

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Marina Starčević**

**STVARANJE SUPEROKSIDA U  
KRVNIM ŽILAMA ŠTAKORA POD  
UTJECAJEM AKUTNE HIPERBARIČNE  
OKSIGENACIJE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2017.**

Rad je ostvaren na: Medicinski fakultet Osijek, Katedra za fiziologiju i imunologiju.

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

Neposredni voditelj: Zrinka Mihaljević, prof.

Rad ima 21 list i 4 slike.

**Zahvale:**

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med. koja mi je pomogla svojim savjetima i iskustvom pri pisanju diplomskog rada. Također, zahvaljujem neposrednoj voditeljici prof. Zrinki Mihaljević na velikoj pomoći pri izradi praktičnog dijela rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji koja mi je tijekom cijelog školovanja bila bezuvjetna podrška i najveći oslonac.

Također, zahvaljujem svim prijateljima i kolegama što su uvijek bili uz mene i ostavili nezaboravan trag tijekom zajedničkog studiranja.

## Sadržaj

Popis kratica.....	II
1. UVOD.....	1
1.1. Oksidativni stres.....	1
1.1.1. Slobodni radikali.....	1
1.2. Utjecaj oksidativnog stresa na krvožilni sustav (disfunkcija endotela) .....	2
1.3. Hiperbarična oksigenacija.....	3
1.3.1. Primjena hiperbarične oksigenacije .....	4
2. HIPOTEZA .....	6
3. CILJ .....	7
4. MATERIJALI I METODE.....	8
4.1. Ispitanici .....	8
4.2. Protokol istraživanja.....	8
4.3. Statističke metode .....	9
5. REZULTATI.....	10
6. RASPRAVA .....	15
7. ZAKLJUČAK .....	16
8. SAŽETAK .....	17
9. SUMMARY .....	18
10. LITERATURA .....	19
11. ŽIVOTOPIS.....	21

## **Popis kratica**

**ROS** – engl. *reactive oxygen species*

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** – superoksidni anion

**OH<sup>•</sup>** – hidroksilni radikal

**ROO<sup>•</sup>** – peroksilni radikal

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – vodikov peroksid

**HClO** – hipokloritna kiselina

**O<sub>2</sub>** – singletni kisik

**SOD** – superoksid dismutaza

**NO** – dušikov oksid

**ONOO<sup>-</sup>** – peroksinitrit

**eNOS** – endotelna NO sintaza

**HBO<sub>2</sub>** – engl. *Hyperbaric Oxygen Treatment*

**TBARS** – engl. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*

**FRAP** – engl. *Ferric Reducing Ability of Plasma*

**DHE** – dihidroetidin

## 1. UVOD

### 1.1. Oksidativni stres

Oksidativni stres predstavlja poremećaj ravnoteže između stvaranja slobodnih radikala i njihovog eliminiranja u organizmu pomoću antioksidansa (1). Povećan broj slobodnih radikala u organizmu uzrokuje poremećaj fiziološke funkcije, stoga se oksidativni stres smatra važnom komponentom pri nastajanju brojnih bolesti (2). Utjecaj oksidativnog stresa na organizam ovisi o vrsti oksidansa, sastavu i djelovanju antioksidanata, mjestu i intenzitetu njihova stvaranja te o sposobnosti organizma za oporavak. Razvijene su brojne laboratorijske metode kojima je moguće izmjeriti ukupnu razinu oksidativnog stresa ili utvrditi oksidativni status mjerenjem koncentracije antioksidativnih enzima. U ovom istraživanju bit će primijenjena jedna od fluorescentnih metoda kojom je moguće izmjeriti prisutnost produkata izravno na tkivima ili stanicama. Navedene se metode ne primjenjuju u rutinskoj laboratorijskoj praksi iako bi značajno pomogle u praćenju bolesnika s arterijskom hipertenzijom i sličnim bolestima (3).

#### 1.1.1. Slobodni radikali

Slobodni je radikal svaka molekula koja u vanjskoj ljusci sadrži jedan ili više nesparenih elektrona. Upravo zbog nesparenog elektrona vrlo su reaktivne molekule. Biološki najznačajniji slobodni radikali jesu kisikove reaktivne vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS). ROS je zajednički naziv za radikale kisika u koje ubrajamo: superoksidni ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrosilni ( $OH^{\cdot}$ ) i peroksilni ( $ROO^{\cdot}$ ) radikal. Vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hipokloritna kiselina ( $HClO$ ) i singletni kisik ( $O_2$ ) nisu slobodni radikali u pravom smislu, ali iz njih tijekom nekoliko reakcija vrlo lako mogu nastati slobodni radikali. Najučinkovitiji postupak uklanjanja ROS-a u organizmu jest enzimski kataliza. Ovisno o jačini oksidativnog stresa, organizam pokreće mehanizam obrane kojim nastoji povećati broj antioksidansa. Poznato je nekoliko skupina antioksidacijskih enzima u koje ubrajamo katalazu, glutation peroksidazu, citokrom oksidazu te superoksid dismutazu (SOD), kojom se iz organizma uklanjaju superoksidni radikali (dismutacijom superoksida u vodikov peroksid) (4).

„Slobodni radikali nastaju homolitičkim cijepanjem kovalentne veze“ i teže stvaranju veze s okolnim molekulama kako bi ostvarili stabilnost, pri čemu molekula s kojom su reagirali postaje novi slobodni radikal (4).

Slobodni radikali mogu nastati (osim uobičajenim staničnim procesima) od različitih egzogenih izvora. Prema spomenutom, izvori superoksidnog radikala dijele se na: enzimske (katalitičke reakcije NADPH oksidaze, citokrom oksidaze, ksantin oksidaze), stanične (respiratorni lanac) i izvore nastale djelovanjem okoline (ultraljubičasto i ionizacijsko zračenje). Kada se u organizmu stvaraju velike količine ROS-a ili njihovo uklanjanje nije dovoljno učinkovito (što rezultira oksidacijskim stresom), može dovesti do oštećenja bioloških makromolekula i uzrokovati metaboličke poremećaje. Važno je naglasiti da mala odstupanja od fizioloških vrijednosti ROS-a mogu značajno utjecati na otpornost stanica prema oksidacijskom oštećenju proteina, lipida i DNA (4).

Nastajanje male količine ROS-a dio je normalne fiziologije i ima pozitivan utjecaj na organizam. ROS u organizmu imaju regulacijsku i obrambenu ulogu. Sudjeluju u unutarstaničnoj signalizaciji i proliferaciji (4). Vrlo važnu ulogu imaju kod imunološkog odgovora, gdje ROS djeluju kao signalne molekule i kao medijatori upale (5). Međutim, u visokim koncentracijama mogu dovesti do narušavanja antioksidativne obrane i značajno doprinijeti nastanku brojnih bolesti. Prema literaturnim podacima, oksidativni stres jedan je od čimbenika nastanka ishemije, ateroskleroze, raznih infektivnih bolesti, neurodegenerativnih bolesti, šećerne bolesti, reumatoidnog artritisa, opstruktivne apneje u snu i drugog (6). Također, male količine ROS-a koje se stalno proizvode aerobnim procesima imaju važnu ulogu u nastajanju matičnih stanica. S obzirom na to da matične stanice nisu diferencirane, povećano stvaranje ROS-a ima negativan utjecaj, te ovisno o dozi uzrokuje diferencijaciju, starenje ili apoptozu. Zbog spomenutih utjecaja ROS-a na organizam vrlo je bitno da je njihova proizvodnja čvrsto regulirana kako bi se omogućila pravilna homeostaza i popravak oštećenja tkiva (7).

## **1.2. Utjecaj oksidativnog stresa na krvožilni sustav (disfunkcija endotela)**

Endotel čini tanak sloj stanica koji prekriva unutrašnju stijenku svih krvnih žila. Endotelne stanice imaju značajnu ulogu u brojnim procesima u organizmu: doprinose selektivnoj kontroli prometa tvari, sudjeluju u kontroli krvnog tlaka, prevenciji zgrušavanja i angiogenezi. Endotelne stanice imaju sposobnost autokrinog, parakrinog i endokrinog lučenja, te tako djeluju na stanične linije poput trombocita i leukocita, ali i na udaljena tkiva (8). Endotel ima vazodilatacijsku, protuupalnu i antiagregacijsku ulogu te sposobnost popravka raznih mehaničkih i kemijskih oštećenja krvnih žila. Međutim, kada izgubi kontrolu nad reparacijskim mehanizmima, dolazi do funkcionalnih i strukturnih promjena endotela. Endotel

gubi svoju zaštitnu ulogu te poprima proaterosklerotsku strukturu. Tu promjenu endotela nazivamo endotelnom disfunkcijom. Endotelnu disfunkciju ponajprije karakteriziraju poremećena svojstva otpuštanja vazoaktivnih tvari. Stoga je usko povezana s većinom kardiovaskularnih bolesti poput hipertenzije, kroničnog zatajenja srca, koronarne bolesti arterija i dr. (9,10).

Oksidativni stres ima važnu ulogu u nastanku endotelne disfunkcije. Prijašnja istraživanja potvrdila su da su endotelne stanice važan izvor superoksida i mogu sudjelovati, tj. doprinijeti smanjenoj dilataciji ovisnoj o endotelu ili čak dovesti do vazokonstrikcije ovisne o endotelu. Nekoliko studija pokazalo je da ROS mogu doprinijeti smanjenoj funkciji endotela u nekoliko oblika hipertenzije (11). Naime, povećana aktivnost NADPH oksidaze ima za posljedicu povećano stvaranje superoksida, čime dolazi do smanjene biološke raspoloživosti dušikovog oksida (NO) (12). NO je ključan relaksirajući čimbenik i ima bitnu ulogu u održavanju bazalnog tonusa (8). U prijašnjim istraživanjima pokazano je da  $O_2^{\cdot-}$  prigušuje NO. Također, može doći do reakcije između  $O_2^{\cdot-}$  i NO pri čemu nastaje peroksinitrit ( $ONOO^-$ ). Nastali spoj i  $O_2^{\cdot-}$  oksidiraju tetrahidrobiopterin te odvezuju endotelnu NO sintazu (eNOS). Razvezana eNOS proizvodit će  $O_2^{\cdot-}$  umjesto NO, što dodatno povećava oksidativni stres i endotelnu disfunkciju. Neravnoteža u stvaranju NO predstavlja temelj poremećaja vazomotorike te se smatra vodećim uzrokom kompleksnog sindroma endotelne disfunkcije (8,13).

Endotelna disfunkcija smatra se presudnom poveznicom između rizičnih čimbenika i ateroskleroze. Također, povezana je s inzulinskom rezistencijom, arterijskom hipertenzijom, hiperlipidemijom te prati različita upalna stanja (8).

### 1.3. Hiperbarična oksigenacija

Terapija hiperbaričnom oksigenacijom (engl. *hyperbaric oxygen treatment*, HBO<sub>2</sub>) metoda je liječenja kojom se nastoji povećati količina kisika u krvi. Ta metoda koristi kisik pri tlaku od 100 kPa (1,0 bara). Bolesnici udišu 100 %-tni kisik u posebno konstruiranoj komori. Kada se kisik udahne pod povišenim tlakom povećava se frakcija slobodnog kisika u plazmi. Dakle, ako se tlak udahnutog kisika poveća za 100 kPa u 100 mL krvi, organizmu se dopremi oko 2,4 mL kisika. Na taj način fizikalno otopljeni kisik zaobilazi eritrocitnu membranu i brže difundira u tkivo. S obzirom da ne postoji farmakološki pripravak kojim bi se povisila koncentracija kisika u krvi, spomenuti mehanizam djelovanja vrlo je značajan za uklanjanje hipoksije koja se javlja kod brojnih patoloških stanja (14,15).



Vrlo je površno primjenu HBO<sub>2</sub> terapiju opisati samo kao smanjenje deficita kisika jer ona ima mnogo veći utjecaj na organizam. Hiperbarična oksigenacija može dovesti do izmjene ekspresije proteina, izmjenjuje signalne putove te utječe na vaskularnu strukturu i funkciju, gdje značajno povećava vaskularni odgovor na angiotenzin-(1-7) koji potiče oslobađanje dušikovog oksida iz endotelnih i glatkih mišićnih stanica krvnih žila te tako djeluje vazodilatacijski (16).

### 1.3.1. Primjena hiperbarične oksigenacije

Terapija hiperbaričnom oksigenacijom ima široku primjenu u kliničkoj praksi. Istraživanja su pokazala kako se tom terapijom poboljšava čitav niz fizioloških mehanizama. Ta metoda prvobitno je služila za liječenje dekompresijske bolesti ronilaca, ali danas se koristi i pri terapiji plinske gangrene, trovanja ugljičnim monoksidom i sl. Terapijski princip temelji se na povećanju parcijalnog tlaka plinova, čime se smanjuje volumen ispunjen plinom, tj. dolazi do istiskivanja mjehurića plina iz plazme, što je ključno za liječenje bolesti u kojima su prisutni mjehurići u tijelu poput spomenute dekompresijske bolesti. Hiperbarična oksigenacija poboljšava tkivnu toleranciju prema ishemiji i biološku otpornost prema slobodnim radikalima. Dokazano je da ima zaštitni učinak na mikrocirkulaciju te mogućnost sprječavanja štetnog djelovanja aktiviranih leukocita na endotel krvnih žila. Time se može smanjiti djelovanje neutrofila i potaknuti angiogeneza, proliferacija stanica i sinteza kolagena (14,15).

Međutim, to nije jedini učinak hiperbarične oksigenacije. Naime, kako je već opisano, kisik je vrlo reaktivna molekula. Pod utjecajem kisika dolazi do povećane izražajnosti različitih enzima i promjene proizvodnje njihovih metaboličkih produkata. Provedena su istraživanja u kojima su korišteni različiti protokoli izlaganja HBO<sub>2</sub> koji su imali različiti utjecaj na cirkulaciju. Dobiveni rezultati često su kontradiktorni i značajno ovise o trajanju izloženosti, tlaku kisika te povijesti bolesti kod ispitanika. Tako je dokazano da izlaganje ispitanika HBO<sub>2</sub> može povisiti, smanjiti ili ne utjecati na krvni tlak. Također, izlaganje životinja HBO<sub>2</sub> povećava hematokrit i uzrokuje acidozu te povećava metaboličku aktivnost. Postoji razlika u akutnom i kroničnom djelovanju kisika u tkivima (17).

Prema smjernica HBO<sub>2</sub> za terapiju preporučuje se primjena tlaka do 3,0 bara. Dokazano je da je HBO<sub>2</sub> terapija sigurna za pacijente i da su nuspojave rijetke kada se tretman provodi pri pritisku tlaka manjem od 3,0 bara. Također, dokazano je da ekstremno hiperbarično stanje ili predugo izlaganje tretmanu može dovesti do toksičnosti kisika. Tako izlaganje tretmanu od

4,0 bara pogoršava oksidacijski stres u moždanom tkivu, dok izlaganje tretmanu od 5,0 bara znatno povisuje rizik od dobivanja napada epilepsije i udara (18).

Poznato je da akutna hiperbarična oksigenacija podiže razinu oksidativnog stresa. S druge strane, kronično izlaganje hiperbaričnom kisiku ne izaziva povećanje oksidativnog stresa, što je dokazano u prethodnim istraživanjima na zdravim štakorima u kojima su neizravnim metodama mjereni produkti lipidne peroksidacije koji se vežu za tiobarbiturnu kiselinu tzv. TBARS (engl. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) metodom i mjerenjem antioksidativnih kapaciteta plazme – FRAP (engl. *Ferric Reducing Ability of Plasma*) metodom. Akutno izlaganje HBO<sub>2</sub> povećava razinu TBARS-a, dok se razina FRAP-a nije značajno promijenila. Nakon 24-satnog izlaganja razine obaju spojeva ostale su gotovo iste. Istraživanje je potvrdilo da akutno izlaganje štakora HBO<sub>2</sub> dovodi do značajnog porasta oksidativnog stresa, ali bez značajnih promjena antioksidativnih enzima (17).

Međutim, nedovoljan je broj istraživanja koji izravno pokazuju produkciju superoksida kao glavnog reaktivnog kisikovog radikala, posebice u tkivima.

## **2. HIPOTEZA**

Akutna hiperbarična oksigenacija podiže razinu oksidativnog stresa u krvožilju, mjerljivu fluorescentnim metodama detekcije superoksida *in situ*.

### **3. CILJ**

Cilj je ovog istraživanja izmjeriti produkciju superoksida u samim krvnim žilama kod pokusnih životinja (štakora soja *Sprague-Dawley*) izloženih akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji metodom izravne fluorescencije pomoću dihidroetidina (DHE).

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ispitanici

U istraživanju smo koristili *Sprague-Dawley* muške štakore iz vlastitog uzgoja (Vivarij Medicinskog fakulteta u Osijeku). Štakori su izlagani hiperbaričnoj oksigenaciji tijekom standardiziranog protokola (17,19). Svi eksperimentalni postupci bili su usklađeni s europskim smjernicama za skrb i primjenu laboratorijskih životinja (Direktiva 86/609). Poduzete su sve mjere da bi se spriječila patnja životinja. Sva istraživanja odobrilo je za provedbu Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek te Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske.

Štakori su bili podijeljeni u 4 grupe:

- a) kontrolni (N=7)
- b) akutno izloženi HBO<sub>2</sub> (N=7)
- c) 24h nakon HBO<sub>2</sub> (N=7)
- d) nakon četverodnevnog susljednog izlaganja HBO<sub>2</sub> (N=7)

### 4.2. Protokol istraživanja

Prije žrtvovanja štakori su normalno hranjeni (pelete i voda). Kako bi se smanjio stres zbog premještaja, štakori stari 6 tjedana prebačeni su iz uzgojnog u eksperimentalni dio nastambe radi prilagodbeni novi prostor. Kao uzorak za aortalne prstene korištena je torakalna aorta štakora. Nakon anestezije kombinacijom ketamina 75 mg/kg i midazolama 0,5 mg/kg napravljena je torakotomija te izolirana i izvađena torakalna aorta. Aorta je potom stavljena u preparativnu Petrijevu zdjelicu s hladnom i oksigeniranom Krebs-Henseleitovom otopinom (sastav otopine u mmol/L: 120 NaCl; 4,8 KCl; 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5 CaCl<sub>2</sub>; 1,2 MgSO<sub>4</sub>; 25,5 NaHCO<sub>3</sub>; 10 glukoza i 0,02 EDTA). Nakon čišćenja masnog i vezivnog tkiva, aorta je izrezana na prstene širine 3 – 4 mm. Prsteni su potom stavljani u organske bazenčice (10 ml zapremine) s Krebs-Henseleitovom otopinom koja je stalno grijana (t = 37°C, pH = 7,4) i oksigenirana mješavinom plinova (95 % O<sub>2</sub> i 5 % CO<sub>2</sub>) na način da su dvije paralelne čelične žice provučene kroz lumen prstena, potom je jedna žica učvršćena na dno držača koji se uranja u bazenčić s kupelji, a druga je povezana na pretvarač vlačne sile. Za određivanje bazičnih vrijednosti superoksida aortni prsteni ostavljeni su 1h u bazenčićima te nakon toga prebačeni u Eppendorf tubicu s HEPES puferom (137 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 4,2 mM NaHCO<sub>3</sub>; 3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O; 0,8 mM MgSO<sub>4</sub> x 7

H<sub>2</sub>O; 10 mM glukoza; 20 mM HEPES i 1,2 mM CaCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O) koji sadrži DHE (*Dihydroethidium, Santa Cruz Biotechnology*) boju (20 mM). Tubice su omotane folijom i držane u CO<sub>2</sub> inkubatoru na stalnoj temperaturi 37 °C, nakon 45 minuta inkubacije, žile su isprane svježim HEPES puferom 2 puta svake 4 minute te nakon toga slikane na Zeiss Axioskop MOT<sub>2</sub> mikroskopu, pomoću Olympus DP70 kamere uz Zeiss filter set 15 (546 nm valna duljina za ekscitaciju i 590 nm za emisiju uz razdjeljivač snopa na 580 nm). Za utvrđivanje djelovanja TEMPOL-a na razinu superoksida, aortni prsteni pripremljeni su kao i za određivanje bazičnih razina, s tim da je 30 minuta nakon stavljanja u organske bazenčice dodan TEMPOL (10 µmol/L) te je inkubacija trajala sljedećih 30 minuta. Aortni su prsteni zatim prebačeni u Eppendorf tubice s HEPES puferom i bojom. Intenzitet boje proporcionalan je razini superoksida.

### **4.3. Statističke metode**

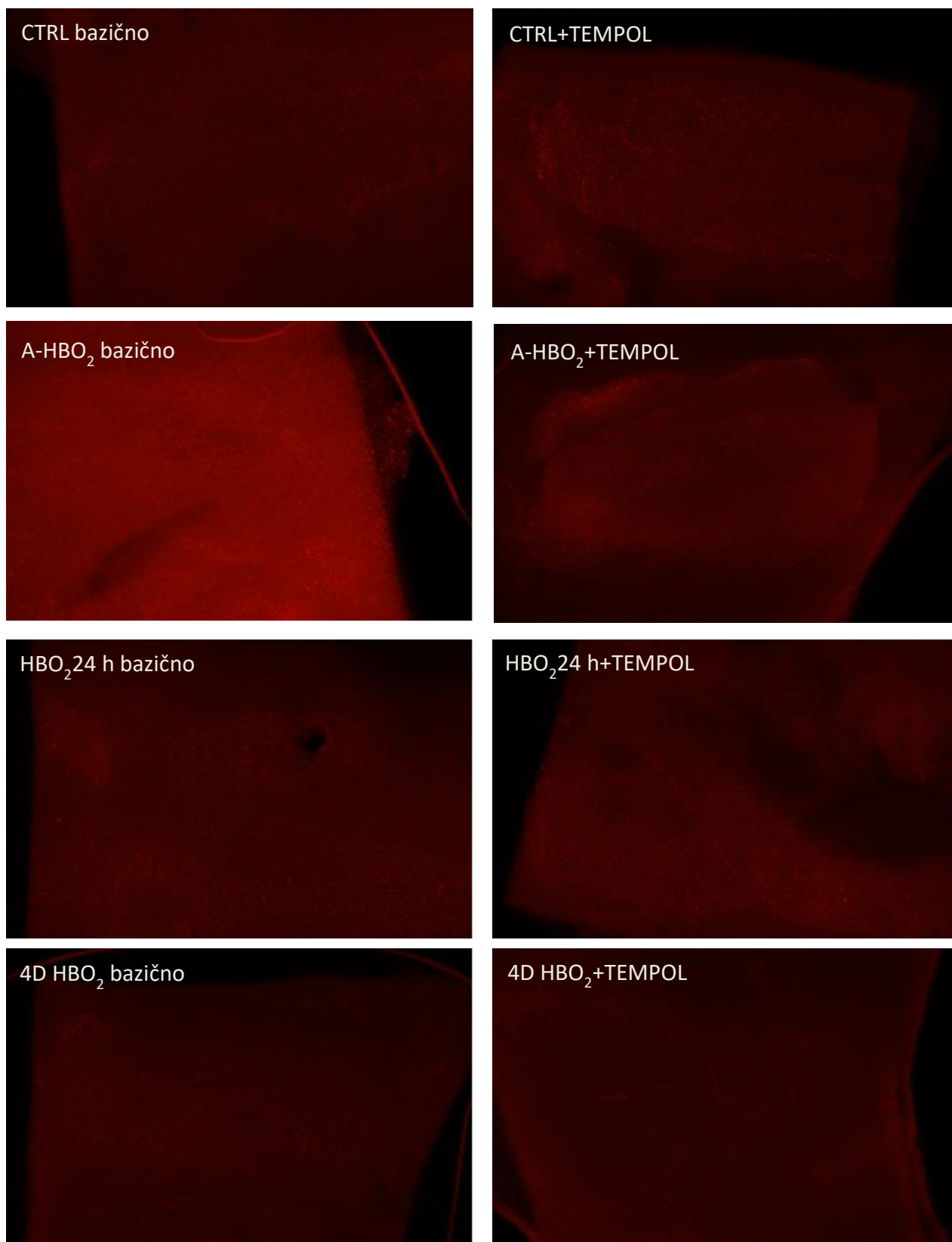
Veličina uzorka određena je pomoću SigmaPlot v11 statističkog programa. Uz alfa = 0,05 te snagu testa od 0,80 i predviđenu najmanju detektabilnu razliku u prosječnim vrijednostima od 15, potrebno je minimalno 7 pokusnih životinja po grupi. Korišten je statistički program SigmaPlot 11.2 (*Systat Software, Inc.*) te GraphPad Prism5. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između ispitivanih skupina testirane su analizom varijance (ANOVA), a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Kruskal-Wallisovim testom. Značajna razlika postavljena je pri vrijednosti  $P < 0,05$ .

## 5. REZULTATI

U istraživanju su korišteni zdravi, muški štakori (*Sprague-Dawley*) koji su prije mjerenja razine oksidativnog stresa podvrgnuti tretmanu hiperbarične oksigenacije.

Produkcija superoksida izmjerena je u samim krvnim žilama kod pokusnih životinja. Kao uzorak za aortalne prstene korištena je torakalna aorta štakora.

Žile su slikane na Zeiss Axioskop MOT<sub>2</sub> mikroskopu, pomoću Olympus DP70 kamere uz Zeiss filter set 15 (546 nm valna duljina za ekscitaciju i 590 nm za emisiju uz razdjeljivač snopa na 580 nm).

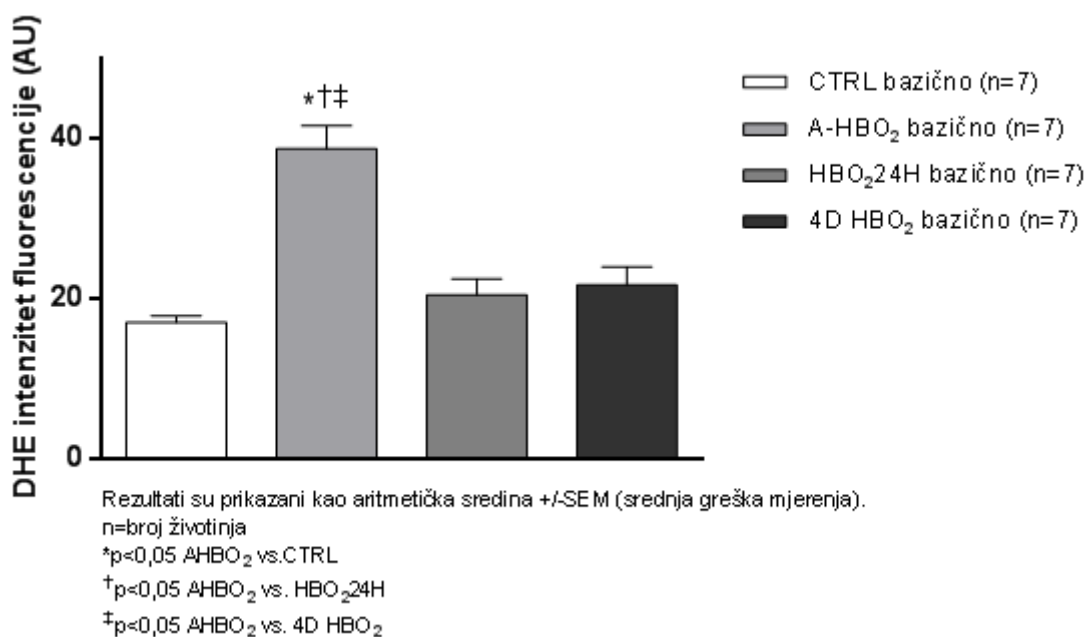


Slika 1. Reprezentativne fotografije žila



Slika 1. prikazuje intenzitet fluorescencije koji je proporcionalan količini stvorenog superoksidnog radikala, tj. razinu oksidacijskog stresa koji je nastao kao nuspojava izlaganja životinja tretmanu hiperbarične oksigenacije. Intenzitet fluorescencije mjereno je u 4 grupe: kontrolni (N=7), akutno izloženi HBO<sub>2</sub> (N=7), 24h nakon HBO<sub>2</sub> (N=7) te nakon četverodnevnog susljednog izlaganja HBO<sub>2</sub> (N=7). Razina superoksidnog radikala mjerena je u svim grupama bez TEMPOL-a (bazično) i nakon dodatka TEMPOL-a u procesu inkubacije. Najviša razina oksidativnog stresa izmjerena je kod životinja koje su akutno izložene hiperbaričnoj oksigenaciji. Njihova razina izmjenjenog signala bila je značajno veća u odnosu na druge dvije ispitivane skupine.

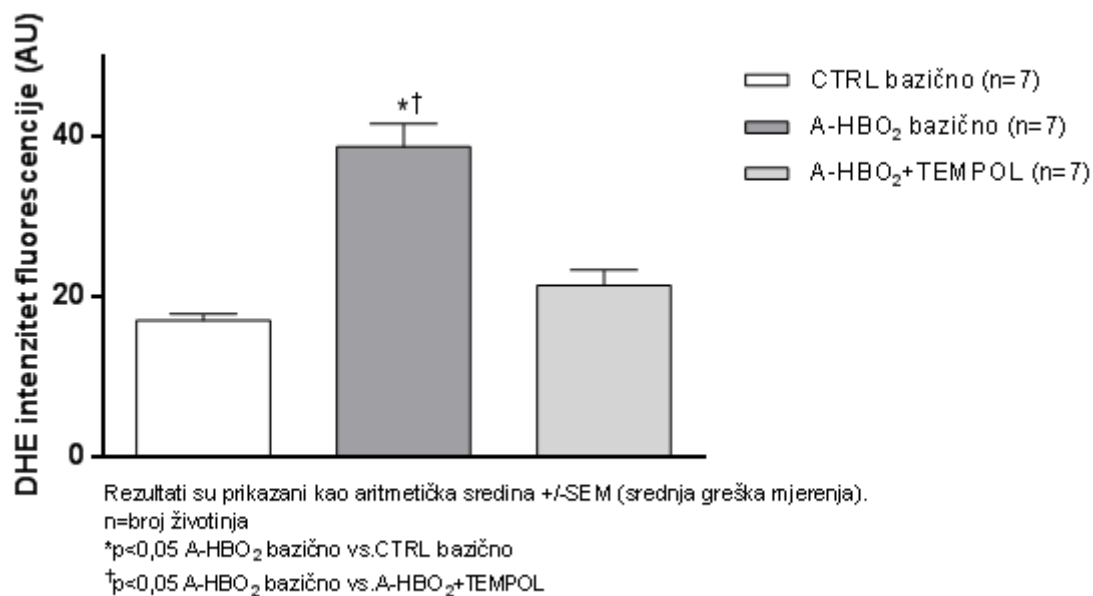
Rezultati su prikazani pomoću grafova koji su napravljeni u programu GraphPadPrism, verzija 5.00 za Windows, GrafPad Software (San Diego, CA, USA).



**Slika 2. Promjena intenziteta fluorescencije nakon A-HBO<sub>2</sub>, HBO<sub>2</sub> 24 h, 4D HBO<sub>2</sub>**

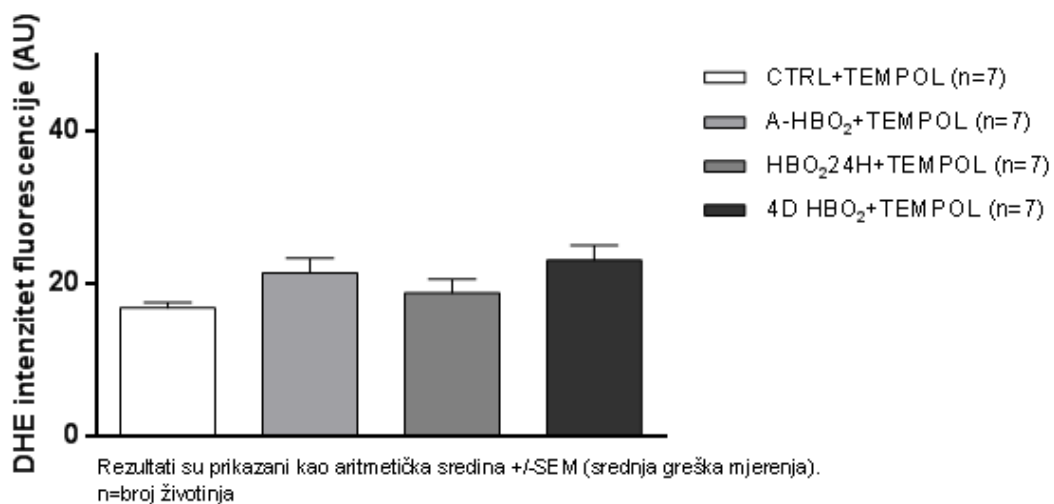
Promjene u intenzitetu fluorescencije izmjerene nakon primjene tretmana HBO<sub>2</sub>; akutno, nakon 24h i nakon četverodnevnog susljednog izlaganja pokazale su značajno povišen intenzitet fluorescencije nakon akutnog izlaganja HBO<sub>2</sub> tretmanu, tj. znatno je povišena razina superoksida u usporedbi s drugim grupama (Slika 2.).

Kako bi se dokazalo djelovanja TEMPOL-a na razinu superoksida, aortni prsteni pripremljeni su istim postupkom kao i za određivanje bazičnih razina, s tim da je 30 minuta nakon stavljanja u organske bazenčiće, dodan TEMPOL te je inkubacija trajala sljedećih 30 minuta.



**Slika 3. Intenzitet fluorescencije nakon A-HBO<sub>2</sub> i A-HBO<sub>2</sub> uz dodatak TEMPOL-a**

Slika 3. prikazuje značajno smanjenje intenziteta fluorescencije uz dodatak TEMPOL-a u grupi akutno oksigeniranih (A-HBO<sub>2</sub>). Kada se u postupku pripreme prstena doda inkubacija s TEMPOL-om, razina superoksida izjednačava se s bazično izmjerenom razinom kod kontrolnih životinja.



**Slika 4. Intenzitet fluorescencije nakon A-HBO<sub>2</sub>, HBO<sub>2</sub> 24 h, 4D HBO<sub>2</sub> uz dodatak TEMPOL-a**

Nakon inkubacije s TEMPOL-om smanjen je intenzitet fluorescencije u A-HBO<sub>2</sub> grupi. Razina oksidativnog stresa gotovo je ista u sve 4 ispitivane skupine (Slika 4.).

## 6. RASPRAVA

Postavljaju se brojna pitanja o ulozi kisika u cirkulaciji; s jedne strane činjenica je da je kisik neophodan za funkciju organizma, a s druge strane može biti vrlo štetan. Složeni učinci hiperoksije mogu djelovati vrlo štetno na organizam. Kako je već ranije spomenuto, kisik je vrlo reaktivna molekula pod čijim utjecajem dolazi do povećane izražajnosti različitih enzima i promjene proizvodnje metaboličkih produkata. Dosadašnja istraživanja pokazala su različite učinke hiperbarične oksigenacije ovisno o primijenjenom protokolu i dužini izlaganja.

Kao što je vidljivo na Slici 2., najveći intenzitet fluorescencije, tj. najveća razina superoksida nastaje kod akutnog izlaganja tretmanu HBO<sub>2</sub>, što potvrđuje hipotezu postavljenu na početku ovoga istraživanja. Intenzitet fluorescencije nije se značajno promjenio nakon 24 sata i četverodnevno susljedno izlaganja, što je izravna potvrda prijašnjih opažanja o oksidativnom stresu, neizravno određenom s TBARS i FRAP metodama (17).

Ako se u inkubaciji nakon akutnog izlaganja HBO<sub>2</sub> tretmanu doda TEMPOL, doći će do smanjenog intenziteta fluorescencije, što prikazuje Slika 3. Ta razlika u intenzitetu fluorescencije posljedica je aktivnosti TEMPOL-a kao SOD-mimetika. TEMPOL zbog svoje male molekularne težine prolazi biološke membrane i utječe na metabolizam brojnih staničnih reaktivnih vrsta kisika i dušika te smanjuje oksidacijski stres (20). Kao što je dokazano u prijašnjim istraživanjima, TEMPOL može spriječiti oksidativna oštećenja mitohondrija i poboljšati oksigenaciju tkiva (21).

S obzirom na to da TEMPOL djeluje kao antioksidans, nakon njegova dodatka u svaki od mjerenih parametara, nije došlo do značajnog povećanja intenziteta fluorescencije (Slika 4.). Razina oksidativnog stresa gotovo je ista u sve 4 mjerene skupine.

Ostaje nepoznato zašto indikatori oksidativnog stresa postaju gotovo normalni tijekom 24h sata nakon izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji, tj. koji su mehanizmi za to odgovorni s obzirom na to da se razina antioksidansa ne promjeni značajno (17).

Druga je nepoznanica zašto se indikatori oksidativnog stresa vraćaju na normalnu razinu kada se primjenjuje intermitentno izlaganje HBO<sub>2</sub>. Nagađa se da je kod intermitentnog izlaganja za normalizaciju zaslužno vrijeme između dvaju izlaganja u kojem cirkulacijski sustav ima vremena za prilagodbu koristeći drugačije mehanizme od prije spomenutih, koji su uključivali porast antioksidativnih enzima (17).

## **7. ZAKLJUČAK**

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Akutna hiperbarična oksigenacija podiže razinu oksidativnog stresa izmjerenu u krvožilju životinja.
- Nakon 24-satnog i četverodnevnog susljednog izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji neće se značajno povećati razina oksidativnog stresa.
- Neutralizacija superoksida TEMPOL-om pri akutnoj hiperoksigenaciji eliminira oksidativni stres.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Cilj je ovog istraživanja izmjeriti produkciju superoksida u krvnim žilama kod pokusnih životinja (štakora soja *Sprague-Dawley*) izloženih hiperbaričnoj oksigenaciji metodom izravne fluorescencije pomoću dihidroetidina (DHE).

**Materijali i metode:** Istraživanje se provelo na zdravim muškim štakorima kod kojih se mjeri razina oksidativnog stresa u 4 skupine: kontrolni (N=7), akutno izloženi HBO<sub>2</sub> (N=7), 24h nakon HBO<sub>2</sub> (N=7) te nakon četverodnevnog susljednog izlaganja HBO<sub>2</sub> (N=7). Kao uzorci za izravno, *in situ*, fluorescentno određivanje proizvodnje superoksida dihidroetidijem (DHE) korišteni su aortalni prsteni iz torakalne aorte štakora.

**Rezultati:** Postoji značajan porast stvaranja superoksida kod akutne hiperbarične oksigenacije, mjerljiv u stijenci krvnih žila (endotelu). Oksidativni stres u krvnim žilama nije se značajno povećao nakon 24-satnog i četverodnevnog susljednog izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji. TEMPOL, kemijska tvar koja neutralizira superoksid, smanjuje količinu superoksida u krvnim žilama akutno oksigeniranih životinja.

**Zaključak:** Akutna hiperbarična oksigenacija podiže razinu oksidativnog stresa izmjerenu u krvožilju životinja. Taj je učinak prolazan, jer 24 sata nakon HBO<sub>2</sub> kao i četverodnevnog nakon susljednih izlaganja HBO<sub>2</sub> nema povećanja oksidativnog stresa.

**Ključne riječi:** hiperbarična oksigenacija, krvne žile, oksidativni stres, slobodni radikali, superoksidi

## 9. SUMMARY

### **The superoxide production under acute hyperbaric oxygenation in rat's blood vessels**

**Aim:** The aim of this study was to measure the production of superoxide in blood vessels in experimental animals (Sprague-Dawley rats) exposed to hyperbaric oxygenation by direct fluorescence method using dihydroetidine (DHE).

**Materials and methods:** The study was performed on healthy male rats by measuring oxidative stress levels in 4 groups: control group (N=7), acute HBO<sub>2</sub> (N=7) group, 24h after HBO<sub>2</sub> (N=7) group, and after 4 days of consecutive HBO<sub>2</sub> exposure (N=7) group. For fluorescent determination of production of superoxide by DHE method as sample, in situ, aortic rings from the rats' thoracic aorta were used.

**Results:** There is a significant increase in the production of superoxide in acute hyperbaric oxygenation, measurable within the blood vessels' wall (endothelium). Oxidative stress in blood vessels did not significantly increase after 24 hours and 4 days of consecutive exposure to hyperbaric oxygenation. TEMPOL, a chemical which neutralizes superoxide, reduces the amount of superoxides in blood vessels of acutely oxygenated animals.

**Conclusion:** Acute hyperbaric oxygenation raises the level of oxidative stress measured in blood vessels of the animal. This effect is transient because 24 hours after HBO<sub>2</sub> exposure and 4 days after consecutive exposure to HBO<sub>2</sub>, there is no increase in oxidative stress.

**Key words:** blood vessels, free radicals, hyperbaric oxygenation, oxidative stress, superoxides

## 10. LITERATURA

1. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000;49:3-8.
2. Friehoff J, Winyard GP, Zarkovic N, Davies SS, Roland Stocker R, Cheng D, i sur. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23:1144–1170.
3. Ćosić A, Novak S, Jukić I, Stupin A, Mihaljević Z, Rašić L, i sur. Primjena laboratorijskih metoda u dijagnosticiranju oksidativnog stresa na primjeru animalnog modela prekomjernog unosa soli. *Cardiol Croat*. 2017;12:78.
4. Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija-uzroci i posljedice. *Medicina* 2007;43:84-93.
5. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Se P. Reddy, Malik AB. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20:1126–1167.
6. Dragun J. (2016.) Učinkovitost galne kiseline na angiogenezu, oksidativni stres i rast tumora. Diplomski rad. Zagreb: Prirodoslovno- matematički fakultet (Biološki odjek).
7. Zhou D, Shao L, Spitz RD. Reactive Oxygen Species in Normal and Tumor Stem Cells. *Adv Cancer Res*. 2014;122: 1–67.
8. Ružić A, Miletić B, Iskra NA, Peršić V, Ražov RM, Včev A. Endotelna disfunkcija u „enigmatskoj slagalici“ kardiovaskularnih bolesti. *Med Glas*. 2009;6:2-15.
9. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, i sur. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int J Biol Sci*. 2013;9:1057-1069.
10. Teodosić A, (2016) Utjecaj arterijskog krvnog tlaka na biljege oksidativnog stresa u novootkrivenih hipertenzivnih. Diplomski rad. Medicinski fakultet Osijek.
11. Jiaxuan Z, Mori T, Huang T, Lombard JH. Effect of high-salt diet on NO release and superoxide production in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004.286:H575-H583.
12. Bertoluci M, Cé G, Silva AMV, Wainstein M, Boff W, Puñales M. Endothelial dysfunction as a predictor of cardiovascular disease in type 1 diabetes. *World J Diabetes*. 2015;6:679-92.



13. Obad A. (2009.) Utjecaj ronjenja na komprimirani zrak i primjene vitamina C i E na izabrane funkcije ljudskog srca i endotelnu funkciju nadlaktične arterije. Disertacija. Zagreb: Medicinski fakultet.
14. Bilić I, Petri NM. Hiperbarična oksigenacija u liječenju infekcija središnjeg živčanog sustava. *Infektološki glasnik*. 2013;33:4,177–181.
15. Thom SR. Hyperbaric oxygen – its mechanisms and efficacy. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127:131–141.
16. Drenjancevic I, Kibel A. Restoring vascular function with hyperbaric oxygen treatment: recovery mechanisms. *J Vasc Res*. 2014;51:1-13.
17. 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;40:319-28.
18. Zhai WW, Sun L, Yu ZQ, Chen G. Hyperbaric oxygen therapy in experimental and clinical stroke. *Med Gas Res*. 2016;6:111-118.
19. Kibel A, Novak S, Cosic A, Mihaljevic Z, Falck JR, Drenjancevic I. Hyperbaric oxygenation modulates vascular reactivity to angiotensin-(1-7) in diabetic rats: potential role of epoxyeicosatrienoic acids. *Diab Vasc Dis Res*. 2015;12:33-45.
20. Bernardy CCF, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Calixto-Campos C, Carvalho TT, Fattori V, i sur. Tempol, a Superoxide Dismutase Mimetic Agent, Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain in Mice. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9584819.
21. Wilcox CS. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol Ther*. 2010;126:119–145.

## **11. ŽIVOTOPIS**

### **Marina Starčević**

Datum i mjesto rođenja: 8.7.1993., Karlovac, Republika Hrvatska

Adresa: Strossmayerov trg 4, 47000 Karlovac

E-mail: starcevic.marina93@gmail.com

#### Obrazovanje:

- 2008. – 2012. Gimnazija Karlovac

- 2012.– 2015. Zdravstveno veleučilište Zagreb – Preddiplomski stručni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

- 2015.–2017. Medicinski fakultet Osijek – Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike