Utjecaj intermitentne hiperbarične oksigenacije na ulogu ionskih kanala u mehanizmima vaskularne reaktivnosti kod Sprague-Dawley štakora

Turza, Lara

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:152:934892

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Lara Turza

UTJECAJ INTERMITENTNE HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA ULOGU IONSKIH KANALA U MEHANIZMIMA VASKULARNE REAKTIVNOSTI KOD SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA

Diplomski rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Lara Turza

UTJECAJ INTERMITENTNE HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA ULOGU IONSKIH KANALA U MEHANIZMIMA VASKULARNE REAKTIVNOSTI KOD SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA

Diplomski rad

Osijek, 2021.

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

Mentorica rada: doc. dr. sc. Ivana Jukić, dr. med.

Rad ima 25 stranica i 5 slika.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Ivani Jukić, dr. med. na utrošenom vremenu i pomoći kojom mi je uvelike olakšala pisanje ovog diplomskog rada. Neizmjerno sam zahvalna svojoj obitelji na podršci, ljubavi i razumijevanju koju su mi pružali tijekom svih godina mog studiranja.

SADRŽAJ

1.UVOD **1**

1.1.Hiperbarična oksigenacija 1

1.2.Reaktivni kisikovi spojevi i oksidativni stres 1

1.3.Endotel i njegova uloga u kontroli vaskularnog tonusa 2

1.4.Protokom potaknuta dilatacija 4

1.5.Ionski kanali 4

2.HIPOTEZA **7**

3.CILJ **8**

4.MATERIJALI I METODE **9**

4.1.Ustroj studije 9

4.2.Pokusni animalni modeli 9

4.3.Izlaganje životinja intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji 9

4.4.Mjerenje protokom potaknute dilatacije središnje moždane arterije 10

4.5.Statističke metode 12

5.REZULTATI **13**

5.1.Protokom potaknuta dilatacija središnje moždane arterije kontrolne skupine i skupine izložene intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji 13

5.2.Protokom potaknuta dilatacija središnje moždane arterije kontrolne skupine u prisutnosti antagonista ionskih kanala 13

5.3.Protokom potaknuta dilatacija središnje moždane arterije eksperimentalne skupine podvrgnute intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji u prisutnosti antagonista ionskih kanala 14

6.RASPRAVA **16**

7.ZAKLJUČAK **18**

8.SAŽETAK **19**

9.SUMMARY **20**

10.LITERATURA **21**

11.ŽIVOTOPIS **25**

POPIS KRATICA

4D – HBOT skupina – skupina štakora izložena intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji

atm – standardna atmosfera

ADP – adenozin difosfat

ATP – adenozin trifosfat

BK_{Ca} – o kalciju ovisni kalijevi kanali velike vodljivosti (engl. *large-conductance calcium-activated potassium channels)*

CO_2 – ugljikov dioksid

Ca^{2+} – kalcij

CTRL skupina – kontrolna skupina štakora

ED – endotelna disfunkcija (engl. *endothelial dysfunction*)

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

EDHF – endotelni hiperpolarizirajući čimbenici (engl. *endothelial-derived hyperpolarization factors*)

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

EETs – epoksiekozatrienoična kiselina (engl. *epoxyeicosatrienoic acid*)

eNOS – endotelna dušik-oksid sintaza (engl. *endothelial nitric-oxide synthase*)

ET-1 – endotelin-1 (engl. *endothelin-1*)

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

H_2O_2 – vodikov peroksid

HBO_2 – hiperbarična oksigenacija

IK_{Ca} – o kalciju ovisni kalijevi kanali srednje vodljivosti (engl. *intermediate-conductance calcium-activated potassium channels*)

K^+ – kalij

K_{ATP} kanali – adenozin trifosfat-kontrolirani kalijevi kanali

K_{Ca} – o kalciju ovisni kalijevi kanali (engl. *calcium-activated potassium channels)*

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

LPO – lipidna peroksidacija

Mg ADP – magnezijev adenozin difosfat

Mg ATP – magnezijev adenozin trifosfat

NO – dušikov oksid (engl. *Nitric oxide*)

O_2 - kisik

PGI_2 – prostaglandin I_2/prostaciklin

pO_2 – parcijalni tlak kisika

PSS otopina – fiziološka slana otopina (engl. *physiological salt solution*)

ROS – reaktivni kisikovi spojevi (engl. *reactive oxygen species*)

SD – standardna devijacija

SD štakori – Sprague-Dawley štakori

SK_{Ca} – o kalciju ovisni kalijevi kanali male vodljivosti (engl. *small-conductance calcium-activated potassium channels)*

SUR – receptori sulfonilureje (engl. *sulfonylurea receptors)*

TXA_2 – tromboksan A_2 (engl. *thromboxane A_2*)

1. UVOD

1.1.Hiperbarična oksigenacija

Hiperbarična oksigenacija (HBO_2) znanstveno je utemeljena metoda liječenja udisanjem 100 %-tnog kisika (O_2) pri tlaku većem od jedne atmosfere (1atm). Tijekom terapije pacijent je smješten u hiperbaričnoj komori s ciljem ispravljanja nedostatka O_2 u tkivima koja su hipoksična (1). Njena široka primjenjivost proizlazi iz činjenice da se tijekom hiperbarične oksigenacije kisik doprema pod visokim tlakom pri čemu se povećavaju tkivni i arterijski parcijalni tlak kisika (pO_2) te se povećava doprema O_2 do tkiva, što poboljšava oksigenaciju i smanjuje tkivna oštećenja (2). U početku se HBO_2 primjenjivala za liječenje dekompresijske bolesti ronioca, a danas se koristi kao pomoć u liječenju šireg spektra bolesti i stanja kao što su dijabetes, plinska embolija, opekline, smrzotine te infekcije, poput plinske gangrene i meningokokne sepse (3, 4, 5). Također, HBO_2 poboljšava stanje nakon srčanog i moždanog udara, a koristi se i u liječenju neurodegenerativnih bolesti, poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti (6). Međutim, HBO_2 dodatna je terapija i potrebno ju je kombinirati sa standardnim terapijskim i kirurškim postupcima jer sama po sebi nije dovoljno učinkovita za liječenje navedenih patoloških stanja i bolesti (7).

1.2.Reaktivni kisikovi spojevi i oksidativni stres

Kisik je molekula neophodna za život svih aerobnih organizama. Tijekom metaboličkih procesa iz molekularnog kisika nastaju slobodni kisikovi radikali, poznati kao reaktivni kisikovi spojevi (engl. *reactive oxygen species* - ROS) (8). U ograničenim količinama nisu štetni, štoviše sastavni su dio normalnog metabolizma i u organizmu imaju niz važnih fizioloških funkcija. Uključeni su u veliki broj staničnih procesa, sudjeluju u sintezi nekih hormona, signalizaciji među molekulama kao i u regulaciji transkripcije (9). Pomoću antioksidansa koji u organizmu imaju funkciju neutraliziranja i uklanjanja radikala, postiže se ravnoteža produkcije i eliminacije ROS-a i organizam se suprotstavlja potencijalnoj opasnosti nastanka oksidativnog stresa (8). Oksidativni stres stanje je praćeno prekomjernom količinom reaktivnih kisikovih spojeva s brojnim štetnim učincima na organizam. Dovodi do oštećenja staničnih struktura, ubrzanog staničnog starenja, nastanka mnogih kroničnih i malignih bolesti te naposlijetku i stanične smrti (9, 10). Može nastati zbog manjka antioksidansa, čime se narušava ravnoteža između oksidanata i antioksidanata ili pak nastaje zbog povećanog stvaranja ROS-a (8).

Prilikom hiperoksije, odnosno pri izlaganju visokim pO_2 kao što je slučaj u hiperbaričnoj komori, također dolazi do povećanog stvaranja ROS-a, što između ostalog utječe na

vaskularnu funkciju i strukturu (7, 11, 12). Rezultati istraživanja utjecaja hiperbarične terapije na vaskularnu funkciju koje su na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek proveli Drenjančević i suradnici, pokazali su da proizvodnja ROS-a ovisi o primjenjenom protokolu izlaganja stopostotnom kisiku u barokomori (13). Naime, u slučaju akutne HBO_2 (izloženost 100 %-tnom O_2, 2 h na 2,0 atm) mjerenjem razine lipidne peroksidacije (LPO) dokazan je povećani oksidativni stres u plazmi zdravih Sprague-Dawley (SD) štakora (13). LPO reakcija je oksidacije nezasićenih masnih kiselina potaknuta reaktivnim kisikovim spojevima, a njezina pojava pokazatelj je patološkog oksidativnog stresa (14). S druge strane, intermitentno izlaganje HBO_2 (četiri uzastopna dana izlaganja 100 %-tnom kisiku, također 2 h na 2,0 atm te peti dan žrtvovanje eksperimentalnih životinja) nema utjecaja na razinu oksidativnog stresa, ali je uočeno da potiče produkciju dušikovog oksida (engl. *nitric oxide* – NO) – jednog od najvažnijih endotelnih čimbenika relaksacije te na taj način poboljšava samu vazorelaksaciju kod zdravih i dijabetičnih štakora (13). Također, rezultati ranijih istraživanja pokazali su da intermitenta hiperbarična oksigenacija, osim što utječe na vaskularnu funkciju i strukturu, smanjuje edem tkiva i inhibira apoptotičke puteve (4, 15 – 17). Mihaljević i suradnici u svom istraživanju dokazali su povećani antioksidativni kapacitet prilikom izlaganja intermitentnoj HBO_2 što je imalo povoljan učinak na očuvanje vaskularne relaksacije. S druge strane, akutna hiperbarična oksigenacija dovela je do povećane produkcije superoksida i povećanog oksidativnog stresa što je za posljedicu imalo narušenu vazodilataciju (4).

1.3.Endotel i njegova uloga u kontroli vaskularnog tonusa

Endotel je važan, kompleksan organ visoke biološke dinamike koji oblaže unutarnji dio krvnih žila čitavog krvožilnog sustava, od srca sve do najmanjih kapilara, a sudjeluje u nizu metaboličkih aktivnosti (18). Sastoji se od jednog sloja endotelnih stanica i subendotelnog vezivnog tkiva. Endotelne stanice čine polupropusnu barijeru za prijenos molekula iz krvi u okolna tkiva te imaju ključnu ulogu u regulaciji vaskularnog tonusa i vaskularne homeostaze (19, 20). Naime, normalnu funkciju endotela karakterizira sposobnost otpuštanja vazoaktivnih tvari u odgovoru na različite podražaje kao i u odgovoru na naglu promjenu protoka krvi (21). Na taj način endotelne stanice mijenjaju stupanj vazodilatacije, odnosno vazokonstrikcije. Također, stanice endotela imaju značajnu ulogu u regulaciji procesa koagulacije, točnije inhibiciji agregacije trombocita, angiogenezi, migraciji leukocita te sprječavanju nastanka upalnih procesa, a njihova metabolička aktivnost pak ovisi o vrsti i veličini krvne žile koju oblažu (22). Endotel se zapravo opisuje kao zaseban endokrini organ, što najbolje ukazuje na

kompleksnost funkcija endotelnih stanica i njihovu ključnu ulogu u očuvanju vaskularne homeostaze (23).

Najvažniji vazodilatatori odnosno endotelni čimbenici relaksacije (engl. *endothelium-derived relaxing factors* – EDRF) jesu NO, prostaglandin I_2 (PGI_2) i endotelni hiperpolarizirajući čimbenici (engl. *endothelial-derived hyperpolarization factors* – EDHF) (24). Podražaj mehaničkog žilnog stresa, neurotransmitera i hormona dovode do njihovog oslobađanja, a većina ih se oslobađa kao odgovor na povećanu unutarstaničnu koncentraciju kalcija (Ca^{2+}) (25). Među endotelnim čimbenicima relaksacije ističe se NO, s ključnom ulogom u održavanju bazalnog vaskularnog tonusa (26). Sintetizira se u endotelu reakcijom iz aminokiseline L-arginina u prisutnosti katalizatora endotelne dušik-oksid sintaze (engl. *Endothelial nitric-oxide synthase* – eNOS) (24). Kao što je spomenuto, sinteza NO-a ubrzava se u slučaju povećanja koncentracije Ca^{2+} u stanici (25). Osim uloge ključnog vazodilatatora, NO ima antiproliferativni učinak te inhibira zgrušavanje krvi, dijapedezu leukocita i oksidaciju lipoproteina male gustoće (engl. *low-density lipoproteins* – LDL). Smanjena bioraspoloživost NO-a dovodi do vazokonstrikcije i posljedično smanjenja promjera krvnih žila, povećava stimulaciju upale u stijenkama krvnih žila, pridonosi aktivaciji trombocita te je jedan od vodećih uzroka nastanka endotelne disfunkcije (engl. *endothelial dysfunction* – ED) (27). Tromboksan A_2 (engl. *thromboxane A_2* – TXA_2), ROS i endotelin-1 (engl. *endothelin-1* – ET-1) najvažniji su vazokonstriktori tj. endotelni čimbenici kontrakcije (engl. *endothelial-derived constricting factors* – EDCF) (24).

Stanje oštećenog endotela i poremećene endotelne funkcije naziva se endotelna disfunkcija (28). Karakteristični fenotip ED-e podrazumijeva smanjenu sposobnost vazodilatacije te promjenu antiinflamatornih i antikoagulantnih svojstava što uključuje smanjenu sintezu čimbenika agregacijsko-koagulacijskog puta kao i smanjenu sposobnost sprječavanja nastanka upalnih procesa (18). Procjena endotelne funkcije važna je kako bi se na vrijeme otkrila oštećenja u stijenkama krvnih žila kod pacijenata s rizikom razvoja kardiovaskularnih, cerebrovaskularnih te metaboličkih i imunoloških bolesti, poput ateroskleroze, arterijske hipertenzije, dijabetesa te srčanog i moždanog udara (28). Čimbenici rizika za razvoj i progresiju navedenih bolesti upravo su i patofiziološki faktori koji pogoduju nastanku endotelne disfunkcije. Neki od spomenutih čimbenika rizika jesu nedovoljna tjelesna aktivnost, pušenje, pretjerana konzumacija alkohola, psihički stres te nepravilna prehrana – prekomjeran unos soli, šećera, loših masti, konzervansa, umjetnih bojila i sladila (18).

1.4.Protokom potaknuta dilatacija

Jedan od prvih znakova endotelne disfunkcije jest smanjena razina protokom potaknute dilatacije (engl. *flow-induced dilatation* – FID) (29). Protokom potaknuta dilatacija mehanizam je regulacije tonusa glatkog mišićja krvnih žila, ovisan je o endotelu i važan za održavanje vaskularne homeostaze (30). Mjerenje navedenog mehanizma prvi je opisao Schretzenmayr još 1933. proučavajući promjenu žilnog promjera na femoralnoj arteriji psa (31). Studije na pokusnim laboratorijskim životinjama pokazale su kako se u slučaju povećanja krvnog protoka promjer krvne žile povećava samo ako je endotel očuvan (21) te je stupanj vazodilatacije uzrokovane naglim porastom protoka obrnuto proporcionalan težini endotelne disfunkcije (32). Na temelju proučavanja mehanizma u raznim krvnim žilama proizašao je zaključak kako protokom potaknuta dilatacija ovisi o veličini i vrsti krvne žile (21, 33).

Protok kroz krvne žile dovodi do povećanja sile smicanja što stimulira endotel krvnih žila na oslobađanje ranije spomenutih endotelnih vazoaktivnih medijatora – NO, PGI_2, EDHF(34). Smanjena razina ključnog vazodilatatora, NO-a, dovodi do oštećenja endotelne funkcije što se pak očituje u smanjenoj razini protokom potaknute dilatacije (35). Kako je ranije spomenuto, razina endotelnog NO-a smanjuje se kod povećanog oksidativnog stresa čiji je nastanak dokazan u slučaju akutne hiperbarične oksigenacije, čime se ujedno smanjuje i FID-a (13, 14). Narušenu protokom potaknutu dilataciju koja nastaje zbog smanjenja biodostupnosti NO-a endotel nastoji kompenzirati povećanim oslobađanjem ostalih endotelnihčimbenika relaksacije poput PGI_2 i EDHF (30). Neke od važnijih molekula koje mogu djelovati kao EDHF u organizmu su ioni kalija (K^+), epoksieikozatrinoična kiselina (engl. *epoxyeicosatrienoic acid* – EET) i vodikov peroksid (H_2O_2), a djeluju na način da povećavaju vodljivost K^+ što dovodi do depolarizacije glatkih mišićnih stanica i posljedično vazorelaksacije(36).

1.5.Ionski kanali

Ionski kanali proteinski su kompleksi smješteni u staničnim membranama, a omogućuju selektivni prijenos iona kroz membranu u svim stanicama organizma (37). Stanične membrane tanke su opne koje obavijaju vanjski dio stanice te tako odvajaju i štite unutrašnjost stanice od utjecaja izvanstaničnog prostora. Selektivno su propusne što znači da zadržavaju tvari koje su stanici korisne i potrebne, a izbacuju ili zadržavaju u izvanstaničnom prostoru one štetne (38). Osnova građe svake biomembrane je fosfolipidni dvosloj koji nije lako propustan za polarne molekule poput aminokiselina ili iona stoga je njihov prolaz moguć isključivo specifičnim

proteinskim kanalima, točnije ionskim kanalima (37). Ionske kanale odlikuju dva vrlo važna svojstva. Prvo važno svojstvo je njihova selektivnost – propusni su samo za određenu vrstu pozitivno ili negativno nabijenih iona, a drugo je mogućnost otvaranja i zatvaranja ovisno o specifičnom podražaju (39). S obzirom na podražaj koji dovodi do njihove aktivacije razlikujemo više vrsta ionskih kanala (40). One regulirane promjenom potencijala na membrani nazivamo naponski kanali od kojih se većina aktivira membranskom depolarizacijom (37). Neki od najvažnijih ionskih naponskih kanala jesu natrijevi (Na), kalijevi (K), kalcijevi (Ca) te kloridni (Cl) kanali. Zatim razlikujemo kanale regulirane ligandom kao što su o kalciju ovisni kalijevi kanali (engl. *calcium-activated potassium channels* – K_{Ca}). Ligand je atom, ion ili molekula čije vezanje na specifično vezno mjesto na kanalu uzrokuje konformacijsku promjenu strukture proteina i dovodi do otvaranja kanala (39). Kanali regulirani mehaničkim naprezanjem treća su vrsta ionskih kanala. Otvaraju se i zatvaraju pod utjecajem tlaka, naprezanja i sile smicanja (40).

Dominantni ionski kanali u stanicama vaskularnog glatkog mišićja jesu kalijevi kanali čija aktivnost sudjeluje u regulaciji vaskularnog tonusa i određivanju membranskog potencijala (37). Poznato je kako povećana unutarstanična koncentracija Ca^{2+} u mišićnim stanicama uzrokuje kontrakciju. Međutim, u stanicama vaskularnog glatkog mišićja povišena razina kalcija uzokuje otvaranje o kalciju ovisnih kalijevih kanala što omogućuje istjecanje K^+ iz stanice i rezultira hiperpolarizacijom endotelnih stanica (39). Hiperpolarizacija sprječava ulazak Ca^{2+} u endotelnu stanicu na način da inhibira kalcijeve kanale te posljedično dolazi do dilatacije krvne žile (36). Prvi koji je uvidio povezanost razine kalcija s propusnošću kalija kroz staničnu membranu je Gardos 1958. godine (41). O kalciju ovisne kalijeve kanale dijelimo u tri podtipa: o kalciju ovisni kalijevi kanali velike vodljivosti (engl. *large-conductance calcium- activated potassium channels* – BK_{Ca}), o kalciju ovisni kalijevi kanali srednje vodljivosti (engl. *intermediate-conductance calcium-activated potassium channels* – IK_{Ca}) i o kalciju ovisni kalijevi kanali male vodljivosti (engl. *small-conductance calcium-activated potassium channels* – SK_{Ca}) (42). Hughes i suradnici proučavali su ulogu BK_{Ca} kanala u promjenjenoj vazoreaktivnosti nakon hipoksije na muškim Sprague-Dawley štakorima. Jedna skupina štakora je u uvom istraživanju izložena hipoksiji tijekom 48 sati pri tlaku od 380 mmHg, dok je druga skupina uključivala zdrave, netretirane štakore. Ispitivači su pretpostavili kako povećana aktivnost BK_{Ca} kanala doprinosi odgovoru na oslabljenu vazokonstrikciju uzrokovanu dugotrajnom izloženošću hipoksiji. Inhibicijom ovih kanala vazokonstrikcijski odgovor krvnih žila je obnovljen, što ukazuje na ulogu BK_{Ca} kanala na

promjenjenu vazoreaktivnost prilikom hipoksije (42). Također, BK_{Ca} kanali su proučavani su na modelu *knockout* miševa, pri čemu je u odsutnosti BK_{Ca} kod eksperimentalnih životinja dokazan povišeni srednji arterijski tlak i vaskularni tonus što ukazuje na ulogu o kalciju ovisnih kalijevih kanala velike vodljivosti u vazorelaksaciji (43).

U važne ionske kanale vaskularnog glatkog mišićja ubrajamo i adenozin trifosfat-kontrolirane kalijeve kanale (K_{ATP} kanali) (37). Sastoje se od četiri Kir6.2-podjedinice koje tvore pore kanala i četiri pripadajuće regulatorne podjedinice receptora sulfonilureje (engl. *sulfonylurea receptors* – SUR). SUR1-podjedinice najvećim dijelom prisutne su u gušterači, SUR2A u srcu i skeletnim mišićima te SUR2B-podjedinice u mozgu i glatkim mišićima (44). Vezanjem na SUR podjedinice, magnezijev adenozin trifosfat (Mg ATP) i magnezijev adenozin difosfat (Mg ADP) dovode do aktivacije kanala uzrokujući vazodilataciju, dok adenozin trifosfat (ATP) zatvara kanal vezanjem na Kir6.2-podjedinice (44). Osim kontrole vaskularnog tonusa, imaju još niz važnih staničnih funkcija: sudjeluju u procesu izlučivanja inzulina u beta stanicama otočića gušterače, imaju zaštitnu ulogu u srčanim miocitima i neuronima tijekom ishemije i hipoksije (38). U fiziološkim uvjetima K_{ATP} kanali su zatvoreni, a njihova aktivacija, do koje dolazi zbog smanjenja staničnog ATP-a, u ishemiji prilikom srčanog i moždanog udara povezana je s njihovom protektivnom ulogom. Naime, ključni uzrok stanične smrti u ishemiji jest povećana koncentracija unutarstaničnog kalcija, a otvaranje K_{ATP} kanala u ishemiji sprječava otvaranje kalcijevih kanala i ulazak Ca^{2+} u stanicu što ima kardioprotektivni učinak (44). Uloga tih kanala prvo je proučavana na srčanim miocitima zamorca (45). Njihova zaštitna uloga potaknula je znanstvenike i farmaceute na proizvodnju lijekova koji u sebi sadrže aktivatore kalijskih kanala, međutim zbog nuspojava koje su izazivali poput aritmija i hipotenzije nisu se zadržali u kliničkoj uporabi (44).

2. HIPOTEZA

Osnovna je pretpostavka ovoga istraživanja da intermitentna hiperbarična oksigenacija neće značajno utjecati na aktivnost ionskih kanala koji su uključeni u mehanizme vaskularne reaktivnosti kod zdravih Sprague-Dawley (SD) štakora.

3. CILJ

Cilj je ovoga istraživanja utvrditi djelovanje intermitentne hiperbarične oksigenacije na aktivnost ionskih kanala kod pokusnih životinja – štakora soja Sprague-Dawley, metodom mjerenja protokom potaknute dilatacije.

4. MATERIJALI I METODE

4.1.Ustroj studije

Provedeno istraživanje eksperimentalna je studija na pokusnim laboratorijskim životinjama – muški SD štakori.

4.2.Pokusni animalni modeli

Ovo eksperimentalno istraživanje provedeno je na Medicinskom fakultetu u Osijeku, u Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije. Za istraživanje su korišteni modeli izoliranih krvnih žila mozga SD štakora, koji su u vlasništvu Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek. Štakori iz kojih su izolirani modeli za provedbu istraživanja bili su starosti od devet do jedanaest tjedana. U svrhu provedbe istraživanja, SD štakori bili su podijeljeni u 2 skupine:

1) CTRL skupina – kontrolna skupina zdravih, netretiranih štakora (N = 12)
2) 4D – HBOT skupina – skupina štakora koji su bili izloženi intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji kroz četiri uzastopna dana te peti dan žrtvovani (N = 6)

4.3.Izlaganje životinja intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji

Štakori soja Sprague-Dawley su četiri uzastopna dana, prema standardiziranom protokolu, bili izloženi djelovanju intermitentne terapije hiperbaričnom oksigenacijom (13). Izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji započelo je smještanjem pokusnih životinja u barokomoru (Rekompresijska komora za pokuse 110 L, proizvođač Đuro Đaković, Aparati d.d., Slavonski Brod) (Slika 1). Uslijedilo je otvaranje kompresijskog ventila i puštanje kisika u komoru (15 min kompresije na 2,0 atm), uz zatvoren dekompresijski ventil. Pri tlaku od 2,0 atm zatvorio se i kompresijski ventil te su štakori tijekom dva sata bili izloženi djelovanju 100 %-tnog kisika. Radi upijanja izdahnutog ugljikovog dioksida (CO_2), u barokomoru je zajedno sa životinjskim modelima stavljena i mala količina granula kalcij-hidroksida, natrij-hidroksida te etilvioleta (Draegersorb 800 Plus, DraegerMedical). Nakon dva sata, uz otvaranje dekompresijskog ventila uslijedilo je 15 min dekompresije. Eksperimentalne životinje su se hiperbaričnom kisiku tijekom četiri uzastopna dana izlagale jednom dnevno, otprilike u isto vrijeme, a bile su pri svijesti i imale dostupnu hranu. Peti su dan, bez izlaganja HBO_2, pokusne životinje bile žrtvovane. Životinje su najprije bile izvagane te anestezirane kombinacijom ketamina 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2ml, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma), a potom je uslijedila

dekapitacija (19).

Slika 1. Rekompresijska komora za pokuse – 110 L, proizvođač Đuro Đaković, Aparati d.d., Slavonski Brod (izvor: original autorice ovog rada)

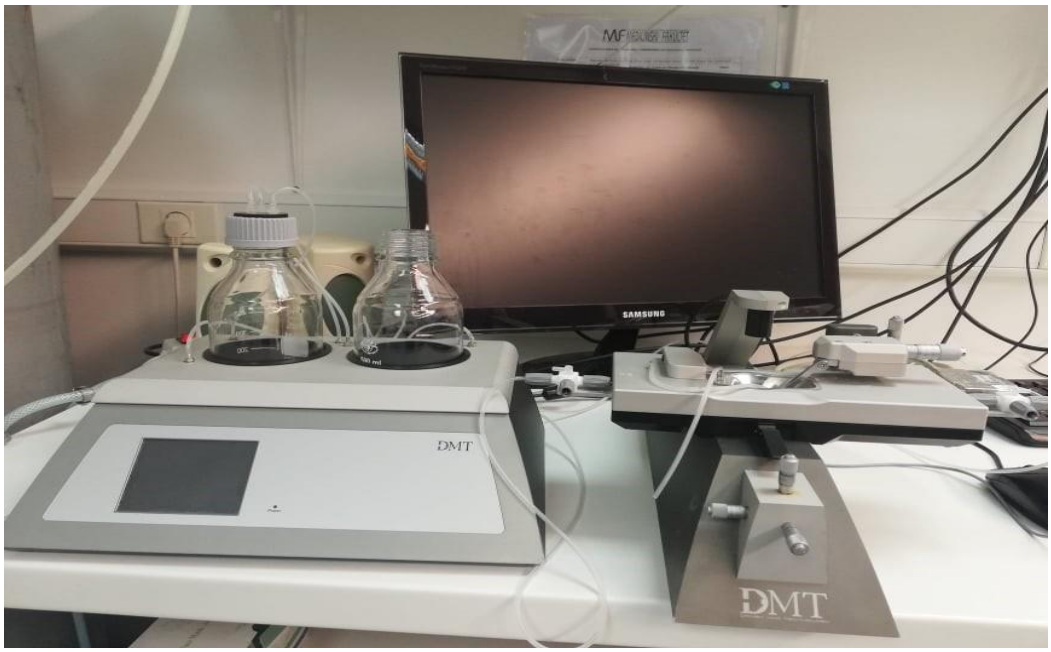
4.4.Mjerenje protokom potaknute dilatacije središnje moždane arterije

Nakon dekapitacije, uslijedila je izolacija središnje moždane arterije pomoću operacijskog mikroskopa i mikrokirurškog pribora. Središnja moždana arterija štakora model je u vlasništvu Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku, na kojem se određivala protokom potaknuta dilatacija na sustavu tlačnog miografa (The Myograph System, DMT) (Slika 2). Izolirana moždana arterija očišćena je od vezivnog tkiva i zatim postavljena između dviju staklenih mikropipeta (vanjskog promjera ~ 100-200 μm) smještenih u komorici ispunjenoj toplom (37 ˚C) fiziološkom otopinom (PSS, pH = 7.4 ± 0.05; sastava (u mM / l): 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.17 MgSO4, 1.6CaCl2, 1.18 NaH2PO4, 24 NaHCO3, 0.026 EDTA i 5.5 glukoze).

Nakon postavljanja u komoricu uslijedila je inkubacija krvne žile u trajanju od 60 minuta pri tlaku Δ80 mmHg (P1 = 80 mmHg, P2 = 0 mmHg) radi procjene njezinog bazalnog promjera. Žila je snimana infracrvenom kamerom, a slika se prikazivala na monitoru. Bilježile su se promjene promjera žile pomoću softvera Pressure Myograph System Model 110P MyoView Version 1.2.0 DMT (Danish Myo Technology). Nakon inkubacije i mjerenja bazalnog promjera, krvna žila bila je izložena protoku koji je postignut istodobnim

promjenama ulaznog (inflow) i izlaznog (outflow) tlaka. Gradijent tlaka doveo je do nastanka protoka pripremljene PSS otopine kroz postavljenu izoliranu žilu te se mjerila protokom potaknuta promjena promjera žile bazalno koja se postiže različitim gradijentima tlaka (Δ10, Δ20, Δ40, Δ60 i Δ100 mmHg) te promjena promjera u prisutnosti antagonista ionskih kanala, točnije BK_{Ca} antagonista i K_{ATP} antagonista. Kako bi se izmjerio maksimalni promjer središnje moždane arterije, PSS otopina na kraju eksperimentalnog protokola zamijenjena je PSS otopinom bez iona kalcija. U nedostatku Ca^{2+} dolazi do maksimalne dilatacije što pak omogućava mjerenje maksimalnog promjera krvne žile. Podaci krvnih žila koje nisu pokazale značajnu razinu aktivnog tonusa (oko 50 %) izuzeti su iz obrade.

Svi eksperimentalni postupci bili su usklađeni s europskim smjernicama za skrb i primjenu laboratorijskih životinja (direktiva 86/609). Također, bile su poduzete sve mjere da bi se spriječila patnja životinja, uključujući načelo zamjene, smanjenja i poboljšanja (3R). Sva istraživanja odobrena su za provedbu od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek te Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (Rješenje Ministarstva poljoprivrede rješenje za rad na životinjama od kojih su materijali uzeti, KLASA: UP/I-322-01/19-01/120; URBROJ: 525-10/0543-20-3). Istraživanje je dio projekta IP-2-MEFOS-2019 pod naslovom: „Utjecaj hiperbarične oksigenacije na mehanizme vaskularne reaktivnosti u mikrocirkulaciji Sprague-Dawley štakora i u staničnim kulturama", odobrenog od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek 2019. god. (KLASA: 602- 04/19-08/04; URBROJ: 2158-61-07-19-137).



Slika 2. Sustav tlačnog miografa (izvor: original autorice ovog rada)

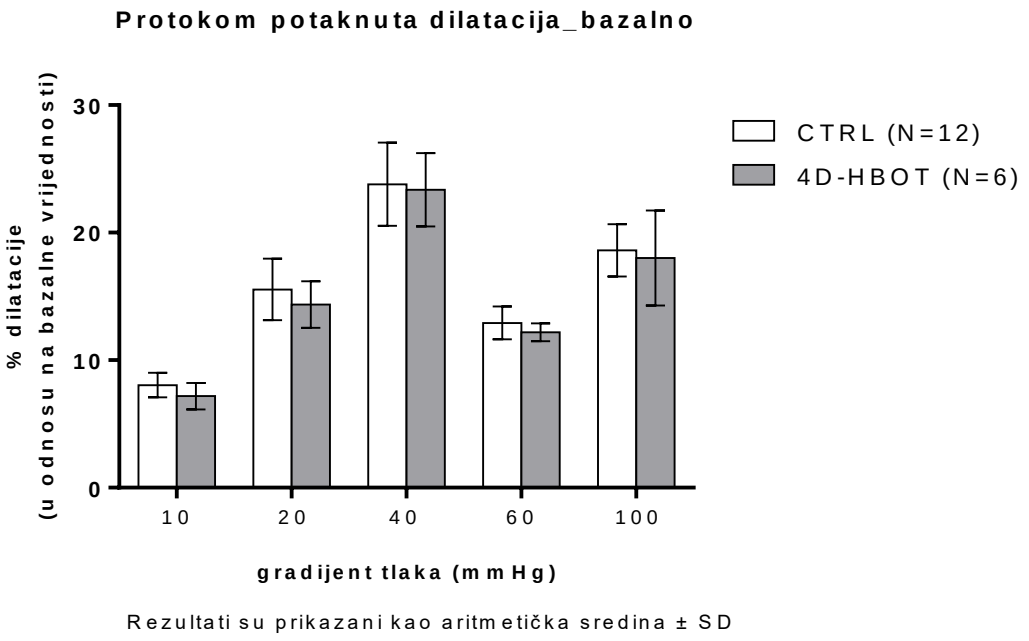
4.5.Statističke metode

Za statističku analizu korišten je program SigmaPlot (verzija 11.2, Systat Software, Inc.) te za dodatne analize i grafove program GraphPad Prism5. Svi rezultati prikazani su kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (SD). Protokom posredovana dilatacija te dilatacija koju uzrokuju BKCa antagonist i K-ATP antagonist izražene su u postotku u odnosu na bazalne vrijednosti izmjerene pri Δ0 mmHg. Odgovor krvne žile na protok analiziran je pomoću Two- Way ANOVA testa za ponavljane uzorke (engl. repeated measures ANOVA) kako bi se ispitala razlika u vaskularnoj reaktivnosti između kontrolne i pokusne skupine, tj. kako bi se odredio utjecaj intermitentne hiperbarične oksigenacije na aktivnost ionskih kanala. Razina značajnosti korištena za ocjenu značajnosti dobivenih rezultata postavljena je na $P < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Protokom potaknuta dilatacija središnje moždane arterije kontrolne skupine i skupine izložene intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji

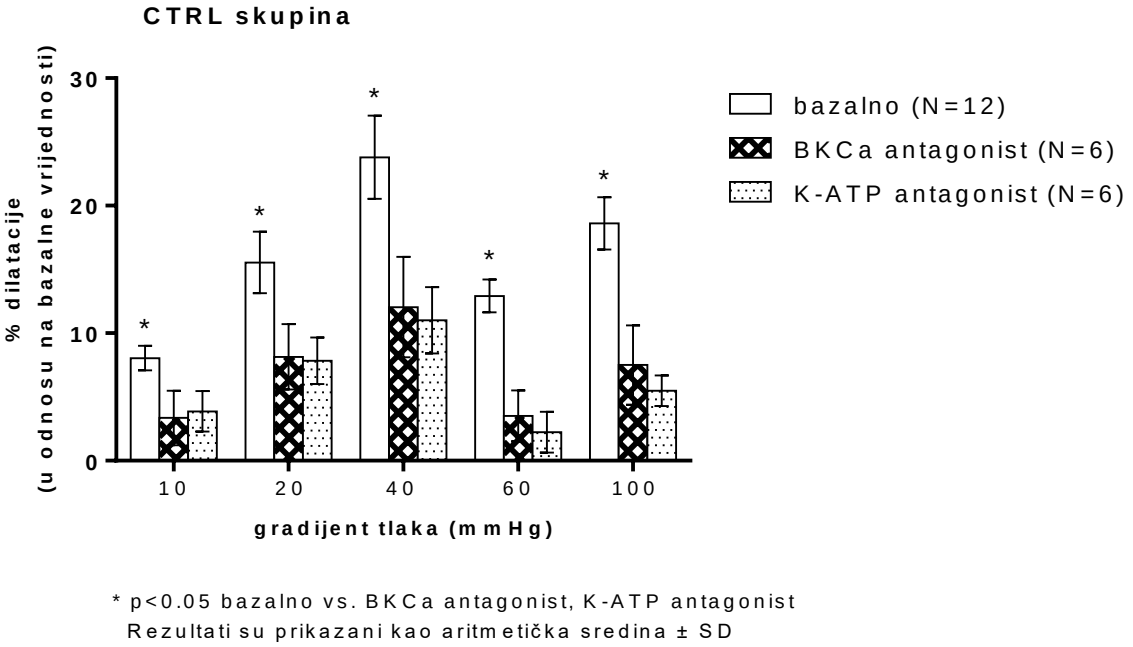
Protokom potaknuta dilatacija središnje moždane arterije kontrolnih štakora i štakora koji su bili izloženi intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji je podjednaka, bez statistički značajne razlike (P > 0,05), pri svakom gradijentu tlaka (Slika 3).



Slika 3. Protokom potaknuta dilatacija središnje moždane arterije CTRL (N=12) i 4D-HBOT (N=6) skupine životinja, pri različitim gradijentima tlaka, izražen kao postotak (%) dilatacije u odnosu na bazalne vrijednosti.

5.2. Protokom potaknuta dilatacija središnje moždane arterije kontrolne skupine u prisutnosti antagonista ionskih kanala

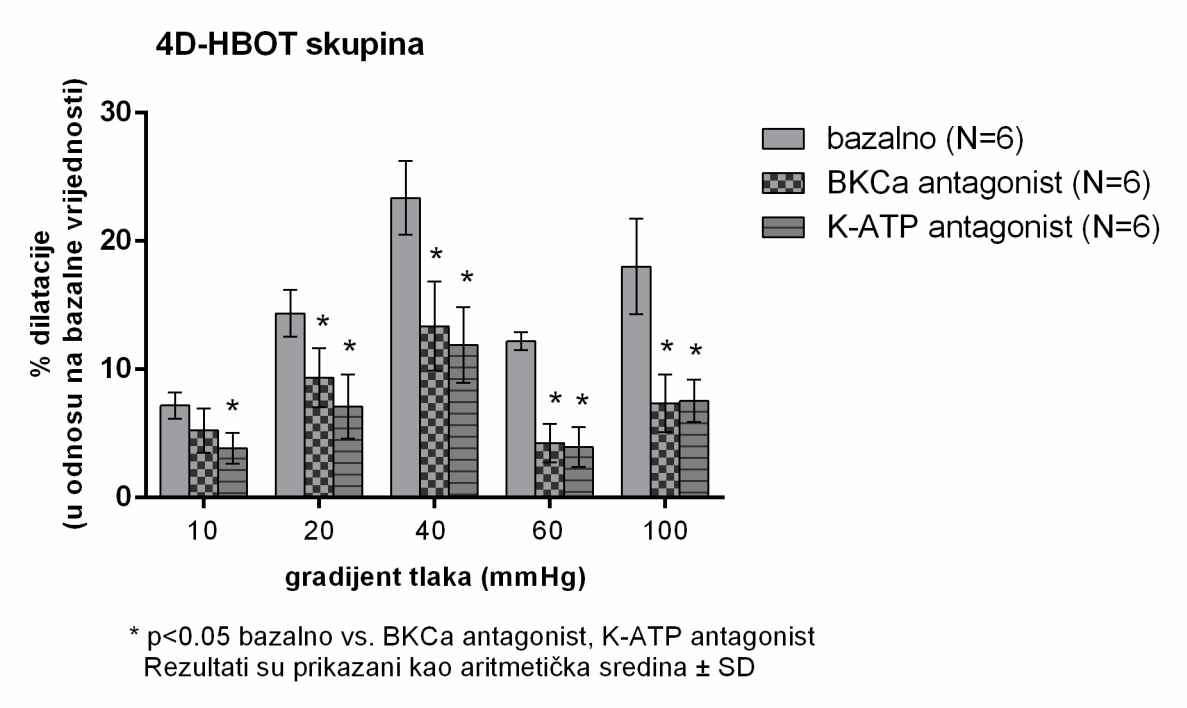
U kontrolnoj skupini životinja, protokom potaknuta dilatacija značajno je smanjena u prisutnosti antagonista ionskih kanala – BK_{Ca} antagonista i K_{ATP} antagonista, u odnosu na bazični odgovor, pri svakom gradijent u tlaka (Slika 4).



Slika 4. Utjecaj antagonista ionskih kanala (BK_{Ca} antagonista i K_{ATP} antagonista) na protokom potaknutu dilataciju središnje moždane arterije kontrolnih netretiranih štakora pri različitim gradijentima tlaka, izražen kao postotak (%) dilatacije u odnosu na bazalne vrijednosti.

5.3.Protokom potaknuta dilatacija središnje moždane arterije eksperimentalne skupine podvrgnute intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji u prisutnosti antagonista ionskih kanala

U skupini životinja koje su bile izložene intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji, 4D – HBOT skupini, protokom potaknuta dilatacija središnje moždane arterije značajno je smanjena u prisutnosti antagonista ionskih kanala – BK_{Ca} antagonista i K_{ATP} antagonista u odnosu na bazični odgovor. Protokom potaknuta dilatacija u prisutnosti K_{ATP} antagonista značajno je smanjena pri svim ispitivanim gradijentima tlaka (Δ10, Δ20, Δ40, Δ60, Δ100 mmHg), dok je FID u prisutnosti BK_{Ca} antagonista smanjena pri svim gradijentima tlaka, osim pri Δ10 mmHg (Slika 5).



Slika 5. Utjecaj antagonista ionskih kanala (BK_{Ca} antagonist i K_{ATP} antagonist) na protokom potaknutu dilataciju središnje moždane arterije štakora izloženih intermitentnoj terapiji hiperbaričnom oksigenacijom, pri različitim gradijentima tlaka, izražen kao postotak (%) dilatacije u odnosu na bazalne vrijednosti.

6. RASPRAVA

Provedeno istraživanje ispitalo je utjecaj primjene intermitentne hiperbarične oksigenacije na ulogu ionskih kanala (BK_{Ca} i K_{ATP}) u mehanizmima vaskularne reaktivnosti, na modelu središnje moždane arterije muških Sprague-Dawley štakora, mjerenjem protokom potaknute dilatacije. CTRL skupina štakora uključivala je zdrave, netretirane štakore, dok su štakori iz skupine 4D – HBOT bili podvrgnuti intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji. Ključna spoznaja ovog istraživanja je kako izlaganje intermitentnoj HBO_2 nema značajan utjecaj na protokom potaknutu dilataciju.

Utjecaj hiperbarične oksigenacije na mehanizme vaskularne reaktivnosti kod štakora soja Sprague-Dawley tema je većeg broja dosadašnjih istraživanja Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku (4, 13, 30). Hiperbarična oksigenacija, kao što je ranije objašnjeno, široko je primjenjivana metoda liječenja mnogih patoloških stanja i bolesti povezanih s hipoksijom jer udisanje 100 %-tnog kisika pri tlaku većem od jedne atmosfere poboljšava oksigenaciju hipoksičnog tkiva i smanjuje njegova oštećenja (1). Kisik, iako molekula neophodna za život, u velikim količinama predstavlja opasnost za organizam. Točnije, slobodni kisikovi radikali u prekomjernim količinama dovode do stanja oksidativnog stresa i posljedično poremećaja funkcije endotela krvnih žila (8). Povećana razina oksidativnog stresa uzrok je oslabljene o endotelu ovisne protokom potaknute dilatacije,što je pokazano i u studiji koja je ispitivala utjecaj visokoslane dijete na vaskularnu reaktivnost i nastavnak oksidativnog stresa (22). Također, oštećenje funkcije krvnih žila uzrokovano oksidativnim stresom dokazali su Drenjančević i suradnici istraživanjem na animalnim modelima u kojem su pokazali kako supresija angiotenzina II unosom povećane količine soli u organizam dovodi do povećane produkcije ROS-a (46). Naime, prilikom povećanog oksidativnog stresa, smanjuje se razina NO-a, a kako je upravo NO ključan čimbenik relaksacije, njegova smanjena biodostupnost dovodi do poremećenog bazalnog tonusa krvnih žila, smanjene vaskularne reaktivnosti i naposlijetku endotelne disfunkcije (27).

Izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji također može uzrokovati prekomjernu produkciju ROS-a i dovesti do stanja oksidativnog stresa što HBO_2 čini vrlo složenom metodom liječenja (8 – 10). S jedne strane, djelovanje visokih parcijalnih tlakova kisika poboljšava oksigenaciju hipoksičnog tkiva mnogih patoloških stanja, a s druge može uzrokovati brojne dišne i neurološke probleme (8). Drenjančević i suradnci u svom su istraživanju, provedenom na SD štakorima, došli do zaključka kako nastanak ROS-a pri visokim pO_2 ovisi o duljini izlaganja

terapiji hiperbaričnom oksigenacijom te o protokolu po kojem se terapija provodi (13.) Naime, u istraživanju je uspoređen utjecaj akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na razinu oksidativnog stresa. Kod štakora na kojima je primjenjen protokol četiri dana izlaganja 100 %-tnom kisiku, a peti dan žrtvovanje, terapija nije imala utjecaja na razinu oksidativnog stresa za razliku od štakora podvrgnutih akutnoj HBO_2 kod kojih se razina oksidativnog stresa povećala (13). Mihaljević i suradnici dokazali su kako izlaganje intermitentnoj HBO_2 čak potiče produkciju NO-a što ima povoljan učinak na vazorelaksaciju (4).

S obzirom da je endotelna disfunkcija jedan od glavnih i prvih pokazatelja razvoja kardiovaskularnih i metaboličkih bolesti, postoji potreba za rutinskim uvođenjem procjene endotelne funkcije u svrhu identifikacije rizičnih pojedinaca te praćenja terapijskog uspjeha, ali još uvijek ne postoje metode prikladne za svakodnevnu kliničku procjenu (47). Ipak, najbolje istražena i najčešće korištena metoda jest definiranje arterijske vazomotorike ovisne o endotelu, točnije mjerenje žilnog promjera promjenom krvnog protoka (48). Ova znastveno-istraživačka metoda, izvedena na pravilan način, predstavlja reprezentativnu mjeru endotelne funkcije organizma. Međutim, niti ova metoda ne smatra se rutinski primjenjivom (47).

Rezultati provedenog istraživanja nisu pokazali statistički značajnu razliku u bazičnom odgovoru na protokom potaknutu dilataciju u skupini životinja izloženoj intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji u odnosu na kontrolnu skupinu netretiranih životinja, što bi značilo kako intermitentno izlaganje HBO_2 ne utječe na FID. Kako bismo ispitali utjecaj hiperbarične okisgenacije na ulogu ionskih kanala u mehanizmu protokom potaknute dilatacije, koristili smo BK_{Ca} i K_{ATP} antagoniste. U prisutnosti i BK_{Ca} i K_{ATP} antagonista, značajno je smanjenja protokom potaknuta dilatacija, u odnosu na bazalne vrijednosti, u obje ispitivane skupine životinja, što potvrđuje značajnu ulogu BK_{Ca} i K_{ATP} kanala u mehanizmu FID-a. Stoga možemo zaključiti kako kod zdravih muških SD štakora intermitentna hiperbarična oksigenacija nema značajan utjecaj na protokom potaknutu dilataciju te su BK_{Ca} i K_{ATP} kanali uključeni u mehanizme FID-a, što potvrđuje hipotezu ovoga rada i u skladu je s rezultatima prijašnjih studija.

7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- ionski kanali BK_{Ca} i K_{ATP} imaju značajnu ulogu u bazalnom mehanizmu protokom potaknute dilatacije;
- intermitentna hiperbarična oksigenacija nema značajan utjecaj na protokom potaknutu dilataciju kod zdravih muških Sprague-Dawley štakora;
- ionski kanali BK_{Ca} i K_{ATP} imaju značajnu ulogu u posredovanju protokom potaknute dilatacije kod intermitentne hiperbarične oksigenacije.

8. SAŽETAK

Cilj: Odrediti djelovanje intermitentne hiperbarične oksigenacije na aktivnost ionskih kanala (BK_{Ca} i K_{ATP}) kod Sprague-Dawley štakora, metodom mjerenja protokom potaknute dilatacije.

Ustroj studije: Eksperimentalna studija na pokusnim laboratorijskim životinjama.

Materijali i metode: U svrhu provedbe istraživanja muški SD štakori podijeljeni su u dvije skupine: CTRL skupina – zdravi, netretirani štakori (N=12) i 4D – HBOT skupina – štakori izloženi intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (N=6). Štakori su HBO_2 bili izloženi tijekom četiri uzastopna dana (100 %-tni kisik, 2 h na 2,0 atm). Peti dan, bez izlaganja djelovanju terapije, štakori su izvagani, anestezirani, a potom je uslijedila dekapitacija i izolacija središnje moždane arterije – model na kojem se određivala protokom potaknuta dilatacija bazalno i u prisutnosti antagonista ionskih kanala (BK_{Ca} antagonist i K_{ATP} antagonist), pri različitim gradijentima tlaka.

Rezultati: Nije utvrđena statistički značajna razlika u odgovoru na protokom potaknutu dilataciju bazalno između CTRL i 4D – HBOT skupine štakora. U objema ispitivanim skupinama životinja, FID središnje moždane arterij u prisutnosti antagonista ionskih kanala značajno je smanjena u odnosu na bazični odgovor gotovo pri svim ispitivanim gradijentima tlaka.

Zaključak: Intermitentna hiperbarična oksigenacija nema značajan utjecaj na protokom potaknutu dilataciju kod SD štakora. Ionski kanali (BK_{Ca} i K_{ATP}) imaju važnu ulogu u bazalnom mehanizmu protokom potaknute dilatacije ali i nakon izlaganja intermitentnoj HBO_2, što je potvrđeno značajnim smanjenjem FID u prisutnosti antagonista ovih kanala u odnosu na bazični odgovor središnje moždane arterije u obje skupine životinja.

Ključne riječi: protokom potaknutadilatacija; intermitentna hiperbarična oksigenacija; ionski kanali; središnja moždana arterija

Istraživanje je dio projekta IP2-MEFOS-2019 pod naslovom: „Utjecaj hiperbarične oksigenacije na mehanizme vaskularne reaktivnosti u mikrocirkulaciji Sprague-Dawley štakora i u staničnim kulturama", voditeljice projekta dr.sc. Zrinke Mihaljević.

9. SUMMARY

Influence of intermittent hyperbaric oxygenation on the role of ion channels in vascular reactivity mechanisms in Sprague-Dawley rats

Objective: The main goal of this study was to determine the influence of intermittent hyperbaric oxygenation on ion channels (BK_{Ca} i K_{ATP}) activity in Sprague-Dawley rats, by flow-induced dilation (FID) measurement.

Study design: Experimental study on laboratory animals – Sprague-Dawley rats.

Materials and methods: Male SD rats were divided into two groups: CTRL group – control group of healthy, untreated rats (N = 12) and 4D - HBOT group - rats exposed to intermittent hyperbaric oxygenation (N = 6). Rats were exposed to HBO_2 for four days (100% oxygen, 2 h at 2,0 atm). Without exposure to a treatment, the rats were weighed and anesthetized on the fifth day. This was followed by decapitation and isolation of the middle cerebral artery - a model on which flow-induced dilation was determined – basal and in the presence of ion channel antagonists (BK_{Ca} antagonist i K_{ATP} antagonist), at different pressure gradients.

Results: No statistically significant difference in the basal response to FID between CTRL and 4D - HBOT group was found. In the presence of ion channel antagonists FID was significantly reduced in both groups of animals at each pressure gradients.

Conclusion: Intermittent hyperbaric oxygenation has no significant influence on flow-induced dilation in SD rats. Ion channels (BK_{Ca} and K_{ATP}) play an important role in the mechanisms of flow-induced dilatation as evidenced by a significant decrease of FID in the presence of channels antagonists relative to the middle cerebral artery basal response in both groups of animals.

Keywords: flow-induced dilatation; intermittent hyperbaric oxygenation; ion channels; middle cerebral artery

The research is part of the IP2-MEFOS-2019 project entitled: "Influence of hyperbaric oxygenation on the mechanisms of vascular reactivity in the microcirculation of Sprague-Dawley rats and in cell cultures", project leader Zrinka Mihaljević, PhD.

10. LITERATURA

1. Huang L, Boling W, Zhang JH. Hyperbaric oxygen therapy as adjunctive strategy in treatment of glioblastoma multiforme. Med Gas Res. 2018;8(1):24-28.
2. Gill AL, Bell CNA. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. QJM. 2004;97:385–395.
3. Verma R, Chopra A, Giardina C, Sabbisetti V, Smyth JA, Hightower LE i sur. Hyperbaric oxygen therapy (HBOT) suppresses biomarkers of cell stress and kidney injury in diabetic mice. Cell Stress Chaperones. 2015 May;20(3):495-505.
4. Mihaljević Z, Matić A, Stupin A, Barić L, Jukić I, Drenjančević Ines. 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 Apr 29;2018:7406027.
5. Kudchodkar BJ, Pierce A and Dory L. Chronic hyperbaric oxygen treatment elicitsan anti-oxidant response and attenuates atherosclerosisin apoE knockout mice. Atherosclerosis 2007; 193: 28–35.
6. 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.
7. Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. J Appl Physiol. 2009;106(3):988-995.
8. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Oxid Med Cell Longev. 2017; 2017: 8416763.
9. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. World Allergy Organ J. 2012 Jan; 5(1): 9–19.
10. Matschke V, Theiss C, Matschke J. Oxidative stress: the lowest common denominator of multiple diseases. Neural Regen Res. 2019 Feb;14(2):238-241.
11. 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.
12. Simsek K, Ay H, Topal T, Ozler M, Uysal B i sur. Long term exposure to repetitive hyperbaric oxygen results in cumulative oxidative stress in rat lung tissue. Inhal

Toxicol, 23(3):166–172,2011.

13. Drenjancevic I, Kibel A, Kibel D, Seric V, Cosic A. Blood pressure, acid-base and blood gas status and indicators of oxidative stress in healthy male rats exposed to acute hyperbaric oxygenation. Undersea Hyperb Med. 2013;40(4):319-28.
14. Živković M, Žarković K, Škrinjar Lj, Waeg G, Poljak-Blaži M, Borović Šunjić S, etal. ANew Method for Detection of HNE-histidine Conjugates in Rat Inflammatory Cells. CroatChem Acta 2005;78:91-98.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Drenckhahn D, Ness W. The endothelial contractile cytoskeleton. U: Born VRG, Schwartz CJ, ur.Vascular endothelium: physiology, pathology and therapeutic opportunities. Stuttgart: Schattauer, 1997; 1-26.
19. 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.
20. Félétou M. The Endothelium, Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. U: Granger N, Granger JP, urednici. Colloquium Series in Integrated System Physiology: From Molecule to Function to Disease. San Rafael: Morgan & Claypool Life Sciences; 2011.
21. Siddiqui A. Effects of Vasodilation and Arterial Resistance on Cardiac Output. J Clin Exp Cardiolog. 2011; 2: 170.
22. Durand MJ, Gutterman DD. Diversity in Mechanisms of Endothelium-Dependent Vasodilation in Health and Disease. Microcirculation 2013; 20(3):239–247.
23. Ingami T, Naruse M, Hoover R. Endothelium as an endocrine organ. Annu RevPhysiol 1995; 57:171-89.

24. Vogel RA. Nitric oxide availability in hypercholesterolaemia. U: Panza J. Cannon III RO, ur. Endothelium, nitric oxide, and atherosclerosis. New York: Futura Publishing Co, 1999:163-84.
25. Kang KT. Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension. Toxicol. Res. 2014; 30(3): 141–148.
26. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980; 288:373-6.
27. Cruz K, Hollenberg SM. Modifing leukocyte endothelial interactions in acute inflammatory models.Crit Care Med 2002; 30:1924-5.
28. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of Endothelial Function for the Clinical Cardiologist. Circulation 2002; 105:546-9.
29. Da Luz P, Libby P, Laurindo F, Chaga A. Endothelium and Cardiovascular Diseases: Vascular Biology and Clinical Syndromes, Chapter 9 - Vasoconstrictor Substances Produced by the Endothelium. 1. izd. Cambridge: Academic Press; 2018.
30. Ćosić A. i sur. Attenuated flow-induced dilatation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet. J Physiol. 2016; 594(17): 4917-31.
31. Schretzenmayr A. Uber Kreislaufregulatorische Voragne an den grossen Arterien bei der Muskelarbeit.Pfugers Arch 1933; 232:743-8.
32. Mirat J. Endotelna funkcija u kliničkoj praksi. Liječ Vjesn 2005; 127:82-5.
33. 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.
34. Larsen BT,Miura H, Hatoum OA, Campbell WB, Hammock BD, Zeldin DC, FalckJR, Gutterman DD. Epoxyeicosatrienoic and dihydroxyeicosatrienoic acids dilate human coronary arterioles via BK(Ca) channels: implications for soluble epoxide hydrolase inhibition. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006;290:H491–H499.
35. Koller A, Huang A. Impaired nitric oxide-mediated flow-induced dilation in arterioles of spontaneously hypertensive rats. Circ Res.1994;74:416-421.
36. Garland CJ, Dora KA. EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. Acta Physiol (Oxf). 2017; 219(1) :152-161.
37. Roux B. Ion channels and ion selectivty. Essays Biochem. 2017;61(2):201-209.

38. J. T.Menéndez, "Pore i ionski kanali reguliraju staničnu aktivnost", u Anales de laReal Academia Nacional de Farmacia, 2004., str. 2. 3.
39. Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF. Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. Compr Physiol. 2017;7(2):485-581.
40. anade SS, Syeda R, Patapoutian A. Mechanically Activated Ion Channels. Neuron. 2015;87(6):1162-1179.
41. Gardos G. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1958;30:653–654.
42. Hughes JM i sur. Novel role of endothelial BKCa channels in altered vasoreactivity following hypoxia. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010 Nov;299(5):H1439-50.
43. Cordeiro B, Terentyev D, Clements RT. BKCa channel activation increases cardiac contractile recovery following hypothermic ischemia/reperfusion. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2015;309(4):H625-33.
44. Girard CA, Shimomura K, Proks P i sur. Functional analysis of six Kir6.2 (KCNJ11) mutations causing neonatal diabetes. Pflugers Arch 2006;453(3):323–32.
45. Noma, A. (1983). "ATP-regulated K+ channels in cardiacmuscle". *Nature*. 305 (5930): 147–148.
46. 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. 2005 Apr; 45(4): 687–91.
47. Ružić A i sur. Endotelna disfunkcija u „enigmatskoj slagalici“ kardiovaskularnih bolesti. Med Glas 2009; 6(1):2-15.
48. Raitakari OT, Celermajer DS. Testing for endothelial dysfunction. Ann Med 2000; 32: 293-304.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Lara Turza

Datum i mjesto rođenja: 8. travnja 1996., Našice

Adresa: Ulica Ruđera Boškovića 62, Našice

Telefon: 091 729 2361

e-pošta: lara113311@gmail.com

Obrazovanje:

2003. – 2011. Osnovna škola kralja Tomislava, Našice

2011. – 2015. Prirodoslovno-matematička gimnazija, Srednja škola Isidora Kršnjavog, Našice

2015. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2019. – danas Diplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku