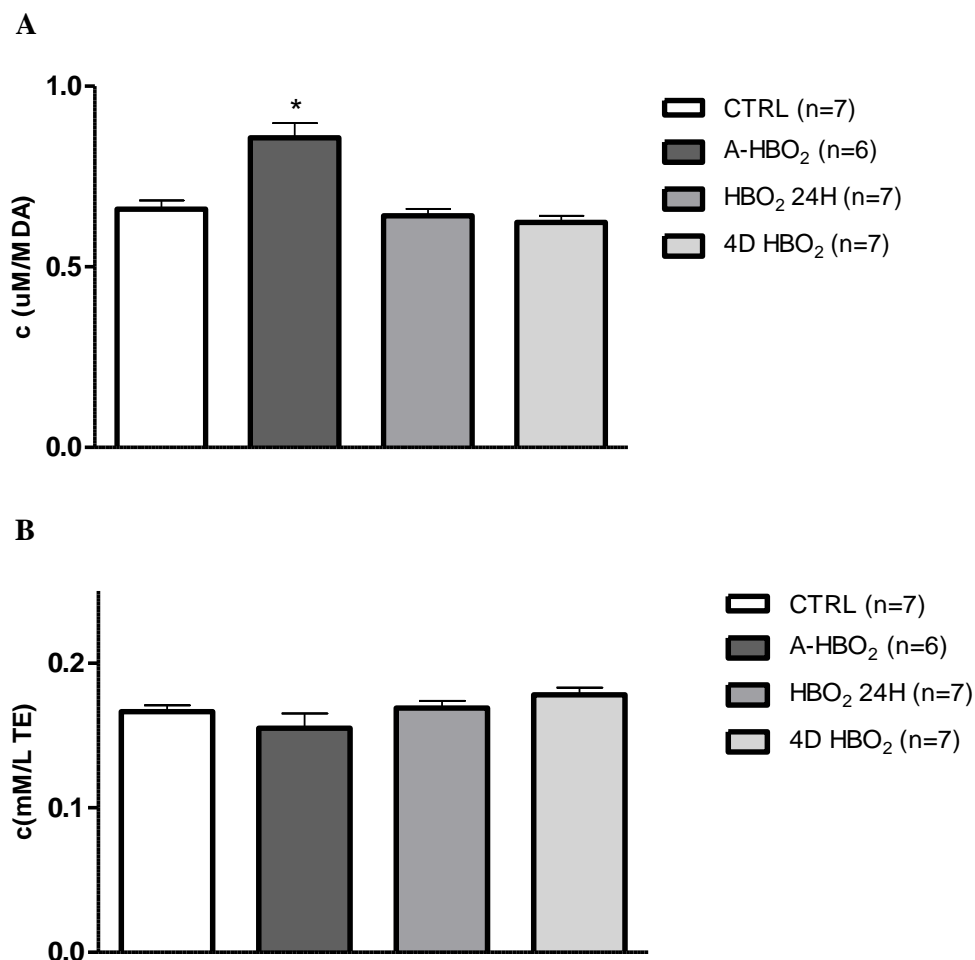
| | CTRL | A-HBO ₂ | 24H-HBO ₂ | 4D-HBO ₂ |
|---------------------------------|-------------|--------------------|----------------------|---------------------|
| sistolički tlak [mmHg] | 133,67±1,28 | 98,33±1,41* | 133,52±2,95 | 136,47±2,65 |
| dijastolički tlak [mmHg] | 93,65±1,81 | 75,99±3,65* | 96,12±4,50 | 95,22±3,43 |
| srednji arterijski tlak | 106,99±1,49 | 83,21±2,39* | 108,59±3,93 | 108,97±2,81 |
| masa [g] | 338,11±8,66 | 336,33±8,79 | 324,83±12,48 | 320,71±12,35 |

*p<0,05 u odnosu na CTRL, 24H-HBO₂ i 4D-HBO₂

U svrhu testiranja prve hipoteze ove doktorske disertacije i određivanja razine oksidativnog stresa kao i utjecaja na vaskularnu funkciju koristeći različite metode, dobiveni su sljedeći rezultati:

5.2. Razina oksidativnog stresa (TBARS) i antioksidativni kapacitet (FRAP) u serumu i tkivu aorte

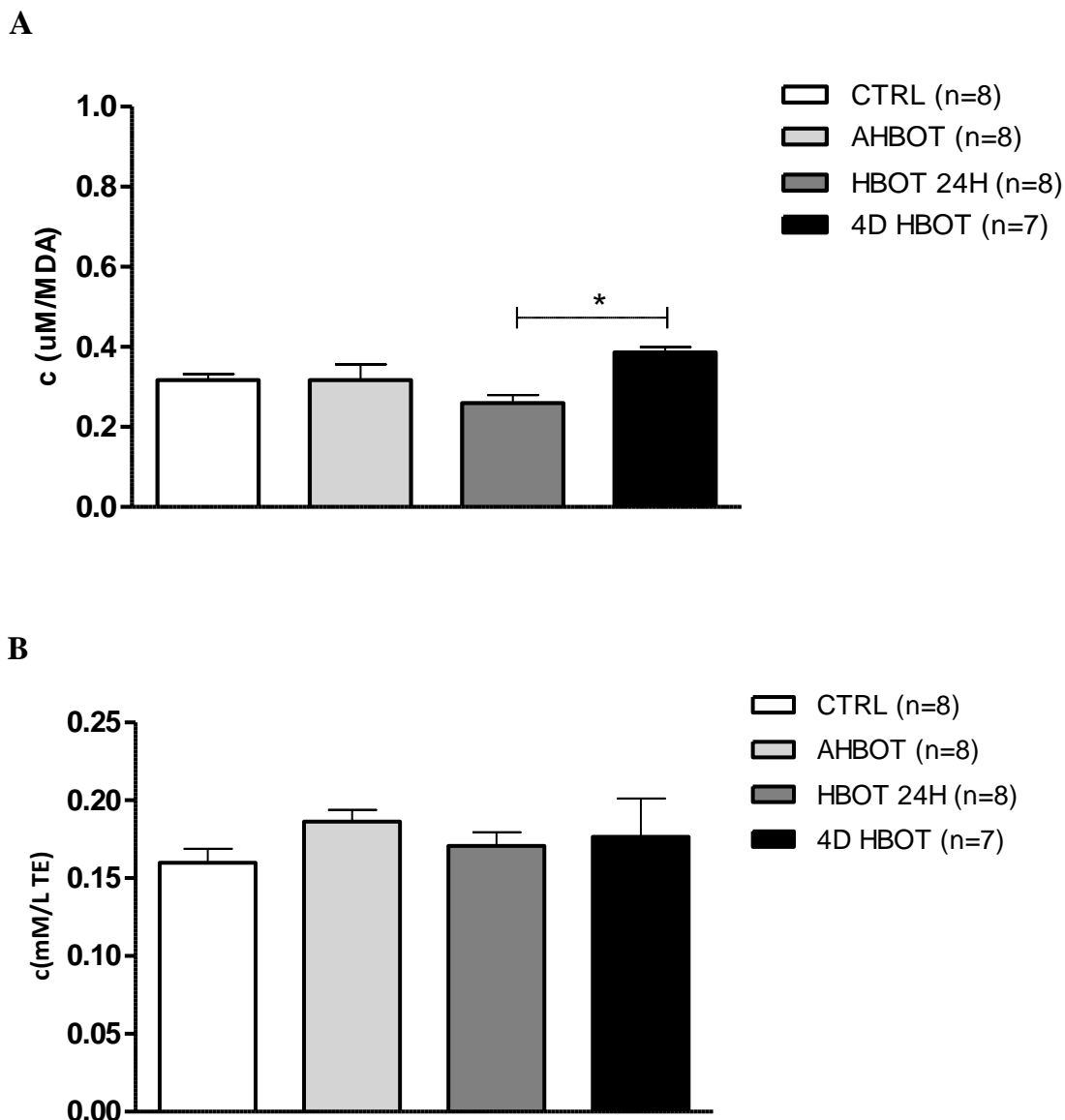
U grupi A-HBO₂ utvrđena je značajno veća razina oksidativnog stresa u serumu u odnosu na CTRL grupu. Antioksidativni kapacitet između svih ispitanih grupa nije se značajno promijenio (Slika 5.2.1. A i B).



Slika 5.2.1. A) Serumska razina oksidativnog stresa (TBARS) i B) antioksidativnog kapaciteta (FRAP) izmjenjenih iz uzoraka arterijske krvi.

A-HBO₂ grupa ima povećani oksidativni stres u odnosu na ostale grupe. U antioksidativnom kapacitetu nisu primjećene razlike između grupa. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti±SEM; *p<0,05 u usporedbi s CTRL, 24H-HBO₂ i 4D-HBO₂.

Razina oksidativnog stresa određena mjerenjem TBARS u tkivu aorte statistički je značajno veća jedino u 4D-HBO₂ grupi u usporedbi s vrijednostima u 24H-HBO₂ grupi. Antioksidativni kapacitet je nepromijenjen kao i u serumu (Slika 5.2.2. A i B).

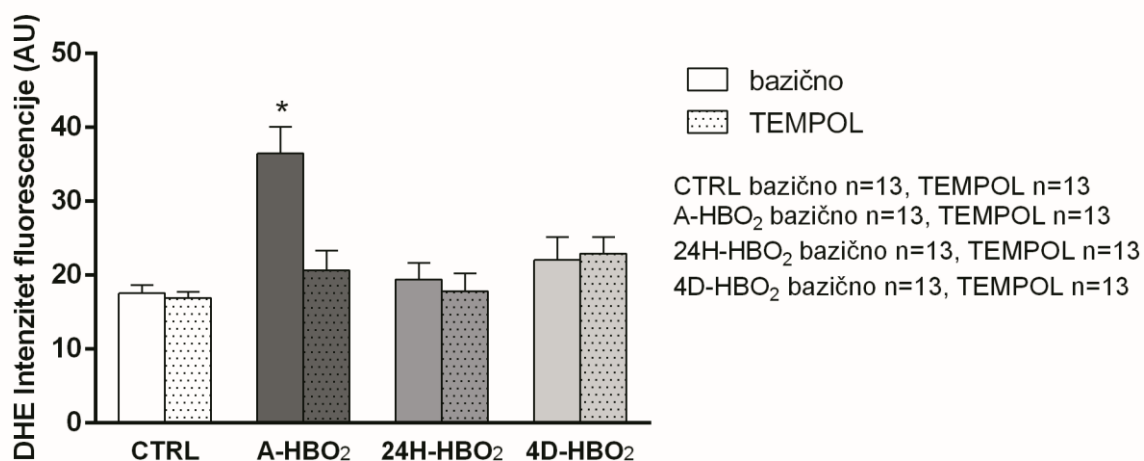


Slika 5.2.2. Razina oksidativnog stresa (TBARS) (A) i antioksidativnog kapaciteta (FRAP) (B) izmjerena iz uzoraka tkiva aorte.

Razina oksidativnog stresa u tkivu aorte povećana je u 4D-HBO₂ grupi u usporedbi s 24H-HBO₂ grupom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM; *p<0,05 u usporedbi s 24H-HBO₂ grupom.

5.3. Mjerenje razine superoksida metodom fluorescencije *in situ*

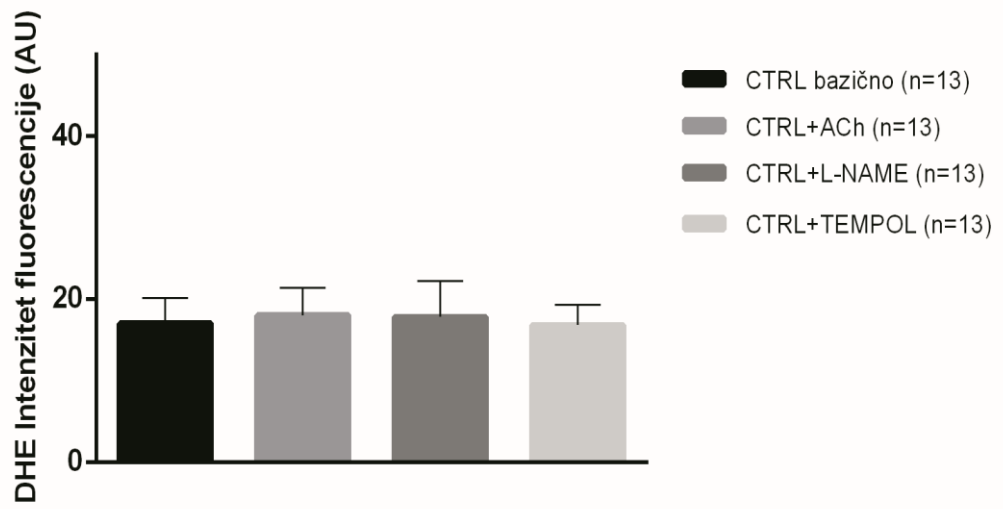
Bazične razine superoksida određene *in situ* metodom fluorescencije u tkivu aorte pokazuju značajno najveće razine superoksida u A-HBO₂ grupi u odnosu na sve ostale testirane grupe (Slika 5.3.1.). Nakon primjene TEMPOL-a nije utvrđena razlika u razinama superoksida među testiranim grupama, dok je u A-HBO₂ grupi razina superoksida nakon primjene TEMPOL-a značajno snižena u odnosu na bazične vrijednosti u toj grupi. Primjenom L-NAME-a, u CTRL grupi nema promjena u razini superoksida, u A-HBO₂ grupi je razina značajno snižena u odnosu na bazičnu dok je u 24H-HBO₂ i 4D-HBO₂ grupama razina superoksida nakon primjene L-NAME-a značajno snižena u odnosu na razinu nakon stimulacije ACh-om. Stimulacija ACh-om, statistički značajno povećava razinu superoksida u 24H-HBO₂ grupi u odnosu na bazične vrijednosti u toj grupi (5.3.2. A-D).



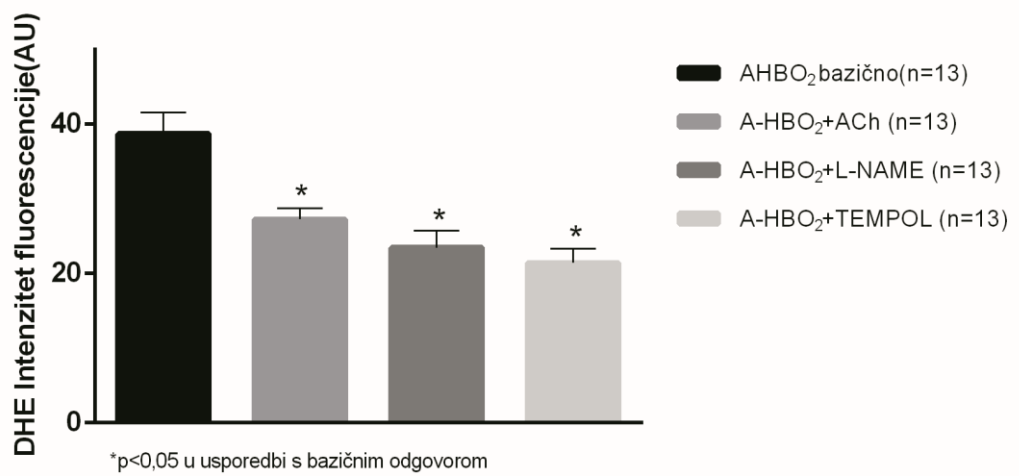
Slika 5.3.1. Grafički prikaz razina superoksida u testiranim grupama određenih *in situ* metodom fluorescencije bazično i nakon primjene TEMPOL-a.

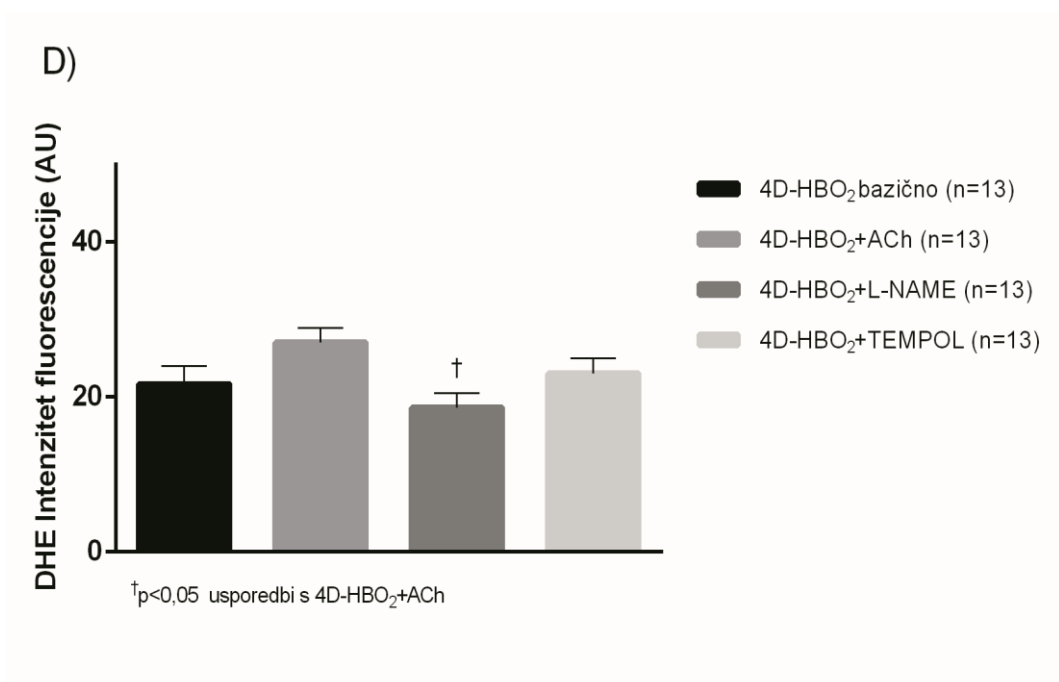
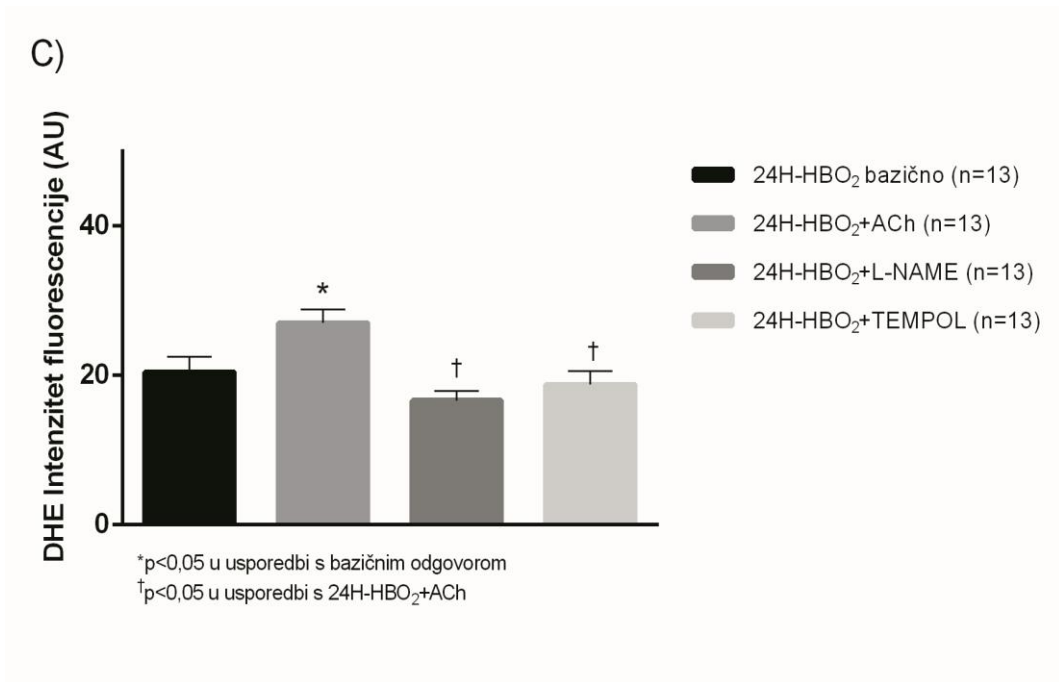
Bazična razina superoksida u tkivu aorte najveća je u A-HBO₂ grupi u odnosu na ostale grupe, primjenom TEMPOL-a razina superoksida u A-HBO₂ grupi je smanjena u odnosu na bazični odgovor, ali podjednaka kao u ostalim grupama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±SEM; *p<0,05 u usporedbi A-HBO₂ bazičnog odgovora s preostalim grupama prije i nakon primjene TEMPOL-a.

A)



B)

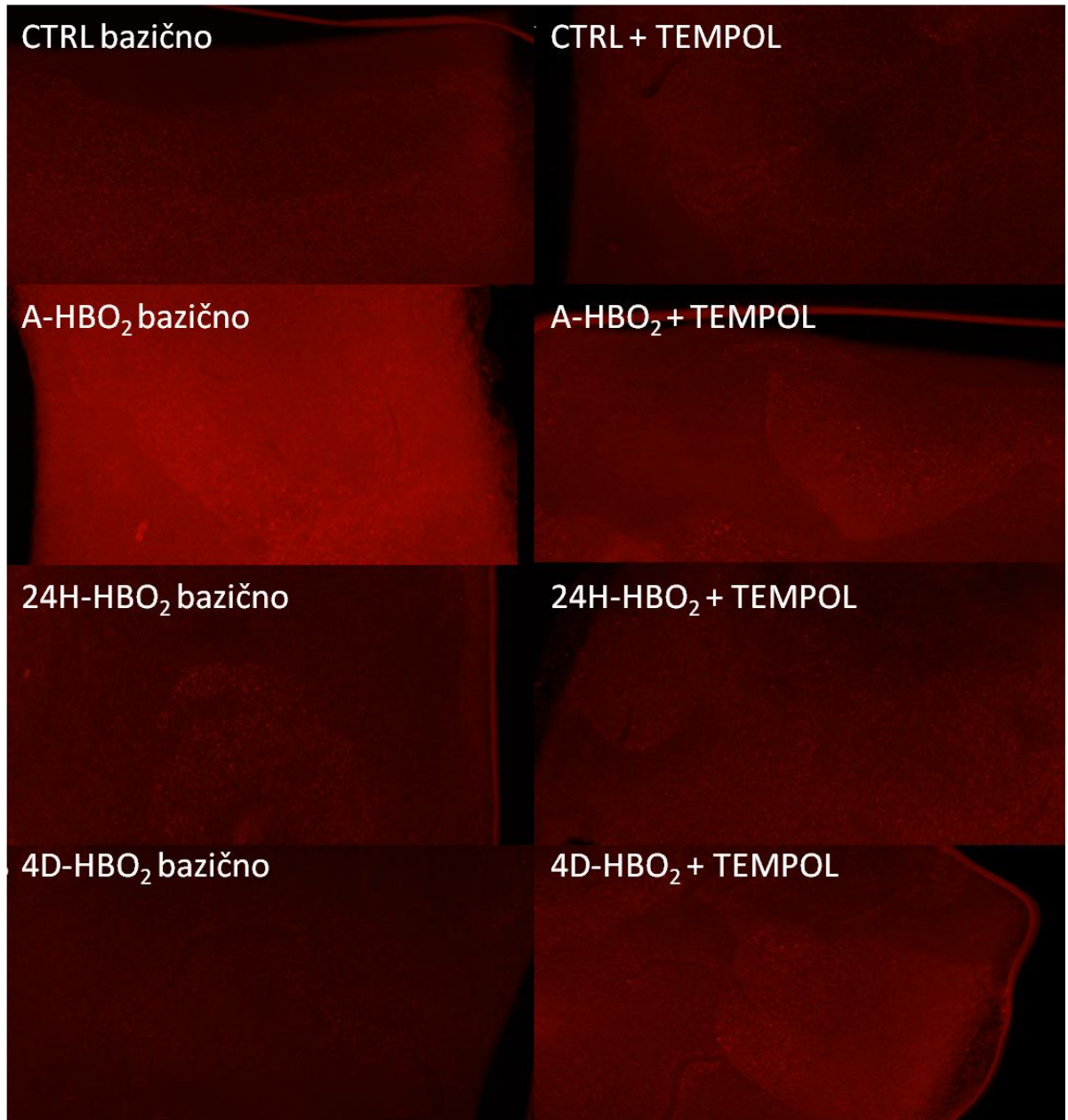




Slika. 5.3.2. Grafički prikaz *in situ* određivanja razine superoksida metodom fluorescencije koristeći DHE specifičnu boju za superoksid u testiranim grupama.

Prikazane su bazične vrijednosti i uz primjenu inhibitora NOS-a L-NAME-a, SOD mimetika TEMPOL-a i ACh (10^{-5}) u CTRL grupi (A), A-HBO₂ (B), 24H-HBO₂ (C) i 4D-HBO₂ (D) grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SEM; *p<0,05 u usporedbi s bazičnim odgovorom odgovarajuće grupe; †p<0,05 u usporedbi s odgovorom nakon dodavanja ACh u odgovarajućoj grupi.

Fotografije tkiva aorte bojanog DHE bojom snimljene Olympus DP70 kamerom na fluorescentnom mikroskopu pod najmanjim povećanjem uz filter set 15 prije i nakon primjene TEMPOL-a pokazuju najveći intenzitet boje u A-HBO₂ grupi.



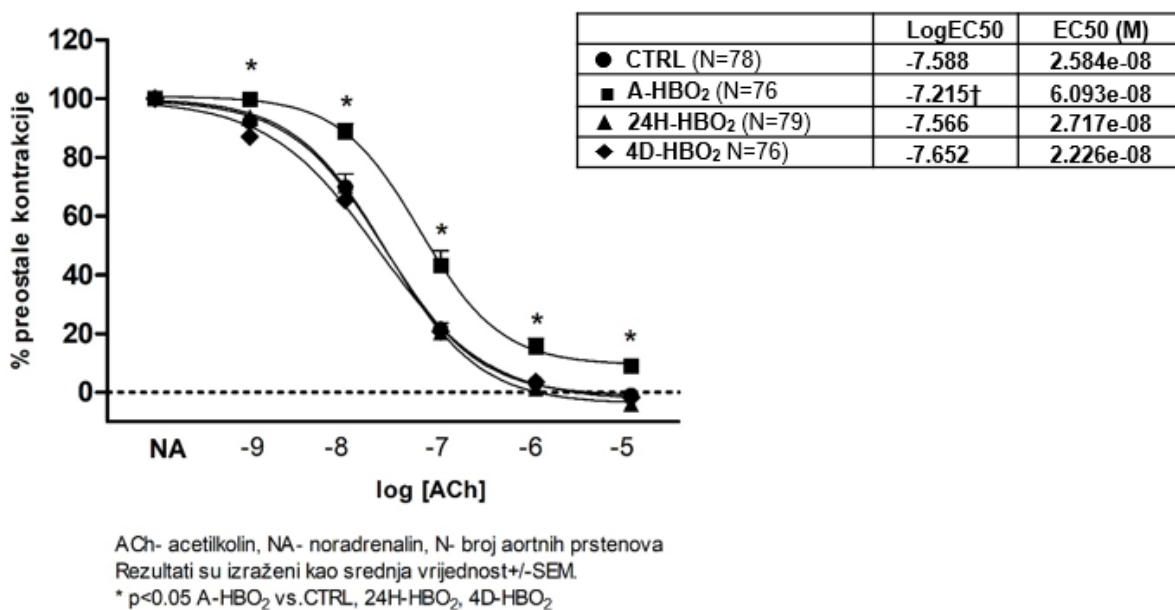
Slika 5.3.3. Reprezentativni prikaz *in situ* fluorescencije superoksida nakon bojanja aortnih prstenova DHE bojom prije i nakon inkubacije s TEMPOL-om.

Intenzitet boje proporcionalan je količini superoksida. Slike su napravljene na ZeissAxioskop MOT2 mikroskopu, pomoću Olympus DP70 kamere uz Zeiss filter set 15 (546 nm valna duljina za ekscitaciju i 590 nm za emisiju uz razdjeljivač snopa na 580 nm).

5.4. Rezultati na aortnim prstenima

5.4.1. Bazični odgovor na ACh

Primjena acetilkolina u koncentracijama od 10^{-9} do 10^{-5} M u sve četiri grupe štakora izazvala je vazodilatacijski odgovor. Utvrđena je statistički značajna razlika u bazičnom odgovoru u A-HBO₂ grupi u odnosu na CTRL i preostale grupe. U A-HBO₂ grupi također je utvrđena i smanjena osjetljivost na ACh što pokazuje LogEC₅₀ vrijednost prikazane u tablici pored grafa. EC₅₀ (polovica maksimalne učinkovite koncentracije) predstavlja koncentraciju ACh (M) koja izaziva odgovor na pola puta između bazičnog odgovora i maksimuma u tablici. Rezultati su prikazani na slici 5.4.1.



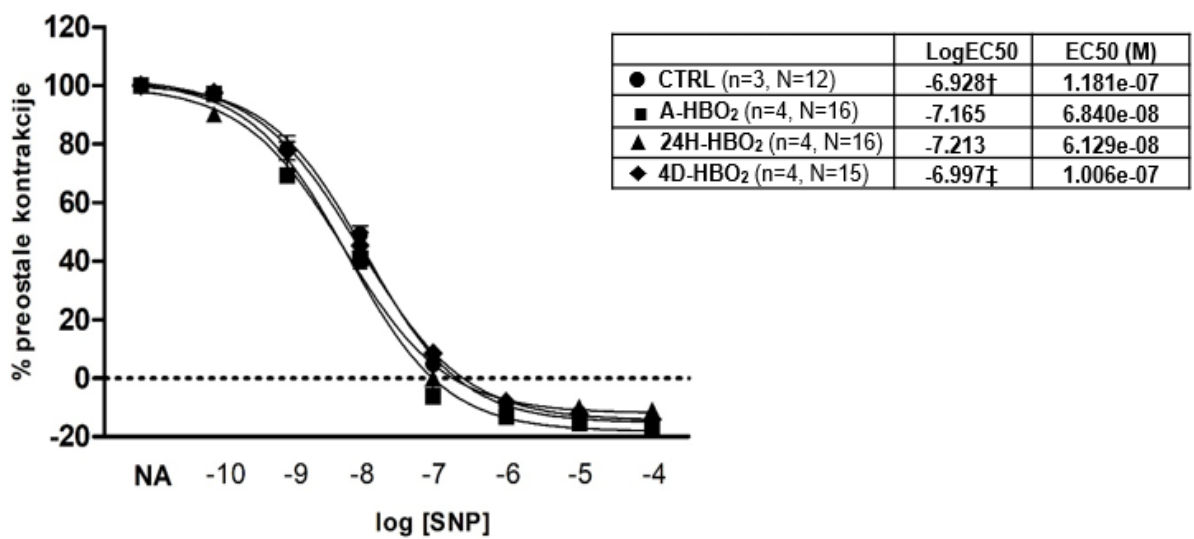
Slika 5.4.1. Bazični odgovor aortnih prstenova u testiranim grupama na primjenu acetilkolina u koncentracijama od 10^{-9} do 10^{-5} M.

Rezultati su prikazani kao postotak preostale kontrakcije nakon primjene noradrenalina u koncentraciji 10^{-7} M \pm SEM. U tablici su prikazane vrijednosti LogEC₅₀ i EC₅₀ koje pokazuju osjetljivost na ACh. (N je broj prstena- 4 aortna prstena po štakoru).

*p<0,05 u A-HBO₂ grupi u odnosu na CTRL i ostale grupe

5.4.2. Endotel - neovisna relaksacija

Nakon primjene SNP-a (koji je izravni donor NO-a) nije utvrđena statistički značajna razlika u odgovoru među grupama. Sve su žile imale očekivani vazodilatacijski odgovor. CTRL grupa pokazala je nižu osjetljivost na SNP u usporedbi s A-HBO₂ i 24H-HBO₂ grupama štakora (†p <0,05); 4D-HBO₂ grupa pokazala je nižu osjetljivost na SNP u usporedbi s 24H-HBO₂ skupinom štakora (‡ p <0,05).



SNP- natrijev nitroprusid, NA- noradrenalin, n- broj štakora, N- broj aortnih prstenova
Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost±SEM.

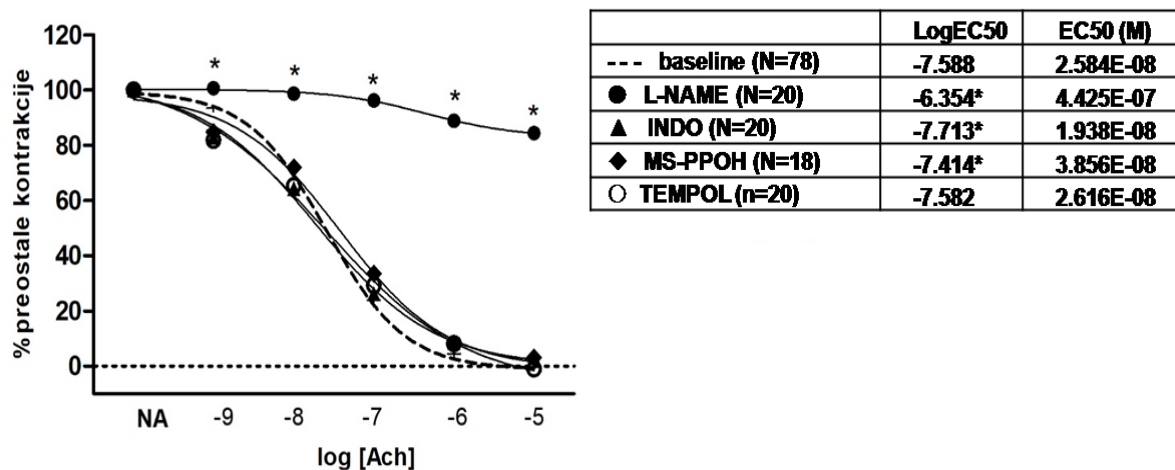
Slika 5.4.2. Reaktivnost aortnih prstenova na primjenu SNP-a u koncentracijama od 10⁻¹⁰ do 10⁻⁴ M.

Rezultati su prikazani kao postotak preostale kontrakcije nakon primjene noradrenalina u koncentraciji 10⁻⁷ M ±SEM. U tablici su prikazane LogEC50 i EC50 koji pokazuju osjetljivost aortnih prstenova na SNP.

(n predstavlja broj štakora, N je broj prstena - 4 aortna prstena po štakoru).

5.4.3. Odgovor aortnih prstena na ACh nakon primjene inhibitora.

U kontrolnoj grupi nije bilo značajnih razlika u vazorelaksacijskom odgovoru nakon primjene različitih inhibitora osim nakon primjene L-NAME-a gdje je vazorelaksacijski odgovor gotovo u cijelosti inhibiran, a osjetljivost na ACh je smanjena.



Grupa: CTRL

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SEM

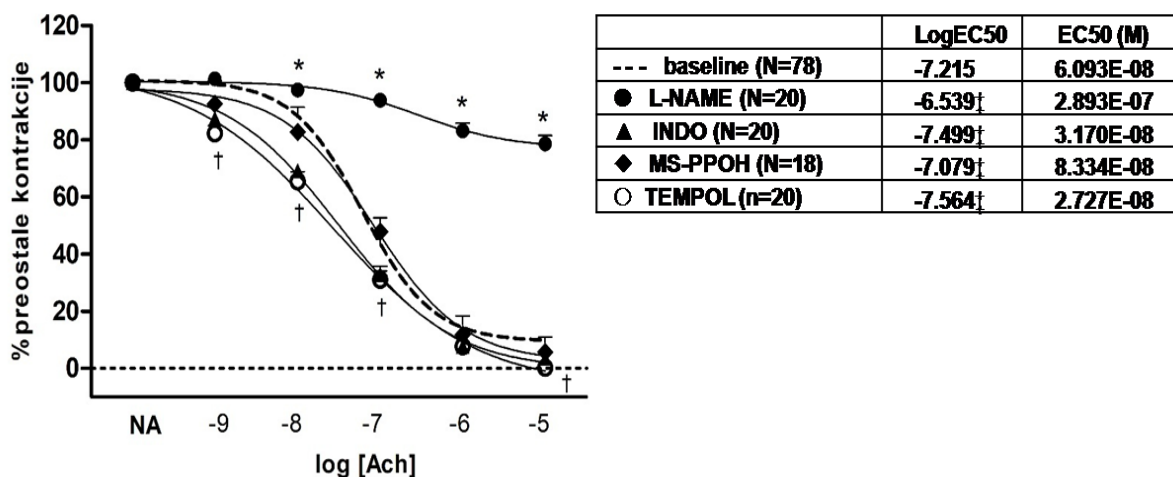
* $p < 0,05$ u usporedbi s bazičnim odgovorom

Slika 5.4.3.1. Odgovor aortnih prstena kontrolne grupe štakora na acetilkolin u koncentraciji od 10^{-9} M do 10^{-5} M u bazalnim uvjetima ($n=78$) te nakon primjene inhibitora L-NAME-a ($n=20$), INDO ($n=20$), MS-PPOH-a ($n=18$) i TEMPOL-a ($n=20$).

Rezultati su prikazani kao postotak preostale kontrakcije nakon primjene noradrenalina u koncentraciji 10^{-7} M \pm SEM. (N je broj prstena - 4 aortna prstena po štakoru).

* $p < 0,05$ u odnosu na bazični odgovor

U A-HBO₂ grupi, primjenom L-NAME-a također je došlo do inhibiranja vazorelaksacijskog odgovora i smanjene osjetljivosti na ACh aortnih prstenova. Primjenom TEMPOL-a postignuta je statistički značajnija relaksacija u odnosu na bazični odgovor. TEMPOL i INDO povećavaju osjetljivost aortnih prstenova na ACh, L-NAME i MS-PPOH ju smanjuje u usporedbi s bazičnim odgovorom.



Grupa: A-HBO₂

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±SEM

*p<0,05 bazični odgovor u usporedbi s L-NAME-om

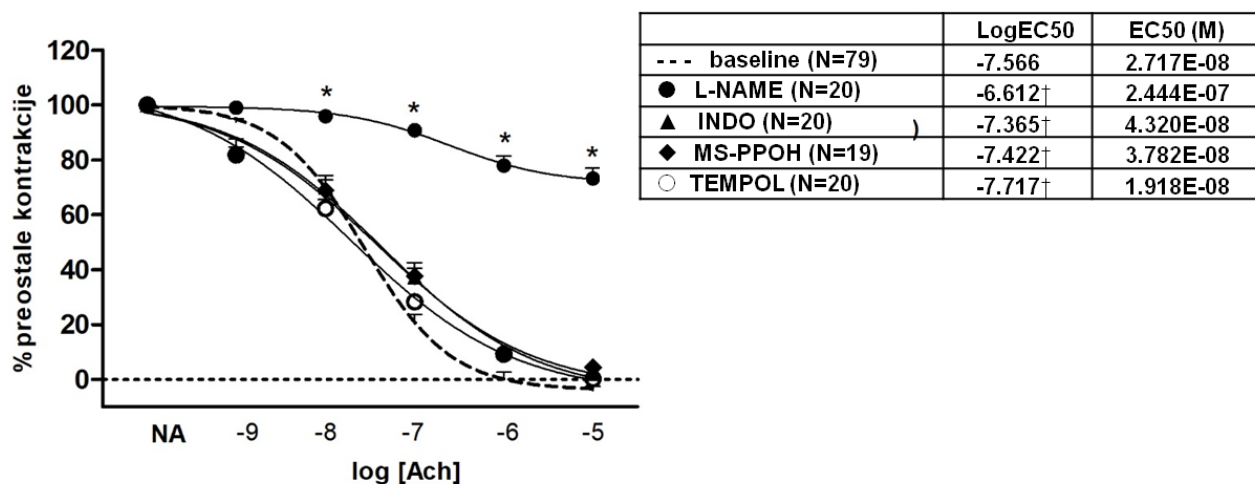
†p<0,05 bazični odgovor u usporedbi TEMPOL-om

‡p<0,05 osjetljivost na ACh nakon primjene inhibitora u odnosu na bazični odgovor

Slika 5.4.3.2. Odgovor aortnih prstena A-HBO₂ grupe štakora akutno tretirane u hiperbaričnoj komori na acetilkolin u koncentraciji od 10⁻⁹ M do 10⁻⁵ M u bazalnim uvjetima (n=76) te nakon primjene inhibitora L-NAME (n=20), indometacina (n=20), MS-PPOH (n=18) i TEMPOL-a (n=20).

Rezultati su prikazani kao postotak preostale kontrakcije nakon primjene noradrenalina u koncentraciji 10⁻⁷ M ±SEM. (N je broj prstena - 4 aortna prstena po štakoru).

Vazorelaksacijski odgovor aortnih prstenova u 24H-HBO₂ grupi statistički je značajno inhibiran jedino primjenom L-NAME-a. Nakon primjene TEMPOL-a nema značajnih razlika u vazorelaksacijskom odgovoru na ACh. Osjetljivost na ACh najviše je smanjena djelovanjem L-NAME-a u usporedbi s bazičnim odgovorom. MS-PPOH i INDO također smanjuju osjetljivost na ACh dok ju TEMPOL povećava.



Grupa: 24H-HBO₂

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±SEM

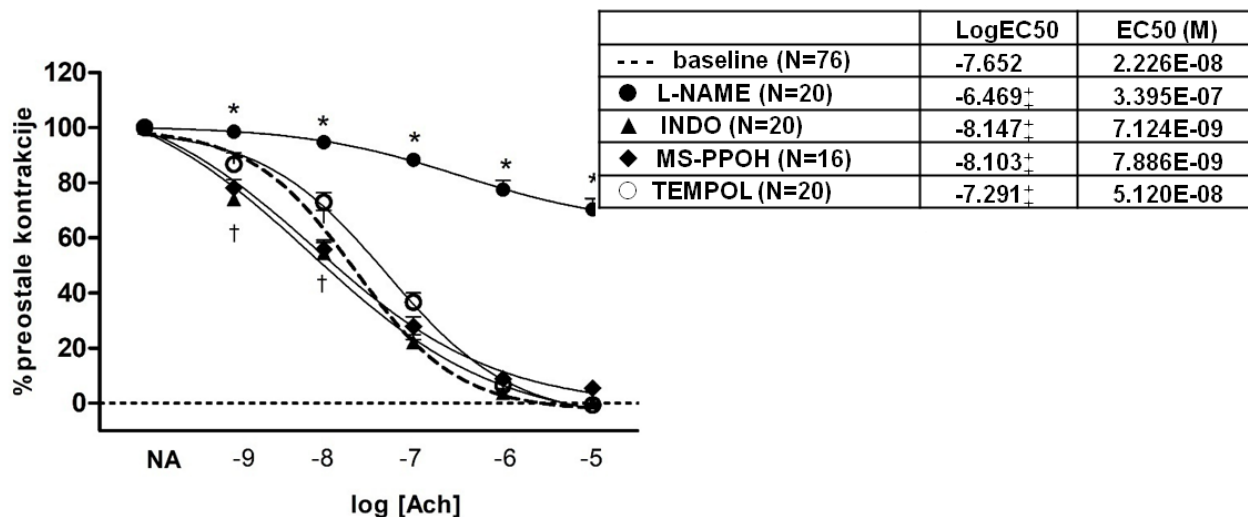
*p<0,05 bazični odgovor u usporedbi s L-NAME-om

†p<0,05 osjetljivost na ACh nakon primjene inhibitora u odnosu na bazični odgovor

Slika 5.4.3.3. Odgovor aortnih prstena 24H-HBO₂ grupe štakora akutno tretirane u hiperbaričnoj komori i testirane nakon 24h na acetilkolin u koncentraciji od 10⁻⁹ M do 10⁻⁵ M u bazalnim uvjetima (n=79) te nakon primjene inhibitora L-NAME (n=20), indometacina (n=20), MS-PPOH-a (n=19) i TEMPOL-a (n=20).

Rezultati su prikazani kao postotak preostale kontrakcije nakon primjene noradrenalina u koncentraciji 10⁻⁷ M ± SEM. (N je broj prstena - 4 aortna prstena po štakoru).

U 4D-HBO₂ grupi vazorelaksacijski odgovor aortnih prstenova na ACh statistički je značajno inhibiran primjenom L-NAME-a, ali ne u potpunosti. Djelomično inhibiran primjenom MS-PPOH u dozama 10⁻⁶ M i 10⁻⁷ M. Primjenom TEMPOL-a nije utvrđena razlika u relaksacijskom odgovoru u odnosu na bazični odgovor. Osjetljivost na ACh također je smanjena djelovanjem L-NAME-a, a povećana djelovanjem INDO, MS-PPOH i TEMPOL-a.



Grupa: 4D-HBO₂

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±SEM

*p<0,05 bazični odgovor u usporedbi s L-NAME-om

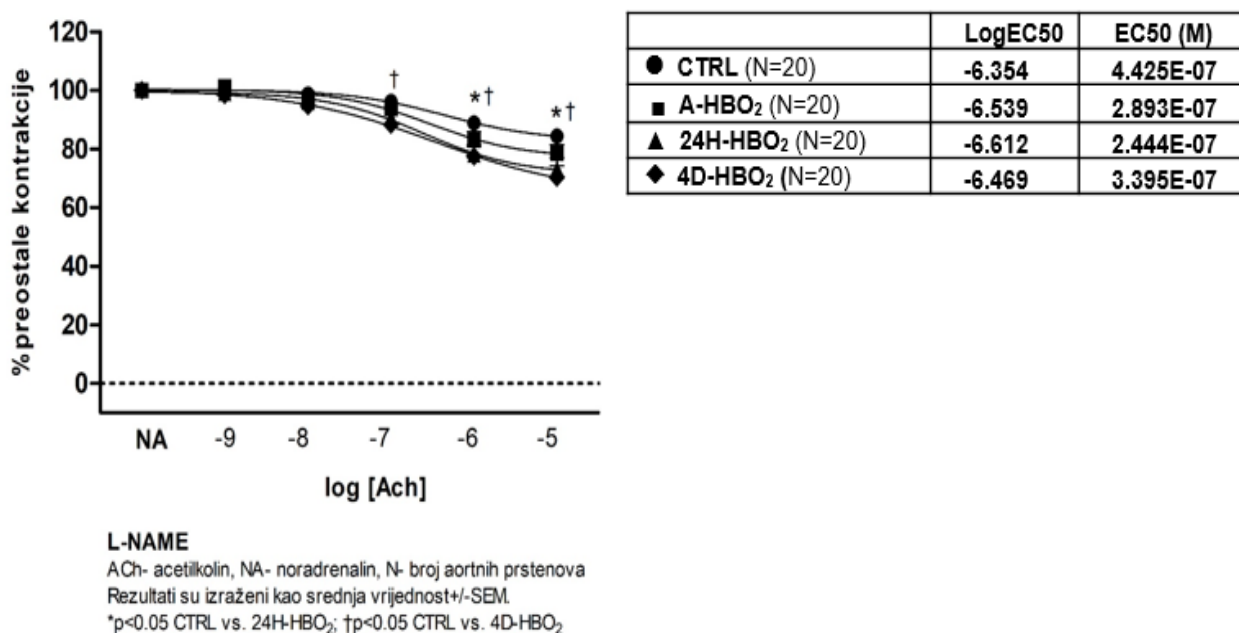
†p<0,05 bazični odgovor u usporedbi s MS-PPOH

‡ p<0,05 osjetljivost na ACh nakon primjene inhibitora u odnosu na bazični odgovor

Slika 5.4.3.4. Odgovor aortnih prstenova 4D-HBO₂ grupe štakora tretirane u hiperbaričnoj komori 4 dana i testirane 5. dan na acetilkolin u koncentraciji od 10⁻⁹ M do 10⁻⁵ M u bazalnim uvjetima (n=76) te nakon primjene inhibitora L-NAME-a (n=20), indometacina (n=20), MS-PPOH-a (n=16) i TEMPOL-a (n=20).

Rezultati su prikazani kao postotak preostale kontrakcije nakon primjene noradrenalina u koncentraciji 10⁻⁷ M ± SEM. (N je broj prstena - 4 aortna prstena po štakoru).

Utvrđujući mehanizme koji posreduju relaksacijski odgovor aortnih prstenova na ACh ovisno o dužini trajanja HBO₂, nakon primjene L-NAME-a, utvrđena je značajnije smanjena inhibicija relaksacije nakon primjene L-NAME-a u odnosu na CTRL grupu u svim HBO₂ grupama iako u osjetljivosti na ACh nema razlika.



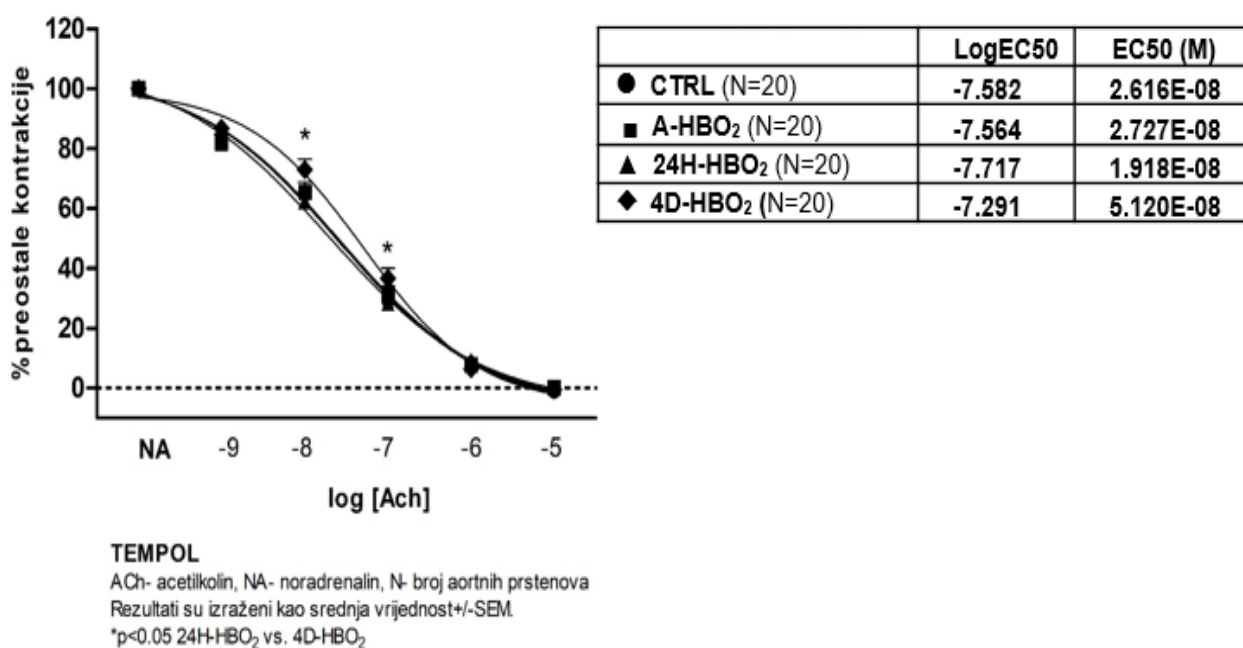
Slika 5.4.3.5. Odgovor aortnih prstenova na acetilkolin u koncentraciji od 10^{-9} M do 10^{-5} M u) te nakon primjene inhibitora L-NAME (n=20) u kontrolnoj i testiranim grupama.

Rezultati su prikazani kao postotak preostale kontrakcije nakon primjene noradrenalina u koncentraciji 10^{-7} M \pm SEM. (N je broj prstena - 4 aortna prstena po štakoru).

* $p < 0,05$ u odnosu na 24H-HBO₂

† $p < 0,05$ u odnosu na 4D-HBO₂

Primjenom TEMPOL-a dolazi do značajno poboljšane relaksacije u A-HBO₂ grupi u odnosu na bazični odgovor u toj grupi. Rezultati nadalje prikazuju da nema značajnih razlika među grupama nakon primjene TEMPOL-a u usporedbi s odgovarajućim bazičnim odgovorom za tu skupinu ili u usporedbi s kontrolom.

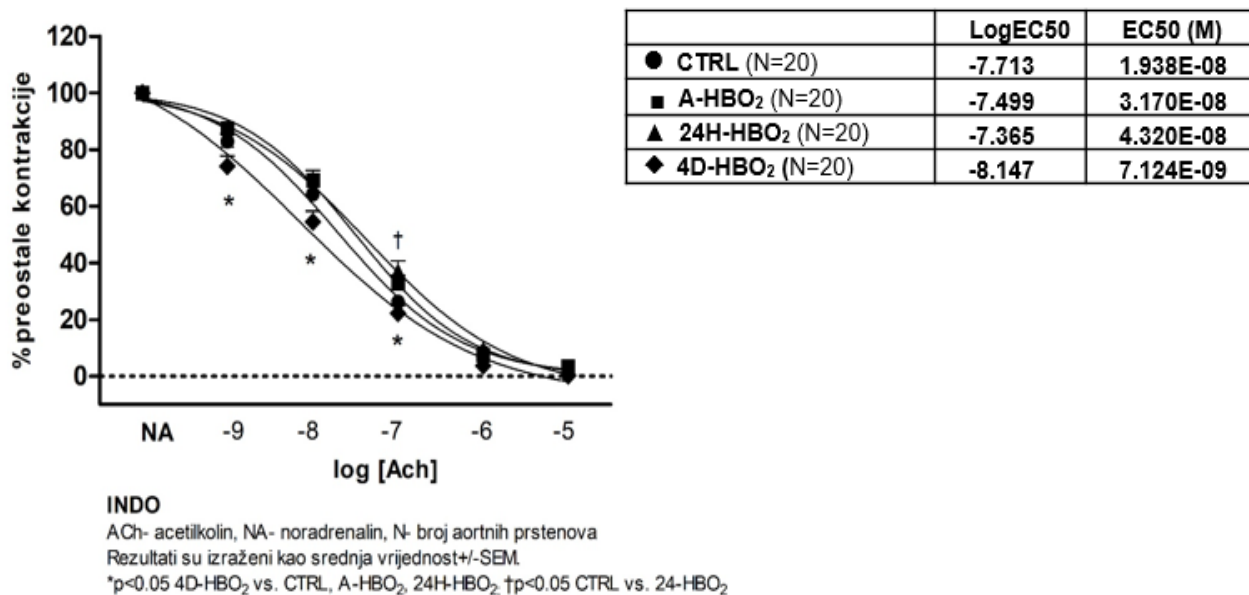


Slika 5.4.3.6. Odgovor aortnih prstenova na acetilkolin u koncentraciji od 10⁻⁹ M do 10⁻⁵ M nakon primjene TEMPOL-a (n=20) u kontrolnoj i testiranim grupama.

Rezultati su prikazani kao postotak preostale kontrakcije nakon primjene noradrenalina u koncentraciji 10⁻⁷ M \pm SEM. (N je broj prstena - 4 aortna prstena po štakoru).

*p<0,05 u usporedbi s 4D-HBO₂

Primjenom indometacina utvrđena je razlika u odgovoru na ACh među grupama. U 4D-HBO₂ grupi statistički je poboljšana relaksacija nakon primjene INDO u usporedbi s preostalim grupama. U 24H-HBO₂ grupi indometacin djelomično inhibira relaksacijski odgovor u dozi 10⁻⁷ M u usporedbi s kontrolom.



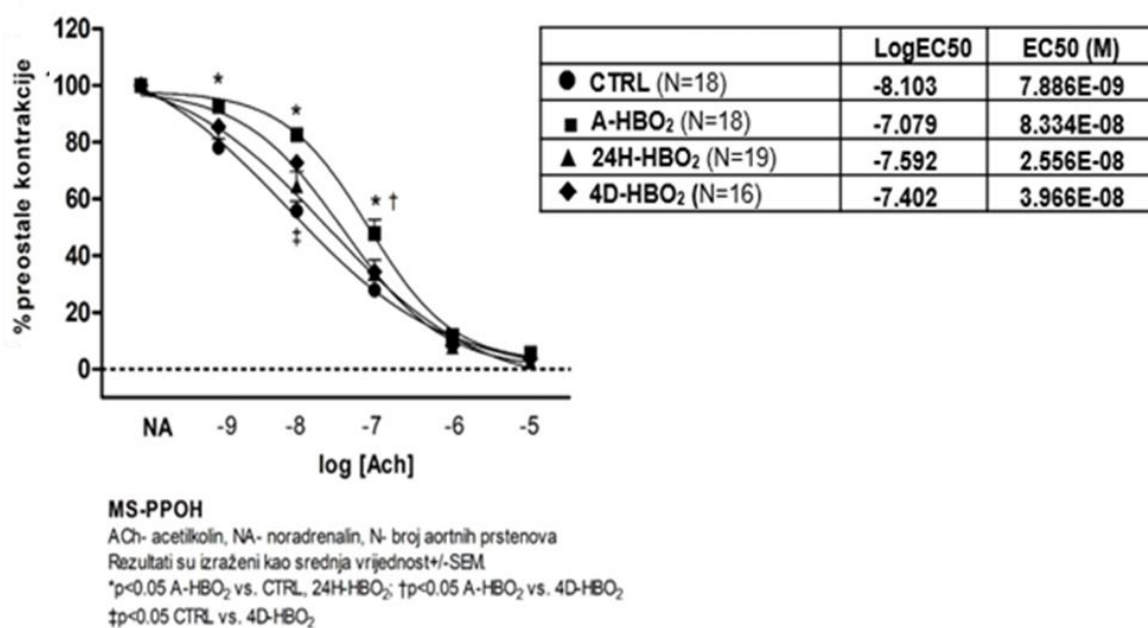
Slika 5.4.3.7. Odgovor aortnih prstenova na acetilkolin u koncentraciji od 10⁻⁹ M do 10⁻⁵ M nakon primjene inhibitora indometacina (n=20) u kontrolnoj i testiranim grupama.

Rezultati su prikazani kao postotak preostale kontrakcije nakon primjene noradrenalina u koncentraciji 10⁻⁷ M \pm SEM. (N je broj prstena - 4 aortna prstena po štakoru).

* $p < 0,05$ u usporedbi s 4D-HBO₂;

† $p < 0,05$ u usporedbi s 24H-HBO₂

Primjenom MS-PPOH-a utvrđena je razlika u odgovoru na ACh u A-HBO₂ grupi u usporedbi s CTRL i 24H-HBO₂ u dozama 10⁻⁹ – 10⁻⁷ M, te u usporedbi s 4D-HBO₂ grupom u dozi 10⁻⁷ M. MS-PPOH djelomično inhibira relaksacijski odgovor u dozi 10⁻⁸ M u 4D-HBO₂ u usporedbi s CTRL.



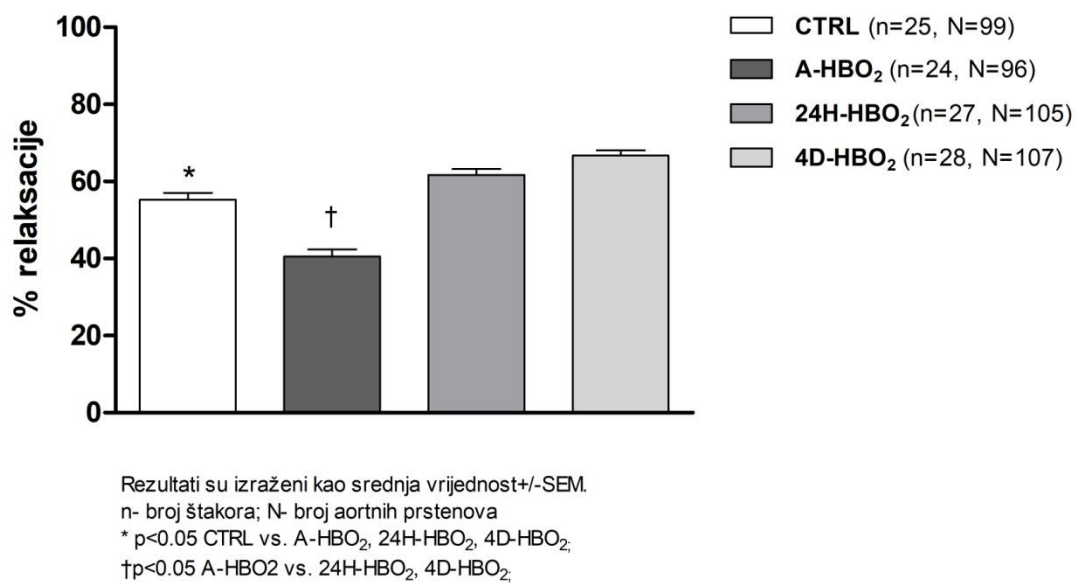
Slika 5.4.3.8. Odgovor aortnih prstenova na acetilkolin u koncentraciji od 10⁻⁹ M do 10⁻⁵ M nakon primjene inhibitora MS-PPOH-a (n=20) u svim grupama.

Rezultati su prikazani kao postotak preostale kontrakcije nakon primjene noradrenalina u koncentraciji 10⁻⁷ M ± SEM. (N je broj prstena - 4 aortna prstena po štakoru).

**p*<0,05 u usporedbi s bazičnim odgovorom odgovarajuće grupe

5.4.4. Hipoksijom uzrokovana relaksacija ovisna o endotelu

Testiranje hipoksijom uzrokovane relaksacije ovisne o endotelu u bazičnim uvjetima i nakon primjene inhibitora pokazalo je slijedeće rezultate: hipoksijom posredovana relaksacija značajno je smanjena u A-HBO₂ grupi, te značajno povećana u 24H-HBO₂ i 4D-HBO₂ grupama u usporedbi s kontrolnom skupinom.



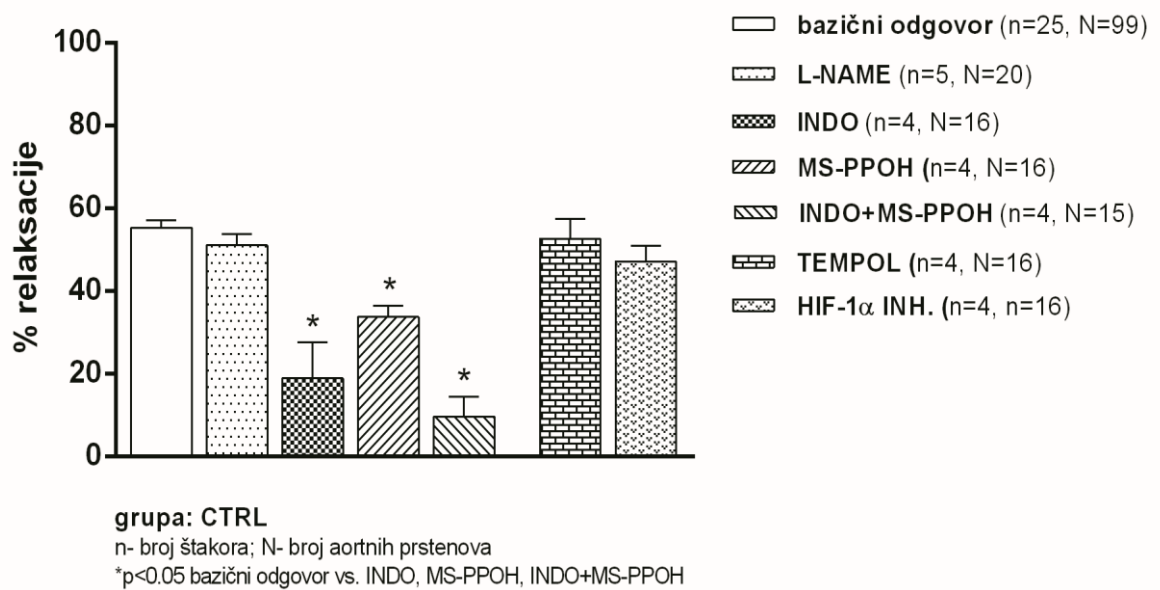
Slika 5.4.4.1. Bazični odgovor aortnih prstenova u kontrolnoj i testiranim grupama na hipoksiju.

Rezultati su prikazani kao postotak relaksacije nakon primjene noradrenalina u koncentraciji 10⁻⁷ M \pm SEM. (n predstavlja broj štakora, N je broj prstena- 4 aortna prstena po štakoru).

*p<0,05 u odnosu na preostale grupe

†p<0,05 u usporedbi s 24H-HBO₂ i 4D-HBO₂

U kontrolnoj grupi je nakon inkubacije s indometacinom došlo do značajnog smanjenja relaksacije u odnosu na bazični odgovor kao i nakon primjene MS-PPOH-a. Kombinacijom tih dviju inhibitora relaksacija je dodatno smanjena. Primjena HIF-1 α inhibitora nije imala utjecaja na hipoksijom posredovanu relaksaciju ovisnu o endotelu u kontrolnoj grupi.

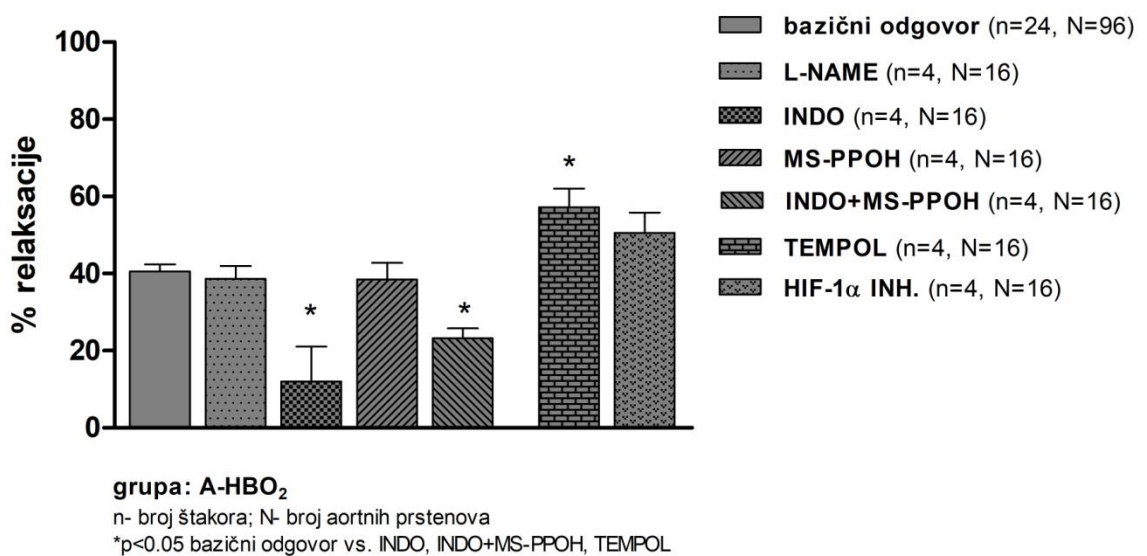


Slika 5.4.4.2. Odgovor aortnih prstena kontrolne grupe štakora na hipoksiju u bazalnim uvjetima (n=84) te nakon primjene inhibitora L-NAME (n=20), INDO (n=16), MS-PPOH (n=16), kombinacije INDO i MS-PPOH (n=15), TEMPOL-a (n=16), te HIF-1 α INH. (n=16).

Rezultati su prikazani kao postotak relaksacije nakon primjene noradrenalina u koncentraciji 10^{-7} M \pm SEM. (n predstavlja broj štakora, N je broj prstena- 4 aortna prstena po štakoru).

*p<0,05 u odnosu na bazični odgovor

Hipoksijom uzrokovana relaksacija aortnih prstenova u A-HBO₂ grupi najvećim dijelom je smanjena djelovanjem indometacina. Primjenom TEMPOL-a došlo je do poboljšane relaksacije, HIF-1 α inhibitor nije imao utjecaja na relaksaciju. Kombinacijom INDO i MS-PPOH relaksacija je značajno smanjena, ali ne dodatno u odnosu nakon primjene INDO zasebno.

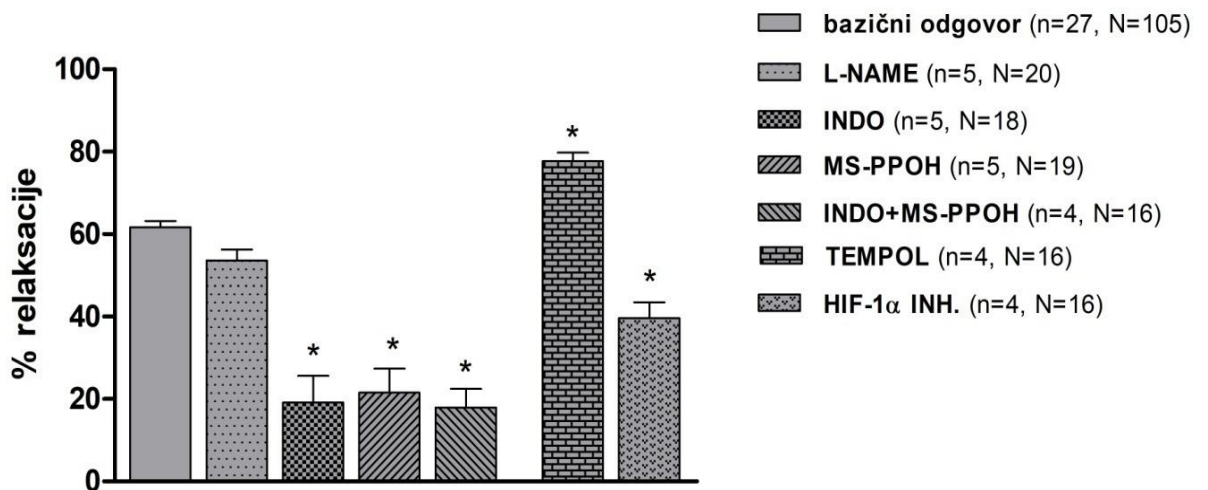


Slika 5.4.4.3. Odgovor aortnih prstena A-HBO₂ grupe štakora akutno tretirane u hiperbaričnoj komori u bazalnim uvjetima (n=96) te nakon primjene inhibitora L-NAME (n=16), INDO (n=16), MS-PPOH (n=16), kombinacije INDO i MS-PPOH (n=16), TEMPOL-a (n=16) te HIF-1 α INH. (n=16).

Rezultati su prikazani kao postotak relaksacije nakon primjene noradrenalina u koncentraciji 10⁻⁷ M \pm SEM. (n predstavlja broj štakora, N je broj prstena- 4 aortna prstena po štakoru).

*p<0,05 u odnosu na bazični odgovor

Primjenom INDO, MS-PPOH i HIF-1 α inhibitora postignuta je značajna inhibicija relaksacijskog odgovora na hipoksiju u 24H-HBO₂ grupi u usporedbi s bazičnim odgovorom. Primjena L-NAME-a nema utjecaja na relaksacijski odgovor na hipoksiju. Djelovanjem TEMPOL-a došlo je do pojačane relaksacije u odnosu na bazični odgovor.



grupa: 24H-HBO₂

n- broj štakora; N- broj aortnih prstenova

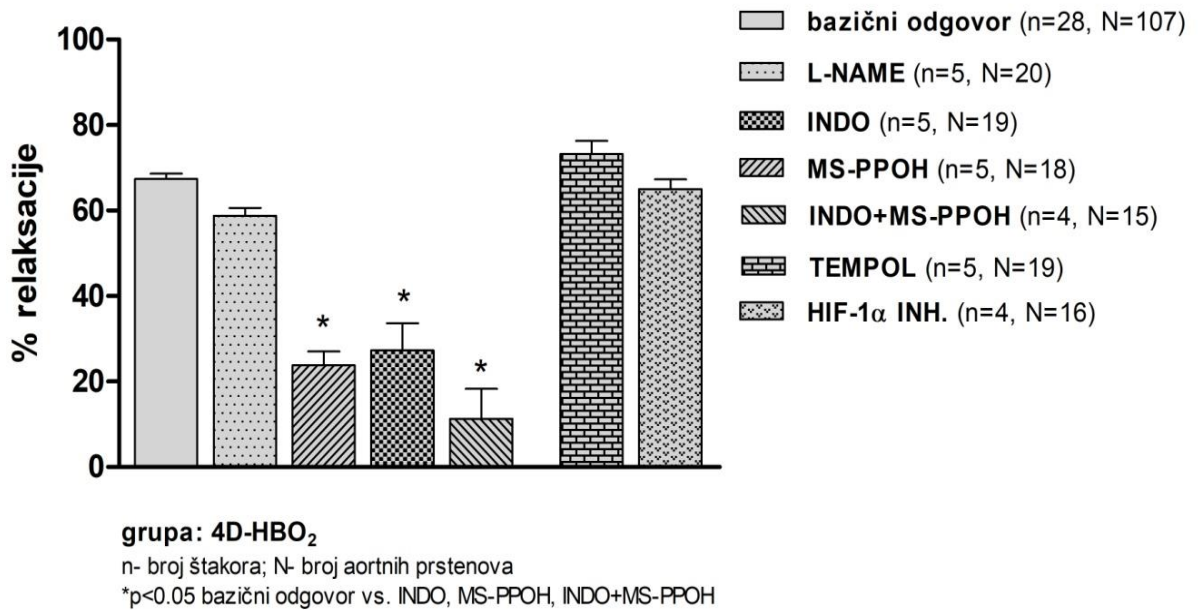
*p<0.05 bazični odgovor vs. INDO, MS-PPOH, INDO+MS-PPOH, TEMPOL, HIF-1 α INH

Slika 5.4.4.4. Odgovor aortnih prstena 24H-HBO₂ grupe štakora akutno tretirane u hiperbaričnoj komori i testirane nakon 24h na hipoksiju u bazalnim uvjetima (n=105) te nakon primjene inhibitora L-NAME (n=16), INDO (n=16), MS-PPOH (n=16), kombinacije INDO i MS-PPOH (n=16), TEMPOL-a (n=16) te HIF-1 α INH. (n=16).

Rezultati su prikazani kao postotak relaksacije nakon primjene noradrenalina u koncentraciji 10⁻⁷ M \pm SEM. (n predstavlja broj štakora, N je broj prstena - 4 aortna prstena po štakoru).

*p<0,05 u odnosu na bazični odgovor

U 4D-HBO₂ grupi primijećen je sličan odgovor nakon primjene inhibitora kao u 24H-HBO₂ grupi, pri čemu je primijećena tendencija dodatnog učinka primjenom kombinacije INDO i MS-PPOH. Primjena L-NAME i TEMPOL-a nije rezultirala nikakvom promjenom kao ni primjena HIF-1 α inhibitora.



Slika 5.4.4.5. Odgovor aortnih prstena 4D-HBO₂ grupe štakora tretirane u hiperbaričnoj komori kroz 4 uzastopna dana i testirane 5. dan na hipoksiju u bazalnim uvjetima (n=107) te nakon primjene inhibitora L-NAME (n=20), INDO (n=19), MS-PPOH (n=18), kombinacije INDO i MS-PPOH (n=15), TEMPOL-a (n=19) te HIF-1 α INH. (n=16).

Rezultati su prikazani kao postotak relaksacije nakon primjene noradrenalina u koncentraciji 10⁻⁷ M \pm SEM. (n predstavlja broj štakora, N je broj prstena - 4 aortna prstena po štakoru).

*p<0,05 u odnosu na bazični odgovor

5.5. Relativni izražaj mRNA u tkivu aorte

Tablice 5.5.1. i 5.5.2. pokazuju relativni izražaj mRNA za izoforme superoksid dismutaze 1, 2, 3 (*Cu / Zn SOD*, *Mn SOD*, *EC SOD* → SOD 1, 2 i 3), katalaze (*CAT*) te glutation peroksidaze 1 i 4 (*GPxl*, *GPx4*). Izražaji *SOD1* i *SOD3* su statistički značajno veći u grupi 4D-HBO₂ u usporedbi s kontrolnim životinjama koje nisu podvrgnute HBO₂ protokolima i u usporedbi s A-HBO₂ i 24H-HBO₂ grupama. To je očigledno kada se normalizira i prema izražaju *HPRT* ili *18s* gena (podatci za normalizaciju prema izražaju *18s* gena nisu prikazani). Relativni izražaj *SOD2* nije značajno različit među grupama. Izražaj mRNA katalaze te *GPxl* i *GPx4* značajno je povećan u grupi 4D-HBO₂ u usporedbi s kontrolnom skupinom. Izražaj mRNA katalazei *GPx4* također je značajno povećan u 24H-HBO₂ grupi u usporedbi s kontrolnom skupinom. U 24H-HBO₂ grupi izražaj za *GPx1* i *GPx4* povećan je i u odnosu na A-HBO₂ skupinu.

Tablica 5.5.1. Relativni izražaj mRNA SOD izoformi (*Cu/Zn SOD*, *Mn SOD* i *EC SOD*) u tkivu aorte kontrolne i testiranih grupa.

| Ispitivana grupa | <i>Cu/Zn SOD</i> | <i>MnSOD</i> | <i>EC SOD</i> |
|----------------------|------------------|--------------|---------------|
| CTRL | 0,85±0,15 | 0,43±0,13 | 0,49±0,15 |
| A-HBO ₂ | 0,82±0,13 | 0,48±0,16 | 0,46±0,08 |
| 24H-HBO ₂ | 0,86±0,10 | 0,97±0,23 | 0,82±0,08 |
| 4D-HBO ₂ | 1,77±0,20*†‡ | 0,40±0,15 | 1,49±0,33*†‡ |

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM

*p<0,05 u usporedbi s CTRL

†p<0,05 u usporedbi s A-HBO₂ grupom

‡p<0,05 u usporedbi s 24H-HBO₂ grupom

Tablica 5.5.2. Relativni izražaj mRNA katalaze (CAT) i glutation peroksidaza 1 i 4 (GPx1, GPx4) u tkivu aorte kontrolne i testiranih grupa.

| Ispitivana grupa | CAT | GPx1 | GPx4 |
|----------------------|--------------|---------------|-------------|
| CTRL | 0,42±0,10 | 1,84±0,65 | 0,35±0,08 |
| A-HBO ₂ | 0,76±0,18 | 3,51±1,22 | 0,31±0,11 |
| 24H-HBO ₂ | 1,12±0,18* | 2,72±0,50† | 0,63±0,07*† |
| 4D-HBO ₂ | 1,66±0,16*†‡ | 10,86±1,84*†‡ | 0,48±0,14*† |

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM

*p<0,05 u usporedbi s CTRL

†p<0,05 u usporedbi s A-HBO₂ grupom

‡p<0,05 u usporedbi s 24H-HBO₂ grupom

Relativni izražaj *COX-1* značajno je snižen u 24H-HBO₂ grupi u usporedbi s ostalim grupama, dok među preostalim grupama nema utvrđenih razlika. Izražaj *COX-2* u usporedbi s kontrolom značajno je snižen u 4D-HBO₂ grupi. Također je značajno snižen i u 24H-HBO₂ i 4D-HBO₂ grupama u usporedbi s A-HBO₂ skupinom.

Relativni izražaj *iNOS*-a značajno je smanjen u grupama A-HBO₂ i 24H-HBO₂ u usporedbi s kontrolnom skupinom, a izražaj *eNOS*-a nije značajno različit među grupama.

Tablica 5.5.3. Relativni izražaj mRNA ciklooksigenaza 1 i 2 (COX-1 i COX-2) te dušik oksid sintaza (iNOS i eNOS) u tkivu aorte kontrolne i testiranih grupa

| Ispitivana grupa | COX-1 | COX-2 | iNOS | eNOS |
|----------------------|--------------|-------------|------------|-----------|
| CTRL | 4,20±0,56 | 1,18±0,34 | 0,38±0,07 | 0,13±0,06 |
| A-HBO ₂ | 4,42±0,71 | 1,45±0,40 | 0,11±0,02* | 0,03±0,02 |
| 24H-HBO ₂ | 1,74±0,21*†‡ | 0,47±0,10† | 0,12±0,03* | 0,13±0,06 |
| 4D-HBO ₂ | 3,53±0,33 | 0,33±0,32*† | 0,21±0,05 | 0,04±0,02 |

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM

*p<0,05 u usporedbi s CTRL

†p<0,05 u usporedbi s A-HBO₂ grupom

‡p<0,05 u usporedbi s 24H-HBO₂ grupom

Relativni izražaj *HIF-1 α* transkripcijskog faktora i njegovog ciljanog gena *VEGF*-a statistički je značajno povišen u 24H-HBO₂ i 4D-HBO₂ grupama u usporedbi s kontrolom i A-HBO₂ skupinom. Relativni izražaj *CYP2c11* značajno je povišen u 4D-HBO₂ grupi u odnosu na preostale grupe. Izražaj sastavnih dijelova NADPH oksidaze statistički je značajno povećan u 4D-HBO₂ grupi u usporedbi s preostalim grupama za obje sastavnice. U 24H-HBO₂ grupi izražaj *gp91phox* je povećan u odnosu na grupe CTRL i A-HBO₂.

Tablica 5.5.4. Relativni izražaj mRNA transkripcijskog faktora *HIF-1 α* i ciljnog gena *VEGF-a*, *CYP2c11*, te sastavnih dijelova NADPH oksidaze *p47phox* i *gp91phox* u tkivu aorte kontrolne i testiranih grupa

| Ispitivana grupa | <i>HIF-1α</i> | <i>VEGF</i> | <i>CYP2c11</i> | <i>p47phox</i> | <i>gp91phox</i> |
|----------------------|---------------------------------|-------------|----------------|----------------|-----------------|
| CTRL | 0,8±0,07 | 0,19±0,05 | 1,11±0,17 | 5,21±1,22 | 0,10±0,02 |
| A-HBO ₂ | 0,48±0,07 | 0,30±0,07 | 0,69±0,10 | 3,87±0,44 | 0,68±0,21 |
| 24H-HBO ₂ | 0,82±0,12*† | 0,53±0,06*† | 0,55±0,11 | 4,44±0,49 | 1,07±0,11*† |
| 4D-HBO ₂ | 0,75±0,08*† | 0,58±0,12*† | 2,21±0,41*†‡ | 6,96±0,67*†‡ | 1,95±0,34*†‡ |

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SEM

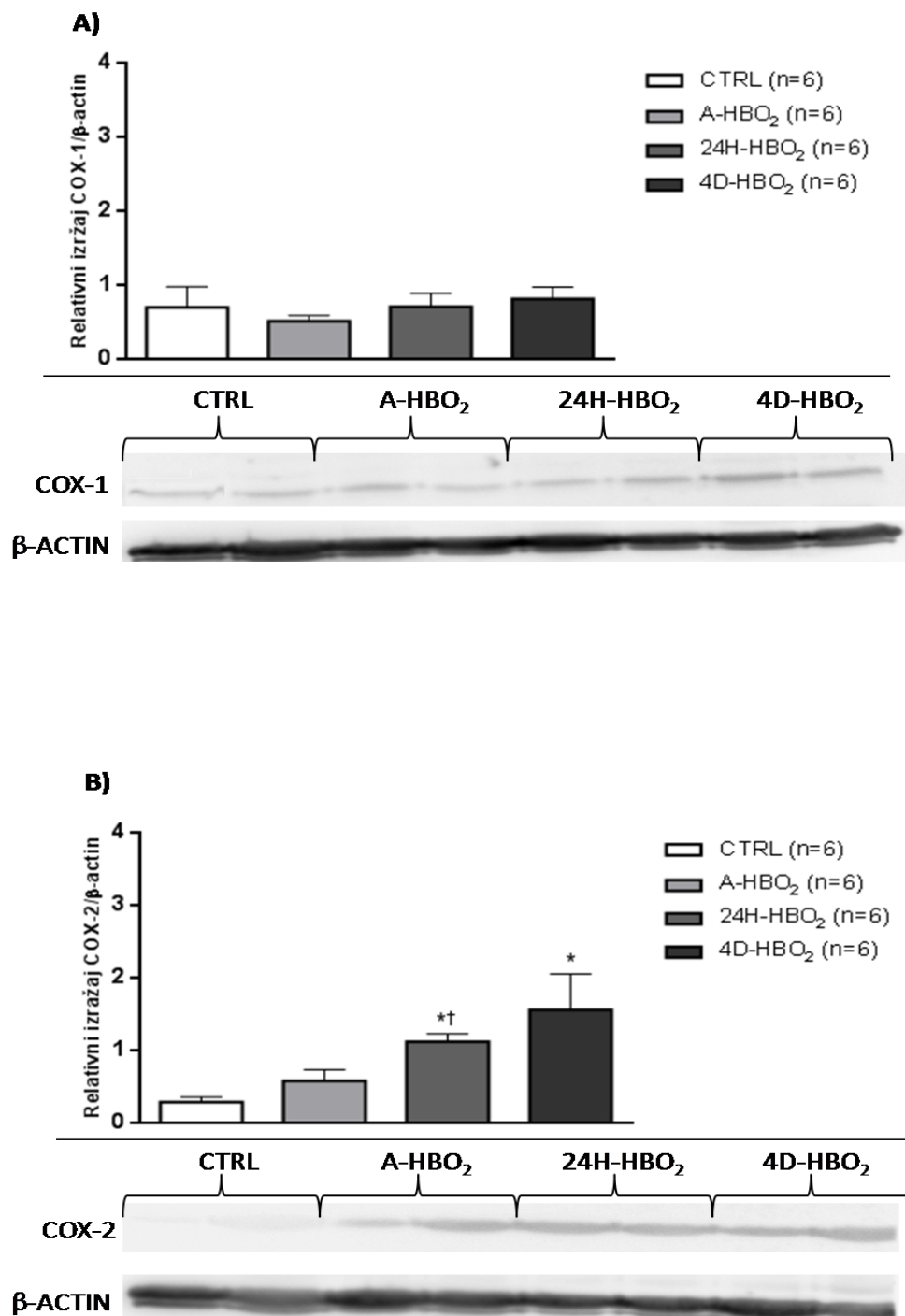
*p<0,05 u usporedbi s CTRL

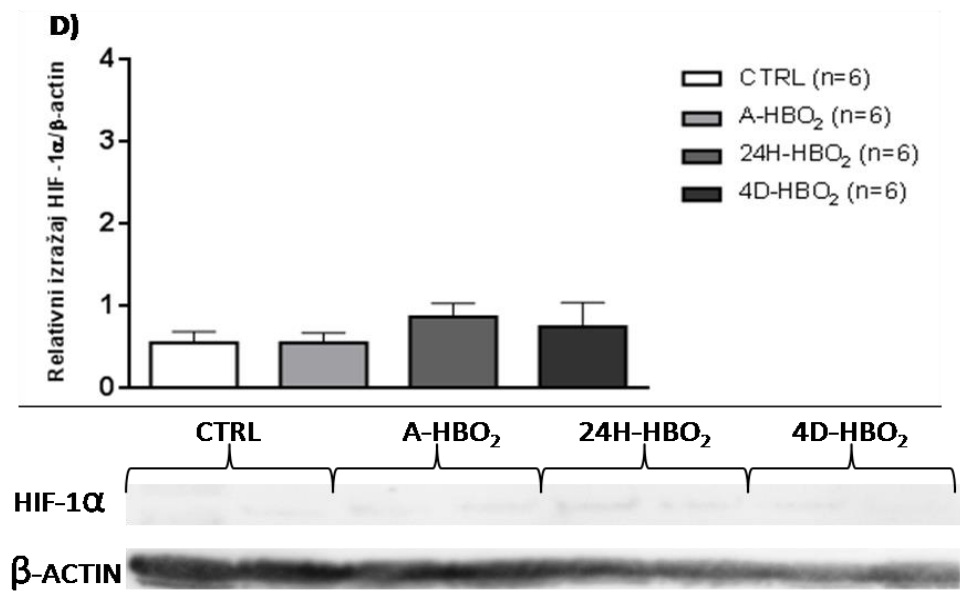
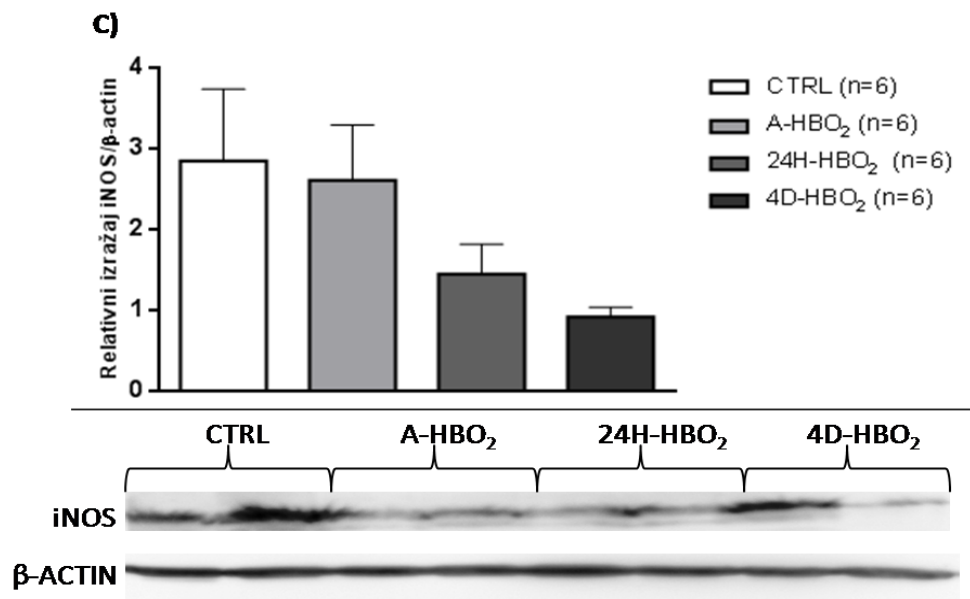
†p<0,05 u usporedbi s A-HBO₂ grupom

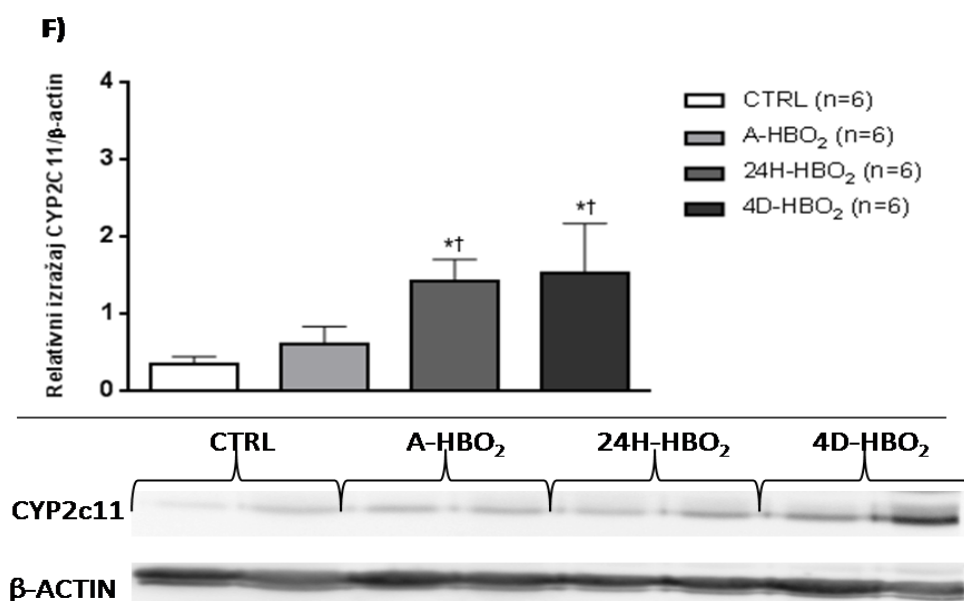
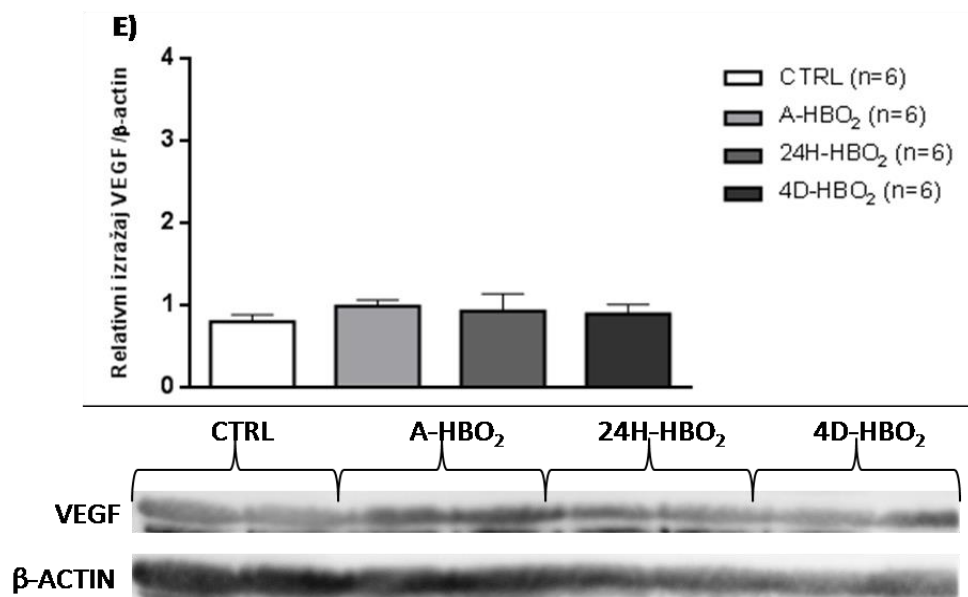
‡p<0,05 u usporedbi s 24H-HBO₂ grupom

5.6. Relativni izražaj proteina u tkivu aorte

Relativni izražaj COX-2 i CYP2c11 proteina značajno je povećan u 24H-HBO₂ i 4D-HBO₂ u usporedbi s CTRL grupom. U relativnim izražajima preostalih istraživanih proteina nema statističkih značajnosti. Mjerenje izražaja proteina zbog tehničkih razloga i nedovoljnog broja uzoraka za adekvatnu statističku analizu potrebno je ponoviti te je rezultate potrebno tumačiti s oprezom.







Slika 5.6.1. Relativni izražaj A) COX-1, B) COX-2, C) iNOS, D) HIF-1 α , E) VEGF i F) CYP2c11 proteina u tkivu aorte određenih Western blot metodom.

Izražaj je normaliziran prema izražaju za β -aktin. Rezultati su prikazani slikovno (reprezentivni prikaz) i grafički kao srednja vrijednost \pm SEM; * p <0,05 u odnosu na CTRL, † p <0,05 u usporedbi s A-HBO₂ skupinom.

6. RASPRAVA

Prikazana je studija prva koja ispituje utjecaj akutnog i intermitentnog izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji zdravih SD štakora na vaskularnu funkciju i endotelom posredovanu dilataciju na oba fiziološka podražaja ACh i hipoksiju, mehanizme kojima se odvija relaksacija te pobliže razjašnjava ulogu antioksidativnih obrambenih mehanizama i povećanog oksidativnog stresa.

Glavne spoznaje ovog istraživanja su: akutno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji narušava i ACh i hipoksijom posredovani relaksacijski odgovor torakalne aorte *in vitro*; akutna hiperbarična oksigenacija uzrokuje povećani oksidativni stres što dovodi do poremećene relaksacije aortnih prstenova u *in vitro* uvjetima; različiti protokoli, tj. trajanje izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji dovodi do promjene mehanizama kojima se odvija relaksacija posredovana ACh ili hipoksijom. Rezultati genskog izražaja enzima uključenih u dilatacijske putove i antioksidativnih enzima podupiru navedene funkcionalne rezultate.

6.1. Uloga HBO₂ i oksidativnog stresa na mehanizme relaksacije

Postoje studije koje su proučavale utjecaj hiperbarične oksigenacije na vaskularnu funkciju, kao naprimjer Hink sa suradnicima koji su pokazali da A-HBO₂ smanjuje ACh posredovanu relaksaciju, ali nisu pokazali učinak uklanjanja superoksida i vodikovog peroksida pomoću PEG-SOD i PEG-katalaze te stoga nisu mogli objasniti takvo smanjenje (4). Naši rezultati pokazuju da proizvodnja superoksida i posljedični oksidacijski stres izazvan akutnom hiperbaričnom oksigenacijom igraju ključnu ulogu kod oštećenih vazorelaksacijskih odgovora na acetilkolin, ali i hipoksiju. Reaktivni kisikovi radikali mogu inaktivirati formiranje NO-a, pa je uočeni reverzibilni učinak akutne HBO₂ na ACh posredovanu relaksaciju, u skladu i sa studijom Ay-a i suradnika koja pokazuje da oksidativni učinak HBO₂ traje samo 1 sat. (123). Istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji također pokazuju da su učinci hiperbaričnog kisika u proizvodnji povećanog oksidativnog stresa i smanjene vaskularne relaksacije ovisne o endotelu izuzetno brzi, jer su nakon samo jednog izlaganja otkrivene značajne promjene.

Nedavna studija iz našeg laboratorija dr. Unfirer sa suradnicima pokazala je alternativni put endotel-ovisne vazorelaksacije posredovane ACh-om kod dijabetičnih životinja izloženih 4 dana hiperbaričnom kisiku koji najvjerojatnije uključuje povećanu proizvodnju ili osjetljivost na EETs (12). Rezultati ove disertacije pokazuju smanjenje doprinosa NO-a na ACh

induciranu relaksaciju u HBO₂ izloženim životinjama što se čini da je proporcionalno trajanju tretmana HBO₂ (Slika.5.4.3.5.) što sugerira da izloženost HBO₂ može izazvati adaptacijske mehanizme čak i kod zdravih životinja, iako je značajnost potvrđena samo na dvije doze ACh, dok je kod hipoksijom posredovane relaksacije taj učinak neupitan.

Istraživanja na životinjskim modelima pokazuju da postoji interakcija između enzima koji proizvode vazoaktivne metabolite (NOS, COX-1, -2, CYP450) i slobodnih radikala kisika (ROS). ROS mogu biti nusproizvodi oštećene aktivacije tih enzima zajedno s aktivacijom NAD(P)H oksidaze, dok ROS može djelovati na COX enzime na način da mijenjaju svoj smjer prema proizvodnji vazokonstriktora i / ili smanjenjem biodostupnosti NO (9). Nadalje, Drenjančević i suradnici također predlažu hipotezu da se vrijeme između dvaju izlaganja može promatrati kao psudohipoksija pa se učinak hiperbaričnog kisika može promatrati s druge točke gledišta ne samo kroz prizmu povećanog oksidativnog stresa i njegovog učinka (9, 10). Rezultati inhibiranja HIF-1 α potvrđuju tu pretpostavku kao i rezultati izražaja gena.

Prilikom HBO₂ dolazi do povećanja oksidativnog stresa, a u nekim patološkim stanjima kao terapijski učinak pojavljuje se smanjivanje oksidativnog stresa. Oter i suradnici (8) dokazali su da se dva sata nakon izlaganja HBO₂ na 3 atm povećava razina peroksidiranih lipida (TBARS) i superoksid dismutaze (SOD) u plućima, mozgu i eritrocitima. Istraživanja na ljudima koji su bili podvrgnuti HBO₂-u zbog dijabetičnih ulkusa pokazala su povećanu razinu TBARS-a i napredne oksidacije proteina (AOPPs) (60). Matsunami i suradnici (124) dokazali su da nakon 7 uzastopnih HBO₂-a čak i kontrolna grupa štakora (nedijabetična) ima povećanu razinu oksidativnog stresa odnosno TBARS-a, čime su pokazali da sama HBO₂ uzrokuje povećani oksidativni stres. U ovom istraživanju povećana količina peroksidiranih lipida, odnosno TBARS-a nađena je u akutno izloženih životinja, ali ne i u grupi koja je izlagana 4 dana hiperbaričnoj terapiji, dok je količina TBARS-a u kontrolnoj grupi bila normalna. Razlog zbog kojeg postoji razlika između ovog istraživanja i prijašnjih (8, 60, 124) može biti u tome što su uzorci za TBARS skupljani 24h poslije zadnjeg izlaganja HBO₂, a u usporednom istraživanjima uzorci su skupljani neposredno nakon zadnjeg izlaganja kao u akutnoj grupi, također su imali tri dana duži period izlaganja HBO₂ i na većem tlaku (2,4 atm u usporedbi s 2,0 atm).

Osim mitohondrija, drugi izvor slobodnih radikala u stanicama je NADPH oksidaza na staničnoj membrani ili na peroksisomima. NADPH oksidaza troši kisik i stvara H₂O₂. U fiziološkim uvjetima, proizvode se velike količine H₂O₂ koji se uz pomoć katalaze (CAT) raspada na vodu i kisik. Iako upotrebljenim metodama kao ni u našim prijašnjim studijama oksidativni stres u intermitentno izloženim životinjama nismo uspjeli dokazati osim metodom

TBARS u tkivu aorte uspoređujući s 24H-HBO₂ skupinom, ali ne i serumu, ovi rezultati u skladu su s prijašnjim studijama koje su dokazale oksidativni stres. Naime, mi smo tkiva 4D-HBO₂ grupe uzorkovali 24h nakon posljednjeg izlaganja, i po povećanom izražaju katalaze i glutation peroksidaza možemo zaključiti da do povišenog oksidativnog stresa ipak dolazi, ali ne u tolikoj mjeri da se normalnim staničnim mehanizmima to ne može regulirati. U prilog tome idu i rezultati na akutno izloženim životinjama i 24h nakon izlaganja, gdje se već nakon jednog izlaganja može vidjeti utjecaj hiperbarične oksigenacije na oksidativni status. Ova disertacija također pokazuje da su učinci hiperbarične oksigenacije u proizvodnji povećanog oksidativnog stresa i smanjene vazorelaksacije ovisne o endotelu izuzetno brzi, ali prolazni, jer su značajne promjene otkrivene nakon samo jedne izloženosti HBO₂, ali su izgubljene 24 sata nakon izlaganja (Slika 5.4.1.; Slika 5.4.4.1.).

Nadalje, rezultati ukazuju na smanjenje uloge NO-a i na ACh induciranu relaksaciju u HBO₂ izloženim životinjama, unatoč povećanoj osjetljivosti glatkog mišića krvnih žila na NO, što se čini da je proporcionalno trajanju HBO₂ tretmana. Naime, izloženost HBO₂ može izazvati adaptivne mehanizme i ublažiti oksidacijski stres čak i u zdravih životinja (Slika 5.4.3.5.). U skladu s tim nalazima su nedavne studije iz našeg laboratorija koje su prezentirali Kibel sa suradnicima (11, 13) te Unfirer sa suradnicima (12) koji pokazuju prisutnost alternativnih putova vazorelaksacije ovisne o endotelu na acetilkolin i ANG (1-7) kod dijabetičnih životinja izloženih 4 dana HBO₂, koje predstavljaju najvjerojatnije povećanje proizvodnje ili osjetljivosti na EET. Studije na životinjskim modelima pokazuju da postoji interakcija između enzima koji proizvode vazoaktivne metabolite (NOS, COX-1, -2, CYP450) i slobodnih kisikovih radikala (ROS) (125). ROS mogu biti nusproizvodi oštećene aktivacije spomenutih enzima zajedno s aktivacijom NAD(P)H oksidaze, dok ROS može djelovati na COX enzime na način da mijenjaju svoj smjer u proizvodnji metabolita prema vazokonstriktorima. Dodatno, ROS može djelovati tako da smanjuje biodostupnost NO-a (125).

Ovo je prvo istraživanje koje izravno procjenjuje endotelnu produkciju superoksida i ekspresiju antioksidativnih enzima u različitim HBO₂ protokolima i povezuje ih uz vaskularnu reaktivnost. Prethodne studije o hiperbaričnoj terapiji pokazale su povećani oksidacijski stres nakon dugotrajne izloženosti (3, 99 - 101). Razlika u odnosu na naša prethodna i sadašnja istraživanja, nastaje uglavnom zbog trajanja i načina izlaganja HBO₂, kao i vremenu uzorkovanja tkiva, osim toga, nijedna od spomenutih studija nije ispitala učinak HBO₂ na ekspresiju antioksidativnih enzima (3, 99 - 101).

Prethodno smo predložili hipotezu (9, 12, 126) da se vrijeme između dvije izloženosti može promatrati kao psudohipoksija koja je važna za povećanje izražaja antioksidativnih enzima (kao što je prikazano u tablicama 5.5.1. i 5.5.2.) kao i ostalih enzima važnih za održavanje mehanizama vaskularne relaksacije (9). U ovoj studiji je opažena povećana ekspresija antioksidativnih enzima u 4D-HBO₂ grupi u usporedbi s kontrolnom skupinom i A-HBO₂ skupinom (Tablica 5.5.1. i 5.5.2.). Glavni izvor superoksida u 4D-HBO₂ grupi čini se da je NADPH oksidaza. Međutim, istodobno je opaženo značajno povećanje SOD1 i SOD3 u 4D-HBO₂ grupi te niža endotelna produkcija superoksida promatrana u izravnim fluorescencijskim mjerenjima, govoreći u prilog inetrmitentnom tretmanu HBO₂ kao korisnom u povećanju vaskularnih antioksidacijskih mehanizama. Slično tome, neke prethodne studije pokazale su da kada se HBO₂ primjenjuje više od jednom, aktiviraju se adaptivni mehanizmi koji štiti od daljnjeg oksidativnog oštećenja (127, 128). Iz toga proizlazi da se HBO₂ prekondicioniranje može koristiti u svrhu preventivnog sprečavanja naknadnih oksidativnih ozljeda (129, 130). Ovi adaptivni i prekondicijski odgovori koje pokreću HBO₂ tretmani mogli bi biti odgovorni i za promjene u temeljnim mehanizmima vaskularne reaktivnosti u ovoj i prethodnim studijama (11-13, 131). Budući da je HBO₂ po život važna terapija u određenim stanjima, a njena učinkovitost općenito ovisi o ponovljenim izlaganjima kroz nekoliko dana (132), osobito je važno definirati njegove molekularne interakcije kada se opetovano primjenjuje. Sadašnji rezultati upućuju na to da ponavljana izloženost HBO₂ dovodi do učinkovitijeg uklanjanja ROS-a i povećane proizvodnje NO-a. Daljnje studije koncentrirane na transkripcijske čimbenike i njihove ciljane gene za koje se zna da se pokreću i aktiviraju s HBO₂ mogu pomoći u razjašnjavanju točnih putova i molekularnih interakcija koje se javljaju tijekom ili nakon ponovljenih HBO₂ izlaganja (133). Poznato je da slobodni radikali izvedeni iz kisika mogu inaktivirati formiranje NO-a (45, 134), stoga, učinak akutnog izlaganja HBO₂ na ACh induciranu relaksaciju, za koji je utvrđeno da je reverzibilan, odgovara studiji Ay-a i suradnika, koji su pokazali da je oksidativni učinak HBO₂ prisutan samo 1 h (123).

Nakon primjene SNP-a (koji je izravni donator NO-a) na aortne prstenove nije bilo statistički značajne razlike među grupama (Slika 5.4.2.). Sve su žile imale očekivani vazodilatacijski odgovor. Ovakav rezultat ukazuje na to da je u ovom eksperimentalnom modelu hiperbarična terapija ne dovodi do strukturnih promjena u stjenci torakalne aorte.

Vazodilatacijski odgovor na hipoksiju odvija se putem otpuštanja različitih vazoaktivnih faktora iz endotelnih stanica, kao što su prostaglandini i NO (135). Najvećim dijelom vazodilatacijski odgovor na hipoksiju ide putem aktivacije COX-a i posljedične

proizvodnje prostaciklina (PGI_2) koji potom aktivira K_{ATP} kanale (136). Fredricks i suradnici (136) pokazali su da NO ne igra ulogu u hipoksičnim uvjetima, jer je žila reagirala vazodilatacijom nakon inhibicije NO-a putem L-NAME-a. NO ne igra ulogu u vazodilataciji pri hipoksičnim uvjetima zbog toga što nema dovoljnog stvaranja NO-a, jer je za enzimatsku reakciju potreban kisik (136). Frisbee i suradnici (137) su dokazali da u hipoksičnoj vazodilataciji dolazi do aktivacije citokrom P450 enzimatskog puta i da hipoksični vazodilatacijski odgovor nije isključivo ovisan o COX-u, odnosno o produkciji prostaciklina. U njihovom pokusu uklonjen je endotel na otporničkoj arteriji skeletnog mišića i vidjeli su da je vazodilatacijski odgovor na hipoksiju znatno smanjen te su zaključili da su prostaciklin, NO i / ili EET ključni za vazodilataciju u hipoksiji. Također su tretirali arterije s očuvanim endotelom s 17-ODYA (neselektivni inhibitor CYP450, inhibira stvaranje EETs-a i 20-HETE) te su te žile imale smanjen vazodilatacijski odgovor na hipoksiju što ukazuje na to da i CYP450 ima ulogu u hipoksiji, a ne samo COX. Pokazali su i da CYP450 epoksigenaza ne igra važnu ulogu u vazodilataciji otporničke žile skeletnog mišića, jer nije došlo do blokade vazodilatacije nakon izlaganja MS-PPOH-u (selektivni inhibitor epoksigenaze). Međutim, neki su autori pokazali da krvne žile u kojima postoji EDHF odgovor (koronarne, cerebralne i plućne) imaju očuvani EDHF odgovor u uvjetima teške hipoksije za koji je dijelom odgovorna i CYP450 epoksigenaza (138).

U ovom istraživanju kontrolna je grupa imala očekivani vazodilatacijski odgovor na hipoksiju te očekivani poremećen vazodilatacijski odgovor u akutnoj grupi (Slika 5.4.4.1.). Dokazano je da 24h nakon HBO_2 i nakon intermitentnog izlaganja dolazi do povećanog vazodilatacijskog odgovora na hipoksiju što ukazuje na to da je HBO_2 dovela do promjene u aktivaciji i/ili izražaju COX-a i/ili CYP450 enzima. Vazodilatacijski odgovor kontrolnih aorti je u potpunosti posredovan aktivacijom COX-a i stvaranjem PGI_2 , jer je vazodilatacija bila gotovo u potpunosti blokirana nakon izlaganja žila indometacinu. MS-PPOH je smanjio vazodilataciju na pola vrijednosti od kontrole što pokazuje da manju ulogu u vazodilataciji pri hipoksiji igra CYP450 epoksigenaza i stvaranje EETs-a (Slika 5.4.4.2.). Nakon izlaganja HBO_2 -u dolazi do nepotpune inhibicije vazodilatacije nakon primjene indometacina te je došlo do još veće inhibicije vazodilatacije nakon primjene MS-PPOH-a što pokazuje da je HBO_2 potaknula veće stvaranje EETs-a (Slika 5.4.4.4; 5.4.4.5.). U akutnoj grupi došlo je do poremećenog odgovora na hipoksiju, jer je bazično poremećeno stvaranje vazokonstriktora i vazodilatatora (povećano stvaranje 20-HETE i smanjeno stvaranje PGI_2). Nakon izlaganja aortnih prstenova kombinaciji inhibitora dolazi do jačeg blokiranja vazodilatacije u grupi INDO + MS-PPOH u donosu na druge kombinacije u HBO_2 tretiranim grupama što ukazuje

na to da je vazodilatacijski mehanizam preusmjeren na stvaranje EETs-a što dokazuju i rezultati izražaja CYP2c11 i na genskoj i na proteinskoj razini. Poznato je da su različiti metaboliti arahidonske kiseline (prostaglandini, EETs, HETEs te NO) iznimno važni u posredovanju vaskularnih reakcija na vazodilatatore i vazokonstriktore uključujući podražaje hipoksijom i hiperoksijom (139, 140).

6.2. Uloga HBO₂ i HIF-1 α na mehanizme relaksacije

U stanjima promjene parcijalnog tlaka kisika može doći do promjena u sintezi metabolita arahidonske kiseline (smanjenje tkivnog pO₂ inhibira sintezu metabolita arahidonske kiseline) (141, 142), nameće se pitanje imaju li ovi metaboliti važnu ulogu u promjenama induciranim hiperbaričnom oksigenacijom i kakvu ulogu u tome ima HIF-1 α (143) s obzirom da postoje oprečni rezultati o ekspresiji HIF-1 α u stanjima promjene parcijalnog tlaka kisika djelovanjem hiperbarične oksigenacije (144 - 147). Zhang i sur. su pokazali da je HIF-1 α povezan s regulacijom vaskularne reaktivnosti utječući na izražaj *eNOS*, *iNOS*, *HO-1*, *COX-2* te produkciju NO, CO i prostaglandina (143). Specifični metaboliti arahidonske kiseline nazvani epoksieikozatrienoične kiseline (engl. *epoxyeicosatrienoic acids* (EETs)) uzrokuju vaskularnu relaksaciju i pojačavaju ulazak kalijevih iona u glatke mišićne stanice. Poznato je da je sinteza ovih kiselina (a također i 20-hidroksieikozatetraenoičnih kiselina) smanjena pri nižim vrijednostima pO₂ (142). Dobro je poznato da su izražaj i aktivacija HIF- α podjedinica čvrsto regulirani i njihova degradacija putem ubikvitinskog proteasoma obično se javlja u hiperoksičnim uvjetima (148, 149). Međutim, neovisno prevladavaju li hipoksični ili normoksični uvjeti, slobodni radikali su potrebni za izražaj HIF- α (149, 150). HBO₂ povećava razine HIF-1 i -2 u matičnim i progenitorskim stanicama zbog povećanja ROS-a. Jedna od posljedica stresa uzrokovanih ROS-om je povećana proizvodnja antioksidativnog tioredoksina i jednog od njegovih regulatornih enzima, tioredoksin reduktaze (151). Sve je veći broj ciljnih gena čiji su izražaj i aktivacija povezani uz HIF-1 α uključujući gene čiji su proteinski produkti uključeni u angiogenezu, energetske metabolizam, eritropoezu, proliferaciju i vijabilnost stanica te vazomotorni odgovor (149).

S obzirom da se stanice i organi trebaju prilagoditi promjenama opskrbe kisikom, ne bi bilo iznenađujuće otkriti da je značajan niz HIF-1 ciljnih gena reguliran na način specifičan za tkivo. Do danas, postoji više od 100 HIF-1 nizvodnih gena identificiranih s različitim funkcijama. HIF-1 aktivira ekspresiju gena vezanjem na 50-bazni par CIS-djelujućeg HRE

koji se nalaze u njihovim područjima pojačivača i promotora (110). Štoviše, korištenjem DNA microarray-a, nedavno je objavljeno da više od 2% svih ljudskih gena regulira HIF-1 u arterijskim endotelnim stanicama, izravno ili neizravno (152).

Za razliku od inhibicije aktivacije HIF-1 u terapiji raka, promicanje njegove aktivacije moglo bi biti korisno kod ishemijskih bolesti (153, 154). Ishemične bolesti kao što su moždani udar i srčani udar uzrokuje lokalizirana hipoksija koja se manifestira kao cerebralna i miokardijalna ishemija. Povećanje izražaja VEGF-a, HIF-1 α ili HIF-2 α moglo bi izazvati stvaranje novih krvnih žila ciljnog područja u mozgu i srcu, čime bi se omogućio povećani protok krvi i kisik i smanjio štetni odziv na ishemiju (155). Transgenični miševi koji prekomjerno izražavaju HIF-1 α u epidermisu pokazali su povećan izražaj VEGF i značajnu indukciju hipervaskularnosti bez indukcije edema, upale ili vaskularnog propuštanja (154). Pokazano je da peptid PR39 izveden iz makrofaga stabilizira HIF-1 α smanjujući njegovu degradaciju, što rezultira ubrzanim stvaranjem vaskularnih struktura in vitro kod miševa (156). Izravna indukcija HIF-1 postiže se primjenom N- ili C-terminala ODDD polipeptida koji blokiraju degradaciju posredovanu VHL (157).

Rezultati ove disertacije, funkcionalni na aortnim prstenovima te izražaj gena i proteina potkrepljuju našu prijašnju pretpostavku o pojavi pseudohipoksičnih uvjeta u pauzama između dva izlaganja. Iako je izražaj gena za *COX-1* i *-2* snižen u 24H-HBO₂ i 4D-HBO₂ grupama, proteinski izražaj COX-2 (Slika 5.6.1.B)) je povećan što je u skladu s rezultatima Kaidi-a i suradnika koji su dokazali da je up-regulacija COX-2 transkripcijska i povezana je s induciranjem pomoću HIF-1 α . Zbog razlike u izražaju COX enzima na genskoj i proteinskoj razini trebalo bi napraviti mjerenje aktivnosti enzima te izmjeriti produkciju metabolita za donošenje konkretnih zaključaka. Također rezultati ukazuju na povezanost HBO₂, hipoksije, HIF-1 α i povećane produkcije EETs-a. Takvi rezultati su u skladu s studijom Chen-a i Goldstein-a (159) koji predlažu mehanizam pozitivne povratne sprege kojom se može objasniti indukcija i aktivacija CYP2C tijekom hipoksije, iako ostaje nejasno kako EETs povećavaju izražaj HIF-1 α proteina i kako fosforilirani AMPK aktivira transkripciju CYP2C gena. Suzuki sa suradnicima je pokazao da se izražaj mRNA HIF-1 α ne povećava pomoću EETs (160), oni zaključuju da opaženo povećanje u izražaju HIF-1 α proteina putem EETs-a pod hipoksijom nije zbog povećane transkripcije već da EETs-i stabiliziraju HIF-1 α aktiviranjem PI3K / Akt puta kako bi se inducirao izražaj VEGF-a. Imajući to na umu, rezultati ove disertacije mogli bi uputiti na to da poboljšana relaksacija u hipoksičnim uvjetima 24h nakon HBO₂ (nakon jednog i 4 dana), gdje funkcionalni rezultati pokazuju uključenost EETs-a u samu relaksaciju, može slijediti sličnu logiku. To bi značilo

da HBO₂ izaziva oksidativni stres koji posljedično aktivira HIF-1 α , ali i CYP2C11 nakon čega dolazi do povećane sinteze EETs-a koji stabiliziraju HIF-1 α i koji dalje aktivira COX-2 na veću produkciju prostaciklina i poboljšanu relaksaciju. Brojna su još neodgovorena pitanja vezana uz mehanizam djelovanja HBO₂, a ograničavajući čimbenik ove disertacije je taj što nismo bili u mogućnosti direktno izmjeriti produkciju NO-a u tkivu, odnosno endotelu aorti zbog nepostojanja odgovarajućeg mikroskopa kojim bi se mogli razlučiti slojevi aortnih stjenki i zbog nespecifičnog vezanja boje upotrijebljene za bojanje NO-a. Također, nismo bili u mogućnosti izmjeriti ni direktnu produkciju EETs-a.

Za budućnost je ključno bolje poznavanje mehanizama djelovanja HBO₂, posebno učinke u vaskulaturi u svrhu učinkovitijeg kliničkog korištenja. Ova disertacija predstavlja dobar temelj za buduća istraživanja. U svrhu daljnjeg razlučivanja utjecaja HBO₂, uz izražaj nekih drugih transkripcijskih faktora koji bi mogli biti uključeni u mehanizme dilatacije trebalo bi izmjeriti aktivnost ciljanih enzima (prvenstveno COX-a i CYP450 epoksigenaze) kao i koncentracije njihovih metabolita.

7. ZAKLJUČCI

1) Rezultati ove disertacije pokazali su oštećenu vazorelaksaciju ovisnu o endotelu u akutnom HBO₂ koja je prolazna i reverzibilna, a izazvali su je povećana endotelna produkcija superoksida i sveukupno povećani oksidativni stres. S druge strane, ponavljana izloženost HBO₂ pokazala je blagotvoran učinak na vaskularnu relaksaciju povećanjem enzimatskog antioksidativnog kapaciteta.

2) Rezultati ove disertacije upućuju na to da HBO₂ utječe na promjenu mehanizma relaksacije aortnih prstenova i kod zdravih životinja najvjerojatnije aktiviranjem CYP450 epoksigenaznog puta metaboliziranja AA i povećanjem stvaranja i osjetljivosti na EETs.

3) HBO₂ povećava izražaj HIF-1 α koji stimulira izražaj COX puta i stvaranje prostaciklina te na taj način posreduje poboljšanu relaksaciju u intermitentnom izlaganju HBO₂.

8. SAŽETAK

Cilj: Cilj ove doktorske disertacije bio je utvrditi kako hiperbarična terapija (HBO_2) utječe na vaskularnu reaktivnost provodnih krvnih žila u zdravih štakora ovisno o dužini izlaganja hiperbaričnom kisiku.

Uvod: Hiperbarična oksigenacija (HBO_2) koristi se kao dodatna terapija u stanjima gdje je smanjena isporuka kisika u tkiva. Poznato je da promjene u $p\text{O}_2$ mogu utjecati na sintezu metabolita arahidonske kiseline i time utjecati na vaskularnu reaktivnost u zdravlju i bolesti, uključivanjem proizvodnje CYP450 metabolita. Općenito, kod zdravih životinja relaksacijski odgovor na hipoksiju je posredovan prostaciklinom (PGI_2), dok je relaksacija kao odgovor na acetilkolin (ACh) uglavnom posredovan NO putom. Podatci o tome kako je HIF-1 α uključen u mehanizam relaksacije vrlo su rijetki, nedostatni i oprečni.

Materijali i metode: Zdravi Sprague-Dawley štakori od 9-12 tjedana podijeljeni su u četiri eksperimentalne skupine (1. kontrola, 2. grupa akutno izložena HBO_2 (A- HBO_2), 3. Grupa analizirana 24 sata nakon akutne izloženosti (24H- HBO_2); i 4. grupa koja je izlagana HBO_2 kroz četiri uzastopna dana (intermitentna, 4D- HBO_2). Reakcija na ACh i smanjeni $p\text{O}_2$ ispitivana je u noradrenalinom prekontrahiranim aortalnim prstenima u odsutnosti ili u prisustvu L-NAME-a, INDO, MS-PPOH, hvatača superoksida TEMPOL-a i LW6 HIF-inhibitora u tkivnoj kupelji. Indikatori oksidacijskog stresa mjereni su metodama TBARS i FRAP i izravnim mjerenjem proizvodnje endotelnog superoksida. Određen je izražaj antioksidativnih gena i gena ciljanih enzima pomoću RT PCR i proteina pomoću Western blota.

Rezultati: U A- HBO_2 skupini, HBO_2 dovodi do značajno smanjene vazorelaksacije na ACh i hipoksiju, koju TEMPOL in vitro obnavlja na razine slične kontrolnoj skupini. ACh inducirana vazorelaksacija posredovana je uglavnom s NO, uz doprinos metabolita CYP450 u HBO_2 skupinama. Hipoksična relaksacija je djelomično blokirana s oba inhibitora, INDO ili MS-PPOH, dok L-NAME nije imao utjecaja na relaksaciju u hipoksičnim uvjetima. HIF-inhibitor na funkcionalnoj razini smanjuje relaksaciju u 24H- HBO_2 skupini. TBARS i produkcija endotelnog superoksida povećani su u A- HBO_2 grupi u usporedbi s drugim testiranim skupinama.

Zaključak: Akutno izlaganje HBO₂ uzrokuje prolaznu i reverzibilnu poremećenu relaksaciju aortnih prstenova, koja je najvjerojatnije izazvana povećanom endotelnom produkcijom superoksida i sveukupno povećanim oksidativnim stresom. Intermitentno izlaganje uzrokuje poboljšanu relaksaciju najvjerojatnije aktiviranjem CYP450 epoksigenaznog puta metaboliziranja arahidonske kiseline i povećanjem stvaranja i osjetljivosti na EETs.

Ključne riječi: acetilkolin, hipoksija, hiperbarična oksigenacija, aortni prstenovi, štakor, HIF-1 α

9. SUMMARY

Influence of acute and intermittent hyperbaric oxygenation on the reactivity of the blood vessels in healthy Sprague-Dawley rats

Aim: The aim of this study was to determine the mechanisms of vasorelaxation in aortic rings in response to ACh and/or reduced pO₂ and the role of oxidative stress and HIF-1 α in acute and intermittent HBO₂ protocols compared to untreated animals.

Introduction: Hyperbaric oxygenation (HBO₂) is used as adjuvant therapy in condition where tissue oxygen delivery is impaired. It is known that changes in pO₂ may affect the synthesis of metabolites of arachidonic acid and thus vascular reactivity in health and disease, by involving CYP450 metabolites production. Generally, in healthy animals, vasorelaxation in response to hypoxia is mediated by prostacyclin (PGI₂), while vasorelaxation in response to acetylcholine (ACh) is mainly mediated by NO pathway. Data on how is HIF-1 α involved in relaxation mechanism are very scarce, inadequate and contradictory.

Methods: Healthy Sprague-Dawley 9-12 weeks old rats were divided in four experimental groups (1. healthy control; 2. acute HBO₂ group exposed to HBO₂ (A-HBO₂); 3. 24 hour after acute exposure (24H-HBO₂); and 4. four subsequent days of HBO₂ exposure (intermittent, 4D-HBO₂). Reactivity to ACh and reduced pO₂ was tested in norepinephrine-precontracted aortic rings in the absence or in the presence of L-NAME, INDO, MS-PPOH, superoxide scavenger TEMPOL and LW6 HIF-1 α inhibitor in tissue bath. The indicators of oxidative stress were measured by TBARS and FRAP methods and by direct measurement of endothelial superoxide production. Expression of antioxidative genes and enzyme-targeted genes was performed using RT PCR and proteins expression measurement was done by the Western blot.

Results: In A-HBO₂ group, HBO₂ leads to impaired vasorelaxation response to both ACh and hypoxia, restored by TEMPOL *in vitro* to levels similar to control group vasorelaxation. ACh-induced vasorelaxation was mediated mainly by NO, with the contribution of CYP450 vasodilator metabolites in HBO₂ groups respectively. Relaxation in response to reduced pO₂ was partially blocked by both, INDO or MS-PPOH and not affected by L-NAME in all groups. HIF-inhibitor on functional level affected only relaxation in 24H-HBO₂ group.

TBARS and endothelial superoxide production were increased in A-HBO₂ group compared to other tested groups.

Conclusion: Acute exposure to HBO₂ causes transient and reversible impaired relaxation of aortic rings, which is most likely caused by increased endothelial production of superoxide and overall increased oxidative stress. Intermittent exposure causes improved relaxation most likely by the activation of the CYP450 epoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism and by increasing the generation and sensitivity to EETs.

Key words: acetylcholine, hypoxia, hyperbaric oxigenation, aortic rings, rats, HIF-1 α

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. *Journal of applied physiology*. 2009;106(3):988-95.
3. Simsek K, Ay H, Topal T, Ozler M, Uysal B, Ucar E, Acikel CH, Yesilyurt O, Korkmaz A, Oter S, Yildiz S: Long-term exposure to repetitive hyperbaric oxygen results in cumulative oxidative stress in rat lung tissue. *Inhal Toxicol*, 23(3):166–172, 2011.
4. Hink J, Thom SR, Simonsen U, Rubin I, Jansen E. Vascular reactivity and endothelial NOS activity in rat thoracic aorta during and after hyperbaric oxygen exposure. *Am J PhysiolHeartCircPhysiol*. 2006 Oct;291(4):H1988-98. Epub 2006 Apr 28.
5. Thom SR, Bhopale V, Fisher D, Manevich Y, Huang PL, Buerk DG: Stimulation of nitric oxide synthase in cerebral cortex due to elevated partial pressures of oxygen: an oxidative stress response. *J Neurobiol*, 51:85–100, 2002.
6. Rossignol DA, Rossignol LW, James SJ, Melnyk S, Mumper E: The effects of hyperbaric oxygen therapy on oxidative stress, inflammation, and symptoms in children with autism: an open-label pilot study. *BMC Pediatrics*, 7:36, 2007.
7. Li-Fan C, Yu-Feng T, Cheng-Hsien L, Lian-Yu H, Ko-Chi N, Mao-Tsun L: Repetitive hyperbaric oxygen therapy provides better effects on brain inflammation and oxidative damage in rats with focal cerebral ischemia. *J Formos Med Assoc*, 113: 620-628, 2014.
8. Oter S, Korkmaz A, Topal T, Ozcan O, Sadir S, Ozler M, Ogur R, Bilgic H. Correlation between hyperbaric oxygen exposure pressures and oxidative parameters in rat lung, brain and erythrocytes. *Clin Biochem*. 2005;38:706-711.
9. Drenjancevic I, Kibel A, Kibel D, Seric V, Cosic A: Blood pressure, acid-base and blood gas status and indicators of oxidative stress in healthy male rats exposed to acute hyperbaric oxygenation. *Undersea Hyperb Med*, 40 (4): 319-328, 2013.
10. Drenjancevic I, Kibel A: Restoring vascular function with hyperbaric oxygen treatment: recovery mechanisms. *J Vasc Res*, 51(1):1-13, 2014.
11. Kibel A, Novak S, Cosic A, Mihaljevic Z, Falck JR, Drenjancevic I. Hyperbaric oxygenation modulates vascular reactivity to angiotensin-(1-7) in diabetic rats: potential role of epoxyeicosatrienoic acids. *Diab Vasc Dis Res*. 2015 Jan;12(1):33-45.

12. Unfirer S, Mihalj M, Novak S, Kibel A, Cavka A, Mihaljevic Z, Gros M, Brizic I, Budimir D, Cosic A, Boban M, Drenjancevic I. Hyperbaric oxygenation affects the mechanisms of acetylcholine-induced relaxation in diabetic rats. *UHM* 2016, Vol. 43, No. 6.
13. 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)*, 39 (6):1053-1066, 2012.
14. Hu Q, Manaenko A, Bian H, Guo Z, Huang JL, Guo ZN, Yang P, Tang J, Zhang JH. Hyperbaric Oxygen Reduces Infarction Volume and Hemorrhagic Transformation Through ATP/NAD⁺/Sirt1 Pathway in Hyperglycemic Middle Cerebral Artery Occlusion Rats. *Stroke*. 2017 May 11. pii: STROKEAHA.116.015753.
15. 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 Research*. 2002; 926:165–171.
16. 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 Apr;158(6):732-4. doi: 10.1007/s10517-015-2849-1. Epub 2015 Apr 23.
17. Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in wound healing- more than a nutrient. *World J Surg*. 2004; 28:294-300.
18. 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.
19. Takac I, Kvolik S, Divkovic D, Kalajdzic-Candrljic J, Puseljic S, Izakovic S: Conservative surgical management of necrotic tissues following meningococcal sepsis: case report of a child treated with hyperbaric oxygen. *Undersea Hyperb Med*, 37(2):95-9, 2010.
20. Korhonen K, Klossner J, Hirn M, Niinikoski J: Management of clostridial gas gangrene and the role of hyperbaric oxygen. *Ann Chir Gynaecol*, 88(2):139-42, 1999.
21. Zhang LD, Ma L, Zhang L, Dai JG, Chang LG, Huang PL, Tian XQ: 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 (Engl)*, 128(22):3088-3093, 2015.

22. 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*, 600:220-225, 2015.
23. 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*, 41(11):3032-3041, 2016.
24. 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*, 47(1):24-32, 2017.
25. Godman CA, Joshi R, Giardina C, Perdrizet G, Hightower LE: Hyperbaric oxygen treatment induces antioxidant gene expression. *Ann N Y Acad Sci*, 1197:178–183, 2010.
26. Katusic ZS. Vascular endothelial dysfunction: Does tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol*. 2001; 281:H981-H986.
27. 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.
28. Zenere BM, Arcaro G, Saggiani F, Rossi L, Muggeo M, Lechi A. Noninvasive detection of functional alterations of the arterial wall in IDDM patients with and without microalbuminuria. *Diabetes Care*. 1995; 18:975-982.
29. Gazis A, White DJ, Page SR, Cockcroft JR. Effect of oral vitamin E (alphatocopherol) supplementation on vascular endothelial function in type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 1999; 16:304-311.
30. Bagi Z, Koller A. Lack of nitric oxide mediation of flow-dependent arteriolar dilation in type i diabetes is restored by sepiapterin. *J Vasc Res*. 2003; 40:47–57.
31. Drenjancevic-Peric I, Phillips SA, Falck JR, Lombard JH. Restoration of normal vascular relaxation mechanisms in cerebral arteries by chromosomal substitution in consomicSS.13BN rats. *Am J Physiol*. 2005; 289(1):H188-95.
32. Junqueira LC, Carneiro J. *Osnove histologije. Udžbenik i atlas. Prema desetom američkom izdanju. 11. poglavlje Žilni sustav.* ŠK, Zagreb, 2005.
33. Thomas M, Feron O. Nitric oxide synthases. Which, where, how and why? *J Clin Invest*. 1997;100(9):2146-2152.

34. Brayden JE, Large WA. Electrophysiological analysis of neurogenic vasodilatation in the isolated lingual artery of the rabbit. *Br J Pharmacol.* 1986;89(1):163-71.
35. Newcomer SC, Taylor JC, Bowles DK, Laughlin MH Endothelium-dependent and -independent relaxation in the forelimb and hindlimb vasculatures of swine. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007;148(2):292-300.
36. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Review article. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001; 357: 593-615.
37. Armitage ME, Wingler K, Schmidt HHHW, La M. Translating the oxidative stress hypothesis into the clinic: NOX versus NOS. *J Mol Med.* 2009; 87:1071-1076.
38. Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.*1993; 28: 97-9.
39. Lincoln TM, Komalavilas P, Cornwell TL. Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Hypertension.* 1994; 23(6 Pt 2):1141-7.
40. Sun D, Messina EJ, Koller A, Wolin MS, Kaley G. Endothelium-dependent dilation to L-arginine in isolated rat skeletal muscle arterioles. *Am J Physiol.* 1992; 262:H1211-H1216.
41. Lacza Z, Puskar M, Kis B, Perciaccante JV, Miller AW, Busija DW. Hydrogen peroxide acts as an EDHF in the piglet pial vasculature in response to bradykinin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283:H406-H411.
42. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 1986;320: 454-456.
43. Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun.* 1993;18: 195-199.
44. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 1986; 250: H822- H827.
45. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. *Circulation Research .* 2000;87: 840-844.
46. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: Regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 287: R1014-R1030.
47. Drenjančević, Ines; Jukić, Ivana; Mihaljević, Zrinka; Ćosić, Anita; Kibel, Aleksandar. The Metabolites of Arachidonic Acid in Microvascular Function // *Microcirculation*

- Revisited - From Molecules to Clinical Practice / Helena Lenasi (ur.). Rijeka : IN TECH d.o.o, 2016.. Str. 101-133.
48. Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2002; 23:374-380.
 49. Campbell WB, Harder DR. prologue: EDHF-what is it? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 280:H2413-H2416.
 50. Garland CJ, Planc F, Kemp BK, Cocks TM. Endothelium-dependent hyperpolarization: A role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci*. 1995; 16:23-30.
 51. Campbell WB, Harder DR. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of tone. *Circ Res*. 1999;84:484-488.
 52. Pieper GM, Langenstroer P, Siebeneich W. Diabetic-induced endothelial dysfunction in rat aorta: role of hydroxyl radicals. *Cardiovascular Research*. 1997; 34:145-156.
 53. Crimi E, Ignarro LJ, Napoli C. Microcirculation and oxidative stress. *Free Radical Research*. 2007; 41(12):1364-1375.
 54. Gürdöl F, Cimsit M, Öner-İyidoğan Y, Körpınar Ş, Yalçınkaya S, Koçak H. Early and late effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress parameters in diabetic patients. *Physiol Res*. 2008; 57:41-47.
 55. Dennog C, Radermacher P, Barnett YA, Speit G: Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat Res*, 428: 83-89, 1999.
 56. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 1973;179:588–590.
 57. Flohe L, Gunzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett*. 1973;32:132–134.
 58. Dringen R, Hamprecht B. Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Res*. 1997;759:67–75.
 59. Packer L, Ed. *Methods in Enzymology*. 2002; Volume 349. San Diego, Calif: Academic Press.
 60. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cerebral Blood Flow Metabol*. 2001; 21: 2–14.

61. Guo Z, Van Remmen H, Yang H, Chen X, Mele J, Vijg J i sur. Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 1131–1138.
62. Didion SP, Ryan MJ, Didion LA, Fegan PE, Sigmund CD, Faraci FM. Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ Res.*2002; 91: 938–944.
63. Fukai T, Galis ZS, Meng XP, Parthasarathy S, Harrison DG. Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1998; 101: 2101–2111.
64. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest.* 2000; 105: 1631–1639.
65. Veerareddy S, Cooke CL, Baker PN, Davidge ST. Gender differences in myogenic tone in the superoxide dismutase knockout mouse: an animal model of oxidative stress. *Am J Physiol. Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(1):H40-5.
66. Cooke CL, Davidge ST. Endothelial-dependent vasodilation is reduced in mesenteric arteries from superoxide dismutase knockout mice. *Cardiovasc Res.* 2003; 60: 635–642.
67. Baumbach GL, Didion SP, Faraci FM. Deficiency of copper-zinc superoxide dismutase promotes cerebral vascular hypertrophy. *FASEB J.* 2003; 17: A63–A64.
68. MacMillan-Crow LA, Cruthirds DL. Manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radical Res.* 2001; 34: 325–336.
69. Suzuki K, Tatsumi H, Satoh S, Senda T, Nakata T, Fujii J, Taniguchi N. Manganese-superoxide dismutase in endothelial cells: localization and mechanism of induction. *Am J Physiol.* 1993; 265: H1173–H1178.
70. Visner GA, Chesrown SE, Monnier J, Ryan US, Nick HS. Regulation of manganese superoxide dismutase: IL-1 and TNF induction in pulmonary artery and microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;188: 453–462.
71. Ruetzler CA, Furuya K, Takeda H, Hallenbeck JM. Brain vessels normally undergo cyclic activation and inactivation: Evidence from tumor necrosis factor- α , heme oxygenase-1, and manganese superoxide dismutase immunostaining of vessels and perivascular brain cells. *J Cerebral Blood Flow Metabol.* 2001; 21: 244–252.

72. Brandes RP, Koddenberg G, Gwinner W, Kim D, Kruse HJ, Busse R and Mügge A. 1999. Role of increased production of superoxide anions by NAD(P)H oxidase and xanthine oxidase in prolonged endotoxemia. *Hypertension*. 33:1243–1249
73. 't Hoen PAC, Van der Lans CAC, Van Eck M, Bijsterbosch MK, Van Berkel TJC, Twisk J. Aorta of apoE-deficient mice responds to atherogenic stimuli by a prelesional increase and subsequent decrease in the expression of antioxidant enzymes. *Circulation Res*. 2003; 93: 262–269.
74. Villeneuve N, Fortuno A, Sauvage M, Fournier N, Breugnot C, Jacquemin C i sur. Persistence of the nitric oxide pathway in the aorta of hypercholesterolemic apolipoprotein-E-deficient mice. *J Vasc Res*. 2003; 40: 87–96.
75. Ballinger SW, Patterson C, Knight-Lozano CA, Burow DL, Conklin CA, Hu Z i sur. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation*. 2002; 106: 544–549.
76. Zanetti M, Sato J, Katusic ZS, O'Brien T. Gene transfer of superoxide dismutase isoforms reverses endothelial dysfunction in diabetic rabbit aorta. *Am J Physiol*. 2001; 280: H2516–H2523.
77. Zanetti M, Sato J, Jost CJ, Gloviczki P, Katusic ZS, O'Brien T. Gene transfer of manganese superoxide dismutase reverses vascular dysfunction in the absence but not in the presence of atherosclerotic plaque. *Human Gene Therapy*. 2001; 12: 1407–1416.
78. Li L, Fink GD, Watts SW, Northcott CA, Galligan JJ, Pagano PJ, Chen AF. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation*. 2003; 107: 1053–1058.
79. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y i sur. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000; 404: 787–790.
80. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J*. 1984; 222: 649–655.
81. Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest*. 1996; 75: 617–636.
82. Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2002; 55: 239–249.
83. Landmesser U, Merten R, Speikermann S, Buttner K, Drexler H, Hornig B. Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease. Relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation*. 2000; 101: 2264–2270.

84. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Griendling KK, Harrison DG. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res.* 1999; 85: 23–28.66.
85. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CnZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biol Med.* 2002; 33:337–349.
86. Stralin P, Marklund SL. Vasoactive factors and growth factors alter vascular smooth muscle cell EC-SOD expression. *Am J Physiol.* 2001; 281: H1621–H1629.
87. Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Biol Med.* 2003; 35: 236–256.
88. Nonaka H, Tsujino T, Watari Y, Emoto N, Yokoyama M. Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation.* 2001; 104: 1165–1170.
89. Davis ME, Cai H, McCann L, Fukai T, Harrison DG. Role of c-Src in regulation of endothelial nitric oxide synthase expression during exercise training. *Am J Physiol.* 2003; 284: H1449–1453.
90. Deisseroth, A., Dounce, A. L. Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol. Rev.* 1970;50, 319-375.
91. Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman HN: Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood* 1996;87:1569–1599.
92. Mueller S, Riedel HD, Stremmel W: Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂ removing enzyme in human erythrocytes. *Blood.* 1997; 90:4973–4978.
93. Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Bioch.* 2010; 48: 909-930.
94. Go´th L, Vitai M. Hypocatalasemia in hospital patients. *Clin Chem.* 1996; 42:341–342.
95. Go´th L, Eaton J. Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. *Lancet* 2000;356:1820–1821.
96. Go´th L. Lipid and carbohydrate metabolism in acatalasemia. *Clin Chem.* 2000; 46:564– 566.
97. Benzie IF, Strain JJ: The ferric reducing ability of plasma [FRAP] as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem,* 239(1):70-76, 1996.

98. Winston GW, Regoli F, Dugas AJ Jr, Fong JH, Blanchard KA: A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radic Biol Med*, 24(3):480-493, 1998.
99. Benedetti S, Lamorgese A, Piersantelli M, Pagliarani S, Benvenuti F, Canestrari F: Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen. *Clin Biochem*, 37:312–7, 2004.
100. Bader N, Bosy-Westphal A, Koch A, Mueller MJ: Influence of vitamin C and E supplementation on oxidative stress induced by hyperbaric oxygen in healthy men. *Ann Nutr Metab*, 50: 173–176, 2006.
101. Bader N, Bosy-Westphal A, Koch A, Rimbach G, Weimann A, Poulsen HE, Müller MJ: Effect of hyperbaric oxygen and vitamin C and E supplementation on biomarkers of oxidative stress in healthy men. *Br J Nutr*, 98: 826–833, 2007.
102. Luo Z, Chen Y, Chen S, Welch W J., Andresen BT, Jose PA i sur. Comparison of inhibitors of superoxide generation in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 2009;157, 935-943.
103. Soule BP, Hyodo F, Matsumoto K, Simone NL, Cook JA, Krishna MC i sur. The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radic Biol Med*. 2007; 42:1632–1650.
104. Wilcox CS, Pearlman A. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharm Rev*. 2008; 60:418–469.
105. Jagadeesha DK, Miller FJ Jr, Bhalla RC. Inhibition of Apoptotic Signaling and Neointimal Hyperplasia by Tempol and Nitric Oxide Synthase following Vascular Injury. *J Vasc Res*. 2009; 46:109–118.
106. Tong X, Ying J, Pimentel DR, Trucillo M, Adachi T, Cohen RA. High glucose oxidizes SERCA cysteine-674 and prevents inhibition by nitric oxide of smooth muscle cell migration. *J Mol Cell Cardiol*. 2008; 44:361–369.
107. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarkis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5680-5684.
108. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit. *J Biol Chem* 1996; 271: 32253-322.
109. Wenger RH, Gassmann M. Oxygen(es) and the hypoxia – inducible factor-1. *Biol Chem* 1997; 378: 609-616.

110. Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* 1993; 268: 21513-21518.
111. Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M. Intracellular localisation of human HIF-1 α hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* 2003; 116: 1319-1326.
112. Shih SC, Claffey KP. Hypoxia-mediated regulation of gene expression in mammalian cells. *Int J Exp Pathol* 1998; 79: 347-357.
113. Sunkari VG, Lind F, Botusan IR, Kashif A, Liu ZJ, Yla-Herttuala S i suradnici. Hyperbaric oxygen therapy activates hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), which contributes to improved wound healing in diabetic mice. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2015;23(1):98-103.
114. Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *The Yale journal of biology and medicine*. 2007;80(2):51-60.
115. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM i suradnici. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(33):25130-8.
116. Stupin A, Ćosić A, Novak S, Vesel M, Jukić I, Popović B, Karalić K, Lončarić Z, Drenjančević I: Reduced dietary selenium impairs vascular function by increasing oxidative stress in Sprague-Dawley rat aortas. *Int J Environ Res Public Health (Basel, Switzerland)*, 14 (6): 591, 2017.
117. Oakes KD, Van Der Kraak GJ: Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus Commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat Toxicol*, 63:447–463, 2003.
118. Ćosić A, Jukić I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljević Z, Novak S, Vuković R, Drenjančević I. Attenuated flow-induced dilation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet. *J Physiol* 000.0 (2016) pp 1–15.
119. Zhu J, Mori T, Huang T, Lombard JH. Effect of high-salt diet on NO release and superoxide production in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H575–H583, 2004.

120. Collins TJ (July 2007). "ImageJ for microscopy". *BioTechniques*. 43 (1 Suppl): 25–30. doi:10.2144/000112517. PMID 17936939.
121. Girish V, Vijayalakshmi A (2004). "Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ". *Indian J Cancer*. 41 (1): 47. PMID 15105580.
122. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162 (1): 156-159.
123. Ay H, Topal T, Ozler M, Uysal B, Korkmaz A, Oter S, Ogur R, Dünder K: Persistence of hyperbaric oxygen-induced oxidative effects after exposure in rat brain cortex tissue. *Life Sci (Oxford, England)*, 80:2025–2029, 2007.
124. Matsunami T, Sato Y, Sato T, Ariga S, Shimomura T, Yukawa M. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. *Int J Clin Exp Pathol*. 2010;3(2):177-188.
125. Zhu J, Drenjancevic-Peric I, McEwen S, Friesema J, Schulta D, Yu M, Roman RJ, Lombard JH. Role of superoxide and angiotensin II suppression in salt-induced changes in endothelial Ca²⁺ signaling and NO production in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol (Bethesda, Maryland, USA)*, 291(2):H929-38, 2006.
126. Unfirer S, Kibel A, Drenjancevic-Peric I: The effect of hyperbaric oxygen therapy on blood vessel function in diabetes mellitus. *Med Hypotheses (Harlow, England)*, 71 (5): 776 – 780, 2008.
127. Rothfuss A, Dennog C, Speit G: Adaptive protection against the induction of oxidative DNA damage after hyperbaric oxygen treatment. *Carcinogenesis (Oxford, England)*, 19 (11): 1913–1917, 1998.
128. Rothfuss A, Speit G: Investigations on the mechanism of hyperbaric oxygen (HBO)-induced adaptive protection against oxidative stress. *Mut Res (Amsterdam, Netherlands)*, 508 (1-2): 157–165, 2002.
129. Jadhav V, Ostrowski RP, Tong W, Matus B, Jesunathadas R, Zhang JH: Cyclooxygenase-2 mediates hyperbaric oxygen preconditioning-induced neuroprotection in the mouse model of surgical brain injury. *Stroke (Dallas, Texas, USA)*, 40 (9): 3139–3142, 2009.
130. Li Q, Li J, Zhang L, Wang B, Xiong L: Preconditioning with hyperbaric oxygen induces tolerance against oxidative injury via increased expression of heme oxygenase-1 in primary cultured spinal cord neurons. *Life Sci (Oxford, England)*, 80 (12): 1087–1093, 2007.

131. Park Y, Capobianco S, Gao X, Falck JR, Dellsperger KC, Zhang C: Role of EDHF in type 2 diabetes-induced endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (Bethesda, Maryland, USA), 295 (5): H1982-8, 2008.
132. Gesell LB, Ed.: *Hyperbaric Oxygen Therapy Indications. The Hyperbaric Oxygen Therapy Committee Report*, Undersea and Hyperbaric Medical Society, Durham, NC, USA, 12th edition, 2008.
133. Simsek K, Ozler M, Yildirim AO, Sadir S, Demirbas S, Oztosun M, Korkmaz A, Ay H, Oter S, Yildiz S: Evaluation of the Oxidative Effect of Long-Term Repetitive Hyperbaric Oxygen Exposures on Different Brain Regions of Rats. *The Scientific World Journal* (Hindawi Publishing Corporation), 2012.
134. Harrison DG: Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol* (Mahwah, New Jersey, USA), 20:II-11–II-17, 1997.
135. Lombard JH, Liu Y, Fredricks KT, Bizub DM, Roman RJ, Rusch NJ. Electrical and mechanical responses of rat middle cerebral arteries to reduced PO₂ and prostacyclin. *Am J Physiol*. 1999;276(2):H509-16.
136. Fredricks KT, Liu Y, Rusch NJ, Lombard JH. Role of endothelium and arterial K⁺ channels in mediating hypoxic dilation of middle cerebral arteries. *Am J Physiol*. 1994; 267: H580-H586.
137. Frisbee JC, Roman RJ, Krishna UM, Falck JR, Lombard JH. Relative contributions of cyclooxygenase and cytochrome P450 ω -hydroxylase-dependent pathways to hypoxic dilation of skeletal muscle resistance arteries. *J VascRes*. 2001; 38:305-314.
138. Feletou M, Vanhoutte PM. EDHF: the complete story. Chapter 4: EDHF and the physiological control of blood flow. CRC Press. 2006; 133-144.
139. Alkayed NJ, Birks EK, Hudetz AG, Roman RJ, Henderson L, Harder DR. Inhibition of brain P-450 arachidonic acid epoxygenase decreases baseline cerebral blood flow. *Am J Physiol* 1996; 271(4 Pt 2):H1541-6.
140. Xu X, Zhang XA, Wang DW. The roles of CYP450 epoxygenases and metabolites, epoxyeicosatrienoic acids, in cardiovascular and malignant diseases. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011.
141. Kerkhof CJ, Bakker EN, Sipkema P. Role of cytochrome P-450 4A in oxygen sensing and NO production in rat cremaster resistance arteries. *Am J Physiol* 1999; 277(4 Pt 2):H1546-52.
142. Harder DR, Narayanan J, Birks EK, et al. Identification of a putative microvascular oxygen sensor. *Circ Res* 1996; 79, 54–61.

143. Zhang Y, Ming J, Li T, Yang G, Xu J, Chen W, Lin L. Regulatory effects of hypoxia-inducible factor 1 alpha on vascular reactivity and its mechanisms following hemorrhagic shock in rats. *Shock* 2008 Nov.; 30 (5): 557-62.
144. GuG-J, LiY-P, PengZ-Y, XuJ-J, KangZ-M, XuW-G, TaoH-Y, Ostrowski RP, Zhang JH, Sun X-J. Mechanism of ischemic tolerance induced by hyperbaric oxygen preconditioning involves upregulation of hypoxia-inducible factor - 1 α and erythropoietin in rats. *J Appl Physiol* 104: 1185-1191, 2008.
145. Zhou Y, Liu XH, Qu SD, Yang J, Wang ZW, Gao CJ, Su QJ. Hyperbaric oxygen intervention on expression of hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in spinal cord injury models in rats. *Chin Med J (Engl)*. 2013 Oct;126(20):3897-903.
146. Bai X, Sun B, Pan S, Jiang H, Wang F, Krissansen GW, Sun X. Down-regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by hyperbaric oxygen attenuates the severity of acute pancreatitis in rats. *Pancreas*. 2009 Jul;38(5):515-22.
147. Peng Z, Ren P, Kang Z, Du J, Lian Q, Liu Y, Zhang JH, Sun X. Up-regulated HIF-1alpha is involved in the hypoxic tolerance induced by hyperbaric oxygen preconditioning. *Brain Res*. 2008 May 30;1212:71-8. doi: 10.1016/j.brainres.2008.03.027. Epub 2008 Mar 27.
148. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*. 1997 Sep 5; 272(36):22642-7.
149. Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol*. 2001 Apr; 13(2):167-71.
150. Schroedl C, McClintock DS, Budinger GR, Chandel NS. Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1alpha requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Nov; 283(5):L922-31.
151. Milovanova TN, Bhopale VM, Sorokina EM, Moore JS, Hunt TK, Hauer-Jensen M, Velazquez OC, Thom SR. Hyperbaric oxygen stimulates vasculogenic stem cell growth and differentiation in vivo. *J Appl Physiol (1985)*. 2009 Feb; 106(2):711-28.
152. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, and Semenza GL (2005) Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105: 659-669.

153. Vincent KA, Shyu KG, Luo Y, Magner M, Tio RA, Jiang C, Goldberg MA, Akita GY, Gregory RJ, and Isner JM (2000) Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1alpha/VP16 hybrid transcription factor. *Circulation* 102: 2255-2261.
154. Elson DA, Thurston G, Huang LE, Ginzinger DG, McDonald DM, Johnson RS, and Arbeit JM (2001) Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Genes Dev* 15: 2520-2532.
155. Semenza GL (1998) Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8: 588-594.
156. Li J, Post M, Volk R, Gao Y, Li M, Metais C, Sato K, Tsai J, Aird W, Rosenberg RD, et al. (2000) PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med* 6: 49-55.
157. Maranchie JK, Vasselli JR, Riss J, Bonifacino JS, Linehan WM, and Klausner RD (2002) The contribution of VHL substrate binding and HIF1-alpha to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 1: 247-255.
158. Kaidi A, Qualtrough D, Williams AC, Paraskeva C. Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia. *Cancer Res.* 2006 Jul 1;66(13):6683-91.
159. Chen Y and Goldstein JA. The transcriptional regulation of the human CYP2C genes. *Curr Drug Metab.* 2009 July; 10(6): 567–578.
160. Suzuki S, Oguro A, Osada-Oka M, Funae Y, Imaoka S. Epoxyeicosatrienoic acids and/or their metabolites promote hypoxic response of cells. *J Pharmacol Sci.* 2008;108(1):79–88.

11. ŽIVOTOPIS

Zrinka Mihaljević, prof.

Asistent na Katedri za fiziologiju imunologiju

Medicinski fakultet Osijek

Cara Hadrijana 10E

31 000 Osijek

Datum i mjesto rođenja: 18. listopada 1983., Našice

Kućna adresa: M. Krleže 6, 31 500 Našice

Mob: 098/533-261

e-mail: zrinka.mihaljevic@mefos.hr; zrinka.mihaljevich@gmail.com

Matični broj znanstvenika: 324952

OBRAZOVANJE:

2002. – 2008.: Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (profesor biologije i kemije)

2010 – danas: Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Radno iskustvo:

25.11.-08.12.2008.: Osnovna škola Vladimira Nazora, Feričanci (kemija)

28.01.-30.06.2009.: Osnovna škola „Dr.Stjepan Ilijašević“, Oriovac (priroda, biologija i kemija)

01.02.2010. – danas: asistentica na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku

2011. - do danas: vanjska suradnica u naslovnom suradničkom zvanju asistenta na predmetu Fiziologija s patofiziologijom na Studiju fizioterapije Veleučilišta Lavoslava Ružičke u Vukovaru

Tečajevi trajnoga usavršavanja:

Veljača 2010.: Institut Ruđer Bošković u Zagrebu, molekularne metode

22. i 23.03.2010.: Sudjelovanje na radionici iz područja mikrocirkulacije u organizaciji tvrtke Perimed©, Medicinski fakultet Sveučilišta u Szegedu, Mađarska

10. i 11.09.2010.: Poslijediplomski tečaj trajne edukacije: Upalne bolesti debelog crijeva; Medicinski fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku

29.03.2011.: Međunarodni tečaj metaanalize, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

15.4.2011.: Training in Transgenic Research Methodology in Biomedicine and Biotechnology (project CABCOS). Medicinski fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska

Rujan - prosinac 2011. Pečuh, Mađarska – Erasmus program Department of Immunology and biotechnology, School of Medicine Pecs, University Pecs, Hungary – Real Time PCR

7.11.2011. - 9.11.2011.: Applied Biosystems, Biotechnology and real time PCR, Osijek, Hrvatska

10.10.-10.12.2011.: On-line tečaj - WIPO (World Intellectual property Organization), Zaštita prava intelektualnog vlasništva

2014.: Osposobljavanje laboratorijskim životinjama, kategorija C, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

13.-17.06.2016.: Ljetna škola stresa, Medicinski fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku

24.10.2016.: Ministarstvo poljoprivrede, Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane, Zagreb
Radionica: Best practice and alternatives to animal experiments in education and training

Strani jezici:

engleski jezik – aktivno

Stipendije i nagrade:

Erasmus stipendija 2011.

Stipendija Hrvatskog fiziološkog društva za sudjelovanje na Physiology 2016 kongresu u Dublinu, Irska

Stipendija Hrvatskog fiziološkog društva za sudjelovanje HDF 2017, 2. regionalnom kongresu fizioloških društava i 4. kongresu Hrvatskog društva fiziologa, Dubrovnik, Hrvatska.

Aktivnost u znanstvenim projektima:

Travanj 2017. – Istraživač na HRZZ projektu: Interakcija renin-angiotenzinskog i adrenergičkog sustava u aktivaciji endotela uzrokovanj oksidativnim stresom (RAS-AdrenOX, IP-2016-06-8744), voditeljica: Ana Stupin

Znanstveni centar izvrsnosti, Proizvodnja i medicinsko ispitivanje funkcionalne hrane (MedResFF)(istraživač)

Listopad 2015. - Istraživač na HRZZ projektu: Poremećena vazorelaksacija i endotelno-leukocitna interakcija (ELI) u razvoju aterosklerotskih lezija (HRZZ 6380 Drenjančević , V-ELI Athero, IP-09-2014), voditeljica: Ines Drenjančević

Veljača 2012. – studeni 2013. Suradnik na projektu “HEALTH IMPULSE” – Health IMproving poPULation initiative reSEarch - Improving the health of the border population: a joint initiative in immunological research HUHR/1001/2.1.3/0006, IPA Hungary - Croatia cross border project, voditeljica: Ines Drenjančević

Siječanj 2011. - Djelovanje kisika na vaskularnu funkciju u zdravlju i bolesti, broj projekta: 219-2160133-2034, Ministarstvo Znanosti, Obrazovanja i Športa Republike Hrvatske, voditelj projekta: Ines Drenjančević.

Objavljeni radovi

Poglavlja u knjizi

1. Drenjančević, Ines; Jukić, Ivana; Mihaljević, Zrinka; Ćosić, Anita; Kibel, Aleksandar. The Metabolites of Arachidonic Acid in Microvascular Function // Microcirculation Revisited - From Molecules to Clinical Practice / Helena Lenasi (ur.).Rijeka : IN TECH d.o.o, 2016.. Str. 101-133.

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

1. Ćosić, Anita; Jukić, Ivana; Stupin, Ana; Mihalj, Martina; Mihaljević, Zrinka; Novak, Sanja; Vuković, Rosemary; Drenjančević, Ines. Attenuated flow-induced dilation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet. // The Journal of Physiology. 594 (2016) , 17; 4917-4931 (članak, znanstveni).

2. Unfirer, Sanela; Mihalj, Martina; Novak, Sanja; Kibel, Aleksandar; Čavka, Ana; Mihaljević, Zrinka; Gros, Mario; Brizić, Ivica; Budimir, Danijela; Ćosić, Anita; Boban, Mladen; Drenjančević, Ines. Hyperbaric oxygenation affects the mechanisms of acetylcholine-induced relaxation in diabetic rats. // Undersea and hyperbaric medicine. 43 (2016) , 6; 653-669 (članak, znanstveni).

3. Kibel, Aleksandar; Novak, Sanja; Ćosić, Anita; Mihaljević, Zrinka; Falck, John R.; Drenjančević, Ines. Hyperbaric oxygenation modulates vascular reactivity to angiotensin-(1-7) in diabetic rats - potential role of epoxyeicosatrienoic acids. // Diabetes & Vascular Disease Research. 12 (2015) ; 33-45 (članak, znanstveni).

Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. Čavka, Ana; Tadžić, Refmir; Grizelj, Ivana; Unfirer, Sanela; Mihaljević, Zrinka; Mihalj, Martina; Manojlović, Dragan; Drenjančević, Ines. Endotelna funkcija - funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. // Medicinski vjesnik. 44 (2012) ; 135-146 (članak, znanstveni).

Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu

1. Ćosić, Anita; Rašić, Lidija; Jukić, Ivana; Stupin, Ana; Mihaljević, Zrinka; Drenjančević, Ines. Superoxide Scavenging in vivo Increases Endothelial Nitric Oxide Bioavailability in Sprague-Dawley Rats on a High Salt Diet // Journal of Vascular Research 54(Suppl 1). Karger, 2017. 56 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
2. Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Čavka, Ana; Mihaljević, Zrinka; Jukić, Ivana; Mihalj, Martina; Drenjančević, Ines. Role of Tempol on the level of oxidative stress and gene expression in high salt diet fed Sprague-Dawley rats // 25th European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection : abstracts ; u: Journal of hypertension 33 (2015) (S1) ; PP.41.25.2015. e506-e507 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
3. Čavka, Ana; Novak, Sanja; Mihaljević, Zrinka; Grizelj, Ivana; Ćosić, Anita; Lončarić, Zdenko; Popović, Brigita; Drenjančević, Ines. Reduced dietary zinc and selenium levels impairs vascular function via oxidative stress in Sprague-Dawley rats aortas // Acta Physiologica Volume 211, Issue Supplement s697.2014. 51-S4-E6 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
4. Ćosić, Anita; Mihaljević, Zrinka; Kibel, Dijana; Novak, Sanja; Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Mihalj, Martina; Drenjančević, Ines. The effect of hyperbaric therapy on the levels of oxidative stress // Acta Physiologica Volume 211, Issue Supplement s697.2014. 166-P12.3 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
5. Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Čavka, Ana; Mihalj, Martina; Mihaljević, Zrinka; Grizelj, Ivana; Jelaković, Bojan; Drenjančević, Ines. Influence of high-salt diet on HIF-1 α and antioxidative enzymes mRNA expression in blood vessels on young male Sprague-Dawley rats // Journal of Hypertension, ESH-ISH Hypertension 2014, Abstract Book.2014. e519 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).
6. Grizelj, Ivana; Čavka, Ana; Mihaljević, Zrinka; Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Mihalj, Martina; Drenjančević, Ines. Adipocytokines and inflammation as a link between obesity and related endothelial dysfunction // Acta Physiologica Volume 211, Issue Supplement s697.2014. 130-P9.10 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

7. Grizelj, Ivana; Čavka, Ana; Mihaljević, Zrinka; Drenjančević, Ines. The influence of high salt intake on vascular responses of middle cerebral arteries to flow-induced dilation of Sprague-Dawley rats // Journal of Hypertension, ESH-ISH Hypertension 2014, Abstract Book.2014. e217 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

8. Ivić, Ivan; Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Mihaljević, Zrinka; Koller, Akos; Drenjančević, Ines. Dietary supplementation of zinc increases acetylcholine induced relaxations of isolated rat carotid arteries // Acta Physiologica Volume 211, Issue Supplement s697.2014. 92 P4.22 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

9. Manojlović, Dragan; Čavka, Ana; Ivanović, Zrinka; Drenjančević, Ines. Hyperbaric oxygen treatment modifies the mechanisms eliciting vasorelaxation to acetylcholine in female diabetic rats // Abstracts of FAME 2011 ; u: Acta Physiologica 202 (2011) (S684).2011. 73-74 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima

1. Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Jukić, Ivana; Stupin, Ana; Mihaljević, Zrinka; Rašić, Lidija; Mihalj, Martina; Drenjančević, Ines. Primjena laboratorijskih metoda u dijagnosticiranju oksidativnog stresa na primjeru animalnog modela prekomjernog unosa soli // Cardiologia Croatica 3(12) / Ivanuša, Mario (ur.).2017. 78 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

2. Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Stupin, Ana; Jukić, Ivana; Mihaljević, Zrinka; Mihalj, Martina; Drenjančević, Ines. Influence of high salt diet on the interrelation of HIF-1 α and antioxidative genes in microcirculation of Sprague-Dawley rats // Proceedings of The Physiological Society.2016. PCB299 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

3. Drenjančević, Ines; Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Stupin, Ana; Jukić, Ivana; Baus Lončar, Mirela; Mihalj, Martina; Mihaljević, Zrinka. The influence of high salt intake on carotid arteries responses to acetylcholine and changes in flow in child type (WT) 129/SV and TFF3 $^{-/-}$ mice // Proceedings of The Physiological Society.2016. PCA358 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

4. Mihaljević, Zrinka; Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Kibel, Aleksandar; Stupin, Ana; Jukić, Ivana; Mihalj, Martina; Drenjančević, Ines. Effects of acute hyperbaric oxygenation on vascular relaxation mechanisms to hypoxia in healthy Sprague Dawley rats // *Physiology* 2016 Abstracts. 2016. PCB296 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
5. Mihaljević, Zrinka; Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Mihalj, Martina; Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Drenjančević, Ines. Alteration of vasorelaxation in response to reduced pO₂ in aortas of diabetic rats - effects of hyperbaric oxygenation // *Proceedings of The Physiological Society* 31. PCB175 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).
6. Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Mihaljević, Zrinka; Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Drenjančević, Ines. Altered aortic reactivity by diabetes mellitus in ovariectomized rats: role of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) // *Proceedings of The Physiological Society* 31. 2014. C66 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
7. Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Mihalj, Martina; Mihaljević, Zrinka; Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Drenjančević, Ines. Effect of high salt diet on expression of antioxidative enzymes, hypoxia inducible factor 1 alpha and cyclooxygenase 1 and 2 in blood vessels of Sprague-Dawley rats // *Proceedings of The Physiological Society* 31. 2014. PCB177 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
8. Grizelj, Ivana; Čavka, Ana; Mihaljević, Zrinka; Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Drenjančević, Ines. Mechanism of flow-induced dilation of middle cerebral arteries in diabetic Sprague-Dawley rats // *Proceedings of The Physiological Society* 31. 2014. C67 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
9. Novak, Sanja; Manojlović, Dragan; Mihaljević, Zrinka; Ines Drenjančević. Influence of hyperbaric oxygenation on gene expression in diabetic and healthy female Sprague-Dawley rats // *Proceedings of The Physiological Society Proc 37th IUPS London, UK.* (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
10. Drenjančević, Ines; Kibel, Aleksandar; Unfirer, Sanela; Ćosić, Anita; Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Gros, Mario; Manojlović, Dragan; Mihaljević, Zrinka; Mihalj, Martina; Misir, Mihael; Novak, Sanja; Paradžiković, Ivana. Hyperbaric oxygenation - the role of EETs // 3. Congress

of Croatian Physiological Society and 1. Regional Congress of The Physiological Societies : abstracts ; u: Periodicum Biologorum 115 (2013) (S2) / Vitale, Branko ; Drenjančević, Ines (ur.).Zagreb, 2013. 26-26 (predavanje,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

11. Pojatic, Dorde; Mihalj, Martina; Ksenija, Marjanovic; Novak, Sanja; Žulj, Marinko; Mihaljevic, Zrinka; Drenjančević, Ines.Development of hyperbaric oxygenation protocol for the treatment of DSS-induced colitis in BALB/c mice // Periodicum biologorum.2013. (poster,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

Sažeci u zbornicima skupova

1. Mihaljević, Zrinka; Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Kibel, Aleksandar; Stupin, Ana; Jukić, Ivana; Mihalj, Martina; Drenjančević, Ines.The effect of acute hyperoxygenation on vascular relaxation mechanisms to ACh in Sprague-Dawley rats // Book of Abstracts FAME 2016.(predavanje,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

2. Mihaljević, Zrinka; Stupin, Ana; Mihalj, Martina; Unfirer, Sanela; Manojlović, Dragan; Drenjančević, Ines.Sex differences and sex-hormones role in aortic reactivity to acetylcholine in Sprague-Dawley rats with and without streptozotocin induced diabetes mellitus // 7th TriNet Meeting - Annual Project Review Meeting Abstract Book.2016. (poster,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

3. Ćosić, Anita; Grizelj, Ivana; Novak, Sanja; Čavka, Ana; Mihaljević, Zrinka; Mihalj, Martina; Drenjančević, Ines. Increased oxidative stress upon high salt diet impaires flow-induced dilation in Sprague- Dawley rats // Third International Symposium on Hypertension ISHOP3 Abstract Book.22 (pozvano predavanje,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

4. Kibel, Aleksandar; Novak, Sanja; Mihaljević, Zrinka; Ćosić, Anita; Čavka, Ana; Kibel, Dijana; Drenjančević, Ines. Evaluation of vascular responses to angiotensin II and angiotensin-(1-7) after hyperbaric oxygenation and the role of epoxyeicosatrienoic acids // Third International Symposium on Hypertension ISHOP3 Abstract Book.2014. 5 (pozvano predavanje,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

5. Mihaljević, Zrinka; Cvijan, Anđela; Mihalj, Martina; Milas-Ahić, Jasminka; Drenjančević, Ines. Prevalence of cardiovascular complications in three age groups of patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) // Bridges in Life Sciences 9th Annual Scientific Conference, Book of abstracts. 2014. 63-63 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).

6. Novak, Sanja; Ćosić, Anita; Mihaljević, Zrinka; Kibel, Aleksandar; Drenjančević, Ines. Influence of hyperbaric oxygen treatment on vascular gene expression in healthy Sprague-Dawley rats // 1st International Doctoral Workshop on Natural Sciences of the University of Pécs (1st IDWoNS/UP) : book of abstracts. Pečuh, Mađarska, 2012. 30-31 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

7. Mihaljević, Zrinka; Ćosić, Anita; Mihalj, Martina; Novak, Sanja; Dujić, Željko; Ćavar, Ivan; Drenjančević, Ines. Students' evaluation and satisfaction with physiology course at medical faculties in Croatia and Bosnia and Herzegovina // Book of abstracts AMEE 2011. (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

8. Begić, Ivana; Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Ivanović, Zrinka; Drenjančević-Perić, Ines. Does baroreflex have any role in the long-term control of blood pressure? // . (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

Članstvo u znanstvenim društvima i udrugama:

1. Hrvatsko društvo fiziologa (HDF)
2. Hrvatsko društvo za hipertenziju (HDH)