

Utjecaj intermitentne hiperbarične oksigenacije na protokom potaknutu dilataciju kod zdravih Sprague-Dawley štakora

Jakšić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:399682>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-24**



Repository / Repozitorij:

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



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

Petra Jakšić

UTJECAJ INTERMITENTNE
HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA
PROTOKOM POTAKNUTU
DILATACIJU KOD ZDRAVIH
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA

Diplomski rad

Osijek, 2020.

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

Petra Jakšić

UTJECAJ INTERMITENTNE
HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA
PROTOKOM POTAKNUTU
DILATACIJU KOD ZDRAVIH
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA

Diplomski rad

Osijek, 2020.

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

Mentor: doc. dr. sc. Ivana Jukić, dr. med.

Rad ima 33 stranice i 4 slike.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Mikrocirkulacija	1
1.2. Endotel i njegova funkcija	1
1.2.1. Uloga endotela u regulaciji vaskularnog tonusa	2
1.3. Mehanizam protokom potaknute dilatacije (FID)	4
1.4. Terapija hiperbaričnom oksigenacijom	5
1.5. Reaktivni kisikovi radikali i oksidativni stres	5
1.6. Antioksidativni mehanizmi.....	6
2. HIPOTEZA	8
3. CILJ.....	9
4. MATERIJALI I METODE	10
4.1. Eksperimentalne životinje	10
4.2. Izlaganje životinja intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji	10
4.3. Izolacija moždane arterije.....	10
4.4. Postupak mjerenja promjera krvne žile	11
4.5. Statističke metode.....	12
5. REZULTATI.....	13
5.1. Odgovor izoliranih krvnih žila kontrolne skupine i eksperimentalne skupine na protokom potaknutu dilataciju.....	13
5.2. Odgovor izoliranih krvnih žila na acetilkolin (ACh) kod kontrolne (CTRL) i eksperimentalne 4D-HBOT skupine (o endotelu ovisna dilatacija).....	13

5.3. Odgovor izoliranih krvnih žila na natrij-nitroprusid (SNP) kod kontrolne (CTRL) i eksperimentalne 4D-HBOT skupine (o endotelu neovisna dilatacija)	14
5.4. Odgovor izoliranih krvnih žila kontrolne skupine i eksperimentalne skupine u prisutnosti PSS Ca-free otopine.....	15
6. RASPRAVA.....	16
7. ZAKLJUČAK	18
8. SAŽETAK.....	19
9. SUMMARY	20
10. LITERATURA.....	22
11. ŽIVOTOPIS	26

POPIS KRATICA

ACh – acetilkolin

ATP – adenzin trifosfat

cAMP – ciklički adenzin monofosfat

cGMP – ciklički gvanozin monofosfat

COX-1 – enzim ciklooksigenaza-1

CTRL – kontrolna grupa

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

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

eNOS – endotelna dušik-oksidi sintetaza (engl. endothelial nitric-oxide synthase)

ET-1 – endotelin-1

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

GTP – gvanozin trifosfat

H₂O₂ – vodikov peroksid

HBO – hiperbarična oksigenacija (engl. hyperbaric oxygenation)

HS – visoko-slana dijeta (engl. high salt)

HO• – hidroksilni radikal

LDL - oksidirani lipoprotein male gustoće (engl. low-density lipoprotein)

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NO – dušikov oksid (engl. nitric oxide)

NOS – dušik-oksidi sintetaza (engl. nitric-oxide synthase)

O₂^{•-} – superoksidni radikal

ONOO⁻ – peroksinitrit

PGI₂ – prostaglandin H₂ (prostaciklin)

ROS – reaktivni kisikovi radikali (engl. reactive oxygen species)

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

ROO[•] – peroksilni radikal

SD – Sprague-Dawley

SNP – natrij-nitroprusid (engl. sodium nitroprusside)

SOD – superoksid dismutaza

TXA₂ – tromboksan A₂

4H-HBOT – štakori izloženi intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji kroz 4 dana

1. UVOD

1.1. Mikrocirkulacija

Mikrocirkulacija predstavlja završni dio kardiovaskularnog sustava. Njezina uloga je osigurati potreban protok krvi u organima i tkivima kako bi oni potom mogli samostalno regulirati lokalni protok krvi prema metaboličkim potrebama. Mikrocirkulacija se sastoji od mreže malih, tankih krvnih žila. Takve žile se nazivaju otporničke krvne žile i upravo su one odgovorne za održavanje lokalnog protoka krvi (1, 2). One također pružaju najveći otpor krvnom protoku pa tako doprinose perifernoj vaskularnoj otpornosti te sudjeluju u kontroli krvnog tlaka (3). Naime, stijenka krvnih žila građena je od endotelnih stanica te glatkih mišićnih stanica. Endotel otpuštajući vazoaktivne posrednike uzrokuje dilataciju glatkih mišićnih stanica. Pri tome se povećava unutarnji pomjer krvne žile, vaskularni otpor se smanjuje, a krvni protok povećava što uzrokuje trenutno snižavanje krvnog tlaka (4, 5).

1.2. Endotel i njegova funkcija

Endotelne stanice su se dugo smatrale homogenom populacijom stanica koje formiraju selektivnu barijeru za prijenos molekula iz krvi u intersticij i stanice (6). No tijekom godina, brojna istraživanja potvrdila su da je endotel dinamičan organ koji oblaže cijeli vaskularni sustav (7,8) i ima bitnu ulogu kod kritičnih funkcija kardiovaskularnog sustava, uključujući proizvodnju tvari koje potiču i inhibiraju rast vaskularnih stanica, izlučivanje prokoagulansa, antikoagulansa i fibrinolitičkih agensa za regulaciju hemostaze i tromboze, proizvodnju kemotaktičnih i adhezijskih molekula na membranama stanica za posredovanje upalnih odgovora i oslobađanje vazodilatatora i vazokonstriktora za regulaciju vaskularnog tonusa (9).

Ključna osobina zdravog endotela je njegova sposobnost otpuštanja vazoaktivnih tvari te reguliranje krvnog protoka. Kod oštećenja endotela i poremećaja u njegovoj funkciji javlja se endotelna disfunkcija (ED). Patofiziološki mehanizmi koji dovode do oštećenja o endotelu ovisne vazodilatacije mogu biti posljedica neravnoteže između vazoaktivnih čimbenika. Smatra se da je glavno obilježje ED nedovoljna raspoloživost NO. Upravo se zbog nesrazmjerne dostupnosti NO-a i aktivnosti vazokonstriktorskih čimbenika javlja vazokonstrikcija koja je karakteristična za endotelnu disfunkciju (10, 11). Posljedica ED su patofiziološke promjene

endotela poput abnormalne vaskularne reaktivnosti krvnih žila, povećanja propusnosti endotela za makromolekule, povećanja ekspresije kemotaktičkih i adhezijskih molekula, povećanja proliferacije i migracije glatkih mišićnih stanica te poremećaja hemostaze zbog stvaranja trombina i prokoagulacijskih molekula, adhezije i agregacije trombocita te odlaganja fibrina (10, 12).

1.2.1. Uloga endotela u regulaciji vaskularnog tonusa

Endotel krvnih žila ključan je za održavanje vaskularnog tonusa te je u složenom međudjelovanju s promjenama vaskularnog protoka (11). Za regulaciju vaskularnog tonusa ključni su vazoaktivni posrednici. Vazoaktivnim posrednicima smatraju se endotelni čimbenici kontrakcije (engl. endothelium-derived constricting factors, EDCF) i endotelni čimbenici relaksacije (engl. endothelium-derived relaxing factors, EDRF). Navedeni čimbenici se sintetiziraju i otpuštaju stimulacijom endotelnih stanica raznim kemijskim (acetilkolin; engl. acetylcholine, ACh) ili fizičkim (sila smicanja) poticajima (13, 14).

Najznačajniji endotelni čimbenici konstrikcije su endotelin-1 (ET-1) i tromboksan (TXA_2). Endotelin-1 smatra se najpotentnijim EDCF-om koji zajedno s NO i prostaciklinom kontrolira vaskularni tonus krvnih žila. Čimbenici koji utječu na njegovu proizvodnju i otpuštanje su angiotenzin II, adrenalin, trombin, žilni stres, oksidirani lipoprotein male gustoće (engl. low-density lipoprotein, LDL) i upalni citokini. Tromboksan predstavlja drugi važan EDCF kojeg izlučuju endotelne stanice, a nastaje u metabolizmu arahidonske kiseline putem COX-1 i tromboksan sintetaze (15). Povećane koncentracije EDCF-a predstavljaju važne rizične čimbenike u razvoju kardiovaskularnih bolesti. Naime, TXA_2 uzrokuje vazokonstrikciju i agregaciju trombocita, dok ET-1 uzrokuje povišen tlak te vaskularnu i miokardijalnu hipertrofiju (16, 17).

Brojna istraživanja su pokazala da endotelni čimbenici relaksacije imaju bitnu ulogu u otporničkim arterijama. Neki od važnijih EDRF-a su dušikov oksid, prostaciklin, endotelni hiperpolarizirajući čimbenik (EDHF), epoksieikozatrienoinska kiselina (EET) te vodikov peroksid (H_2O_2) (18). Dušikov oksid, za kojeg se pokazalo da ima ključnu ulogu u vazodilataciji, nastaje iz aminokiseline L-arginina. Sintetizira ga dušik-oksida sintetaza (NOS) koja se javlja u tri izoformna oblika. Neuronalna NOS (nNOS), endotelna NOS (eNOS) i inducibilna NOS (iNOS). Endotelna NOS se nalazi na membrani endotelnih stanica krvnih žila

te je stoga primarna NOS u sintezi NO. Pošto aktivnost i endotelne i neuronalne NOS ovisi o koncentraciji unutarstaničnog kalcija (Ca^{2+}), povećane koncentracije Ca^{2+} potiču stvaranje NO kao odgovor na različite podražaje agonista (ACh) ili djelovanjem sila smicanja („shear stress“). Inducibilna NOS je posredovana vanjskim čimbenicima i ne ovisi o promjenama unutarstaničnog Ca^{2+} , pri čemu se u citosolu stvaraju velike količine NO koje mogu biti citotoksične (15). Osim što stvaranje NO zahtijeva prisutnost L-arginina, potrebni su i kofaktori – tetrahidrobiopterin, flavin adenin dinukleotid, flavin mononukleotid, kalmodulin i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) (19). Nakon što se NO sintetizira u endotelnim stanicama, difuzijom dopire u obližnju mišićnu stanicu gdje se veže za topljivu gvanilil ciklazu. Aktivirana gvanil ciklaza potiče pretvorbu gvanozin trifosfata u ciklički gvanozin monofosfat (cGMP) koji potom sudjeluje u različitim biokemijskim reakcijama koje dovode do smanjenog ulaska iona kalcija u stanicu te do relaksacije glatkih mišićnih stanica (15, 20).

Izuzev održavanja bazalnog dilatacijskog tonusa krvnih žila, NO također sprječava adheziju i migraciju leukocita u arterijsku stijenku, adheziju i agregaciju trombocita, oksidaciju LDL-a te proliferaciju glatkih mišićnih stanica. To su ujedno i ključni mehanizmi u nastanku ateroskleroze što govori kako manjak aktivnosti NO ima značajnu ulogu u razvoju ateroskleroze (18).

Povećana razina unutarstaničnog Ca^{2+} aktivira i fosfolipazu A2 pri čemu se oslobađa arahidonska kiselina iz fosfolipida. Iz arahidonske se kiseline putem ciklooksigenaze-1 (COX-1) stvara prostaglandin H_2 iz kojeg nastaje prostaciklin (PGI_2) pomoću prostaciklin sintaze te već spomenuti TXA_2 pomoću tromboksan sintaze. PGI_2 povišuje koncentraciju cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) u trombocitima i glatkim mišićnim stanicama što uzrokuje inhibiciju agregacije trombocita i opuštanje glatkog mišićja. Arahidonska kiselina je također prekursor u sintezi epoksieikozatrienoinske kiseline (EET) pomoću enzima epoksigenaze (18). Endotelni hiperpolarizirajući čimbenici (EDHF) su također uključeni u o endotelu-ovisnu regulaciju vaskularnog tonusa. Njihovo djelovanje ovisi o aktivaciji o kalciju ovisnih kalijevih kanala. Naime, aktivacija o kalciju ovisnih kalijevih kanala dovodi do promjene u razini izvanstaničnog kalcija te njegovog otpuštanja iz mišićne stanice što uzrokuje hiperpolariziraju mišićne stanice. Promijenjen membranski potencijal smanjuje unutarstaničnu razinu Ca^{2+} , uzrokujući relaksaciju glatkog mišićja (15). O endotelu ovisna vazodilatacija posredovana vodikovim peroksidom (H_2O_2) je u velikim krvnim žilama ovisna o eNOS te tako aktivno stimulira eNOS za proizvodnju NO-a. U stanjima u kojima je eNOS nesparen (hipertenzija ili ateroskleroza) i proizvode se veće količine O_2^- nego NO, endotel može kompenzirati dilataciju

preko mehanizama koji još nisu sasvim poznati. Smatra se da je jedna od mogućnosti direktna polarizacija vaskularnih glatkih mišićnih stanica. Istraživanje provedeno na koronarnim arterijama pokazalo je da je protokom potaknuta dilatacija posredovana endotelnim H_2O_2 (21). Thengchaisri i Kuo su pokazali da H_2O_2 potiče aktivaciju kalijevih kanala u cerebralnim arterijama te da je H_2O_2 potaknuta o endotelu ovisna vazodilatacija u koronarnim arteriolama neovisna o NO i aktivira COX-1 i kalijevske kanale glatkog mišićja (22). Sukladno navedenim istraživanjima, evidentno je da H_2O_2 može, ovisno ili neovisno o NO, potaknuti o endotelu ovisnu vazodilataciju.

1.3. Mehanizam protokom potaknute dilatacije (FID)

Važan fiziološki mehanizam koji regulira hemostazu i mikrovaskularni tonus naziva se protokom potaknuta dilatacija (engl. flow-induced dilation, FID) (23). Cijeli mehanizam odvija se pomoću već spomenutih vazoaktivnih posrednika, a upravo je ta sposobnost endotelnih stanica da izazovu vazodilataciju u odgovoru na naglu promjenu krvnog protoka glavno svojstvo prikladne funkcije endotela (10). Istraživanja provedena na životinjama pokazala su da je očuvani endotel ključan za FID, odnosno da se promjer krvne žile povećava prilikom povećanja krvnog protoka samo kod dobro očuvanog endotela (23, 24). Druga istraživanja provedena na životinjama pokazala su da se u stanju povećane razine oksidativnog stresa smanjuje raspoloživost dušikovog oksida u mehanizmu protokom potaknute dilatacije (FID) (25). In vivo i in vitro istraživanja kod ljudi su pokazala da se održavanje FID-a, prilikom smanjenje dostupnosti NO, kompenzira drugim vazodilatacijskim faktorom (26). Poremećaj u mehanizmu protokom potaknute dilatacije ključan je u razvoju kardiovaskularnih bolesti te početni korak u razvoju ateroskleroze (27). Kuo i suradnici su u svom istraživanju na životinjskim modelima aterosklerotske koronarne bolesti dokazali da se patofiziološki učinci širenja ateroskleroze u mikrocirkulaciju ispoljavaju kao abnormalan o endotelu ovisan farmakološki odgovor na agoniste te da je protokom potaknuta vazodilatacija arteriola oslabljena (28). Phillips i suradnici su kod ljudi pokazali da se u otporničkim arterijama visceralnog masnog tkiva kod koronarne arterijske bolesti NO zamijenjuje s H_2O_2 kao posrednikom o endotelu ovisne protokom potaknute dilatacije (29). Sukladno tome, Miura i suradnici su potvrdili da se pri žilnom stresu povećava endotelno otpuštanje H_2O_2 (30). Postoje različita istraživanja koja ukazuju da je povećana razina oksidativnog stresa glavni uzrok nastanka vaskularne endotelne disfunkcije. Dokazano je da se u visoko-slanjoj dijeti (engl. high

salt, HS) povećava razina reaktivnih kisikovih radikala te oksidativnog stresa zbog smanjenog vaskularnog antioksidativnog kapaciteta (31). Istraživanje provedeno na životinjama je pokazalo da se kod unosa HS narušava vaskularna funkcija zbog povećane razine oksidativnog stresa kojeg uzrokuje manjak angiotenzina II u plazmi (32).

1.4. Terapija hiperbaričnom oksigenacijom

Hiperbarična oksigenacija (engl. hyperbaric oxygenation, HBO) metoda je koja se primjenjuje u klinički patološkim stanjima pri kojoj bolesnici udišu 100 % -tni kisik pri tlaku višem od 100 kPa (1,0 bara) u uređajima posebne konstrukcije. Budući da je kisik najvažniji makroelement u aerobnom organizmu te sudjeluje u metaboličkim reakcijama sinteze i razgradnje, njegove smanjene koncentracije imaju za posljedicu poremećaj hemostaze (33). Pri smanjenoj opskrbljenosti kisika (hipoksija) organizam je skloniji oboljevanju, a prvi simptomi hipoksije su umor, opća slabost, vrtoglavice te česte infekcije (34). Kronična hipoksija dovodi do nastanka različitih patofizioloških bolesti, a prvi korak u njihovom liječenju je primjena kisika kako bi se smanjio njegov deficit. Stoga je temelj hiperbarične oksigenacijske terapije korištenje 100 %-tnog kisika pod tlakom većim od atmosferskog (između 1 – 3 atm) (35, 36). Liječenje HBO koristilo se za brojne klasične indikacije, poput plinske gangrene, trovanja ugljičnim monoksidom, dekompresijskih bolesti i drugih, ali posljednjih godina pokazalo se da djeluje u raznim stanjima s vaskularnom patologijom (35). Terapija hiperbaričnom oksigenacijom pokazala se uspješnom i kod infarkta miokarda, akutne periferne ishemije te kod liječenja ishemijskih ulceracija kod pacijenata s dijabetesom (37).

Upotreba HBO, bilo u terapijskoj ili operativnoj primjeni, ima svoje povlastice, no zbog reaktivne prirode kisika, on ima i toksične efekte koji se ispoljavaju ovisno o tlaku i vremenu izlaganja HBO, odnosno o samom hiperbaričnom protokolu (38). U istraživanju koje je provedeno na našoj Katedri, Mihaljević i suradnici su pokazali da se kod zdravih Sprague-Dawley štakora prilikom akutne izloženosti HBO povećava oksidativni stres čime se narušava vaskularna funkcija (39).

1.5. Reaktivni kisikovi radikali i oksidativni stres

Slobodni radikali su kemijski spojevi koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj orbitali i mogu postojati sami za sebe. Upravo su zbog tih nesparenih elektrona vrlo

nestabilni, kratkoživi i reaktivni. Kako bi postigli stabilnost, mogu apsorbirati elektrone iz različitih bioloških molekula, poput nukleinskih kiselina, lipida i proteina. Pri tome, molekula gubi svoj elektron i nastaje slobodni radikal koji uzrokuje molekularno oštećenje stanice (40). Najznačajniji i najzastupljeniji slobodni radikali su reaktivni kisikovi radikali (engl. reactive oxygen species, ROS). To su svi nestabilni metaboliti molekularnog kisika koji imaju veću reaktivnost od samog O_2 , poput superoksidnog radikala ($O_2^{\cdot-}$) i hidroksilnog radikala ($HO\bullet$) te vodikovog peroksida i hipoklorita, koji su ne radikalne molekule (41). Lančane reakcije u kojoj jedan ROS stvara drugi obilježje su slobodnih radikala pa tako $O_2^{\cdot-}$, primarni kisikov radikal, stvara sekundarne radikale s ostalim molekulama. U stanjima upale $O_2^{\cdot-}$ i NO mogu zajedno reagirati te formirati peroksinitrit ($ONOO^-$) koji je vrlo toksičan (13).

Budući da su reakcije s kisikom neophodne za život, ROS se neprestano stvaraju u malim količinama kao rezultat fiziološkog staničnog metabolizma te sudjeluju u regulaciji bitnih staničnih aktivnosti, među kojima je i regulacija funkcije endotela te vaskularne reaktivnosti. Nastaju u procesu oksidativne fosforilacije unutar mitohondrija, gdje su neophodni za proizvodnju ATP-a. Mogu nastati i u reakcijama autooksidacije te u enzimskim reakcijama redukcije (42). Povećane koncentracije slobodnih radikala u organizmu uzrokuju poremećaj ravnoteže oksidacijsko-redukcijskih reakcija na stranu oksidacije, što za posljedicu ima stvaranje velikih količina ROS-a (43). Uslijed prekomjerne proizvodnje ROS-a ili nedostatka proizvodnje antioksidansa nastaje oksidativni stres. Brojna istraživanja su pokazala kako oksidativni stres doprinosi endotelnoj disfunkciji te aktivaciji patoloških mehanizama koji sudjeluju u nekoliko patoloških stanja, kao što su hipertenzija, ateroskleroza i kardiovaskularne bolesti (10, 11, 20).

1.6. Antioksidativni mehanizmi

Stvarajući antioksidanse, organizam kontinuirano održava ravnotežu između stvaranja i uklanjanja ROS-a. Antioksidansi su strukturno raznolika skupina spojeva koji se protiv oksidativnog stresa koriste složenim mehanizmima. Četiri su glavna antioksidativna mehanizma – uklanjanje iona prijelaznih metala, sprječavanje nastanka ROS-a i RNS-a i njihovo uklanjanje, prekid lančanih reakcija slobodnih radikala te molekularni popravak stanica oštećenih zbog radikala. Svaki antioksidans cilja specifične vrste ROS-a i tako štiti organizam na različitim mjestima (44, 45). Antioksidansi se mogu podijeliti na izvanstanične (industrijske kemikalije, konzervansi, hrana) i na unutarstanične (prirodni spojevi koji se nalaze u tkivu), dok se unutarstanični još dijele na enzimске i neenzimске. Enzimski antioksidansi su

superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza, katalaza i drugi, te djeluju tako što u višestupanjskoj reakciji pretvaraju oksidirane metaboličke produkte u vodikov peroksid, a zatim u vodu koristeći kofaktore poput željeza, cinka, bakra i mangana (44). SOD predstavlja skupinu ključnih enzima koji djeluju kao prva linija antioksidativne obrane zahvaljujući sposobnosti pretvaranja visoko reaktivnih superoksidnih radikala u vodikov peroksid i molekularni kisik (45). Neenzimski antioksidansi zaustavljaju tijek lančane reakcije slobodnih radikala, a nalaze se u citosolu ili citoplazmatskom matriksu (hidrosolubilni) ili u staničnim membranama (liposolubilni). Neki od njih su glutation, vitamin A, C, E, feritin, mokraćna kiselina i haptoglobin (42). 70 % ukupnog antioksidativnog kapaciteta tijela čine glutation, vitamin C, mokraćna kiselina i vitamin E (39).

Unatoč prisutnosti antioksidativnog obrambenog mehanizma, oštećenja nastala zbog oksidativnog stresa imaju kumulativni učinak i ključna su u razvoju kroničnih bolesti, raka, kardiovaskularnih bolesti i neurodegenerativnih poremećaja (45).

2. HIPOTEZA

Osnovna je pretpostavka ovog istraživanja da intermitentna hiperbarična oksigenacija ne oštećuje protokom potaknutu dilataciju središnjih moždanih arterija kod zdravih Sprague-Dawley štakora.

3. CILJ

Ciljevi ovog istraživanja su:

- 1) odrediti utjecaj intermitentne hiperbarične oksigenacije na protokom potaknutu dilataciju kod pokusnih životinja (zdravi štakori soja Sprague-Dawley) pomoću metode mjerenja protokom potaknute dilatacije;
- 2) odrediti ulogu endotela u mehanizmu protokom potaknute dilatacije kod intermitentne hiperbarične oksigenacije.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Eksperimentalne životinje

Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije Medicinskog fakulteta u Osijeku. Korišteni su Sprague-Dawley (SD) muški štakori u dobi od 9 do 11 tjedana starosti. Svi su štakori iz vlastitog uzgoja Vivarija pri Medicinskom fakultetu u Osijeku.

Štakori su podijeljeni u dvije skupine:

- 1) Grupa 1: KONTROLA – zdravi netretirani štakori (N = 12)
- 2) Grupa 2: 4D-HBOT – štakori izloženi HBO tijekom 4 dana (N = 11)

4.2. Izlaganje životinja intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji

Štakori su bili izloženi četverodnevnoj (intermitentnoj) terapiji hiperbaričnim kisikom prema standardiziranom protokolu (46). Nakon smještanja životinja u barokomoru (110 L, proizvođač Đuro Đaković, Aparati d. d., Slavonski Brod), otvaranjem kompresijskog ventila i puštanjem kisika u barokomoru slijedila je kompresija u trajanju od 15 minuta na 2,0 atm. Nakon što je tlak dosegnuo 2,0 atm, ventil za kompresiju je zatvoren i štakori su bili izloženi djelovanju 100 % -tnog kisika u trajanju od 2h uz protok 2-3 l/min. U komori su bile postavljene male količine granula kalcij-hidroksida, natrij-hidroksida te etilvioleta (Draegersorb 800 Plus, DraegerMedical) kako bi upijale izdahnuti ugljikov dioksid. Po isteku terapije, izvršena je dekompresija, na način da se dekompresijski ventil otpuštao 15 minuta.

Spomenuti protokol ponavljao se 4 uzastopna dana, a 5. dan su životinje bile žrtvovane.

Životinje su kroz svaki protokol bile pri svijesti i imale su dostupnu hranu.

4.3. Izolacija moždane arterije

Nakon vaganja štakori su bili anestezirani kombinacijom midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma) i ketamina 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2ml, Pfizer) (47). Nakon toga slijedila je dekapitacija te je bila izolirana središnja moždana arterija koja je predstavlja model za određivanje protokom potaknute dilatacije na sustavu tlačnog miografa (The Myograph System, DMT). Prije nego što je arterija

bila postavljena između dviju staklenih mikropipeta (vanjskog promjera ~ 100 – 200 μm) smještenih u komorici ispunjenoj toplom (37 °C) fiziološkom otopinom PSS, pH = $7,4 \pm 0,05$ sastava (u mM/l): 119 NaCl, 4,7 KCl, 1,17 MgSO₄, 1,6 CaCl₂, 1,18 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 0,026 EDTA i 5,5 glukoze, arterija je bila očišćena od vezivnog tkiva mikrokirurškim priborom pod mikroskopom.

4.4. Postupak mjerenja promjera krvne žile

Za procjenu osnovnog (bazalnog) promjera žile, krvna žila je bila postavljena u komorici te inkubirana u trajanju od 60 minuta pri tlaku $\Delta 80$ mmHg (P1 je 80 mmHg, P2 0 mmHg). Žila je snimana infracrvenom kamerom te se slika prikazivala na monitoru, a bilježile su se promjene promjera žile. Nakon inkubacije, krvna žila je bila izložena protoku koji se postizao istodobnim promjenama ulaznog (inflow) i izlaznog (outflow) tlaka (tlačni gradijenti $\Delta 10$, $\Delta 20$, $\Delta 40$, $\Delta 60$ i $\Delta 100$ mmHg). Gradijent tlaka rezultirao je nastankom protoka PSS otopine kroz postavljenu krvnu žilu. Nakon izmjerenih bazalnih vrijednosti promjera krvne žile pri navedenim gradijentima tlaka, mjerila se o endotelu ovisna dilatacija u prisutnosti acetilkolina (ACh, 100 μL ; 10⁻⁶ mol/L) te o endotelu neovisna dilatacija u prisutnosti izravnog NO donora, natrijeva nitroprusida (SNP, 100 μL ; 10⁻⁶ mol/L). Odgovori na ACh i SNP su se procjenjivali pri tlaku od 80 mmHg (stanje mirovanja, bez protoka).

Na kraju eksperimentalnog protokola PSS otopina je bila zamijenjena s PSS Ca-free otopinom. Zbog nedostatka Ca došlo je do maksimalne dilatacije krvne žile što je omogućilo mjerenje maksimalnog promjera krvne žile. Podatci onih krvnih žila koje nisu pokazivale značajnu razinu aktivnog tonusa (oko 50 %) izuzeli su se iz obrade.

Svi su eksperimentalni postupci bili usklađeni s Europskim smjernicama za dobrobit laboratorijskih životinja korištenih u istraživanjima (direktiva 210/63/EU). Poduzele su sve mjere kako bi se spriječila patnja životinja. Provedbu svih istraživanja odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/20-08/07; Ur.broj: 2158-61-07-20-101) te Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske.

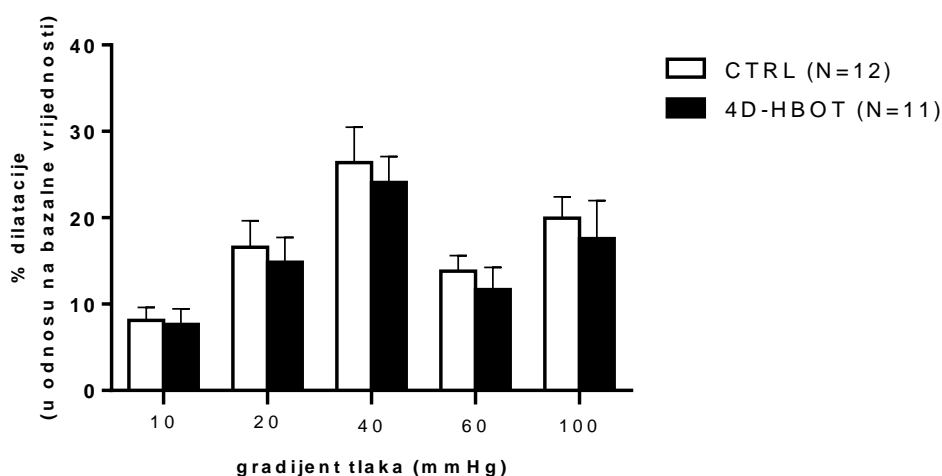
4.5. Statističke metode

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Statistički programi SigmaPlot 11.2 (Systat Software, Inc.) te GraphPad Prism5 korišteni su za prikazivanje rezultata. Mjerena dilatacija koja je rezultat protoka izražena je u postotku u odnosu na osnovne vrijednosti dobivene mjerenjem pri $\Delta 0$ mmHg. Koristio se Two-way ANOVA test (GraphPad Prism 5) za ispitivanje razlika u vaskularnoj reaktivnosti među skupinama. Razina statističke značajnosti postavljena je na $P < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Odgovor izoliranih krvnih žila kontrolne skupine i eksperimentalne skupine na protokom potaknutu dilataciju

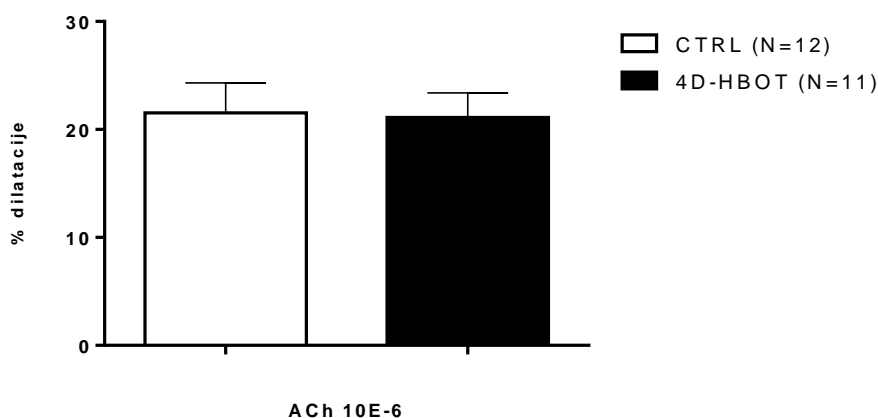
Ne postoji statistički značajna razlika u odgovoru na protokom potaknutu dilataciju središnjih moždanih arterija između kontrolne CTRL i eksperimentalne 4D-HBOT skupine (Slika 1.).



Slika 1. Odgovor središnjih moždanih arterija na promjenu gradijenta tlaka kod kontrolne, netretirane skupine životinja (N = 12) i životinja tretiranih intermitentnom hiperbaričnom oksigenacijom (N = 11) izražen kao udio (%) dilatacije u odnosu na bazalne vrijednosti.

5.2. Odgovor izoliranih krvnih žila na acetilkolin (ACh) kod kontrolne (CTRL) i eksperimentalne 4D-HBOT skupine (o endotelu ovisna dilatacija)

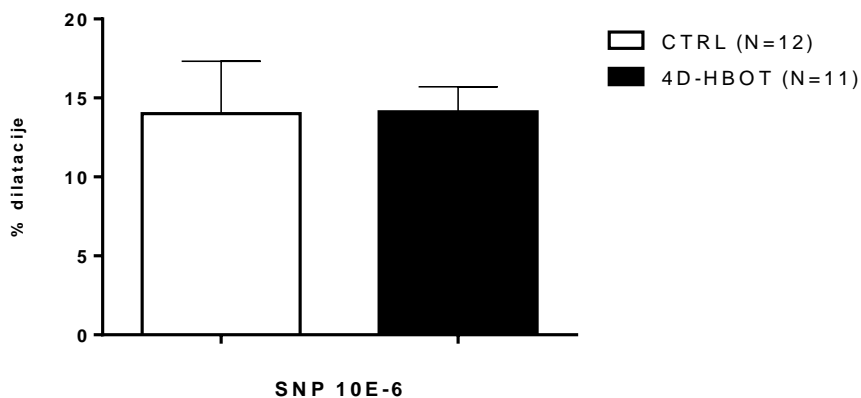
Odgovor izoliranih središnjih arterija na acetilkolin ne pokazuje statistički značajnu razliku između kontrolne (CTRL) i eksperimentalne 4D-HBOT skupine (Slika 2.).



Slika 2. Odgovor središnjih moždanih arterija na acetilkolin u kontrolnoj (N=12) i pokusnoj skupini životinja (N=11).

5.3. Odgovor izoliranih krvnih žila na natrij-nitroprusid (SNP) kod kontrolne (CTRL) i eksperimentalne 4D-HBOT skupine (o endotelu neovisna dilatacija)

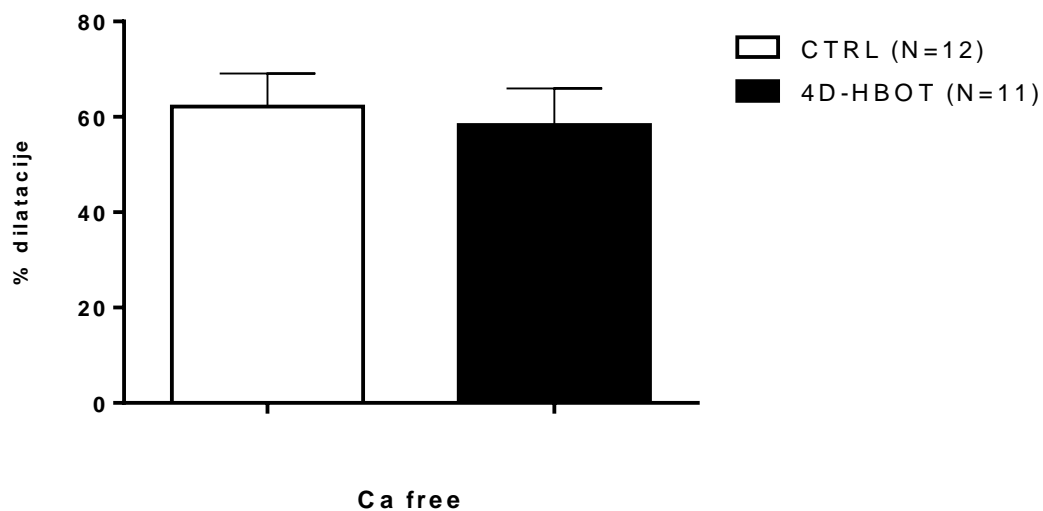
Vaskularni je odgovor na o endotelu-neovisnog donora NO-a (SNP) očuvan i nisu utvrđene razlike između ispitivanih grupa ($P > 0,05$) (Slika 3.).



Slika 3. Odgovor središnjih moždanih arterija na izravni NO-donor SNP natrijeva nitroprusid (SNP) u kontrolnoj (N=12) i pokusnoj skupini životinja (N=11)

5.4. Odgovor izoliranih krvnih žila kontrolne skupine i eksperimentalne skupine u prisutnosti PSS Ca-free otopine

U prisutnosti PSS Ca-free otopine postignuta je maksimalna dilatacija središnjih moždanih arterija u obje skupine (CTRL i 4D-HBOT) te nije utvrđena statistički značajna razlika između navedenih skupina (Slika 4.).



Slika 4. Odgovor središnjih moždanih arterija u prisutnosti PSS Ca-free otopine na protokom posredovanu dilataciju u kontrolnoj (N=12) i pokusnoj skupini životinja (N=11)

6. RASPRAVA

U ovome istraživanju se ispitivao utjecaj četverodnevno (intermitentnog) izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji na protokom potaknutoj dilataciji u središnjim moždanim arterijama kod zdravih muških SD štakora. U prvoj smo skupini imali zdrave netretirane štakore (CTRL), dok smo u drugoj skupini imali štakore koji su bili izloženi HBO kroz 4 dana (4D-HBOT). Ovo istraživanje potvrdilo je da intermitentna hiperbarična oksigenacija ne narušava protokom potaknutu dilataciju kod zdravih SD štakora.

Danas je poznato da se mnoga patofiziološka stanja i bolesti razvijaju zbog nedostatka kisika u organizmu. S obzirom da kisik sudjeluje u brojnim metaboličkim reakcijama i stoga je neophodan za preživljavanje aerobnog organizma, terapija hiperbaričnom oksigenacijom (udisanje 100 % -tnog kisika pri tlaku većim od atmosferskog tlaka) široko je primjenjivana. Pokazala se kao uspješna u liječenju brojnih bolesti poput kroničnih komplikacija dijabetesa, infarkta miokarda, dekompresijskih bolesti (33, 35 - 37). Brojna istraživanja su ukazala na povećano stvaranje reaktivnih kisikovih radikala (ROS) pri terapiji hiperbaričnom oksigenacijom (HBO). Razlog tomu je povećano reaktivno svojstvo kisika pri visokim parcijalnim tlakovima koji se koriste u HBO. Posljedice povećanih koncentracija ROS-a su poremećena hemostaza i vaskularna funkcija (39).

Mihaljević i suradnici su dokazali da se kod zdravih SD štakora prilikom akutne izloženosti HBO povećava oksidativni stres (39). Istraživanje u sklopu završnog rada na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek ukazalo je da akutno izlaganje HBO značajno smanjuje protokom potaknutu dilataciju (48), što je upravo posljedica povećanog oksidativnog stresa. Stoga je svrha ovog istraživanja bila vidjeti kakav će utjecaj imati intermitentno izlaganje hiperbaričnom kisiku na protokom potaknutu dilataciju kod središnjih moždanih arterija zdravih SD štakora. Rezultati su pokazali da nema značajne razlike u odgovoru središnjih moždanih arterija kod štakora izloženih intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (4D-HBOT) i kod zdravih štakora što govori da intermitentna primjena HBO nije narušila vaskularnu funkciju endotela. Rezultati su sukladni s prethodno navedenim istraživanjem u kojem se na modelu aorte dokazalo da se kod intermitentnog izlaganja HBO ne povećava koncentracija superoksida, i štoviše, da je ekspresija i aktivacija antioksidativnih enzima bila povišena u usporedbi s akutnim izlaganjem hiperbaričnoj oksigenaciji (39).

Primjenom acetilkolina, čije je vazodilacijsko djelovanje ovisno o endotelu te natrijevog nitroprusida (SNP), koji je izravan donor NO-a, ispitivali smo ulogu endotela u mehanizmu FID-a te dokazali da nema značajnih promjena u vazodilaciji kod 4D-HBOT u odnosu na kontrolnu skupinu. Navedeno je u skladu s istraživanjem u kojem je dokazano da se nakon intermitentne HBO, osjetljivost aortalnih prstenova na vazodilaciju ovisnu o endotelu (acetilkolin) i na o endotelu neovisnu vazodilaciju (SNP) ne mijenja (39).

Zamjenom PSS otopine s PSS otopinom bez iona kalcija, postignuta je maksimalna vazodilacija te je ona bila približno jednaka kod zdravih SD štakora i onih izloženih intermitentnoj (4D-HBOT) hiperbaričnoj oksigenaciji.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata iz provedenog istraživanja mogu se izvesti zaključci:

- 1) Intermitentna hiperbarična oksigenacija ne utječe na protokom potaknutu dilataciju kod skupine izložene intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji u odnosu na kontrolnu skupinu, odnosno ne mijenja ju.
- 2) Intermitentna hiperbarična oksigenacija ne utječe na odgovor izoliranih središnjih moždanih arterija zdravih SD štakora na acetilkolin, kojim se ispituje o endotelu ovisna vazodilatacija.
- 3) Intermitentna hiperbarična oksigenacija ne mijenja odgovor središnjih moždanih arterija na natrijev nitroprusid, izravnog donora NO-a kojim se ispituje o endotelu neovisna dilatacija.

8. SAŽETAK:

Cilj: Glavni cilj ovog istraživanja je odrediti učinak intermitentne hiperbarične oksigenacije na protokom potaknutu dilataciju kod Sprague-Dawley štakora.

Materijali i metode: U istraživanje su bili uključeni zdravi muški Sprague-Dawley (SD) štakori podijeljeni u dvije skupine: zdravi netretirani štakori (CTRL, N = 12) te štakori izloženi intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (100 % O₂, 2h/2 bara) tijekom četiri uzastopna dana, a potom bili žrtvovani 5.dan (4D-HBOT, N = 11). Štakori su bili anestezirani ketaminom (75 mg/kg) i midazolamom (0,5 mg/kg). Nakon dekapitacije središnja moždana arterija je bila izolirana te postavljena u komoricu ispunjenu pripremljenom fiziološkom otopinom, a zatim inkubirana pri tlaku $\Delta 80$ mmHg radi procjene bazalnog promjera. Potom su se mjerile bazalne vrijednosti promjera žile pri tlačnim gradijentima koji su bili dobiveni istovremenim promjenama ulaznog i izlaznog tlaka (tlačni gradijenti $\Delta 10$, $\Delta 20$, $\Delta 40$, $\Delta 60$ i $\Delta 100$ mmHg). Nakon izmjerenih bazalnih vrijednosti, vazodilatacija ovisna o endotelu je bila ispitivana acetilkolinom (ACh), a o endotelu neovisnu natrijevim nitroprusidom (SNP) pri tlaku 80 mmHg (bez protoka). Na kraju protokola PSS je bila zamijenjena s PSS Ca-free otopinom radi procjene maksimalnog promjera krvne žile.

Rezultati: Protokom potaknuta dilatacija središnjih moždanih arterija u eksperimentalnoj skupini životinja (4D-HBOT) i kontrolnoj skupini (CTRL) nije pokazala statistički značajnu razliku. Dodatkom acetilkolina (o endotelu-ovisan vazodilatator) te SNP-a (o endotelu neovisna vazodilatacija) nije utvrđena statistički značajna razlika u dilataciji kod 4D-HBOT u odnosu na CTRL. Dodatkom PSS Ca-free otopine također nije utvrđena statistički značajna razlika u protokom potaknutnoj dilataciji između CTRL i 4D-HBOT.

Zaključak: Intermitentna hiperbarična oksigenacija ne mijenja odgovor izoliranih rezistentnih žila na protokom potaknutu dilataciju kod zdravih muških SD štakora, kao ni odgovor na acetilkolin ili SNP, odnosno o endotelu ovisnu/neovisnu dilataciju.

Ključne riječi: intermitentna hiperbarična oksigenacija; protokom potaknuta dilatacija; acetilkolin, Sprague-Dawley štakori

9. SUMMARY

Effects of intermittent hyperbaric oxygenation on flow-induced dilation in healthy Sprague-Dawley rats.

Objective: The main aim of this study was to determine the effects of intermittent hyperbaric oxygenation on the flow-induced dilation in healthy Sprague-Dawley rats.

Methods: Healthy male Sprague-Dawley (SD) rats were included in this research and were divided into two groups: healthy untreated rat (CTRL, N=12) and the rats exposed to intermittent hyperbaric oxygenation in a hyperbaric oxygen chamber (100 % O₂, 2h/2 atm) over the course of 4 days and then they were sacrificed on the 5th day (4D-HBOT, N = 11). Rats were anesthetized (ketamine, 75 mg/kg and midazolam, 0,5 mg/kg) and afterwards decapitated. The middle cerebral artery was isolated and placed in a chamber filled with PSS solution, then incubated for 1 hour at pressure of $\Delta 80$ mmHg to estimate basal diameter. After that, basal diameter values were measured depending on the pressure gradients obtained by simultaneous changes of inlet and outlet pressure (pressure gradients $\Delta 10$, $\Delta 20$, $\Delta 40$, $\Delta 60$ i $\Delta 100$ mmHg). After the basal diameter values were determined, endothelium-dependent vasodilation was assayed with acetylcholine and independent vasodilation with SNP at the pressure of 80 mmHg without flow. In the end, PSS solution was replaced by PSS Ca-free and the maximum blood vessel diameter was measured.

Results: Flow-induced dilation in the middle cerebral artery in the experimental group of animals (4D-HBOT) and the control group (CTRL) didn't reveal statistically significant difference. The addition of acetylcholine (endothelium-dependent vasodilation) and SNP (endothelium-independent vasodilation) didn't show a statistically significant difference in flow-induced dilation in 4D-HBOT compared to CTRL. The addition of PSS Ca-free also didn't show statistically significant difference in flow-induced dilation between CTRL and 4D-HBOT.

Conclusion: Intermittent hyperbaric oxygenation doesn't change the response of isolated resistant vessels in flow-induced dilation in healthy man SD rats, nor it affect the response to acetylcholine or SNP, that is endothelium-dependent or independent dilation.

Key words: intermittent hyperbaric oxygenation; flow-induced dilation; acetylcholine

10. LITERATURA

1. Ančić, E. Uloga Tempol-a na protokom potaknutu dilataciju nakon akutnog izlaganja hiperbaričnom kisiku zdravih Sprague-Dawley štakora (Završni rad). 2018. Dostupno na adresi: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:643170>. Datum pristupa: 31.8.2020.
2. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija – udžbenik. 13. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017.
3. Hill JA, Olson EN. Muscle; Fundamental Biology and Mechanisms of Disease. U: Jackson WA, urednik. Microcirculation. Academic Press; 2012. str. 1197-1206. Dostupno na adresi: <https://www.sciencedirect.com/sdfe/pdf/download/eid/3-s2.0-B9780123815101000892/first-page-pdf>. Datum pristupa: 31.8.2020.
4. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* 2015; 129(2): 83–94.
5. Siddiqui A. Effects of Vasodilation and Arterial Resistance on Cardiac Output. *J Clinic Experiment Cardiol.* 2011; 2: 170.
6. Pries AR, Kuebler WM. Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 2006; 176 Pt1: 1–40.
7. Vane JR, The Croonian Lecture, 1993. The endothelium: maestro of the blood circulation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 1994; B343225–246.
8. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.* 2004; 93: 105–13.
9. Ngai CY, Yao X. Vascular Responses to Shear Stress: The Involvement of Mechanosensors in Endothelial Cells. *The Open Circulation and Vascular Journal.* 2010; 3: 85–94.
10. Čavka A, Tadžić R., Grizelj I, Unfirer S, Mihaljević Z, Mihalj M. Endotelna funkcija – funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. *Med Vjesn.* 2012; 44(1–4): 135–146.
11. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial Dysfunction. A Marker of Atherosclerosis Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 168–175.
12. Kang KT. Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension. *Toxicol. Res.* 2014; 30(3): 141–148.

13. Vanhoutte P.M. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension*. 1989; 13: 658–667.
14. Godo S, Shimokawa H. Endothelial Functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017; 37(9): e108–e114.
15. Jukić, I. Vaskularna reaktivnost otporničkih krvnih žila potkožnog i visceralnog masnog tkiva u ljudskoj pretilosti (disertacija). 2014. Dostupno na adresi: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:203277>. Datum pristupa: 3.9.2020.
16. Fitzgerald GA. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. *Am J Cardiol*. 1991; 68:11B-15B.
17. Kiely DG, Cargill RI, Struthers AD, Lipworth BJ. Cardiopulmonary effects of endothelin-1 in man. *Cardiovasc Res*. 1997; 33:378-86.
18. Grizelj I, Čavka A, Phillips SA. Vascular dysfunction and exercise. *Periodicum biologorum*. 2014; 116(1):15-19.
19. Pirahanchi Y, Marsidi JL, Brown KN. Physiology, Endothelial Derived Relaxation Factor (EDRF). StatPearls Publishing. 2020. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537010/>. Datum pristupa: 22.8.2020.
20. Višević, R., Mihalj, M., Novak, S., Čosić, A., Žulj, M., Unfirer, S. & Drenjančević, I. Temeljni mehanizmi i manifestacije endotelne disfunkcije u autoimunim bolestima. *Med Vjesn*. 2012; 44 (1–4), 125–134.
21. Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res*. 2005; 68:26–36.
22. Thengchaisri N, Kuo L. Hydrogen peroxide induces endotheliumdependent and -independent coronary arteriolar dilation: role of cyclooxygenase and potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 285:H2255–63.
23. Miura H, Wachtel RE, Liu Y, Loberiza FR Jr, Saito T, Miura M, i sur. Flow-induced dilation of human coronary arterioles: important role of Ca(2+)-activated K(+) channels. *Circ*. 2001; 103(15): 1992–8.
24. Siddiqui A. Effects of Vasodilation and Arterial Resistance on Cardiac Output. *J Clinic Experiment Cardiol*. 2011; 2: 170.
25. Koller A, Huang A. Impaired nitric oxide-mediated flow-induced dilation in arterioles of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1994; 74:416-421.
26. Paniagua OA, Bryant MB, Panza JA. Role of endothelial nitric oxide in shear stress-induced vasodilation of human microvasculature: diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients. *Circulation*. 2001; 103:1752-8.

27. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endotheliumdependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects. *J Am Coll Cardiol.* 1994; 24(6):1468-1474.
28. Kuo L, Davis MJ, Cannon MS, Chilian WM. Pathophysiological consequences of atherosclerosis extend into the coronary microcirculation. Restoration of endothelium dependent responses by L-arginine. *Circ Res.* 1992; 70:465-76.
29. Phillips SA, Hatoum OA, Gutterman DD. The mechanism of flow-induced dilation in human adipose arterioles involves hydrogen peroxide during CAD. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292:H93–100.
30. Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res.* 2001; 92:e31–40.
31. Drenjancevic-Peric I, Frisbee JC & Lombard JH (2003). Skeletal muscle arteriolar reactivity in SS BN13 consomic rats and Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 41. 2003; 1012–1015.
32. Drenjancevic-Peric I & Lombard JH Reduced angiotensin II and oxidative stress contribute to impaired vasodilation in dahl salt-sensitive rats on low-salt diet. *Hypertension* 45. 2005; 687–691.
33. Choudhury R. Hypoxia and hyperbaric oxygen therapy: a review. *Int J Gen Med.* 2018; 11: 431–442.
34. 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; 12(1): 33–45.
35. Medikor. Disanje, kisik i pulsna oksimetrija. Dostupno na adresi: <http://medikor.hr/wp/disanje-kisik-i-pulsna-oksimetrija/>. Datum pristupa: 4.9.2020.
36. Oxy poliklinika. Liječenje primjenom hiperbarične oksigenacije. Dostupno na adresi: <http://oxy.hr/hiperbaricna-oksigenacija-hbot/lijecenje-kisikom/lijecenje-primjenom-hiperbaricne-oksigenacije>. Datum pristupa: 4.9.2020.
37. Bakker DJ. Hyperbaric oxygen therapy and the diabetic foot. *Diabetes Metab Res Rev* 2000; 16(1): 55–58.
38. Körpınar Ş, Uzun H. The Effects of Hyperbaric Oxygen at Different Pressures on Oxidative Stress and Antioxidant Status in Rats. *Medicina (Kaunas).* 2019; 55(5): 205.
39. Mihaljević Z, Matic A, Stupin A, Rašić L, Jukić I, Drenjančević I. Acute Hyperbaric Oxygenation, Contrary to Intermittent Hyperbaric Oxygenation, Adversely Affects

- Vasorelaxation in Healthy Sprague-Dawley Rats due to Increased Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 2018: 1406027.
40. Phaniendra, A., Jestadi, D.B. & Periyasamy, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Ind J Clin Biochem* 30. 2015; 11–26.
41. Ćosić, A. Uloga oksidativnog stresa u razvoju poremećenog vaskularnog odgovora pod utjecajem visokog unosa natrijeva klorida kod sprague-dawley štakora (Disertacija). 2016. Dostupno na adresi: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:300285>. Datum pristupa: 4.9.2020.
42. Čvorišćec D, Čepelak I, ur. Štrausova medicinska biokemija. 4. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
43. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012; 24(5): 981–990.
44. Moussa Z, Judeh ZMA, Ahmed SA. Nonenzymatic Exogenous and Endogenous Antioxidants. 2019. Dostupno na stranici: <https://www.intechopen.com/books/free-radical-medicine-and-biology/nonenzymatic-exogenous-and-endogenous-antioxidants>. Datum pristupa: 27.8.2020.
45. Aguilar TAF, Hernandez Navarro BC, Mendoza Pérez JA. Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress, A Master Regulator of Oxidative Stress. 2016. Dostupno na adresi: <https://www.intechopen.com/books/a-master-regulator-of-oxidative-stress-the-transcription-factor-nrf2/endogenous-antioxidants-a-review-of-their-role-in-oxidative-stress>. Datum pristupa: 27.8.2020.
46. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol*. 2006; 141(2): 312–322.
47. Grizelj I, Cavka A, Bian JT, et al. Reduced flow-and acetylcholine-induced dilations in visceral compared to subcutaneous adipose arterioles in human morbid obesity. *Microcirculation*. 2015; 22(1): 44–53.
48. Marković, P. Utjecaj akutne hiperbarične oksigenacije na protokom potaknutu dilataciju kod zdravih Sprague-Dawley štakora. (Završni rad). 2018; Dostupno na adresi: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:911293>. Datum pristupa: 23.8.2020.

11. ŽIVOTOPIS

Petra Jakšić

Datum rođenja: 11. veljače 1997. god.

Adresa: Antuna Gustava Matoša 10, 31 551 Belišće, Republika Hrvatska

E-mail: petrajaksic55@gmail.com

Obrazovanje:

2003. – 2011. Osnovna škola Ivana Kukuljevića, Belišće

2011. – 2015. Srednja škola Valpovo

2015. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu u Osijeku

2018. – 2020. Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu u Osijeku