

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Elena Ančić**

**ULOGA TEMPOL-A NA PROTOKOM  
POTAKNUTU DILATACIJU NAKON  
AKUTNOG IZLAGANJA  
HIPERBARIČNOM KISIKU ZDRAVIH  
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Elena Ančić**

**ULOGA TEMPOL-A NA PROTOKOM  
POTAKNUTU DILATACIJU NAKON  
AKUTNOG IZLAGANJA  
HIPERBARIČNOM KISIKU ZDRAVIH  
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**

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

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

Rad sadrži: 2 slike i 23 stranice.

## ZAHVALA

*Veliku zahvalu, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Ivani Jukić, dr. med. koja mi je omogućila pisanje ovog završnog rada, usmjeravala me tijekom same izrade rada te velikoj pomoći i strpljenju za moja mnogobrojna pitanja.*

*Zahvaljujem se svojim roditeljima što su uvijek bili tu za mene tijekom školovanja, hvala im na bezuvjetnoj potpori i pomoći u teškim situacijama te usmjeravanju na pravi put.*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Mikrocirkulacija i uloga endotela.....	1
1.2. Protokom potaknuta dilatacija i uloga dušikovog oksida.....	2
1.3. Oksidativni stres i slobodni radikali.....	3
1.4. Akutna hiperbarična oksigenacija.....	4
2. HIPOTEZA.....	5
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	6
4. MATERIJALI I METODE.....	7
4.1. Istraživački životinjski model.....	7
4.2. Izlaganje štakora akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji.....	7
4.3. Izolacija središnje moždane arterije.....	7
4.4. Statističke metode.....	8
5. REZULTATI.....	9
6. RASPRAVA.....	11
7. ZAKLJUČAK.....	12
8. SAŽETAK.....	13
9. SUMMARY.....	14
10. LITERATURA.....	15
11. ŽIVOTOPIS.....	17

## **POPIS KRATICA**

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

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

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

**cGMP** – ciklički gvanozin-monofosfat

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

**OH** – hidroksilni radikal

**O<sub>2</sub>** – superoksidni anionski radikal

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

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

**ROCH** – reaktivni acetaldehid

**HBOT** - terapija hiperbaričnom oksigenacijom (engl. hyperbaric oxygen therapy)

**SEM** - (engl. Mean  $\pm$  standard error of the mean)

## 1. UVOD

### 1.1 Mikrocirkulacija i važnost endotela

Mikrocirkulacija je završni dio kardiovaskularnog sustava u organizmu čovjeka. Mreža malih, tankih krvnih žila našem tijelu služi za prijenos raznih spojeva između krvi i tkiva. Glavna uloga im je prijenos kisika i nutrijenata parenhimalnim tkivima te odvođenje produkata metabolizma. Prenose razne spojeve kao što su hranjive tvari, respiratorni plinovi, hormoni, krvne stanice, otpadni produkti, ali i toplina. Mikrocirkulacija ima značajnu ulogu u kontroli krvnog tlaka, sudjeluje u regulaciji protoka krvi u tkiva i organe te doprinosi perifernoj vaskularnoj otpornosti. Ona započinje grananjem arterije u manje krvne žile, arteriole, koje se dalje granaju u vrstu arteriole ovisno o tkivu koje opskrbljuju (1,2). Razliku između opsegom većih arterija i arteriola čini blizina parenhimalnim stanicama jer arteriole opskrbljuju krvlju tkivo s kojim su povezane. Također, arteriole imaju jedan ili dva sloja stanica u mišićnim stjenkama što ih čini veličinom manjima od arterija. Na promjene kod intravaskularnog tlaka, arterije i arteriole odgovaraju svojim sužavanjem i otpuštanjem. Porast tlaka rezultira sužavanjem krvnih žila, dok smanjenje krvnog tlaka dovodi do širenja žila, odnosno vazodilatacije (3).

Endotel je jedan od najvećih organa u tijelu težine oko 1 kg kojeg čine trilijuni stanica povezanih u jedan sloj. Služi kao polupropusna barijera između protoka krvi i nepomičnog vaskularnog zida. Endotelni sloj osjetljiv je na stres, odnosno, u stresnom periodu oslobađa vazokonstriksijske čimbenike ili hiperpolarizira membrane mišićne stanice kako bi se potaknula aktivnost glatkih mišića (4). Uz to, endotel je u kontaktu sa svakim organskim sustavom i sudionik je bolesti raznih organskih sustava u našem tijelu kao na primjer neurološkog sustava, imunološkog, kardiovaskularnog, renalnog i ostalih. Sposoban je reagirati na razne unutarne i vanjske tjelesne promjene u koje spadaju temperatura, psihički stres, lijekovi i dr. (5).

Endotelne stanice reguliraju tonus krvnih žila proizvodnjom dušikovog oksida (NO), endotelina i prostaglandina te sudjeluju u manifestacijama aterogeneze, autoimunih bolesti i zaraznih procesa. Nekonrolirani odgovor endotelnih stanica može ukazivati na brojne poremećaje kao što su hipertenzija, ateroskleroza, plućna hipertenzija, upalne bolesti i sepsa. Kako proizvode i reagiraju na različite citokine i adhezijske molekule, endotelne stanice ključne su

imunoreaktivne stanice koje mogu uspostaviti protuupalne i zaštitne odgovore ovisne o uvjetima u okolini.

Uz to, endotel proizvodi brojne vazodilatatorske i vazokonstriktorske tvari koje reguliraju vazomotorni tonus, aktivnost upalnih stanica te reguliraju trombozu. NO, prostaciklin, endotelin i endotelni hiperpolarizirajući čimbenik snažne su vazoaktivne tvari oslobođene iz endotela kao odgovor na humoralne i mehaničke podražaje. NO je jaki vazodilatator, sastavni je dio endotelne proizvodnje koji održava vaskulaturu u stanju vazodilatacije. U endotelnim stanicama nalaze se dušik oksid sintetaze koji kataliziraju pretvorbu dušik oksida iz L-arginina. Jedan od najranijih markera u bolesnika kod kojih nalazimo aterogene čimbenike rizika je disfunkcija endotela nastala zbog smanjene aktivnosti dušikova oksida, te se endotelna disfunkcija i opisuje kao smanjena biodostupnost NO-a (6).

## **1.2. Protokom potaknuta dilatacija (FID) i uloga dušikovog oksida**

Protokom potaknuta dilatacija (engl. flow-induced dilatation, FID ) je fiziološki mehanizam koji je odgovoran za regulaciju tonusa krvnih žila i homeostazu perifere cirkulacije. Glavni dio otpornosti na protok kroz pojedinačne mišiće čine arterije koje leže na vanjskoj strani mišića i dovode do arteriola unutar samog mišića. Neka istraživanja su utvrdila da se protokom potaknuta dilatacija suprotstavlja i natječe s mio genom konstrikcijom potaknutu tlakom u postavljanju otpornosti tonusa. Kao odgovor na protok, vazodilatacija je endotelno zavisna te je važan fiziološki regulator perfuzije tkiva. Postoje mnogi posrednici protokom potaknute dilatacije, ovisno o vrsti i strukturi žilnog tkiva koji se proučava. Među njima najvažniji posrednici su NO, dilatacijski prostaglandini ili kombinacija ta dva posrednika (7).

Dušikov oksid ima izuzetno značajnu ulogu u mehanizmu protokom potaknute dilatacije, te je u uvjetima povećanog oksidativnog stresa njegova biodostupnost smanjena, a samim time i narušena vaskularna funkcija (8,9). NO sintetizira se oksidacijom arginina, a sintetiziraju ga enzimi dušik-oksida sintetaze (engl. nitric-oxide synthase, NOS) koji mogu biti endotelni, neuronski ili inducirani. Stvaranje dušikova oksida ima vitalnu ulogu u regulaciji fizioloških procesa u tijelu, obrani organizma, upali i imunosti. Produkt endotelnih stanica dušikov oksid može imati zaštitnu ili protuupalnu funkciju sprečavajući adheziju i otpuštanje oksidansa koje su mikrocirkulaciji proizveli aktivirani neutrofili (10,11). Topljiva gvanil ciklaza je fiziološki cilj u mnogim stanicama i biološkim signalnim ulogama dušikova oksida. On ju aktivira vezanjem za njenu hem skupinu što rezultira povećanjem cGMP razine. U žilnom sustavu,



cGMP posreduje NO-ovisnoj relaksaciji glatkih mišića krvnih žila, što dovodi do vazodilatacije. Slično kao i u vaskulaturi, dušikov oksid stvoren kao neurotransmiter u autonomnom živčanom sustavu inervirajući gastrointestinalni, respiratorni i urinarni trakt, potiče opuštanje glatkih mišića tako što povećava proizvodnju cGMP-a (10).

### 1.3. Oksidativni stres i slobodni radikali

Oksidativni stres je stanje u kojem dolazi do neravnoteže u stvaranju slobodnih kisikovih radikala (engl. reactive oxygen species, ROS) i sposobnosti tjelesnih antioksidansa da neutraliziraju njihove štetne učinke. Normalni stanični organizam proizvodi slobodne kisikove radikale i ima važnu ulogu u signalnim putevima stanice. Oksidativni stres može dovesti do mnogih patofizioloških stanja u organizmu. Neki od njih uključuju bolesti kao što su Parkinsonova i Alzheimerova bolest, mutacije gena i tumore, poremećaje rada srca i krvnih žila, ateroskleroza i mnoge ostale poremećaje povezane s oksidativnim stresom (12). Poznato je da oštećuje DNA, izmjenjuje puteve stanične signalizacije, povezan je s regulacijom nastanka različitih oblika raka kao npr. rak pluća ili mozga. Uz to, hidroksilni radikali mogu vezati cijelu molekulu DNA te time oštetiti kostur deoksiriboze, posebno purinske i pirimidinske baze.

Najviše proučavani slobodni radikali jesu: hidroksilni radikal ( $\text{HO}^\cdot$ ), superoksidni anionski radikal ( $\text{O}_2^\cdot$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), peroksilni radikal ( $\text{ROO}^\cdot$ ) i reaktivni aldehid ( $\text{ROCH}$ ) (13). Biomarkeri oksidativnog stresa bitni su za procjenu stanja bolesti te učinaka antioksidansa koji pozitivno utiču na zdravlje tj. poboljšavaju ga. Poznato je da reaktivni kisikovi spojevi pod utjecajem oksidativnog stresa uništavaju sve stanične biomolekule (lipide, ugljikohidrate, polinukleotide i proteine). Prema tome, unutar stanica postoji nekoliko mehanizama koji služe sprječavanju nakupljanja kisikovih radikala. Ti mehanizmi uključuju neenzimatske molekule (glutacione, vitamine A, C i E i nekoliko antioksidansa u hrani). Antioksidansi su bitni iz razloga što štite tijelo od oštećenja slobodnim radikalima te su stoga vrlo važni za sveukupno zdravlje organizma (14). Slobodni radikali mogu se smatrati vrlo nestabilnim molekulskim ili atomskim vrstama koje u vanjskoj orbitali imaju jedan nespareni elektron. Visoko su reaktivni te sposobni u stanicama i staničnim membranama uništavati biološki važne. U tijelu nastaju kontinuirano kao posljedica enzimskih i neenzimskih reakcija. Brzina stvaranja im se povećava kako se povećava i sama dostupnost kisika kao što je kod terapije hiperbaričnom oksigenacijom (12).

#### 1.4. Akutna hiperbarična oksigenacija

Terapija hiperbaričnom oksigenacijom (HBOT) metoda je liječenja kojom se nastoji povećati količina kisika u krvi. Ta metoda koristi kisik pri tlaku od 100 kPa (1,0 bara) te bolesnici udišu 100 %-tni kisik u posebno konstruiranim komorama. U ovakvim uvjetima, u hipoksičnim tkivima se razina tkivnog kisika normalizira te je naglašen broj o kisiku ovisnih reakcija i signalnih putova. Hiperbarična oksigenacija može dovesti do izmjene ekspresije proteina te utječe na vaskularnu strukturu i funkciju. Ciljna mjesta djelovanja hiperbarične oksigenacije su endotelne stanice jer su vrlo osjetljive na visokotlačni kisik (15). Terapija ima široku primjenu u kliničkoj praksi te je dokazano da poboljšava čitav niz fizioloških mehanizama: koristi se za saniranje ozljeda povezanih s hipoksijom i ishemijom, uključujući infekcije, kao što je meningokokna sepsa i plinovita gangrena (16).

HBOT može povećati razinu oksidativnog stresa, odnosno uzrokovati stanje neravnoteže između stvaranja slobodnih kisikovih radikala te njihova uklanjanja putem antioksidanata i enzima. Antioksidanti sustav služi obrani organizma od oštećenja nastalog djelovanjem slobodnih kisikovih radikala. On uključuje antioksidacijske enzime kao što su glutation-peroksidaze, superoksid dismutaze ili katalaze. Uz njega, postoji još i neenzimski unutarstanični i izvanstanični sustav kojeg čine različite kemijske skupine: vitamini, aminokiseline, karotenoidi i peptidi koje pronalazimo raznim staničnim strukturama. Svi antioksidansi, bilo da pripadaju enzimskom ili neenzimskom sustavu, čine antioksidacijski kapacitet. Do sad je učinak hiperbarične oksigenacije na antioksidacijski obrambeni mehanizam ispitalo par istraživanja, a on može biti važan modulator različitih učinaka akutne i kronične hiperoksidacije (16).

Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) pripada u obitelj nitroksidnih spojeva koji u *in vitro* uvjetima oponaša djelovanje SOD (kao SOD „mimetic“), odnosno djeluje kao „hvatač“ superoksidnih radikala. Za njega je poznato da je antioksidans djelotvoran u detoksikaciji reaktivnih kisikovih vrsta u staničnoj kulturi i studijama na životinjama. Zbog svoje male molekularne mase, lako prolazi kroz stanične membrane. On štiti organizam od raznih oštećenja nastalih staničnim reaktivnim oksidima i dušikovim spojevima. Njegovi biološki učinci zaštitno djeluju na zračenja, oštećenja srca, bubrega i središnjeg živčanog sustava, štite od metaboličkog sindroma i šoka. Također, primjena terpija Tempolom eliminira slobodne radikale i inhibira lipidnu peroksidaciju u *in vivo* i *in vitro* uvjetima (17).

## **2. HIPOTEZA**

Osnovna pretpostavka ovog istraživanja je da će djelovanjem akutne hiperbarične oksigenacije protokom potaknuta dilatacija biti narušena zbog povećane razine oksidativnog stresa, te da će Tempol oporaviti narušenu protokom potaknutu dilataciju, smanjujući razinu oksidativnog stresa.

### **3. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog istraživanja je:

- 1) odrediti učinak Tempola na protokom potaknutu dilataciju kod pokusnih životinja (štakori soja Sprague-Dawley) koji su bili izloženi akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji, pomoću metode mjerenja protokom potaknute dilatacije.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Istraživački životinjski model

Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije Medicinskog fakulteta u Osijeku. U svrhu eksperimenta korišteni su muški Sprague-Dawley štakori, u dobi od 9 do 11 tjedana starosti. Svi štakori su iz vlastitog uzgoja Vivarija pri Medicinskom fakultetu Osijek.

Štakori su bili podijeljeni u dvije skupine:

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

### 4.2. Izlaganje štakora akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji

Štakori su bili izloženi djelovanju akutne terapije hiperbaričnom oksigenacijom prema standardiziranom protokolu (18). 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 stavljena 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

Postupku izolacije središnje moždane arterije prethodilo je vaganje štakora te anesteziranje 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 (9) na sustavu tlačnog miografa (The Myograph System, DMT).

Arterija se očisti od vezivnog tkiva te se postavlja između dviju staklenih mikropipeta (vanjskog promjera  $\sim 100\text{-}200\ \mu\text{m}$ ) smještenih u komorici koja je ispunjena toplom ( $37\ \text{C}$ ) fiziološkom slanom otopinom (PSS,  $\text{pH} = 7,4 \pm 0,05$ ; sastava (u mM / l): 119 NaCl, 4,7 KCl, 1,17 MgSO<sub>4</sub>, 1,6 CaCl<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  $\Delta 80\ \text{mmHg}$  (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  $\Delta 100\ \text{mmHg}$ ). Gradijent tlaka rezultirat će nastankom protoka pripremljene PSS otopine kroz postavljenu krvnu žilu.

Nakon što su se odredile bazalne vrijednosti promjera izolirane krvne žile, mjerio se vaskularni odgovor krvne žile u prisutnosti Tempola ( $100\ \mu\text{mol/L}$ ), koja se stavlja u komoricu na vrijeme inkubacije 20-30 min. Nakon inkubacije, ponavljalo se mjerenje promjera krvne žile ovisno o tlačnim gradijentima. Na kraju eksperimentalnog protokola, PSS otopinu u sustavu zamijenili smo sa PSS Ca-free otopinom, kako bi se izmjerio maksimalni promjer krvne žile. Podaci onih krvnih žila koje nisu pokazivale značajnu razinu aktivnog tonusa (oko 50 %), izuzimaju se 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.

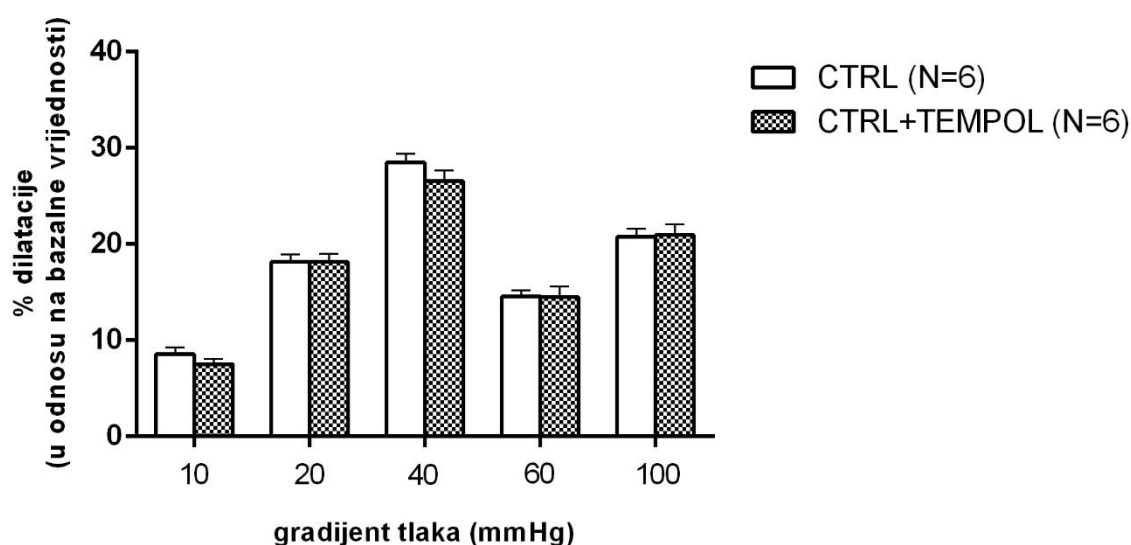
#### 4.4. Statističke metode

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna pogreška aritmetičke sredine  $\pm\ \text{SEM}$  (engl. Mean  $\pm\ \text{SEM}$ ). Za prikaz rezultata korišten se Two-way ANOVA test (GraphPad Prism 5) za ispitivanje razlika u vaskularnoj reaktivnosti među skupinama. (Kod pojedinih rezultata utvrđivanja međusobne razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih grupa koristio se Studentov t-test). Dilatacija koju proizvodi protok izražena je u postotku uvijek u odnosu na bazalne vrijednosti izmjerene pri  $\Delta 0\ \text{mmHg}$ . Razina statističke značajnosti je  $P < 0,05$ .

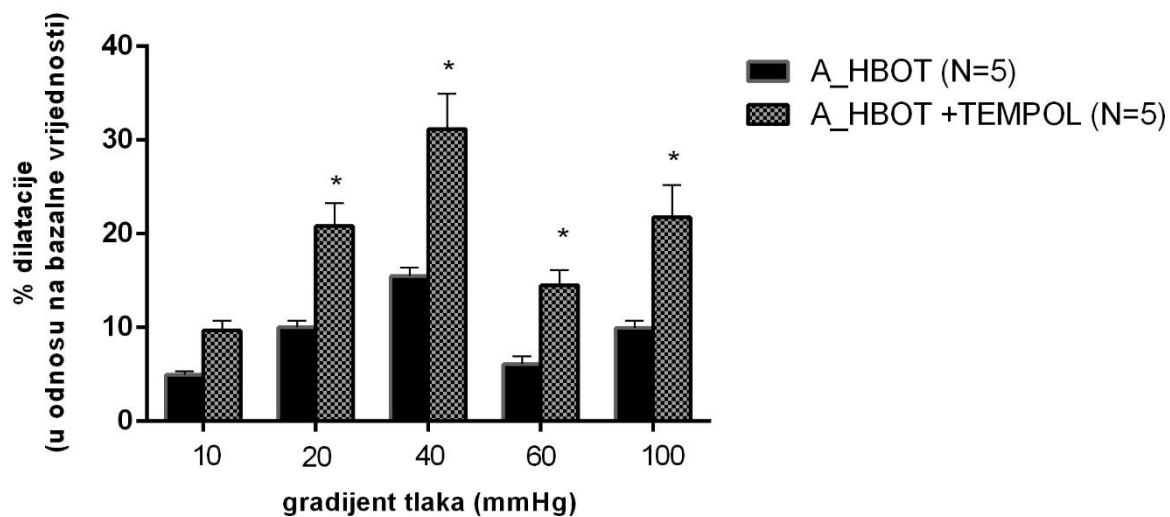
## 5. REZULTATI

### 5.1. Učinak *in vitro* primjene Tempola na protokom potaknutu dilataciju središnje moždane arterije kontrolne i eksperimentalne skupine štakora

Tempol (100  $\mu\text{mol/L}$ ) *in vitro* poboljšava razinu dilatacije u eksperimentalnoj skupini životinja koje su bile podvrgnute akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji u usporedbi s njegovim bazalnim vrijednostima pri svakom gradijentu tlaka, a značajno pri gradijentu od  $\Delta 20$  ( $P = 0,0018$ ),  $\Delta 40$  ( $P < 0,0001$ ),  $\Delta 60$  ( $P = 0,0212$ ) i  $\Delta 100$  mmHg ( $P = 0,0006$ ). (Slika 2.), dok u kontrolnoj skupini Tempol nije imao učinka na promjenu razine dilatacije središnje moždane arterije (Slika 1.).



**Slika 1.** Odgovor središnje moždane arterije u kontrolnoj skupini na protokom potaknutu dilataciju *in vitro* primjenom Tempola pri različitim gradijentima tlaka  $\Delta 10$  ( $P = 0,9277$ ),  $\Delta 20$  ( $P = 0,9999$ ),  $\Delta 40$  ( $P > 0,5008$ ),  $\Delta 60$  ( $P > 0,9999$ ),  $\Delta 100$  mmHg ( $P > 0,9999$ ).



\*P<0.05 A\_HBOT vs. A\_HBOT+TEMPOL  
A\_HBOT - akutna hiperbarična oksigenacija  
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SEM

**Slika 2.** Odgovor središnje moždane arterije pokusne skupine životinja koje su bile podvrgnute terapiji akutnim hiperbaričnim kisikom na protokom potaknutu dilataciju *in vitro* primjenom Tempola pri različitim gradijentima tlaka.



## 6. RASPRAVA

Prikazana studija ispituje utjecaj akutne hiperbarične oksigenacije na protokom potaknutu dilataciju kod zdravih muških Sprague Dawley štakora. U prvoj smo skupini imali zdrave netretirane štakore (CTRL), dok smo u drugoj imali štakore koji su bili podvrgnuti terapiji akutnim hiperbaričnim kisikom (A\_HBOT). Mjerenje protokom potaknute dilatacije napravljeno je prema standardiziranom protokolu na uzorcima središnje moždane arterije (9).

Glavne spoznaje ovog istraživanja su: 1) *in vitro* primjena Tempola kod zdravih netretiranih životinja ne dovodi do promjene razine dilatacije središnje moždane arterije; 2) Tempol koji djeluje kao „hvatač“ superoksida značajno oporavlja narušenu protokom potaknutu dilataciju nastalu nakon akutne hiperbarične oksigenacije što dokazuje povećanu razinu oksidativnog stresa stvorenu akutnim izlaganjem hiperbaričkom kisiku.

U našem laboratoriju su i ranije provedena istraživanja vaskularne funkcije u različitim stanjima povećane razine oksidativnog stresa. Pokazano je kako je upravo kod akutnog izlaganja hiperbaričnom kisiku povećana razina stvorenog oksidativnog stresa, te je smanjen vaskularni vazodilatacijski odgovor (16), stoga smo željeli istražiti da li će se slično dogoditi i kod mehanizma protokom potaknute dilatacije. Rezultati ove naše studije pokazuju kako je i ona u skladu s prethodno navedenim istraživanjem. Naime, u skupini zdravih netretiranih životinja nismo niti očekivali da će Tempol imati učinak na protokom potaknutu dilataciju središnje moždane arterije jer kod kontrolnih životinja ne očekujemo povećanu razinu oksidativnog stresa. Nadalje, rezultati naše studije pokazuju kako upravo kod stanja povećane razine oksidativnog stresa koja nastaje kod akutnim izlaganjem hiperbaričnom kisiku Tempol ima značajnu ulogu, što smo i očekivali budući da Tempol djeluje kao „hvatač“ superoksida.

Ukratko, možemo reći kako akutna hiperbarična oksigenacija narušava o endotelu ovisnu protokom potaknutu dilataciju u otporničkim moždanim krvnim žilama povećavajući proizvodnju oksidativnog stresa, što smo potvrdili oporavljanjem vazodilatacije nakon dodavanja Tempola.

## 7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata možemo zaključiti:

- 1) *in vitro* primjena Tempola kod zdravih netretiranih životinja ne dovodi do promjene razine dilatacije središnje moždane arterije;
- 2) Tempol koji djeluje kao „hvatač“, superoksida značajno oporavlja narušenu protokom potaknutu dilataciju središnje moždane arterije, nastalu nakon akutne hiperbarične oksigenacije.

## 8. SAŽETAK

**CILJ:** Glavni cilj ovog istraživanja je odrediti učinak Tempol-a na protokom potaknutu dilataciju kod Sprague-Dawley štakora izloženih akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji.

**MATERIJALI I METODE:** U istraživanje su bili uključeni zdravi muški Sprague Dawley štakori, podijeljeni u dvije skupine: CTRL skupina - zdravi netretirani štakori (N=6) te A\_HBOT skupina - štakori izloženi akutnom djelovanju hiperbaričnog kisika u barokomori (100 %-tni kisik; 2 bar/2 sata, N=5). Prije dekapitacije, štakori su anestetizirani s ketaminom (75 mg/kg) i midazolamom (0,5 mg/kg). Srednje cerebralna arterija je izolirana i inkubirana pri tlaku od  $\Delta 80$  mmHg. Zatim se mjerio promjer ovisno o tlačnim gradijentima ( $\Delta 10$ ,  $\Delta 20$ ,  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$  i  $\Delta 100$  mmHg), prvo bazalne vrijednosti, a onda u prisutnosti Tempola (100  $\mu\text{mol/L}$ ). Na kraju eksperimentalnog protokola, PSS otopinu u sustavu zamijenili smo sa PSS Ca-free otopinom, kako bi se izmjerio maksimalni promjer krvne žile.

**REZULTATI:** Rezultati pokazuju da *in vitro* primjena Tempola poboljšava razinu dilatacije u eksperimentalnoj skupini životinja koje su bile izložene akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji, dok u kontrolnoj skupini Tempol nije imao učinka na promjenu razine dilatacije središnje moždane arterije.

**ZAKLJUČAK:** Tempol oporavlja narušenu protokom potaknutu dilataciju kod životinja koje su bilo izložene akutnom djelovanju hiperbaričnog kisika, smanjujući razinu stvorenog oksidativnog stresa, dok *in vitro* primjena Tempola kod zdravih netretiranih životinja ne dovodi do promjene razine dilatacije središnje moždane arterije.

**KLJUČNE RIJEČI:** središnja moždana arterija, protokom potaknuta dilatacija; akutna hiperbarična oksigenacija; Tempol.

## 9. SUMMARY

### **Role of Tempol on the flow-induced dilation after acute hyperbaric oxygenation in healthy Sprague-Dawley rats**

**Aim:** The main goal of this study is to determine the effect of Tempol on the flow-induced dilation of Sprague-Dawley rats exposed to acute hyperbaric oxygenation.

**Materials and methods:** The study included healthy male Sprague Dawley rats, divided into two groups: CTRL group – healthy untreated rats (N=6) and A\_HBOT group - rats exposed to acute hyperbaric oxygen in hyperbaric chamber (100 % oxygen; 2 bar/2 hours, N=5). Before decapitation, rats were anesthetized with ketamine (75 mg/kg) and midazolam (0.5 mg / kg) anesthesia. The middle cerebral artery was isolated and incubated at a pressure of 80 mmHg. The diameter was measured depending on the pressure gradients ( $\Delta 10$ ,  $\Delta 20$ ,  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$  i  $\Delta 100$  mmHg), first basal values, and then with Tempol (100  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ). At the end of the experimental protocol, PSS solution in the system was replaced with PSS Ca-free solution so the maximum blood vessel diameter could be measured.

**Results:** The results show that Tempol *in vitro* improves the level of dilation in the experimental group of animals that were exposed to acute hyperbaric oxygenation, while in the control group of healthy untreated rats Tempol had no effect on flow-induced dilation of middle cerebral artery.

**Conclusion:** Tempol restores flow-induced dilatation of middle cerebral artery in animals that were exposed to activity of acute hyperbaric oxygen by reducing the level of produced oxidative stress. Tempol *in vitro* has no effect on flow-induced dilation of middle cerebral arter in healthy untreated control rats.

**Key words:** middle cerebral artery, flow-induced dilation; acute hyperbaric oxygenation; Tempol.

## 10. LITERATURA

1. Hill JA, Olson EN. Muscle; Fundamental Biology and Mechanisms of Disease. U: Jackson WA, urednik. Microcirculation. Academic Press; 2012. str. 1197-1206. Dostupno i na: <https://www.sciencedirect.com/sdfe/pdf/download/eid/3-s2.0-B9780123815101000892/first-page-pdf>. Datum pristupa: 31.8.2018.
2. Williams DA, Segal SS. Feed artery role in blood flow control to rat hindlimb skeletal muscles. *J Physiol*. 1993; 463, pp. 631-646.
3. Dabertrand F, Nelson MT, Brayden JE. Ryanodine receptors, calcium signaling and regulation of vascular tone in the cerebral parenchymal microcirculation. *Microcirculation*. 2013 May; 20(4): 307–316.
4. Freed JK, Gutterman DD. Communication is Key: Mechanisms of Intercellular Signaling in Vasodilation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2017 May; 69(5): 264–272.
5. Widmer RJ, Lerman A. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2014; 2014(3): 291–308.
6. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*. 2004 Jul;93(1):105-13
7. Izzard AS, M Heagerty. Impaired flow-dependent dilatation in distal mesenteric arteries from the spontaneously hypertensive rat. *J Physiol*. 1999 Jul 1; 518(Pt 1): 239–245.
8. Miura H, Wachtel RE, Liu Y, Loberiza FR, Saito T, Miura M i sur. Flow-Induced Dilation of Human Coronary Arterioles. *Circulation*. 2018;103:1992-1998.
9. 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.

10. Liu VWT, Huang PL. Cardiovascular roles of nitric oxide: A review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res.* 2008 Jan; 77(1): 19–29.
11. Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2001 Dec;15(5):831-45.
12. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *PubMed. Pharmacogn Rev.* 2010 Jul-Dec; 4(8): 118–126.
13. Balmus I, Ciobica A, Antioch I, Dobrin R, Timfote D. Oxidative Stress Implications in the Affective Disorders: Main Biomarkers, Animal Models Relevance, Genetic Perspectives, and Antioxidant Approaches. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 3975101.
14. Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:6501046.
15. Verma R, Chopra A, Giardina C, Sabbisetti V, Smyth JA, Hightower LE, i sur. Hyperbaric oxygen therapy (HBOT) suppresses biomarkers of cell stress and kidney injury in diabetic mice. *Cell Stress Chaperones.* 2015 May;20(3):495-505.
16. Mihaljević Z, Matic 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
17. Bernardy CC, Zarpelon AC, Carvalho TT, Fattori V, Casagrande R, Pihno-Ribeiro FA i sur. Tempol, a Superoxide Dismutase Mimetic Agent, Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain in Mice. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 9584819.
18. 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.

## 12. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Elena Ančić

**Datum i mjesto rođenja:** 26.11.1996., Virovitica, Republika Hrvatska

**Adresa:** Kralja Tomislava 12, 34550 Pakrac

**Telefon:** 099/8708 010

**E-mail:** jelena6626@gmail.com

### **Obrazovanje:**

2003. – 2011. Osnovna škola braće Radić, Pakrac

2004. – 2010. Osnovna glazbena škola Pakrac

2011. – 2015. Opća gimnazija. Srednja škola Pakrac

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