

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijska  
dijagnostika**

**Patricija Marković**

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

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijska  
dijagnostika**

**Patricija Marković**

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

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**

Rad je ostvaren na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskoga fakulteta u Osijeku.

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

Rad sadrži 3 slike i 25 stranica.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Ivani Jukić, dr. med. što mi je omogućila izradu ovoga završnog rada te na tome što je cijelo vrijeme bila od velike pomoći nesebično trošeći svoje vrijeme kako bi mi u što većoj mjeri olakšala pisanje rada.*

*Također, zahvaljujem svojim roditeljima, bratu i sestri na stalnoj bezuvjetnoj potpori.*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Endotel i njegova uloga.....	1
1.2. Protokom potaknuta dilatacija i dušikov oksid (NO).....	2
1.3. Slobodni radikali i oksidativni stres .....	3
1.4. Terapija hiperbaričnom oksigenacijom (HBOT).....	4
2. HIPOTEZA .....	5
3. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	6
4. MATERIJALI I METODE .....	7
4.1. Istraživački životinjski model .....	7
4.2. Izlaganje životinja akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji .....	7
4.3. Izolacija središnje moždane arterije te mjerenje protokom potaknute dilatacije.....	7
4.4. Statističke metode .....	8
5. REZULTATI.....	9
5.1. Bazični odgovor središnje moždane arterije kontrolne skupine i eksperimentalne skupine na protokom potaknutu dilataciju .....	9
5.2. Bazični odgovor na acetilkolinom (Ach) potaknutu dilataciju (AChID) središnje moždane arterije (o endotelu ovisna vazodilatacija).....	10
5.3. Bazični odgovor na natrij-nitroprusidom (SNP) potaknutu dilataciju središnje moždane arterije (o endotelu neovisna vazodilatacija) .....	10
6. RASPRAVA .....	12
7. ZAKLJUČCI.....	13
8. SAŽETAK.....	14
9. SUMMARY .....	15
10. LITERATURA.....	16
11. ŽIVOTOPIS .....	19

## **POPIS KRATICA**

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

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

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

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

**EDHF** – endotelni hiperpolarizirajući čimbenik (engl. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*)

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

**nNOS** – neuronalna dušik-oksidska sintetaza

**eNOS** – endotelna dušik-oksidska sintetaza

**iNOS** – inducibilna dušik-oksidska sintetaza

**GTP** – gvanozin-trifosfat (engl. *guanosine-triphosphate*)

**cGMP** – ciklički gvanozin-monofosfat

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

**IDDM** – inzulin-ovisni dijabetes (engl. *insulin-dependant diabetes mellitus*)

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

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

**CTRL skupina** – kontrolna skupina štakora

**A\_HBOT skupina** – skupina štakora podvrgnuta djelovanju akutne hiperbarične oksigenacije

**SD štakori** – Sprague-Dawley štakori

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

**ACh** – acetilkolin

**AChID** – acetilkolinom potaknuta dilatacija

**SNP** – natrijev nitroprusid (engl. *sodium nitroprusside*)

# 1. UVOD

## 1.1. Endotel i njegova uloga

Endotel je tvorba koju čini jedan sloj endotelnih stanica, a oblaže unutrašnjost svih krvnih žila i žila limfnog sustava te je kao takav u izravnom kontaktu s krvlju, limfom i stanicama koje kolaju tim tekućinama. Znanstvenici su do početka sedamdesetih godina prošlog stoljeća endotel smatrali jednostavnom barijerom koja sprječava ulazak krvnih stanica u dublje slojeve žile. Međutim, danas se zna da upravo endotel stvara polupropusnu barijeru između krvi i okolnog tkiva. Kontrola prijenosa otopljenih tvari i makromolekula, iz krvi i u krv, preko stijenki krvne žile jedna je od glavnih funkcija endotela. Propusnost se može podijeliti na bazalnu propusnost – koja se javlja na razini kapilara, glavnom mjestu razmjene u vaskularnom sloju – i induciranu propusnost, povezanu s upalom, koja pretežno uključuje postkapilarne venule (1,2).

Endotelne su stanice uključene u bitne metaboličke aktivnosti ovisno o dijelu krvožilnog sustava te veličini i tipu krvne žile. Osim što sudjeluju u hemostazi, endotelne stanice mogu metabolizirati, odnosno aktivirati brojne cirkulacijske čimbenike s vazoaktivnim svojstvima ili bez njih, uključujući polipeptidne hormone, amine, nukleotide, lipoproteine, razgradne produkte arahidonske kiseline i reaktivne kisikove spojeve (1). Sintezom i otpuštanjem vazoaktivnih tvari kao što su endotelni čimbenici relaksacije (EDRF) i kontrakcije (ECRF), endotel utječe na tonus glatkog mišićja stijenke krvnih žila te mijenja njezin stupanj vazodilatacije, odnosno vazokonstrikcije. Dušikov oksid, endotelni hiperpolarizirajući čimbenik te prostaciklin najvažniji su EDRF, a tromboksan, slobodni kisikovi radikali i endotelin najvažniji su EDCF (2,3). Endotel također ima značajnu ulogu i u angiogenezi, agregaciji trombocita na endotel, dijapedezi leukocita i sl. (1,2).

Promjene u regulatornim funkcijama endotela, koje dovode do neravnoteže u proizvodnji relaksacijskih i kontrakcijskih čimbenika, prokoagulantnih te antikoagulantnih čimbenika, rezultiraju njegovim oštećenjem. Patofiziološki mehanizmi koji dovode do endotelnog oštećenja podrazumijevaju čimbenike rizika za kardiovaskularne bolesti kao što su hiperkolesterolemija, pušenje, inzulinska rezistencija, hiperglikemija, hipertenzija ili kombinaciju navedenih. Poremećaj u funkciji endotela stoga je i pokazatelj mnogih kardiovaskularnih i metaboličkih bolesti kao što su arterijska hipertenzija, zatajenje srca, ateroskleroza i dijabetes te se također javlja kod starenja i kao odgovor na kemoterapeutike i onečišćeni okoliš (3,4).



## 1.2. Protokom potaknuta dilatacija i dušikov oksid (NO)

Protokom potaknuta dilatacija (FID) o endotelu je ovisan mehanizam regulacije tonusa glatkih mišića vaskulature cijeloga organizma te održavanja homeostaze periferne cirkulacije. Protok kroz krvne žile uzrokuje povećanje smicanja što dovodi do oslobađanja vazoaktivnih tvari iz endotela kao što su dušikov oksid (NO), prostaciklini i endotelni hiperpolarizirajući čimbenici (EDHF). Nedavna saznanja govore o tome da se NO oslobađa iz različitih stanica sisavaca, stoga ima različite uloge ovisno o mjestu otpuštanja. Kao neurotransmiter djeluje kada ga neuroni središnjeg i perifernog sustava otpuste u maloj količini. Regulaciju krvnog tlaka kontrolira tako da inhibira zgrušavanje krvi kada je veća količina dušikova oksida sintetizirana u endotelu i otpuštena u krvotok. Također, NO može djelovati kao citostatik koji može zaustaviti dijeljenje stanica raka i ostalih patogena (5).

Dušikov oksid nastaje iz aminokiseline L-arginina uz prisutnost enzima dušik-oksida sintetaze (NOS) i u prisutnosti kočimbenika kisika, NADPH, tetrahidrobiopterina i flavin adenin nukleotida (6). NOS postoji u trima izoformnim oblicima, a to su neuronalna NOS (nNOS), endotelna NOS (eNOS) i inducibilna NOS (iNOS). Od navedenih, nNOS i eNOS sastavni su enzimi stanica gdje su normalno prisutne i neprestano proizvode dušikov oksid u neznatnim količinama. Tek na podražaj ioniziranim kalcijem, odnosno povećanjem njegove koncentracije u stanici, povećava se i brzina proizvodnje NO-a. Inducibilna NOS ne ovisi o promjeni koncentracije ioniziranog kalcija u stanici, ali potaknuta vanjskim čimbenicima stvara velike količine dušikova oksida koje mogu dovesti do citotoksičnosti (7).

Nakon njegova formiranja, poluživot u krvi mu je svega nekoliko sekundi. Razlog je tomu što superoksidni anion ima visoki afinitet za NO zbog prisutnih nesparenih elektrona u vanjskoj orbitali koji ih čine visoko reaktivnima što za posljedicu ima smanjenje biodostupnosti NO-a. Dušikov se oksid veže za hem u molekuli hemoglobina i enzima gvanilil ciklaze koju pronalazimo u vaskularnom sustavu glatkog mišićja, ali i u glavnini stanica u tijelu. Zbog mogućnosti vezanja na hem u hemoglobinu, NO brzo difundira u krv i tako biva uništen, a vezanjem na hem u gvanilil ciklazi potiče njezinu aktivnost. Taj enzim katalizira defosforilaciju GTP-a u cGMP koji je drugi glasnik u većini bitnih staničnih funkcija.

Vaskularne aktivnosti NO-a podrazumijevaju izravnu vazodilataciju koja je ovisna o protoku i posredovana je receptorima, neizravnu vazodilataciju koja se postiže inhibicijom vazokonstriktorskih utjecaja (inhibicija angiotenzina II i simpatičke vazokonstrikcije), antitrombotski, protuupalni i antiproliferativni učinak. Antitrombotski učinak rezultat je

inhibicije adhezije trombocita na vaskularni endotel, protuupalni je učinak posljedica inhibicije adhezije leukocita na vaskularni endotel i uklanjanja superoksidnog aniona, a antiproliferacijsko djelovanje podrazumijeva inhibiciju hiperplazije glatkih mišića (6).

Brze reakcije NO-a sa slobodnim radikalima smatraju se jednim od glavnih putova za stvaranje reaktivnih dušikovih spojeva (engl. reactive nitrogen species, RNS). Najčešće reagira sa superoksidnim anionom pri čemu nastaje peroksinitrit (OONO<sup>-</sup>). Apoptoza potaknuta peroksinitritom jedan je od glavnih čimbenika napretka raznih patoloških stanja. Neka su od njih bakterijske infekcije, brojne neurodegenerativne bolesti, a upravo peroksinitrit djeluje kao okidač za razvitak inzulinski ovisnog dijabetesa (IDDM) (8).

### **1.3. Slobodni radikali i oksidativni stres**

Slobodni radikali predstavljaju kemijski reaktivne i nestabilne spojeve s nesparenim elektronom u vanjskoj orbitali. Zbog te osobine, oni u organizmu popunjavanju slobodne orbitale tako da stupaju u reakcije s proteinima, ugljikohidratima, lipidima te dovode do njihova oštećenja. Slobodni kisikovi radikali (ROS) najčešći su i biokemijski najznačajniji radikali. Toj skupini pripadaju superoksidni, hidroperoksidni, hidroksilni radikal, ali i neradikali kao što su vodikov peroksid ili hipoklorit. Slobodni su kisikovi radikali uobičajeni nusprodukti staničnog metabolizma. Njihova se brzina stvaranja povećava s povećanjem dostupnosti kisika što se događa npr. prilikom terapije hiperbaričnom oksigenacijom (9). Budući da je ljudskom organizmu neophodan kisik, razvijeni su mehanizmi kojima se sprječava akumulacija slobodnih kisikovih i ostalih radikala. Spojevi koji to sprječavaju jesu antioksidansi koji u svojoj strukturi imaju jedan elektron viška te im on omogućuje sparivanje s elektronom vanjske orbitale slobodnog radikala i njegovu neutralizaciju. Antioksidansi se dijele na stanične (enzimi, askorbinska kiselina), izvanstanične (transferin, ceruloplazmin, haptoglobin, itd.) i membranske ( $\alpha$  i  $\beta$ -tokoferol) antioksidanse i na taj način strateški štite sve strukture organizma.

Nagomilavanje molekula koje su oštećene djelovanjem radikala, smanjena proizvodnja antioksidansa ili povećana proizvodnja prooksidansa dovode do narušavanja ravnoteže između uklanjanja i stvaranja radikala zbog čega nastaje oksidativni stres. Takvo stanje dugoročno može uzrokovati smrt stanice i nastanak raznih patoloških stanja. Istraživanja su dokazala da slobodni kisikovi radikali sudjeluju u nastanku karcinoma te u nastanku Parkinsonove, Alzheimerove i Huntingtonove bolesti. Nadalje, sve više provedenih istraživanja govori u prilog tomu da oksidativni stres potiče razvitak obaju tipova dijabetesa ometanjem unosa

glukoze u mišiće i masno tkivo te smanjenjem lučenja inzulina iz  $\beta$ -stanica gušterače (10). Furukawa i suradnici su u svojem su istraživanju dokazali da je oksidativni stres temelj visokog krvnog tlaka te ateroskleroze (11). Čimbenici su koji dovode do stanja oksidativnog stresa su lijekovi, stres, loša prehrana, zračenje, zagađen okoliš i sl.

#### **1.4. Terapija hiperbaričnom oksigenacijom (HBOT)**

Terapija hiperbaričnom oksigenacijom metoda je liječenja kojoj je cilj povećanje koncentracije kisika u krvi. Budući da se slobodan kisik nalazi otopljen u plazmi, može doprijeti do mjesta kojima je onemogućena oksigenacija zbog opstrukcije i nemogućnosti pristupa eritrocita (12). S obzirom na to da se takav kisik udiše pod tlakom većim od jedne atmosfere (1atm), ostvaruje se brz oporavak hipoksičnog tkiva i reakcija koje ovise o njemu (12). Upravo je zbog toga HBOT našla široku primjenu u kliničkoj praksi. Prvotno se takva terapija primjenjivala za liječenje dekompresijske bolesti ronilaca tako da se povećavao parcijalan tlak plinova, a rezultat je bio iščezavanje nastalih mjehurića plina u krvi. Također, terapija se hiperbaričnom oksigenacijom primjenjuje i pri trovanju ugljičnim monoksidom, kod plinske embolije, nekih kroničnih bolesti kao što je dijabetes (13), ali i kod nekih infekcija kao što su meningokokna sepsa, plinska gangrena itd. (14).

Dvojna priroda kisika čini HBOT složenom metodom. Kisik, iako ključan za život, u prekomjernoj je količini otrovan. Velika količina kisika potiče stvaranje ROS-a i RNS-a što se može i pozitivno i negativno odraziti na stanje organizma. Iako je obrana organizma od viška ROS-a visoko učinkovita, pod djelovanjem visokih parcijalnih tlakova kisika dulje vrijeme organizam može posustati. Takvo stanje može dovesti do dišnih i neuroloških problema koji predstavljaju najčešće nuspojave terapije hiperbaričnom oksigenacijom. Kako bi se prevladale takve komplikacije, primjena HBOT-a ograničena je na tri atmosfere (atm) 100 %-tnog kisika. Akutne se i kronične ozljede stoga liječe na 2 – 2,5 atm što dokazano ne uzrokuje dišne probleme u pacijenata (15).

## **2. HIPOTEZA**

Osnovna je pretpostavka ovoga istraživanja da akutna hiperbarična oksigenacija utječe na protokom potaknutu dilataciju, odnosno narušava ju podižući razinu oksidativnog stresa.

### **3. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj je ovoga istraživanja odrediti djelovanje akutne hiperbarične oksigenacije na protokom potaknutu dilataciju kod pokusnih životinja (štakori soja Sprague-Dawley) metodom mjerenja protokom potaknute dilatacije.

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Istraživački životinjski model**

Ova eksperimentalna studija provedena je u Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije Medicinskoga fakulteta u Osijeku. U svrhu istraživanja korišteno je 11 zdravih muških Sprague-Dawley štakora u starosti od 9 do 11 tjedana, a svi su štakori iz vlastitog uzgoja Vivarija pri Medicinskom fakultetu u Osijeku.

Štakori su bili podijeljeni u dvije skupine:

- 1) CTRL skupina – kontrolna skupina koja podrazumijeva zdrave, netretirane štakore (N=6);
- 2) A\_HBOT skupina – štakori izloženi akutnom djelovanju hiperbaričnog kisika u barokomori, žrtvovani odmah po izlaganju (Rekompresijska komora za eksperimente 110L, Đuro Đaković, Aparati d.d., Slavonski Brod) (N=5).

### **4.2. Izlaganje životinja akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji**

Štakori su bili izloženi djelovanju akutne terapije hiperbaričnom oksigenacijom prema standardiziranom protokolu (16). Nakon smještaja životinja u barokomoru slijedi 15 minuta kompresije na 2,0 atm otvaranjem kompresijskog ventila (dekompresijski je ventil pri tome zatvoren) i puštanjem kisika u komoru. Kad se postigne tlak od 2,0 atm, zatvori se kompresijski ventil te su štakori izloženi djelovanju 100 %-tnog kisika u trajanju od dva sata uz protok 2-3 l/min. Za vrijeme trajanja terapije sa štakorima u komori smještena je i mala količina granula kalcij-hidroksida i natrij-hidroksida te etilvioleta (Draegersorb 800 Plus, DraegerMedical) za upijanje izdahnutog CO<sub>2</sub>. Slijedi 15 minuta dekompresije otpuštanjem dekompresijskog ventila. Životinje su kroz cijeli proces bile pri svijesti i s dostupnom hranom.

### **4.3. Izolacija središnje moždane arterije te mjerenje protokom potaknute dilatacije**

Postupku izolacije središnje moždane arterije prethodilo je vaganje štakora te anesteziiranje kombinacijom ketamina 75 mg/kg ((Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2 ml, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma). Zatim slijedi dekapitacija te se pomoću mikrokirurškog pribora i operacijskog mikroskopa iz mozga izolira središnja moždana arterija. Ona je model na kojem smo odredili kasnije opisano mjerenje protokom

potaknute dilatacije (17) na sustavu tlačnog miografa (The Myograph System, DMT). Arterija se očisti od vezivnog tkiva te se postavlja između dviju staklenih mikropipeta (vanjskog promjera ~ 100-200  $\mu\text{m}$ ) smještenih u komorici koja je ispunjena toplom (37 C) fiziološkom slanom otopinom (PSS, pH =  $7.4 \pm 0.05$ ; sastava (u mM / l): 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.17 MgSO<sub>4</sub>, 1.6CaCl<sub>2</sub>, 1.18 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 0.026 EDTA i 5.5 glukoze). Sustav je kontinuirano oksigeniran smjesom plinova 21 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> i balans N<sub>2</sub>. Nakon postavljanja u komoricu arterija je inkubirana 60 minuta pri tlaku od  $\Delta 80$  mmHg (P1 je 80 mmHg, P2 0 mmHg) kako bi se procijenio osnovni (bazalni) promjer. Žila je cijelo vrijeme snimana infracrvenom kamerom te se slika prikazuje na monitoru, a bilježe se promjene promjera žile. Nakon inkubacije, krvna će žila biti izložena protoku koji se postiže istodobnim promjenama ulaznog (*inflow*) i izlaznog (*outflow*) tlaka (tlačni gradijenti  $\Delta 10$ ,  $\Delta 20$ ,  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$  i  $\Delta 100$  mmHg). Gradijent tlaka rezultirat će nastankom protoka pripremljene PSS otopine kroz postavljenu krvnu žilu. Nakon izmjerenih bazalnih vrijednosti promjera krvne žile pri različitim gradijentima tlaka, mjerila se o endotelu ovisna dilatacija u prisutnosti acetilkolina (100 $\mu\text{L}$ ;  $10^{-6}$  mol/L), te o endotelu neovisna dilatacija u prisutnosti izravnog NO donora, natrijevog nitroprusida (100 $\mu\text{L}$ ;  $10^{-6}$  mol/L).

Na kraju eksperimentalnog protokola PSS se otopina u sustavu zamijeni s PSS Ca-free otopinom kako bi se izmjerio maksimalan promjer krvne žile. Podatci se onih krvnih žila koje nisu pokazivale značajnu razinu aktivnog tonusa (oko 50 %) izuzimaju iz obrade.

Svi eksperimentalni postupci usklađeni su s europskim smjernicama za skrb i primjenu laboratorijskih životinja (direktiva 86/609). Poduzete su sve mjere kako bi se spriječila patnja životinja. Sva su istraživanja za provedbu odobrili Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek te Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske.

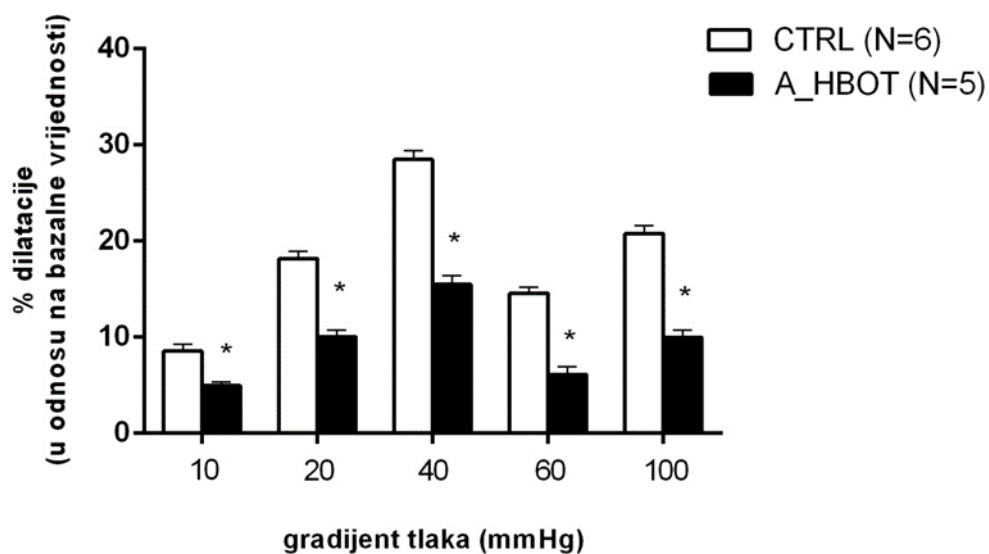
#### 4.4. Statističke metode

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM (engl. Mean  $\pm$  SEM). Za prikazivanje su rezultata upotrijebljeni statistički programi SigmaPlot 11.2 (Systat Software, Inc.) te GraphPad Prism5. Mjerena dilatacija koja je rezultat protoka izražena je u postotku u odnosu na osnovne vrijednosti dobivene mjerenjem pri  $\Delta 0$  mmHg. Odgovor na protok analiziran je s Two-Way ANOVA testom za ponavljane uzorke (engl. repeated measures ANOVA) kako bi se moglo odrediti djelovanje postupka na odgovor analizirane krvne žile. Razina statističke značajnosti postavljena je na  $P < 0,05$ .

## 5. REZULTATI

### 5.1. Bazični odgovor središnje moždane arterije kontrolne skupine i eksperimentalne skupine na protokom potaknutu dilataciju

Protokom potaknuta dilatacija središnje moždane arterije značajno je smanjena u eksperimentalnoj skupini životinja, odnosno životinja koje su bile podvrgnute akutnoj terapiji hiperbaričnom oksigenacijom pri svakom gradijentu tlaka u odnosu na kontrolnu skupinu, odnosno netretirane životinje ( $P < 0,05$ ) (Slika 1.).



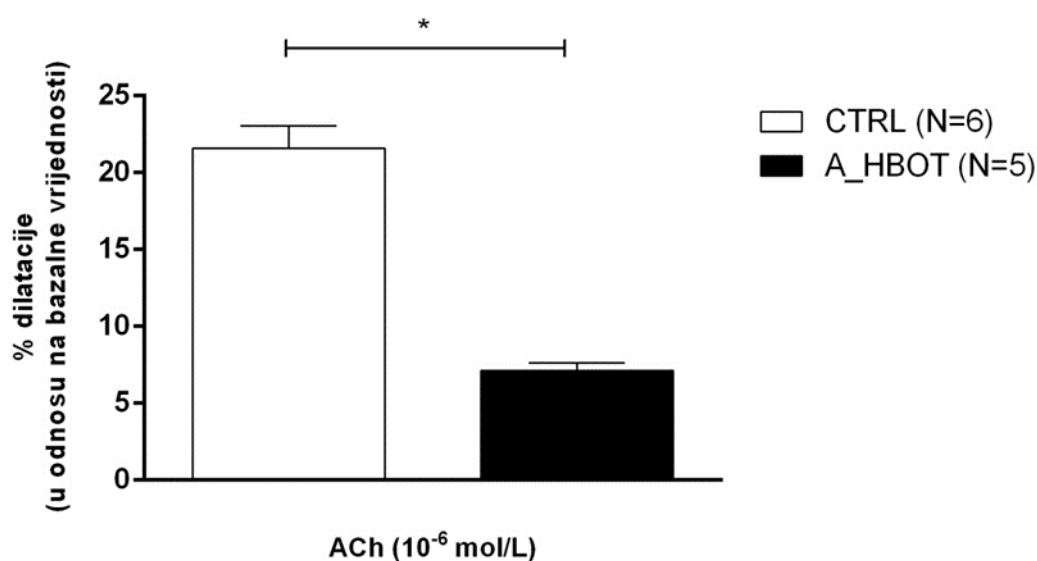
\* $P < 0.05$  CTRL vs. A\_HBOT  
CTRL - kontrola  
A\_HBOT - akutna hiperbarična oksigenacija  
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM

*Slika 1. Bazični odgovor srednje moždane arterije na promjenu gradijenta tlaka kod kontrolne, netretirane skupine životinja (N=6) i životinja tretiranih hiperbaričnom oksigenacijom (N=5) izražen kao udio (%) dilatacije u odnosu na bazalne vrijednosti.*



## 5.2. Bazični odgovor na acetilkolinom (ACh) potaknutu dilataciju (AChID) središnje moždane arterije (o endotelu ovisna vazodilatacija)

Dilatacijski je odgovor srednje moždane arterije skupine tretiranih životinja manje osjetljiv na dilataciju potaknutu acetilkolinom u usporedbi s kontrolnom skupinom životinja (Slika 2.). Ti podatci upućuju na smanjenu osjetljivost središnje moždane arterije nakon akutne hiperbarične oksigenacije na vazodilataciju ovisnu o endotelu.

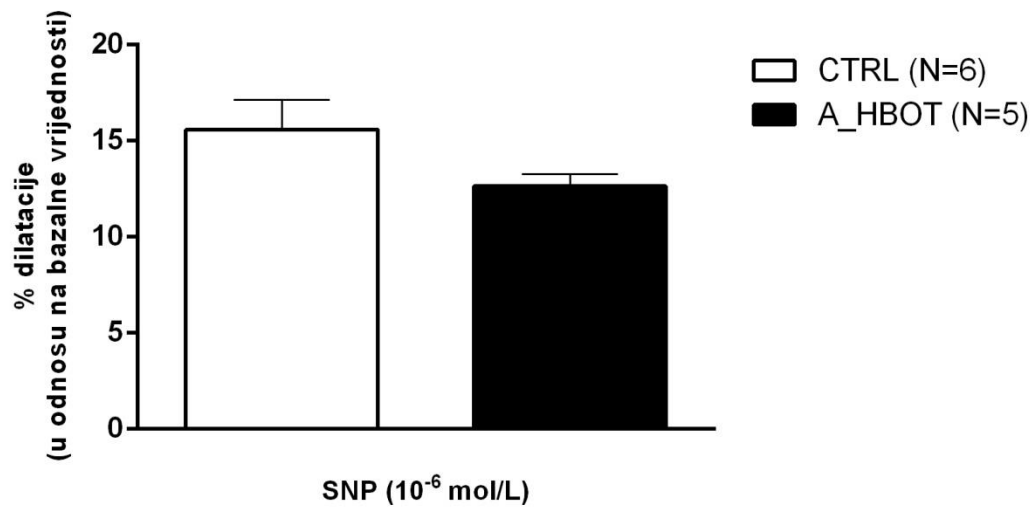


\*P<0.05 CTRL vs. A\_HBOT  
CTRL - kontrola  
A\_HBOT - akutna hiperbarična oksigenacija  
ACh - acetilkolin  
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM

*Slika 2. Bazični odgovor srednje moždane arterije na acetilkolinom potaknutu dilataciju (AChID) u kontrolnoj i pokusnoj skupini životinja.*

## 5.3. Bazični odgovor na natrij-nitroprusidom (SNP) potaknutu dilataciju središnje moždane arterije (o endotelu neovisna vazodilatacija)

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



CTRL - kontrola  
 A\_HBOT - akutna hiperbarična oksigenacija  
 SNP - natrijev nitroprusid  
 Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM

*Slika 3. Bazični odgovor srednje moždane arterije dodatkom NO donora natrijeva nitroprusida na protokom posredovanu dilataciju u kontrolnoj i pokusnoj skupini.*

## 6. RASPRAVA

U ovome je istraživanju ispitivan utjecaj akutne hiperbarične oksigenacije na protokom potaknutu dilataciju u središnjoj moždanoj arteriji zdravih muških štakora soja Sprague-Dawley. Ključna saznanja ovoga istraživanja potvrđuju da akutna hiperbarična oksigenacija utječe na protokom potaknutu dilataciju, odnosno značajno ju smanjuje.

Rezultati ovog istraživanja u skladu su s ranije prikazanim studijama koje ispituju utjecaj hiperbarične oksigenacije na vaskularnu funkciju, a prikazuju smanjen vaskularni odgovor nakon akutnog tretmana hiperbaričnim kisikom (14,16,18). Nedavne studije iz našeg laboratorija pokazale su značajno povećanu razinu oksidativnog stresa nakon akutnog izlaganja hiperbaričnom kisiku (14,16) te smo u ovom istraživanju htjeli vidjeti hoće li stvorena povećana razina oksidativnog stresa imati utjecaj i na protokom potaknutu dilataciju. Rezultati naše studije u skladu su s prethodno navedenim istraživanjima budući da je protokom potaknuta dilatacija značajno smanjena kod pokusnih životinja, koje su bile izložene djelovanju akutnog hiperbaričnog kisika, u odnosu na zdrave netretirane životinje.

Kako bismo ispitali ulogu samog endotela u mehanizmu protokom potaknute dilatacije, u drugom dijelu istraživačkog protokola primijenili smo acetilkolin, čiji je vazodilatacijski učinak posredovan upravo preko endotela, a zatim smo primijenili SNP čiji je vazodilatacijski učinak neovisan o endotelu jer djeluje kao izravan donor NO-a. Dobiveni rezultati nakon primjene tih dviju vazoaktivnih supstanci i pokazana značajna razlika u dilataciji nakon primjene acetilkolina upućuju upravo na važnost endotela u mehanizmu protokom potaknute dilatacije što je i potvrđeno nakon primjene SNP-a, nakon kojega nema značajne razlike između istraživačkih skupina.

I ranije studije iz našeg laboratorija koje istražuju stanja povećane razine stvorenog oksidativnog stresa (npr. dijabetes ili visok unos soli) pokazale su značajan utjecaj povećanog oksidativnog stresa na vaskularnu funkciju krvnih žila te smanjen vaskularni odgovor (14,19). Ova studija potvrđuje narušenu funkciju ispitivanih krvnih žila te je u skladu s prethodno navedenim studijama.

## 7. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata i provedenog istraživanja mogu se izvesti zaključci:

- 1) Akutna hiperbarična oksigenacija smanjuje protokom potaknutu dilataciju.
- 2) Zbog smanjenja osjetljivosti središnje moždane arterije tretiranih štakora na dilataciju ovisnu o endotelu, njezin je dilatacijski odgovor manje osjetljiv na dilataciju potaknutu acetilkolinom uspoređujući ga s kontrolnom skupinom.
- 3) Odgovor središnje moždane arterije na dodatak o endotelu neovisnog donora NO-a natrijeva nitroprusida na protokom potaknutu dilataciju gotovo je nepromijenjen i nisu dokazane značajne razlike između ispitivanih grupa.

## 8. SAŽETAK

**CILJ:** Odrediti učinak akutne hiperbarične oksigenacije na protokom potaknutu dilataciju kod zdravih Sprague-Dawley štakora.

**MATERIJALI I METODE:** U istraživanje je bilo uključeno 11 zdravih Sprague-Dawley štakora podijeljenih u dvije skupine – kontrolnu (CTRL, N=6) i A\_HBOT skupinu (N=5) koju čine štakori podvrgnuti tretmanu akutnog hiperbaričnog kisika (100 %-tni kisik, 2 h/2 bara). Nakon izlaganja kisiku štakori su anestetizirani kombinacijom ketamina (75 mg/kg) i midazolama (0,5 mg/kg) te dekapitirani. Iz mozga je izolirana središnja moždana arterija koja je inkubirana u sustavu 60 minuta pri tlaku od  $\Delta 80$  mmHg (P1 je  $\Delta 80$  mmHg, P2  $0\Delta$  mmHg) zbog procjene bazalnog promjera. Nakon inkubacije, arterija je izložena protoku koji se dobiva istovremenim promjenama ulaznog i izlaznog tlaka uz tlačne gradijente  $\Delta 10$ ,  $\Delta 20$ ,  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$ ,  $\Delta 100$  mmHg te je nakon bazalnog mjerenja protokom potaknuta dilatacija mjerena u prisutnosti acetilkolina (ACh) i natrijeva nitroprusida (SNP). Na kraju eksperimenta PSS otopina, koja je protokom stvarala gradijent tlaka, zamijenjena je PSS Ca-free otopinom u svrhu mjerenja maksimalnog promjera arterije.

**REZULTATI:** Protokom potaknuta dilatacija središnje moždane arterije značajno je smanjena u životinja koje su bile tretirane akutnim hiperbaričnim kisikom u odnosu na zdrave netretirane životinje. Dilatacijski odgovor tretiranih životinja na acetilkolinom potaknutu dilataciju koja je o endotelu ovisna vazodilatacija značajno je smanjen u odnosu na kontrolnu skupinu što upućuje na važnu ulogu endotela u mehanizmu protokom potaknute dilatacije, a odgovor krvnih žila na SNP koji je izravan donor NO-a nije pokazao značajnu razliku između skupina.

**ZAKLJUČAK:** Akutna hiperbarična oksigenacija narušava protokom potaknutu dilataciju, odnosno smanjuje ju.

**KLJUČNE RIJEČI:** hiperbarična oksigenacija; protokom potaknuta dilatacija; acetilkolin; natrijev nitroprusid

## 9. SUMMARY

Influence of hyperbaric oxygenation on flow-induced dilation in healthy Sprague-Dawley rats

**AIM:** To determine the influence of acute hyperbaric oxygenation on the flow-induced dilation in healthy Sprague-Dawley rats by a method of measuring flow-induced dilation.

**MATERIALS AND METHODS:** This study included 11 healthy Sprague-Dawley rats divided into two groups – control, CTRL (N=6) and A\_HBOT group (N=5) which was exposed to acute hyperbaric oxygenation in hyperbaric oxygen chamber to 100% oxygen on 2 bar for 2 hours. After that procedure, rats were anesthetized with ketamine (75 mg/kg) and midazolam (0,5 mg/kg) and then decapitated. Middle cerebral arteries were isolated from rats' brains, and then the arteries were incubated in the pressure myograph system 60 minutes under the pressure of  $\Delta 80$  mmHg (P1 is  $\Delta 80$ mmHg, P2 is  $\Delta 0$  mmHg) due to basal diameter estimation. After incubation, arteries were exposed to flow which is obtained by simultaneous changes of in-flow and out-flow pressure with pressure gradients  $\Delta 10$ ,  $\Delta 20$ ,  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$ ,  $\Delta 100$  mmHg. After basal measurements of the arteries, flow-induced dilation is measured in presence of acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP). At the end of the protocol, PSS solution which was creating pressure gradient with its flow was replaced with PSS Ca-free solution, for the purpose of measuring maximum diameter of arteries.

**RESULTS:** Flow-induced dilation of middle cerebral arteries has significantly decreased in the group treated with acute hyperbaric oxygen therapy, in comparison to healthy untreated animals. The dilation response to acetylcholine (ACh) induced dilation (AChID) of the middle cerebral artery, which is an endothelium-dependent vasodilation, is less sensitive in treated group than in control group. Such data suggests reduced sensitivity of the middle cerebral artery in treated animals after the application of acute hyperbaric oxygenation on endothelial-dependent vasodilation, which indicates an important role of endothelium in mechanism of flow-induced dilation. The blood vessel response to the endothelium-independent nitrogen oxide donor (SNP) was conserved and no differences were found between the two groups.

**CONCLUSION:** Acute hyperbaric oxygenation distorts flow-induced dilation by increasing the level of oxidative stress.

**KEYWORDS:** hyperbaric oxygenation; flow-induced dilation; acetylcholine; sodium nitroprusside

## 10. LITERATURA

1. 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.
2. Sandoo A, van Zanten JJ, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *The Open Cardiovasc Med J.*2010;4:302-312.
3. Gonçalves DR, Negrão CE, Krieger MH. Nitric Oxide and the Cardiovascular System: Cell Activation, Vascular Reactivity and Genetic Variant. *Arq Bras Cardiol.*2011;96(1):68-75.
4. 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.
5. Malinski T. The vital role of nitric oxide; *Oakland university Journal*; 2016; 47-58.
6. Klabunde RE. *Cardiovascular Physiology Concepts*. 2. izd. Lippincott Williams & Wilkins; 2011. Dostupno i na : <http://www.cvphysiology.com/Blood%20Flow/BF011>  
Datum pristupa: 18.08. 2018.
7. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest.*1997;100:2146-52.
8. Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA i sur. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta.* 1999 May 5;1411(2-3):385-400.
9. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Medicinska naklada: 3. izd. Zagreb; 2009. Poglavlje 14 Hormoni (360-363).
10. Maritim AC, Sanders RA, WatkinsJB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 1. izd. 2003; str. 24-38.

11. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*. J Clin Invest. 2004 Dec 15; 114(12): 1752–1761.
12. Saglam M, Bozlar U, Kantarci F, Ay H, Battal B, Coskun U. Effect of hyperbaric oxygen on flow-mediated vasodilation: an ultrasound study. *J Ultrasound Med*. 2008 Feb;27(2):209-14.
13. Verma R, Chopra A, Giardina C, Sabbiseti V, Smyth JA, Hightower LE, et al. Hyperbaric oxygen therapy (HBOT) suppresses biomarkers of cell stress and kidney injury in diabetic mice. *Cell Stress Chaperones*. 2015 May;20(3):495-505.
14. 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.
15. Wilcox JR, Covington DS. Wound healing and hyperbaric oxygen therapy physiology: oxidative damage and antioxidant imbalance U: Armstrong D, Stratton RD, urednici. *Oxidative stress and antioxidant protection: The science of free radical biology and disease*. Hoboken: Wiley – Blackwell; 2016. str. 347-355.
16. 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 Jul-Aug;40(4):319-28.
17. Grizelj I, Cavka A, Bian JT, Szczurek M, Robinson A, Shinde S, Nguyen V, Braunschweig C, Wang E, Drenjancevic I, Phillips SA. Reduced flow-and acetylcholine-induced dilations in visceral compared to subcutaneous adipose arterioles in human morbid obesity. *Microcirculation*; 2015; Jan;22(1):44-53.
18. Hink J, Thom SR, Simonsen U, Rubin I, Jansen E. Vascular reactivity and endothelial NOS activity in rat thoracic aorta during and after hyperbaric oxygen exposure. *Am J PhysiolHeartCircPhysiol*. 2006 Oct;291(4):H1988-98.



19. 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 in rats on a short-term high salt diet. *J Physiol.* 2016 Sep 1;594(17):4917-31.

## 11. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Patricija Marković

**Datum i mjesto rođenja:** 6. rujna 1996., Zagreb, Republika Hrvatska

**Adresa:** Kolodvorska 74 A, Novi Jankovci, 32 241 Stari Jankovci

**Telefon:** 099/738 81 80

**e-pošta:** markpatricija@gmail.com

### **Obrazovanje:**

2003. – 2011. Osnovna škola Stari Jankovci, Stari Jankovci

2011. – 2015. Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci

2015. – preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku