

Uloga ionskih kanala u mehanizmima vaskularne reaktivnosti kod Sprague-Dawley štakora nakon akutnog izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji

Poštić, Mirna

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:296538>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



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

Mirna Poštić

**ULOGA IONSKIH KANALA U
MEHANIZMIMA VASKULARNE
REAKTIVNOSTI KOD SPRAGUE-
DAWLEY ŠTAKORA NAKON
AKUTNOG IZLAGANJA
HIPERBARIČNOJ OKSIGENACIJI**

Diplomski rad

Osijek, 2021

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

Mirna Poštić

**ULOGA IONSKIH KANALA U
MEHANIZMIMA VASKULARNE
REAKTIVNOSTI KOD SPRAGUE-
DAWLEY ŠTAKORA NAKON
AKUTNOG IZLAGANJA
HIPERBARIČNOJ OKSIGENACIJI**

Diplomski rad

Osijek, 2021

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

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

Rad sadrži: 23 lista i 5 slika

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Ivani Jukić dr.med. na velikoj pomoći pri izradi rada, na svim savjetima i znanju koje je podijelila sa mnom, na razumijevanju, strpljenju i potrošenom vremenu. Zahvaljujem svojoj obitelji, a posebno roditeljima koji mi svaki dan pružaju podršku i oslonac, koji su puni razumijevanja i koji su me u teškim trenucima motivirali i podsjećali da je svaki dan nova prilika za učenje i napredak. Zahvaljujem i prijateljima, s vama je cijeli ovaj period bio puno lakši i zabavniji. Ponosno mogu reći da je uz vas još jedno poglavlje mog školovanja uspješno završeno.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Endotel i vaskularna reaktivnost.....	1
1.2. Ionski kanali; BK _{Ca} i K _{ATP} kanali.....	2
1.3. Reaktivni kisikovi spojevi i oksidativni stres.....	3
1.4. Protokom potaknuta dilatacija (FID).....	4
1.5. Hiperbarična oksigenacija (HBO ₂).....	5
1. HIPOTEZA.....	6
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	7
4. MATERIJALI I METODE.....	8
4.1. Eksperimentalne skupine.....	8
4.2. Izlaganje akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji.....	8
4.3. Proces izolacije središnje moždane arterije.....	9
4.4. Određivanje protokom potaknute dilatacije i aktivnosti BK _{Ca} i K _{ATP} ionskih kanala.....	10
4.5. Statističke metode.....	11
5. REZULTATI.....	12
5.1. Protokom potaknuta dilatacija središnje moždane arterije kontrolne skupine i skupine izložene akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji.....	12
5.2. Protokom potaknuta dilatacija središnje moždane arterije kontrolne skupine u prisutnosti agonista ionskih kanala.....	13
5.3. Protokom potaknuta dilatacija središnje moždane arterije eksperimentalne skupine podvrgnute akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji u prisutnosti agonista ionskih kanala.....	14
6. RASPRAVA.....	15
7. ZAKLJUČAK.....	17
8. SAŽETAK.....	18
9. SUMMARY.....	19
10. LITERATURA.....	20
11. ŽIVOTOPIS.....	23

POPIS KRATICA

1 atm – 1 atmosfera

AA – arahidonska kiselina (engl. *arachidonic acid*)

A-HBOT skupina - skupina štakora izložena akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji

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

Ca⁺ - kalcijev ion

cAMP – ciklički adenozin monofosfat

COX-1 – ciklooksigenaza-1

CTRL skupina – kontrolna skupina štakora

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

EDCH – 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*)

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

ET-1 – endotelin-1

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

HBO₂ – hiperbarična oksigenacija (engl. *hyperbaric oxygenation*)

HBOT – terapija hiperbaričnim kisikom (engl. *hyperbaric oxygen therapy*)

H₂O₂ – vodikov peroksid

HSD – visoko-slana dijeta (engl. *high-salt diet*)

iNOS – inducibilna dušik-oksidi sintaza (engl. *inducible nitric-oxide synthase*)

K⁺ - kalijev ion

K_{ATP} – adenzin trifosfat-kontrolirani kalijevi kanali (engl. *ATP-sensitive potassium channel*)

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

NADPH - nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat (engl. *nicotin amide adenine dinucleotide phosphate*)

nNOS - neuronska dušik-oksidi sintaza (engl. *neuronal nitric-oxide synthase*)

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

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

O₂ – molekularni kisik

O₂ •⁻ - superoksidni anion

•OH – hidroksilni radikal

pCO₂ – parcijalni tlak ugljikova dioksida

PO₂ – parcijalni tlak kisika

PG - prostaglandini

PGI₂ – prostaglandin I₂ (prostaciklin)

PGIS – prostaciklin sintaza

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

SD štakori - Sprague – Dawley štakori

TX - tromboksan

TXA₂ – tromboksan A₂

VMSC – vaskularne glatke mišićne stanice (engl. *vascular smooth muscle cell*)

1. UVOD

1.1. Endotel i vaskularna reaktivnost

Godinama se smatralo da je endotel samo jednostavna selektivno propusna barijera koja dijeli stijenku krvnih žila od krvotoka, no danas se zna da je endotel odgovoran za održavanje vaskularne homeostaze (1). Svojom strukturom je vrlo jednostavan, međutim ima brojne fiziološke uloge: sudjeluje u kontroli vaskularnog tonusa, regulira proliferaciju glatkih mišićnih stanica i regulira interakcije stanica, inhibirajući agregaciju trombocita i adheziju monocita, koji čine važan korak u patogenezi ateroskleroze. Endotel ima ključnu ulogu u regulaciji kardiovaskularne homeostaze otpuštajući različite vazoaktivne faktore (2).

Endotel oslobađa endotelne čimbenike relaksacije (engl. *endothelium-derived relaxing factors*, EDRF), od kojih su najvažniji dušikov oksid (engl. *nitric oxide*, NO) i prostaciklin (PGI_2) te endotelne hiperpolarizirajuće čimbenike (engl. *endothelium-derived hyperpolarization factors*, EDHF). Osim vazoaktivnih čimbenika, endotel oslobađa i čimbenike vazokstricije, odnosno endotelne čimbenike kontrakcije (engl. *endothelial-derived constricting factors* – EDCF), a među njima su najznačajniji endotelin (ET-1) i tromboksan A_2 (TXA_2) (3). Dušikov oksid glavni je posrednik vazodilatacije (4). Kratkoživući slobodni radikal, mase svega 30 Da, koji ima nespareni elektron u vanjskoj ljusci čine NO malom i jednostavnom signalnom molekulom s nizom brojnih uloga u fiziologiji sisavaca. NO je lipofilna molekula te kao takva lako difundira kroz stanične membrane i ima kratak poluživotni vijek. Uzevši u obzir da je signalna molekula, regulira ključne procese poput vazorelaksacije, vaskularne permeabilnosti, regulacije gena, neuronske komunikacije, lučenja hormona i sl. (5). Vazodilatacijsko djelovanje NO-a utječe na kontrolu bazalnog protoka krvi, a abnormalnosti u njegovoj proizvodnji mogu dovesti do širokog spektra patoloških stanja (6-8). Smanjeno djelovanje NO-a, odnosno njegova smanjena sinteza dovodi do povećane vazokonstrukcije i povišenog arterijskog krvnog tlaka. S druge strane, prekomjerna proizvodnja NO-a uzrokuje vazodilataciju i snižavanje krvnog tlaka (7). NO se sintetizira uz pomoć enzima NO-sintaze (NOS). NOS je enzim koji u pravilu katalizira pretvorbu L-arginina u L-citrulin i dušikov oksid, ali ponekad umjesto NO-a može doći do stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS). Postoje 3 izoforme NO-sintaze: neuronska (nNOS), endotelna (eNOS) i inducibilna (iNOS). Sve izoforme koriste L-arginin kao supstrat, a nikotinamid adenindinukleotid fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) i molekularni kisik kao kosupstrate (8-10).

Budući da je endotel važan u održavanju vaskularnog tonusa, vazoaktivni i vazokonstriktivni čimbenici koje oslobađa moduliraju kontraktilno stanje u vaskularnim glatkim mišićnim stanicama (engl. *vascular smooth muscle cell*, VMSC). Dođe li do oštećenja endotela, smanjuje se oslobađanje vazorelaksanata, a povećava proizvodnja vazokonstriktora, ET-1 i TXA₂ (11). Tromboksan A₂ je produkt metabolizma arahidonske kiseline. Arahidonska kiselina (engl. *arachidonic acid*, AA) sastojak je fosfolipida stanične membrane, gdje ima ulogu u staničnoj signalizaciji i kao lipidni sekundarni glasnik regulira signalne enzime. Pomoću enzima ciklooksigenaze (COX), AA se metabolizira u prostaglandine (PG), prostaciklin i tromboksan (TX). Uz TXA₂ vrlo važan čimbenik vazokonstrikcije je endotelin (ET-1), koji djeluje kao prirodni pandan vazodilatacijskom dušikovom oksidu. ET-1 doprinosi vaskularnom tonusu i regulira staničnu proliferaciju, a različiti čimbenici poput žilnog stresa, angiotenzina II te trombina, pojačavaju njegovo lučenje. Nasuprot tome, medijatori poput NO-a, cikličkog GMP-a, atrijskog natriuretskog peptida i prostaciklina smanjuju oslobađanje endogenog ET-1. Stoga se u normalnim uvjetima učinci ET-1 pažljivo reguliraju inhibicijom ili stimulacijom oslobađanja ET-1 iz endotela (12,13).

1.2. Ionski kanali; BK_{Ca} i K_{ATP} kanali

Ionski kanali predstavljaju specifične makromolekularne transportne sustave u staničnoj membrani koji olakšavaju prolazak iona kroz fosfolipidni dvosloj. Jedinstveni su po svojoj selektivnosti, jer je svaki ionski kanal propustan za specifične ione, npr. kalijevi kanali dopuštaju prolaz samo kalijevim ionima, a sprječavaju prolaz natrijevih iona. Uz selektivnost, za aktivaciju pojedinih ionskih kanala je važno i to da se mogu aktivirati ovisno o nekom specifičnom podražaju. Specifični podražaj može uzrokovati promjene membranskog potencijala, a za to su zaslužni naponski kanali čija aktivacija ovisi o promjeni naboja. Najznačajniji ionski naponski kanali su natrijevi, kalijevi i kalcijevi kanali. VMSC izražavaju nekoliko vrsta kalijevih kanala, a to su o kaliju ovisni kalcijevi kanali (engl. *calcium-activated potassium channels*, K_{Ca}) te ATP ovisni kalijevi kanali (engl. *ATP-sensitive potassium channel*, K_{ATP}) koji sudjeluju regulaciji i modulaciji mišićnog tonusa. Funkciju ionskog kanala također moduliraju vazokonstriktori i vazodilatatori (14-16).

Kalijevi kanali s velikom provodljivošću, kako im i samo ime govori, provode velike količine kalijevih iona kroz staničnu membranu. Lokalizirani su u mitohondrijima, endoplazmatskom retikulumu, jezgri i Golgijevom aparatu, a njihova sposobnost održavanja ravnoteže unutarstanične i izvanstanične koncentracije K⁺ i Ca²⁺ iona utječe na membranski potencijal i ekscitabilnost, te na kontraktilnost glatkog mišićja. Oni, osim naponom, mogu biti

aktivirani vezanjem iona magnezija ili kalcija. Kada se na njih veže kalcij oni se nazivaju o kalciju ovisni kalijevi kanali velike vodljivosti (engl. *large-conductance calcium- activated potassium channels*, BK_{Ca}). K⁺ kanali aktivirani naponom i o kalciju ovisni kalijevi kanali velike vodljivosti važan su regulator membranske podražljivosti u raznim stanicama i tkivima, a vrlo su izraženi u živčanom sustavu kralježnjaka gdje reguliraju neuronsku podražljivost (17).

Porast unutarstaničnog Ca²⁺ i aktivacija K_{Ca} kanala na endotelu induciraju hiperpolarizaciju endotela (18). Hiperpolarizaciju i opuštanje glatkog mišićja posreduju i K_{ATP} kanali, koji se nalaze na glatkim mišićnim stanicama krvnih žila. Povećana koncentracija NO-a aktivacijom K_{ATP} kanala uzrokuju hiperpolarizaciju stanične membrane, što je razlog spriječenog ulaska kalcija kroz kalcijske naponske kanale. K_{ATP} kanali su zatvoreni u fiziološkim uvjetima, a aktiviraju se za vrijeme tkivne hipoksije zbog povećane koncentracije laktata i vodikovih iona te smanjene koncentracije ATP-a (19).

1.3. Reaktivni kisikovi spojevi i oksidativni stres

Za sve žive aerobne vrste središnja molekula staničnog disanja je molekularni kisik. Prije otprilike 2,5 milijarde godina, uslijed procesa fotosinteze kod cijanobakterija, porasla je koncentracija molekularnog kisika (O₂) u atmosferi, što je dovelo do evolucije aerobnog disanja, te razvoju složenih eukariotskih organizama. Budući da se u vanjskoj ljusci molekularnog kisika nalaze 2 nesparena elektrona on je jak oksidans. Oksidansi su tvari koje primaju elektrone, to jest mogu se reducirati. Kako bi se kisik što prije vratio u stabilno stanje potrebne elektrone uzima iz bjelančevina, masti te ugljikohidrata. Dođe li do reakcije s navedenim biomolekulama, vanjska ljuska se popuni s nesparenim elektronima, a na taj način se produciraju reaktivni kisikovi spojevi (engl. *reactive oxygen species*, ROS). U skupinu reaktivnih kisikovih spojeva pripadaju atomarni kisik (1O₂), superoksidni anion, vodikov peroksid (H₂O₂), hidroksilni radikal (•OH), peroksilni radikal (ROO•) i hipokloritna kiselina (HOCl) (20,21).

U zdravim jedinkama postoji ravnoteža između slobodnih radikala i antioksidativne obrane, ali ta ravnoteža nije savršena i stanice nisu u mogućnosti potpuno eliminirati reaktivne vrste. Stanje neravnoteže između oksidansa i antioksidansa se naziva oksidativni stres. Do njega dolazi zbog prekomjerne produkcije reaktivnih kisikovih vrsta i smanjene mogućnosti njihove neutralizacije u organizmu (22). Oksidativni stres ima značajan utjecaj na vaskularnu reaktivnost, što potvrđuju brojne studije; npr. visoko-slana dijeta (engl. *high-salt diet*, HSD)

povećava razinu oksidativnog stresa što uzrokuje oslabljen vaskularni odgovor na različite podražaje, i to u animalnim (23), ali i humanim istraživanjima (24).

Antioksidansi su mogu ukloniti ili neutralizirati reaktivne spojeve, kao i njihove međuprodukte. Djelovanje antioksidansa može biti enzimsko ili neenzimsko. Superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza predstavljaju najvažnije enzimske antioksidanse, prva su prva linija obrane od ROS-a jer preveniraju njihovo formiranje (25). S druge strane, neenzimatski obrambeni sustav uključuje vitamine, karotenoide, aminokiseline i peptide (26).

Kada je organizam izložen blagom oksidativnom stresu sposoban je prilagoditi se i upravo iz tog razloga organizam može podnijeti povišene koncentracije slobodnih radikala (26). Prilagodljivost organizma na oksidativni stres mogu pojasniti prethodna istraživanja na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek, u kojima se ispitivao akutni i intermitentni utjecaj hiperbarične oksigenacije (engl. *hyperbaric oxygenation*, HBO₂). Pri akutnom izlaganju hiperbaričnom kisiku povećao se oksidativni stres u plazmi, dok intermitentno izlaganje mijenja metaboličke putove koji sudjeluju u vazorelaksaciji, no ne utječe na razinu oksidativnog stresa (27).

1.4. Protokom potaknuta dilatacija (FID)

Protokom potaknuta dilatacija (engl. *flow-induced dilation*, FID) važan je mehanizam za osiguravanje vaskularne homeostaze te perfuzije tkiva, a ovisan je o endotelu (2). Strujanje krvi uzrokuje povećanje sile smicanja što potiče stvaranje endotelnih vazoaktivnih tvari, poput NO-a i prostaciklina (28).

Smanjena biodostupnost NO-a do koje dolazi zbog oksidativnog stresa, narušava protokom potaknutu dilataciju. Kako bi se FID oporavio, odnosno kako bi se omogućio nesmetani protok, aktiviraju se faktori koji kompenziraju manjak NO-a. Manjak glavnog vazodilatatora se nadomješta s ostalim čimbenicima relaksacije poput prostaciklina i EDHF (29). U prethodnim istraživanjima koja su provedena na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek se proučavao efekt hiperbarične oksigenacije kod zdravih SD štakora, a dokazano je da akutni utjecaj hiperbarične oksigenacije uzrokuje povećani oksidativni stres (27). Istraživao se također i akutni utjecaj hiperbarične oksigenacije na protokom potaknutu dilataciju, gdje je potvrđeno da se u akutnom izlaganju hiperbaričnom kisiku značajno smanjila protokom potaknuta dilatacija. Nadalje, kako bi se istražilo koja je uloga endotela u FID-u, primijenjene su vazoaktivne supstance – acetilkolin i natrijev nitropursid. Vazodilatacijski učinak acetilkolina je ovisan o endotelu, dok s druge strane vazodilatacijski učinak natrijevog

nitroprusida ne ovisi o endotelu. Korištenjem navedenih vazodilatatora dokazano je acetilkolin uzrokuje razlike u vazodilataciji, dok ta razlika ne postoji nakon primjene natrijevog nitroprusida, što naglašava važnost endotela u mehanizmu FID-a (30).

1.5. Hiperbarična oksigenacija (HBO₂)

Hiperbarična oksigenacija je tretman koji opisuje medicinsku primjenu čistog (100%-tnog) kisika u uvjetima tlaka većeg od 1 atmosfere (1 atm). Dokazano je da je terapija hiperbaričnim kisikom (engl. *hiperbaric oxygen therapy*, HBOT) koristan dodatak u liječenju raznih stanja poput embolije, trovanja ugljikovim monoksidom, plinske gangrene, dekompresijske bolesti te zacjeljivanja rana (31). HBOT također ima važnu ulogu u liječenju raznih stanja povezanih s vaskularnom patologijom. Klinički, možda najvažniji efekt je na liječenje ulkusa u dijabetičara, liječenje i oporavak nakon moždanog i srčanog udara te na smanjenje plaka u aterosklerozi (32). Liječenje hiperbaričnim kisikom može biti korisna pomoćna terapija kod navedenih poremećaja smanjene oksigenacije tkiva i perfuzije. Međutim, učinci hiperbarične oksigenacije ne mogu se jednostavno objasniti kao kompenzacija deficita kisika. Hiperbarična oksigenacija ima mnogo širi utjecaj i ima sposobnost promijeniti ekspresiju proteina, modulirati signalne putove i utjecati na vaskularnu strukturu i funkciju (33,34).

Pozitivni učinak kisika u tretmanu hiperbarične oksigenacije je u ovisnosti o tlaku i vremenu primjene terapije. Povećanje tlaka kisika, može pridonijeti povećanju koncentracije reaktivnih kisikovih spojeva u krvi i tkivu, ostavljajući tako utjecaj na hemodinamiku i vaskularnu funkciju. Neadekvatna antioksidativna aktivnost može pridonijeti stvaranju patogenih promjena (27,34). Prethodna istraživanja na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek pokazala su da se u akutnoj izloženosti HBO₂ povećala razina oksidativnog stresa, nadalje sistolički i dijastolički krvni tlak se smanjio, kao i pH i pCO₂ dok se parcijalni tlak kisika povećao. Usporedno, intermitentna terapija hiperbaričnim kisikom obnovila je vaskularnu relaksaciju (27). Stoga zaključujemo da HBOT ima utjecaj na vaskularnu funkciju ovisno o protokolu primjene.

1. HIPOTEZA

Osnovna pretpostavka ovog istraživanja je da izloženost akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji ima značajan utjecaj na aktivnost ionskih kanala uključenih u mehanizam vaskularne reaktivnosti.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

- 1) Odrediti ulogu BK_{Ca} i K_{ATP} ionskih kanala u mehanizmu protokom potaknute dilatacije (FID);
- 2) Odrediti utjecaj akutne hiperbarične oksigenacije na aktivnosti BK_{Ca} i K_{ATP} kanala u mehanizmu protokom potaknute dilatacije.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Eksperimentalne skupine

Ovo istraživanje je provedeno kao eksperimentalna studija u sklopu Laboratorija za fiziologiju cirkulacije na Medicinskom fakultetu Osijek. Materijal za istraživanje su bili modeli izoliranih krvnih žila mozga SD štakora, koji su u vlasništvu Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek. Korišteni su štakori starosti 9 do 11 tjedana, a svi su iz vlastitog uzgoja Vivarija pri Medicinskom fakultetu Osijek.

Pokusni štakori bili su podijeljeni u 2 skupine:

- 1) CTRL skupina – kontrolna skupina zdravih, netretiranih štakora (N=12);
- 2) A-HBOT – štakori izloženi akutnom djelovanju hiperbarične oksigenacije u barokomori 2 sata i odmah po završetku izlaganja žrtvovani (Rekompresijska komora za eksperimente 110L, Đuro Đaković, Aparati d.d., Slavonski Brod) (N=12)

U vremenu trajanja protokola životinje iz obje skupine su imale dostupnu standardnu hranu za laboratorijske glodavce (Mucedola, Italija) i bile su pri svijesti.

4.2. Izlaganje akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji

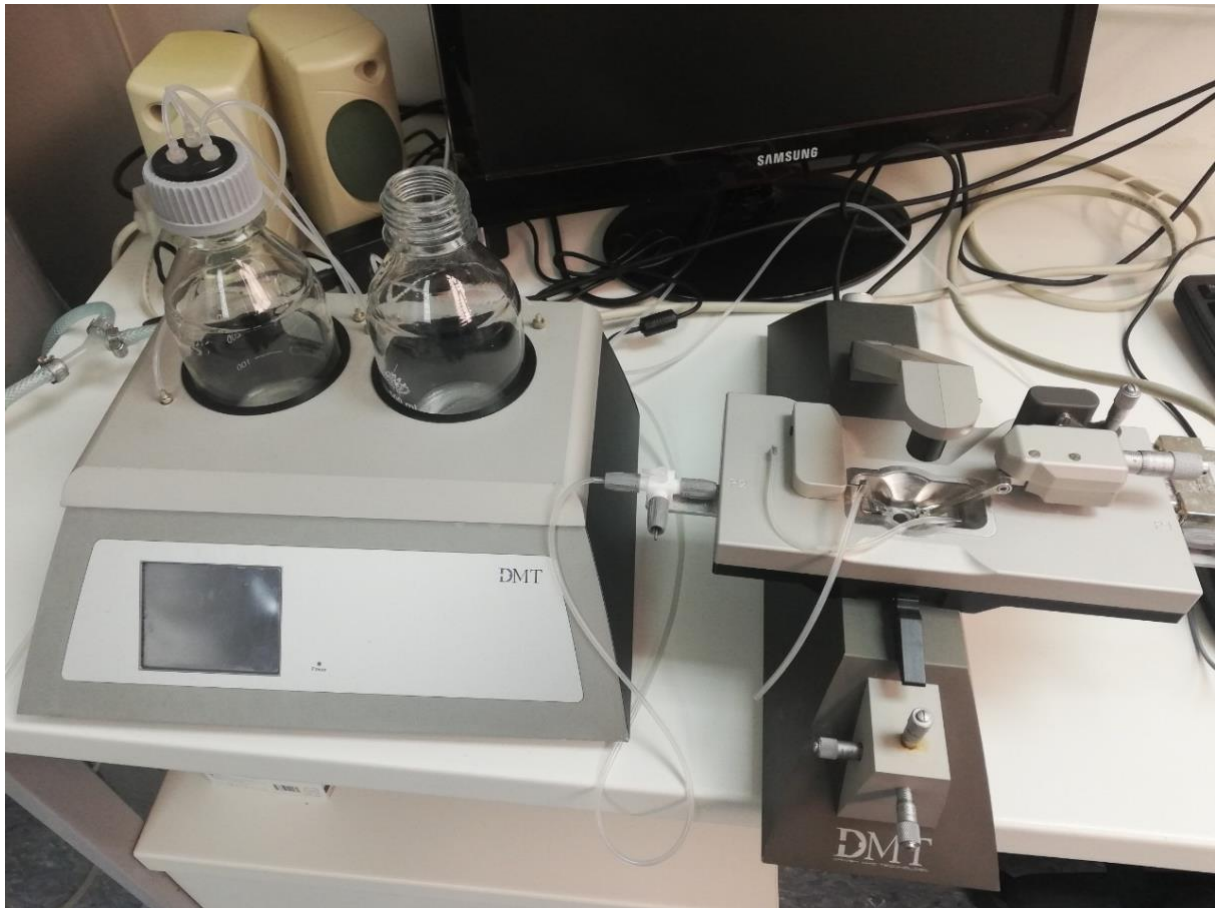
Akutne terapija hiperbaričnom oksigenacijom provodila se prema standardiziranom protokolu. Po smještanju pokusnih životinja u barokomoru uslijedila je kompresija u vremenu od 15 minuta 2,0 atm uz otvoreni ventil za kompresiju (dekompresijski ventil je za to vrijeme bio zatvoren) i puštanje kisika u barokomoru. Kada se postigao tlak od 2,0 atm, kompresijski ventil je zatvoren i životinje su izložene djelovanju 100 %-tnog kisika. Vrijeme trajanja postupka je iznosilo 2 sata uz protok 2-3 l/min. Uz štakore je u komoru smještena i mala količina granula kalcij-hidroksida, natrij – hidroksida i etilvioleta (Draegersorb 800 Plus, Draeger Medical) koje su poslužile za upijanje izdahnutog ugljikova dioksida (CO₂). Nakon isteka 2 sata, otpuštenje ventil za dekompresiju, a dekompresija je trajala 15 minuta. Štakori su nakon HBOT bili žrtvovani.



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

4.3. Proces izolacije središnje moždane arterije

Po završetku terapije hiperbaričnim kisikom, pokusne su životinje izvagane, te anestetizirane 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) iza toga je izvršena dekapitacija giljotinom. Pomoću mikrokirurškog pribora i operacijskog mikroskopa izolira se središnja moždana arterija te se postavi između staklenih mikropipeta. Kako bi odradili navedeni dio protokola koristili smo DMT Pressure Myograph System (Model 110P), na čijem je zaslonu bio prikaz izolirane središnje moždane arterije.



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

4.4. Određivanje protokom potaknute dilatacije i aktivnosti BK_{Ca} i K_{ATP} ionskih kanala

Krvna je žila postavljena između 2 staklene mikropipete (vanjskog promjera $\sim 100\text{-}200\ \mu\text{m}$) koje su smještene u komorici ispunjenoj toplom ($37\ \text{C}$) fiziološkom slanom otopinom (PSS, $\text{pH} = 7.4 \pm 0.05$; sastava ($\mu\text{M} / \text{l}$): $119\ \text{NaCl}$, $4.7\ \text{KCl}$, $1.17\ \text{MgSO}_4$, $1.6\ \text{CaCl}_2$, $1.18\ \text{NaH}_2\text{PO}_4$, $24\ \text{NaHCO}_3$, $0.026\ \text{EDTA}$ i 5.5 glukoze). Sustav je kontinuirano oksigeniran smjesom plinova $21\% \text{O}_2$, $5\% \text{CO}_2$ i balans N_2 . Nakon što je arterija postavljena u komoricu inkubirana je 60 minuta pri tlaku od $\Delta 80\ \text{mmHg}$ (P_1 je $80\ \text{mmHg}$, P_2 $0\ \text{mmHg}$) radi procijene osnovnog (bazalnog) promjera. Središnja moždana arterija je snimana infracrvenom kamerom, čiji je prikaz bio vidljiv na monitoru. Bilježene su promjene u promjeru krvne žile. Poslije inkubacije, krvna žila je bila izložena protoku koji se postigao na način istodobne promjene 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 pripremljene PSS otopine kroz krvnu žilu. Završetkom određivanja FID bazalnih vrijednosti promjera žile

koju smo izolirali, izmjeren je odgovor krvne žile na agoniste ionskih kanala, točnije BK_{Ca} i K_{ATP} .

Na kraju procesa određivanja protokom potaknute dilatacije, PSS otopinu smo u sustavu zamijenili s PSS Ca-free otopinom kako bi se izmjerila maksimalna dilatacija krvne žile. Podatci onih krvnih žila koje nisu bili statistički značajni, odnosno gdje razina aktivnog tonusa nije bila oko 50%, izuzeti su iz obrade.

Istraživački su postupci usklađeni s Europskim smjericama za skrb i primjenu laboratorijskih životinja (direktiva 86/609). Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku i 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-2MEFOS-2019 pod naslovom: „Utjecaj hiperbarične oksigenacije na mehanizme vaskularne reaktivnosti u mikrocirkulaciji Sprague-Dawley štakora i u staničnim kulturama", kojeg je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek 2019. god. (KLASA: 602- 04/19-08/04; URBROJ: 2158-61-07-19-137).

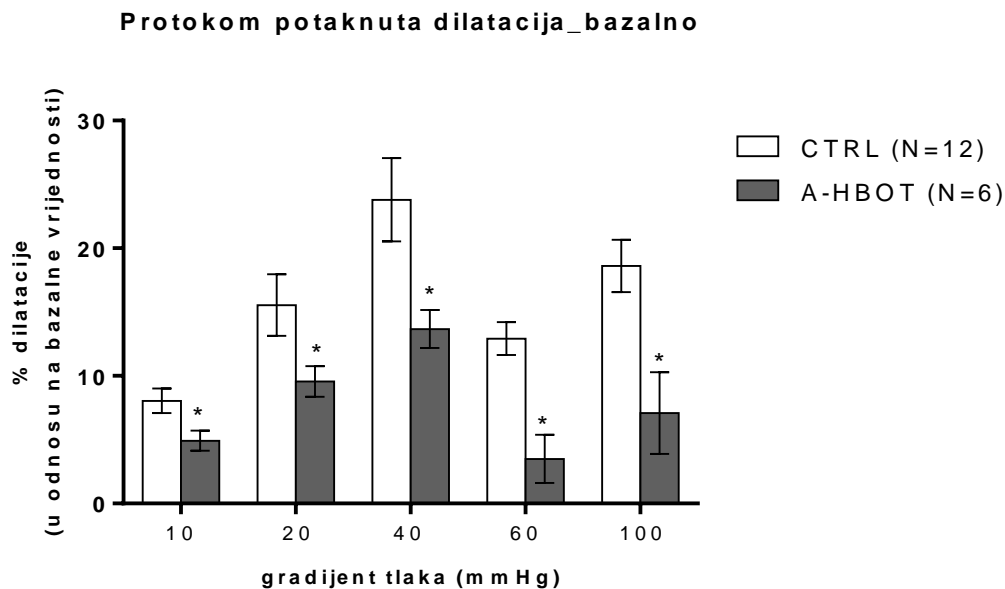
4.5. Statističke metode

Za statističku analizu korišten je program SigmaPlot verzija 11.2, Systat Software, Inc. te za dodatne analize i grafove program GraphPad Prism5. Odgovor na protok analiziran je pomoću Two-Way ANOVA testa za ponavljane uzorke (engl. repeated measures ANOVA) kako bi se odredio utjecaj tretmana hiperbaričnom oksigenacijom na odgovor krvne žile. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (engl. mean \pm standard deviation (SD)). Protokom potaknuta dilatacija je izražena u postotku u odnosu na bazalne vrijednosti izmjerene pri $\Delta 0$ mmHg. Razina statističke značajnosti je $P < 0.05$.

5. REZULTATI

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

Protokom potaknuta dilatacija središnje moždane arterije značajno je smanjena u skupini životinja koje su bile izložene akutnom utjecaju hiperbarične oksigenacije pri svim gradijentima tlakova, u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih, netretiranih životinja (*Slika 1.*).



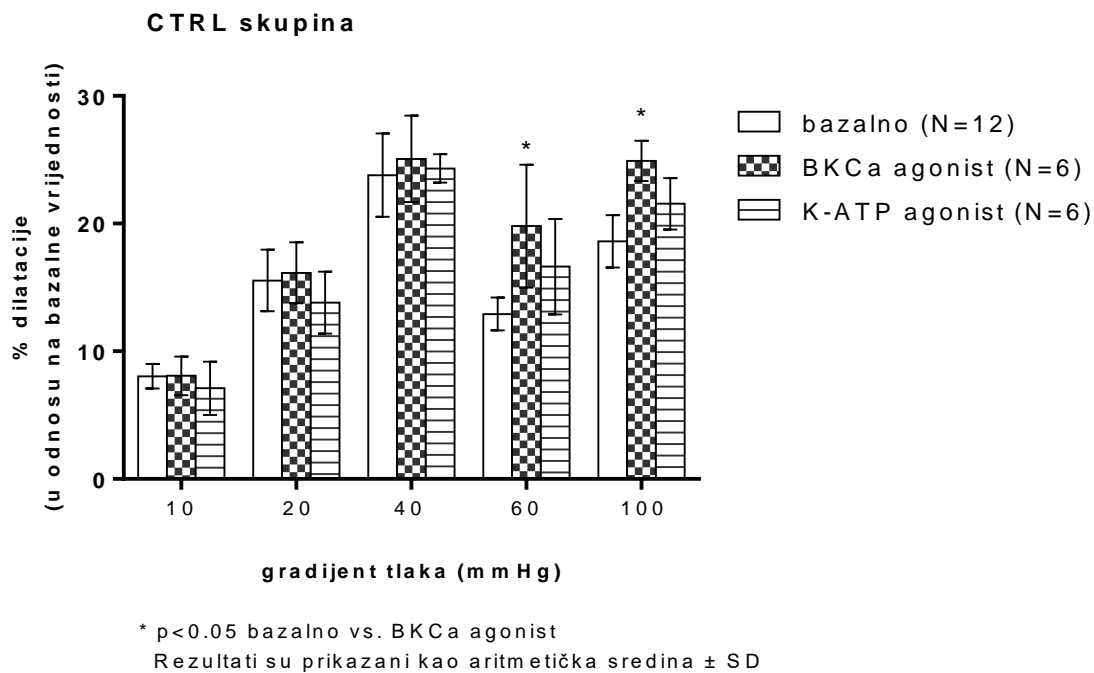
* $p < 0.05$ CTRL vs. A-HBOT

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD

Slika 1. Bazični odgovor središnje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju kod kontrolne skupine zdravih, netretiranih štakora i štakora izloženih akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji, izražen kao udio (%) dilatacije u odnosu na bazalnu vrijednost.

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

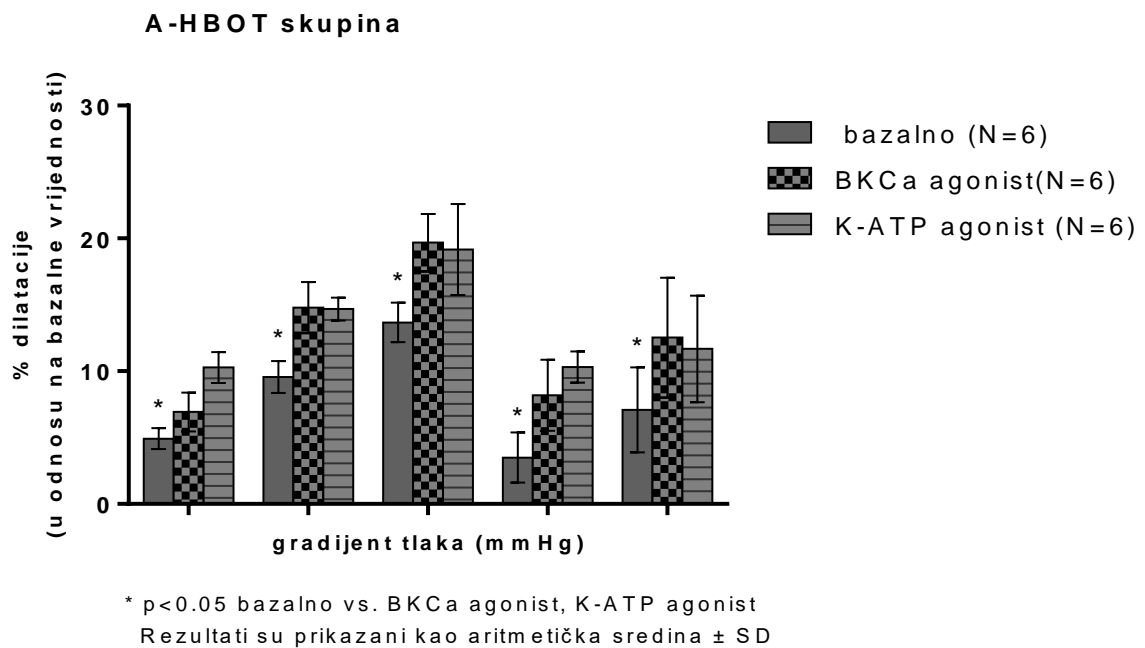
Kod kontrolne skupine životinja, agonisti BK_{Ca}kanala imaju statistički značajno djelovanje na protokom potaknutu dilataciju središnje moždane arterije samo pri višim gradijentima tlaka, Δ60 mmHg i Δ100 mmHg, u usporedbi s bazalnim odgovorom. S druge strane, u kontrolnoj skupini životinja, primjena agonista K_{ATP}kanala nije dovela do statistički značajnih promjena protokom potaknute dilatacije (*Slika 2.*).



Slika 2. Utjecaj agonista ionskih kanala (BK_{Ca} agonista i K_{ATP}agonista) na protokom potaknutu dilataciju središnje moždane arterije kontrolnih netretiranih štakora pri različitim gradijentima tlaka, izražen kao postotak (%) dilatacije u odnosu na bazalnu vrijednost

5.3. Protokom potaknuta dilatacija središnje moždane arterije eksperimentalne skupine podvrgnute akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji prisutnosti agonista ionskih kanala

Kod A-HBOT skupine primjenom agonista BK_{Ca} i K_{ATP} kanala značajno se povećala protokom potaknuta dilatacija pri svim gradijentima tlakova, u odnosu na bazalni odgovor bez primjene agonista (Slika 3.).



Slika 3. Utjecaj agonista ionskih kanala (BK_{Ca} agonista i K_{ATP} agonista) na protokom potaknutu dilataciju središnje moždane arterije štakora izloženih akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji, pri različitim gradijentima tlaka, izražen kao postotak (%) dilatacije u odnosu na bazalne vrijednosti.

6. RASPRAVA

U ovom se istraživanju ispitivao utjecaj akutne hiperbarične oksigenacije na ulogu ionskih kanala u mehanizmima vaskularne reaktivnosti kod zdravih muških Sprague-Dawley štakora. Štakori su bili podijeljeni u 2 skupine, prvu skupinu su činili zdravi, kontrolni, netretirani štakori (CTRL skupina), dok su drugoj skupini pripadali štakore koji su bili podvrgnuti akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji u trajanju od 2h (A-HBOT skupina). Protokom potaknuta dilatacija A-HBOT skupine bila je značajno smanjena u odnosu na CTRL skupinu, što znači da akutna hiperbarična oksigenacija narušava o endotelu ovisnu dilataciju. Ovaj naš rezultat u skladu je s ranije provedenim istraživanjima te su Mihaljević i suradnici pokazali kako akutna hiperbarična oksigenacija također slabi vazorelaksaciju izoliranih aortalnih prstenova SD štakora, a u pozadini priče leži povećana razina oksidativnog stresa (27). Kisik je neophodna molekula za sve žive aerobne vrste, no zbog svoje dvojne prirode nema samo pozitivne učinke na organizam, već može djelovati i razarajuće. Njegova 2 nesparena elektrona u vanjskoj ljusci mogu dovesti do stvaranja slobodnih kisikovih spojeva. Nakupljanje slobodnih kisikovih vrsta, bez mogućnosti za njihovu eliminaciju dovodi do oksidativnog stresa. Stoga oksidativni stres predstavlja disrazmjer između proizvedenih slobodnih kisikovih spojeva te antioksidanata, a štetno djeluje na vaskularnu funkciju, odnosno dovodi do oslabljene vaskularne reaktivnosti (20,21). Ćosić i suradnici su ispitivali utjecaj HSD na vaskularni oksidativni stres i dokazali kako se visokim unosom soli značajno povećala količina ROS-a, a samim time i oksidativni stres. Nadalje, pokazali su kako je upravo povećana proizvodnja ROS-a i posljedično povećana razina oksidativnog stresa, uzrokovala značajno oslabljenu protokom potaknutu dilataciju kod SD štakora koji su bili na visoko-slanj dijete (23).

Uzevši u obzir reaktivnu prirodu kisika i sposobnost da tvori slobodne kisikove vrste, postavlja se pitanje kolika je zapravo granica između pozitivnog i toksičnog učinka na organizam. Upravo zbog toga prilikom izlaganja 100%-tnom kisiku za vrijeme tretmana hiperbarične oksigenacije valja biti na oprezu (27,32). Mihaljević i sur. su proveli istraživanje u kojem su izolirali aortalne prstenove Sprague-Dawley štakora. Dokazano je da se u akutnoj izloženosti HBO₂ povećala razina oksidativnog stresa, nadalje sistolički i dijastolički krvni tlak se smanjio, kao i pH i pCO₂ dok se parcijalni tlak kisika povećao. S druge strane, intermitentno izlaganje HBO₂ mijenja metaboličke putove koji sudjeluju u vazorelaksaciji, no ne utječe na razinu oksidativnog stresa (27). Konačno, HBO₂ ovisno o protokolu primjene može utjecati na funkcionalne i strukturne karakteristike krvnih žila.

U ovoj našoj studiji, potvrđeno je da akutna hiperbarična oksigenacija narušava vaskularnu reaktivnost, odnosno, smanjuje ju, što se očituje kao smanjenje FID-a pri svakom gradijentu tlaka, u odnosu na kontrolne bazalne vrijednosti (Slika 1.). Kako bismo utvrdili važnost ionskih kanala u mehanizmu FID-a, koristili smo agoniste kanala. Kod skupine SD štakora koju smo izložili akutnom djelovanju hiperbarične oksigenacije, pokazalo se da primjenom agonista BK_{Ca} i K_{ATP} kanala dolazi do značajnog povećanja protokom potaknute dilatacije pri svakom gradijentu tlaka u odnosu na bazalni odgovor bez primjene agonista (Slika 3.). Iz dobivenih rezultata je zaključeno kako BK_{Ca} i K_{ATP} kanali imaju značajnu ulogu u vaskularnom odgovoru krvne žile jer smo njihovim aktiviranjem oporavili FID. Ovim smo istraživanjem dokazali da akutna hiperbarična oksigenacija utječe na aktivnosti ionskih kanala uključenih u mehanizam vaskularne reaktivnosti. U ovom istraživanju pretpostavlja se da je također povećan oksidativni stres, koji dokazano nastaje kod akutne hiperbarične oksigenacije (27), razlog značajno smanjenog FID-a kod A-HBOT skupine štakora.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata provedenog istraživanja mogu se izvesti slijedeći zaključci:

- 1) Akutna hiperbarična oksigenacija utječe na protokom potaknutu dilataciju, odnosno značajno ju smanjuje;
- 2) U akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji BK_{Ca} i K_{ATP} kanali imaju značajnu ulogu u mehanizmu protokom potaknute dilatacije, te akutna hiperbarična oksigenacija smanjuje njihovu aktivnost

8. SAŽETAK

Cilj: Istraživanje je za cilj imalo ustanoviti ulogu BK_{Ca} i K_{ATP} ionskih kanala u mehanizmima vaskularne reaktivnosti kod Sprague-Dawley štakora.

Materijali i metode: U istraživanje su bili uključeni zdravi muški Sprague-Dawley (SD) štakori podijeljeni u dvije skupine: 1. skupinu su činili kontrolni, netretirani zdravi štakori (CTRL, N=12), a u 2. su skupini bili štakori podvrgnuti akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (100% O_2 , 2h/2bara) (A-HBOT, N=12). Po završetku HBOT, štakori su bili anestezirani ketaminom (75 mg/kg) i midazolamom (0,5 mg/kg), te je uslijedila dekapitacija i izolacija središnje moždane arterija – modela na kojem se određivala protokom potaknuta dilatacija bazalno i u prisutnosti agonista ionskih kanala (BK_{Ca} agonist i K_{ATP} agonist), pri različitim gradijentima tlaka.

Rezultati: Protokom potaknuta dilatacijaznačajno je smanjenjau A-HBOT skupini u odnosu na CTRL skupinu. U CTRL skupini agonist BK_{Ca} značajno su doveli do povećanja FID-a samo pri višim vrijednostima tlaka ($\Delta 60$ mmHg i $\Delta 100$ mmHg), dok agonist K_{ATP} kanala nije utjecao na FID. Primjena agonista BK_{Ca} i K_{ATP} kanala u A-HBOT skupini značajno je povećala protokom potaknutu dilataciju pri svakom gradijentu tlaka, u odnosu na bazalni odgovor bez primjene agonista.

Zaključak: Akutna hiperbarična oksigenacija značajno smanjuje protokom potaknutu dilataciju, a BK_{Ca} i K_{ATP} kanali imaju značajnu ulogu u mehanizmu protokom potaknute dilatacije.

Ključne riječi: BK_{Ca} kanali, K_{ATP} kanali, oksidativni stres, protokom potaknuta dilatacija, hiperbarična oksigenacija

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", koje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek 2019. god. (KLASA: 602- 04/19-08/04; URBROJ: 2158-61-07- 19-137).

9. SUMMARY

Objectives: The study aimed to establish the role of BK_{Ca} and K_{ATP} ion channels in the mechanisms of vascular reactivity in Sprague-Dawley rats.

Studydesign: Experimental study on laboratory animals.

Materials andmethods: The study included healthy male Sprague-Dawley (SD) rats divided into two groups: group 1 consisted of control, untreated healthy rats (CTRL, N = 12), and group 2 included rats subjected to acute hyperbaric oxygenation (100 % O₂, 2x / 2bar) (A-HBOT, N = 12). After hyperbaric oxygenation therapy, rats were anesthetized with ketamine (75 mg / kg) andmidazolam (0.5 mg / kg), followed by decapitation and isolation of the middle cerebral artery – a model on which flow-induced dilation (FID) was determined – basal and in the presence of ion channel agonists (BK_{Ca} agonist and K_{ATP} agonist), at different pressure gradients.

Results: Flow-induced dilatation is significant reduced in the A-HBOT group compared to the CTRL group. In the CTRL group, BK_{Ca} agonists significantly led to anincrease in FID only at higher pressure values ($\Delta 60$ mmHg and $\Delta 100$ mmHg), while the K_{ATP} channel agonist did not affect FID. In the A-HBOT group BK_{Ca} and K_{ATP} channel agonists significantly increased the flow-induced dilation at each pressure gradient, compared with basal response without the agonists.

Conclusion: Acute hyperbaric oxygenation significantly reduces flow-induced dilatation, and BK_{Ca} and K_{ATP} channels play a significant role in the flow-induced dilatatio nmechanism.

KeyWords: BK_{Ca} channels, K_{ATP} channels, oxidative stress, flow-induced dilation, hyperbaric oxygenation

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. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. Br J Pharmacol. 2009 Jun;157(4):527–536.
2. Čavka A i sur. Endotelna funkcija – funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. Med Vjesn 2012;44(1-4);135-146.
3. 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: 16.8.2021.
4. Harris RA, Nishiyama SK, Wray DW, Richardson RS. Ultra sound assessment of flow-mediated dilation: a tutorial. Hypertension 2010 May;55(5):1075–1085.
5. Alimoradi H, Greish K, Gamble A, Gilles G. Controlled delivery of nitric oxide for cancer therapy. Pharm Nanotechnol. 2019 Dec;7(4):279–303.
6. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. Lancet 1989;2:997-1000.
7. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. Br J Pharmacol.2006;147:S193-S201.
8. Umar S, van der Laarse A. Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. Mol Cell Biochem.2010 Jan;333(1-2):191-201.
9. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 1988;333:664–6.
10. Michael T, Feron O. Nitric oxide synthases: Which, where, how and why? J Clin Invest. 1997 Nov 1;100(9):2146–2152.
11. Loscalzo J. Endothelial injury, vasoconstriction, and its prevention. Texas Heart Inst J. 1995;22(2);180-184.
12. Rucker D, Duhamoon AS. Physiology, Tromboxane A₂. September 13, 2020. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539817/>. Datum pristupa: 07.09.2021.
13. Schiffrin EL. Does endothelin-1 raise or lower blood pressure in humans?. Nephron 2018;139;47-50.
14. RouxB. Ion channels and ion selectivity. Essays Biochem.2017;61(2):201-209.

15. Salari V, Naeij H, Shafiee A. Quantum interference and selectivity through biological ion channels. *Sci Rep.* 2017;7;41625. Dostupno na adresi: <https://www.nature.com/articles/srep41625>. Datum pristupa: 12.09.2021.
16. Fuji N, Louie JC, McNeely BD, Zhang SY, Tran MA, Kenny GP. K⁺ channel mechanisms underlying cholinergic cutaneous vasodilation and sweating in young humans: roles of K_{Ca}, K_{ATP} and K_{Vc} hannels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2016 Sep 1;311(3):R600–R606.
17. Hermann A, Stidikova GF, Weiger TM. Oxidative stress and maxi calcium activated potassium (BK) channels. *Biomolecules.* 2015 Sep;5(3);1870-1911.
18. Köhler R, Kaistha BP, Wulff H. Vascular K_{Ca} channels as therapeutic target sin hypertension and restenosis disease. *Expert Opin Ther Targets.* 2010 Feb;14(2):143–155.
19. Liu Q, Flavahan NA. Hypoxic dilatation of porcine small coronary arteries: role of endothelium and K_{ATP}-channels. *BJP* 1997 Feb;120(4);728-734.
20. Krumova K, Cosa G. Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences. Chapter 1: Overview of Reactive Oxygen Species. 2016;1:1-21.
21. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003 Oct 15; 552(Pt 2):335–344.
22. Pizzino g, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, AltavillaD, BittoA. OxidativeStress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:8416763.
23. Cosic A, Jukic I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljevic Z, Novak S, Vukovic R, Drenjancevic I. Attenuated flow-induced dilatation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress i nrats on a short-term high salt diet. *J Physiol.* 2016 Sep 1;594(17):4917-31.
24. Cavka A, Jukic I, Ali M, Goslawski M, Bian JT, Wang E, Drenjancevic I, Phillips SA. Short-term high salt intake reduces brachial artery and microvascular function in the absence of changes in blood pressure. *J Hypertens.* 2016 Apr;34(4):676-84.
25. Santo A, Zhu H, Li YR. (2016). Free Radicals: From Health to Disease. ROS. 2016;2(4):245–263.
26. A van der Pol, WH van Gilst, Voors AA, P van der Meer. Treating oxidative stres sin heart failure: past, present and future. *Eur J Heart Fail.* 2019 Apr;21(4);425-435.
27. 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. 2018;2018:1406027.
- 28.** 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.
- 29.** Čosić A. Uloga oksidativnog stresa u razvoju poremećenog vaskularnog odgovora pod utjecajem visokog unosa natrijeva klorida kod Sprague-Dawley štakora (disertacija). 2016. Dostupno na adresi:
[file:///C:/Users/User/Downloads/cosic_anita_mefos_2016_diser_sveuc%20\(5\).pdf](file:///C:/Users/User/Downloads/cosic_anita_mefos_2016_diser_sveuc%20(5).pdf).
Datum pristupa: 14.09.2021.
- 30.** 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: 29.8.2021.
- 31.** Shah J. Hyperbaric oxygen therapy. *J Am Col Certif Wound Spec.* 2010;2(1):9–13.
- 32.** Kiebel A, Novak S, Čosić A, Mihaljević Z, Falck JR, Drenjančević I. Hyperbaric oxygenation modulates vascular reactivity to angiotensin-(1-7) in diabetic rats: Potential role of epoxyeicosatrienoic acids. *Sage journals*; 2015;12(1);33-45.
- 33.** Mcmonnies CW. Hyperbaric oxygen therapy and the possibility of ocular complications or contraindications. *Clinical and experimental optometry.* 2015;98(2);122-125.
- 34.** Drenjančević I, Kibel A. Restoring vascular function with hyperbaric oxygen treatment: recovery mechanisms, *J. Vasc. Res.* 2014;51(1):1–13.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Mirna Poštić

Datum i mjesto rođenja: 5.7.1996., Osijek, Hrvatska

Adresa: Ulica J.J. Strossmayera 2, 31208 Petrijevci

Telefon: 099/693 1835

E-mail: mirna.postic@gmail.com

Obrazovanje:

2003. – 2011. Osnovna škola Petrijevci, Petrijevci

2011. - 2015. Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku

2015. - 2019. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu u Osijeku

2019. - 2021. Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu u Osijeku