

MODULACIJA VASKULARNIH ODGOVORA NA ANGIOTENZIN II I ANGIOTENZIN-(1-7) HIPERBARIČNOM OKSIGENACIJOM - ULOGA CYP ENZIMA

Kibel, Aleksandar

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:632933>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET

Aleksandar Kibel, dr.med.

MODULACIJA VASKULARNIH ODGOVORA NA ANGIOTENZIN II I
ANGIOTENZIN-(1-7) HIPERBARIČNOM OKSIGENACIJOM - ULOGA CYP ENZIMA

Doktorska disertacija

OSIJEK, 2013.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET

Aleksandar Kibel, dr.med.

MODULACIJA VASKULARNIH ODGOVORA NA ANGIOTENZIN II I
ANGIOTENZIN-(1-7) HIPERBARIČNOM OKSIGENACIJOM - ULOGA CYP ENZIMA

Doktorska disertacija

OSIJEK, 2013.

MENTORICA RADA: Prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr.med

Rad ima 115 listova.

Od srca se zahvaljujem mentorici, prof.dr.sc. Ines Drenjančević, dr.med., za sve što je za mene učinila u poticanju mojih znanstvenih aktivnosti.

Također se zahvaljujem voljenoj supruzi Dijani na potpori, toleranciji i razumijevanju.

Posvećujem ovaj rad, ali i sve druge radove u životu svom najvećem životnom uspjehu: predivnoj kćeri Nori.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Hiperbarična oksigenacija.....	1
1.1.1. Definicija.....	1
1.1.2. Hiperbarična oksigenacija u kliničkoj i eksperimentalnoj uporabi.....	1
1.1.3. Izravan porast razine otopljenog kisika.....	5
1.1.4. Utjecaj hiperbarične oksigenacije na vaskularnu reaktivnost.....	6
1.1.5. Daljnji molekularni učinci hiperbarične oksigenacije.....	7
1.1.6. Uloga u oksidativnom stresu.....	10
1.2. Dijabetes melitus.....	11
1.2.1. Poremećena vaskularna reaktivnost i učinci hiperbarične oksigenacije.....	11
1.2.2. Animalni modeli dijabetesa.....	13
1.3. Sustav renin-angiotenzin.....	14
1.3.1. Fiziološka uloga.....	14
1.3.2. Dosadašnje poveznice s hiperbaričnom oksigenacijom.....	17
1.3.3. Učinak angiotenzina-(1-7) u dijabetesu mellitusu.....	18
1.4. Potencijalna uloga CYP enzima i njihovih metabolita.....	19
2. HIPOTEZA.....	23
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	24
4. MATERIJALI I METODE.....	25
4.1. Eksperimentalne životinje.....	25
4.2. Hiperbarični protokol.....	25
4.3. Pokusi vaskularnih odgovora s izoliranim aortalnim prstenovima.....	27
4.3.1. Kirurški postupci.....	27
4.3.2. Korišteni reagensi.....	27
4.3.3. Sustav za ispitivanje reaktivnosti aortalnih prstenova.....	27
4.4. Ispitivanje serumskih koncentracija ELISA metodom.....	31
4.5. Invazivno mjerenje arterijskog tlaka.....	31
4.5.1. Kirurški postupci.....	31
4.5.2. Monitoriranje arterijskog tlaka.....	33
4.6. Određivanje pokazatelja oksidativnog stresa.....	34

4.7. Određivanje ekspresije mRNA specifičnih CYP enzima.....	35
4.7.1. Izolacija RNA.....	35
4.7.2. Pročišćavanje RNA pomoću deoksiribonukleaze.....	36
4.7.3. Reverzna transkripcija.....	36
4.7.4. PCR u realnom vremenu.....	36
4.8. Određivanje proteinske ekspresije specifičnih CYP enzima.....	37
4.8.1. Homogenizacija uzoraka.....	37
4.8.2. Određivanje ukupne koncentracije proteina u uzorcima.....	38
4.8.3. Western blot metoda - jednodimenzionalna SDS gel elektroforeza (SDS- PAGE).....	38
4.8.4. Prijenos proteina na membranu.....	41
4.8.5. Inkubacija s protutijelima i detekcija.....	41
4.9. Statistička analiza.....	42
5. REZULTATI.....	44
5.1. Zdravi štakori.....	44
5.1.1. Vaskularni odgovori izoliranih aortalnih prstenova na ANG II i ANG II + ANG-(1-7).....	44
5.1.2. Vaskularni odgovori na ANG-(1-7) nakon prekontrakcije s noradrenalinom.....	45
5.1.3. Potencijalna uloga EETs u modulaciji vaskularne reaktivnosti.....	47
5.1.4. Utjecaj HBO na serumsku koncentraciju ANG-(1-7).....	52
5.1.5. Utjecaj HBO na srednji arterijski tlak i pokazatelje oksidativnog stresa.....	53
5.1.6. Utjecaj HBO na mRNA ekspresiju CYP enzima.....	54
5.1.7. Utjecaj HBO na proteinsku ekspresiju CYP enzima.....	58
5.2. Rezultati na animalnom modelu dijabetesa.....	60
5.2.1. Vaskularni odgovori izoliranih aortalnih prstenova na ANG II i ANG II + ANG-(1-7).....	60
5.2.2. Vaskularni odgovori na ANG-(1-7) nakon prekontrakcije s noradrenalinom.....	61
5.2.3. Potencijalna uloga EETs u modulaciji vaskularne reaktivnosti.....	63
5.2.4. Utjecaj HBO na serumsku koncentraciju ANG-(1-7).....	65
5.2.5. Utjecaj HBO na srednji arterijski tlak i pokazatelje oksidativnog stresa.....	66
5.2.6. Utjecaj HBO na mRNA ekspresiju CYP enzima.....	67

5.2.7. Utjecaj HBO na proteinsku ekspresiju CYP enzima.....	71
6. RASPRAVA.....	73
6.1. Utjecaj hiperbarične oksigenacije na vaskularne odgovore na ANG II i ANG-(1-7).....	73
6.2. Uloga EETs u modulaciji vaskularnih odgovora.....	75
6.3. Krvni tlak, oksidativni stres i serumska razina ANG-(1-7).....	77
6.4. Ekspresija CYP enzima.....	79
7. ZAKLJUČCI.....	82
8. SAŽETAK.....	84
9. SUMMARY.....	86
10. LITERATURA.....	88
11. ŽIVOTOPIS.....	100

KRATICE

ACE - agiotenzin kovertirajući enzim (engl. *angiotensin converting enzyme*)
ACE2 - agiotenzin kovertirajući enzim 2 (engl. *angiotensin converting enzyme 2*)
AMP - adenzin monofosfat
ANG I - angiotenzin I
ANG II - angiotenzin II
ANG-(1-7) - angiotenzin-(1-7)
ANG-(1-9) - angiotenzin-(1-9)
ANG III - angiotenzin III
ANG IV - angiotenzin IV
apoE - apolipoprotein E
APS - amonijev persulfat
ATP - adenzin trifosfat
Bcl-2 - *B-cell lymphoma 2*
CAMs - stanične adhezijske molekule (engl. *cell adhesion molecules*)
CRP - C - reaktivni protein
CYP - citokrom P450 (engl. *cytochrome p450*)
DHETs - dihidroksieikozatrienoične kiseline (engl. *dihydroxyeicosatrienoic acids*)
DM - dijabetes melitus
dNTP - deoksinukleotid trifosfat
EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)
EETs - epoksieikozatrienoične kiseline (engl. *Epoxyeicosatrienoic acids*)
EGR-1 - protein rasta ranog odgovora 1 (engl. *Early growth response protein 1*)
ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
eNOS - endotelna sintaza dušikovog oksida (engl. *endothelial nitric oxide synthase*)
FGF - čimbenik rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor*)
FRAP - *Ferric Reducing Ability of Plasma*
GTP - gvanozin trifosfat
HBO - hiperbarična oksigenacija
HETE - hidroksieikozatetraenoične kiseline (engl. *Hydroxyeicosatetraenoic acids*)

HGF - čimbenik rasta hepatocita (engl. *hepatocyte growth factor*)

HIF-1 α - hipoksijom inducibilan čimbenik 1 alfa (engl. *hypoxia-inducible factor-1alpha*)

HRP - peroksidaza hrena (engl. *Horseradish Peroxidase*)

DM - dijabetes melitus

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

LFA-1 - antigen povezan s limfocitnom funkcijom 1 (engl. *Lymphocyte function-associated antigen 1*)

MDA - malonildialdehid

MPV - srednji volumena trombocita (engl. *mean platelet count*)

MS-PPOH - *N-methylsulphonyl-6-(2-propargyloxyphenyl) hexanamide*

NA - noradrenalin

NEP - neutralna endopeptidaza

NF- κ B - *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NOD - nepretili dijabetični (engl. *nonobese diabetic*)

OSR-1 - odgovor na oksidativni stres 1 (engl. *Oxidative Stress Response 1*)

pCO₂ - parcijalni tlak ugljikovog dioksida

PCR - lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase chain reaction*)

pO₂ - parcijalni tlak kisika

PVDF - *Polyvinylidene fluoride*

ROS - reaktivni oblici kisika (engl. *Reactive oxygen species*)

STDEV - standardna devijacija

TBARS - *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*

TCA - trikloroetena kiselina (engl. *trichloroacetic acid*)

TNF α - čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*)

1. UVOD

1.1. Hiperbarična oksigenacija

1.1.1. Definicija

Hiperbarična oksigenacija (HBO) ili terapija hiperbaričnom oksigenacijom, engl. *Hyperbaric oxygen therapy* (HBOT), je svako terapijsko ili eksperimentalno korištenje 100% kisika pri tlaku koji je iznad razine atmosferskog tlaka (1, 2). HBO se najčešće provodi u posebno dizajniranim hiperbaričnim komorama u kojima može biti smještena jedna ili istovremeno više osoba ili eksperimentalnih životinja, a izlaganje 100% kisiku može se provoditi preko maske uz okolne uvjete hiperbaričnog zraka ili pak cijela komora može biti ispunjena 100% kisikom. Postoje različiti načini primjene HBO u modernim kliničkim uvjetima, a najčešće se upotrebljavaju opetovana izlaganja u trajanju 90 - 120 minuta pod tlakom od 2.0 - 2.5 bara, uz različit broj ponavljanja (1-5). Doprema kisika pod visokim tlakom dovodi do povećanja arterijskog i tkivnog parcijalnog tlaka kisika (pO_2), što ima korisne učinke u stanjima u kojima smanjena tkivna oksigenacija ne zadovoljava metaboličke potrebe. Uz HBO povećava se količina otopljenog kisika u plazmi, pojačavajući prijenos kisika neovisan o hemoglobinu (6, 7). Unatoč dugogodišnjoj kliničkoj i eksperimentalnoj uporabi, te brojnim istraživačkim radovima koji su analizirali učinke HBO, saznanja o točnim mehanizmima djelovanja HBO u zdravom i bolesnom organizmu nisu potpuna, posebice saznanja o učincima u cirkulaciji.

1.1.2. Hiperbarična oksigenacija u kliničkoj i eksperimentalnoj uporabi

U svrhu poboljšanja kvalitete kliničke i eksperimentalne uporabe HBO, regulacije korištenja HBO i nadzora novih spoznaja u hiperbaričnoj medicini i medicini ronjenja, formirano je udruženje "Undersea and Hyperbaric Medical Society" (s tim imenom od 1986. godine) koje je postalo međunarodno prepoznato tijelo i koje doprinosi jasnijem definiranju korisnih i potencijalno štetnih učinaka HBO, te kliničkih indikacija i kontraindikacija (2). Klasične indikacije za kliničku uporabu HBO uključuju dekompresijsku bolest, plinsku gangrenu, otrovanje ugljičnim monoksidom ili cijanidom, zračnu emboliju, nekrotizirajući fasciitis, celulitis i druge nekrotizirajuće infekcije tkiva, „crush“ ozljede i compartment sindrom, kronični refraktorni osteomijelitis, radijacijsku nekrozu kosti i mekih tkiva, aktinomikozu, poteškoće s

cijeljenjem kožnih presađaka, tešku anemiju zbog gubitka krvi, kronične rane (posebice dijabetične) (8). Međutim, posljednjih godina brojna istraživanja jasno su dokumentirala i pozitivne učinke HBO u drugim patološkim stanjima, s naglaskom na neka stanja u kojima dominira vaskularna patologija. Koristi se kao dodatna terapija u mnogim stanjima sa smanjenom i nedovoljnom tkivnom oksigenacijom i perfuzijom (stanja hipoksije i ishemije). Osim što HBO značajno pridonosi cijeljenju ishemičnih ulceracija u dijabetičnih pacijenata, HBO je povezan s poboljšanjem ishoda cerebrovaskularnog infarkta, s pozitivnim učincima u oporavku od infarkta miokarda i akutne periferne ishemije ekstremiteta, sa smanjenjem aterosklerotskih plakova i drugim učincima (7, 9-12).

Poboljšanje ishoda ishemijskog cerebrovaskularnog incidenta uporabom HBO demonstrirano je u animalnim eksperimentalnim modelima, kao i u humanim kliničkim studijama (12-14). Međutim, postoje i određene dvojbe jer neka klinička istraživanja nisu potvrdila pozitivne učinke HBO (15), premda je to moguće povezati i s drukčijim protokolom oksigenacije s višim tlakovima koji se koristio u istraživanjima u kojima nisu uočeni pozitivni učinci (16). U modelu prolazne žarišne cerebralne ishemije u štakora, HBO se pokazala povoljnom dovodeći do smanjenja infarciranog područja, što je bilo povezano s potisnutom mRNA i proteinskom ekspresijom ciklooksigenaze-2 (12). Henninger i sur. pratili su neuroprotektivni učinak HBO pomoću magnetne rezonancijske tomografije u embolijskom modelu žarišne cerebralne ishemije u štakora s djelomično spontanom reperfuzijom (17). Životinje su bile podvrgnute embolijskoj okluziji arterije cerebri medije te tretirane sa 100% kisikom pod tlakom od 2.5 bara. Tretirane životinje su imale značajno smanjeni volumen infarciranog područja u usporedbi s kontrolnim životinjama, uz značajnu neuroprotekciju u tretiranih životinja 5 sati nakon embolijske žarišne cerebralne ishemije koja je trajala 168 sati (17). HBO može smanjiti i moždano oštećenje nakon drugih cerebrovaskularnih incidenata, kao što je subarahnoidalno krvarenje gdje modulira posljedični cerebralni vazospazam (18).

HBO je povezan s redukcijom veličine infarkta miokarda i s protektivnim učincima u ishemično-reperfuzijskoj ozljedi štakorskog miokarda, dovodeći do indukcije katalaze i sintaze dušikovog oksida (NO) (19-21). Ilustrativni su pokusi u kojima su laboratorijski štakori intermitentno izloženi HBO pri tlaku 2.5 bara tijekom 60 minuta dva puta dnevno u 2 dana, pri

čemu su po 12 sati ostavljeni na normalnom sobnom zraku. Ove životinje su imale značajno manju veličinu infarkta, 3 dana nakon ligacije ramusa interventricularis anterior lijeve koronarne arterije, u usporedbi s kontrolnim životinjama (22). Slični učinci HBO opaženi su u izoliranim štakorskim srcima koji su podvrgnuti 40-minutnoj ishemiji i 90-minutnoj reperfuziji. Veličina infarkta bila je značajno smanjena u životinja koje su prije pokusa podvrgnute HBO (19). HBO je također povezana s prevencijom paroksizama fibrilacije atrija, s redukcijom anginoznih napadaja i s olakšanjem dispneje u kliničkim studijama (20, 22). Posebice se HBO pokazala učinkovitom kao metoda prekondicioniranja - ublažavajući srčanu ishemijsku ozljedu u štakorskim modelima i poboljšavajući parametre srčane funkcije (sistolički tlak u lijevom ventrikulu, indikatore kontraktilnosti miokarda), kao što je utvrđeno u radovima Hana i suradnika (22). U kliničkim studijama prekondicioniranje pacijenata s HBO, prije kirurškog postavljanja koronarnih prijemosnica, pokazuje zaštitne učinke u miokardu i mozgu (manji porast troponina i razine S100 proteina B koji veže kalcij - engl. *S100 calcium binding protein B*), popravljajući funkciju miokarda, smanjuje duljinu boravka u jedinici intenzivnog liječenja (za 18%) i ograničava postoperativne komplikacije (23).

U pokusima s aterosklerotskim modelima, u kojima su korišteni zečevi hranjeni hranom s visokim udjelom kolesterola, kronična ponavljana kratkotrajnom izlaganju HBO dovela su do indukcije antioksidativnih obrambenih mehanizama (vidljivo mjerenjem aktivnosti paraoksonaze i kvantifikacijom lipidne peroksidacije) koji su pak bili odgovorni za vidno kočenje razvoja aterosklerotskih plakova ili za ubrzanje regresije takvih nutritivno izazvanih plakova (9). Slično, u aterosklerotskom modelu koji rabi apoE knockout miševe, HBO atenuira aterosklerozu u tkivu aorte. Uzrokuje duboke promjene u redoks stanjima tkiva, snižava razinu autoprotutijela usmjerenih na oksidativno promijenjen LDL, smanjuje aortni sadržaj kolesterola i smanjuje formiranje masnih pruga (24). U ljudskih ispitanika takvi su učinci HBO na aterosklerozu zapaženi u dijabetičnih pacijenata, pri čemu se mjerio razmjer ateroskleroze i markera upalne aktivnosti kao što su CRP, broj leukocita, lipoproteinski profili, urati, MPV (engl. *mean platelet volume* - srednji volumen trombocita) i broj trombocita. Nakon završene HBO došlo je do statistički značajnog poboljšanja u vrijednostima svih mjerenih parametara (25).

HBO bi mogla biti korisna kao dodatna terapija u pacijenata s teškom ishemijom ekstremiteta i pridruženim kroničnim ranama, a kojima nije moguće uspješno postavljanje krvožilnih prijemosnica, kojima nisu uspjeli prethodni pokušaji revaskularizacije ili kojima vaskularna rekonstrukcija sama po sebi nije bila dovoljna za cijeljenje (26). Prema kliničkim istraživanjima, korist od tretmana imaju samo pacijenti koji su na prvotno udisanje čistog kisika odgovorili značajnim povišenjem transkutano mjerene kisika (26). Specifičan ciljni mehanizam za ove korisne efekte HBO nije bio istražen.

Dobro poznavanje utjecaja HBO na arterijski krvni tlak je potencijalno vrlo važno u kliničkim uvjetima s pacijentima koji imaju hipertenziju, ali je i preduvjet za adekvatnu analizu i razumijevanje utjecaja HBO na vaskularnu funkciju. Objavljeni podatci o djelovanju HBO na arterijski tlak vrlo su raznoliki i dijelom kontradiktorni. Nađeno je da HBO dovodi do povišenja arterijskog tlaka (27-29), sniženja arterijskog tlaka (30) ili pak da ne mijenja značajno arterijski tlak (29, 31, 32). To je vjerojatno posljedica uporabe vrlo različitih protokola (duljina terapije i sl.), raznolikosti vrsta koje su korištene kao ispitanici (životinje, ljudi), raznolikosti patoloških stanja u podlozi (zdravi ispitanici, dijabetes, hipertenzija itd.), stanje svijesti/anestezija. Usporedba rezultata dobivenih u različitim ispitivanjima je stoga otežana ili onemogućena i u daljnjim istraživanjima nužno je uspostaviti i definirati referentne vrijednosti za standardne specifične eksperimentalne uvjete. Iz ranijih pokusa je poznato da promjene arterijskog tlaka mogu značajno utjecati na vaskularnu reaktivnost (33-35), stoga je u ovom radu važno promotriti i ulogu arterijskog tlaka u analizi HBO.

Postoje također dobro poznati i dokumentirani štetni učinci HBO. Vrlo ozbiljan događaj je akutno otrovanje kisikom koje se očituje epileptičkim napadajima nakon kojih većina osoba zapada u komu, a rizik pojave istih raste s porastom tlaka kisika i naročito je visok pri tlaku iznad 4 bara (36). Takvo akutno otrovanje uključuje i simptome kao što su mučnina, mišićni trzaji, omaglica, poremećaji vida, razdražljivost i dezorijentacija. Kronično otrovanje kisikom, koje se već može javiti nakon 12-satnog izlaganja kisiku pri tlaku od jednog bara, očituje se kongestijom dišnih putova, plućnim edemom i atelektazom zbog oštećenja sluznice bronha i alveola (36).

Premda je HBO klinički korisna u određenim stanjima u kojima su vaskularni poremećaji patogenetski važni, uvid u mehanizme utjecaja HBO na vaskularnu funkciju još je uvijek vrlo oskudan (37-39), a njeni učinci se ne mogu jednostavno objasniti pojačanom dostavom kisika u tkiva i nadoknadom postojećeg deficita kisika. Uz daljnje istraživanje u ovom području postaje sve jasnije da su djelovanja kisika izuzetno kompleksna i nisu samo objašnjiva kao djelovanje jednog nutrijenta. Kisik igra važnu ulogu u zamršenom sustavu signalnih putova i sposoban je promijeniti ekspresiju proteina kao što su faktori rasta (7) ili proteini toplinskog šoka (engl. *heat-shock proteini*) (40).

1.1.3. Izravan porast razine otopljenog kisika

S porastom korištenog tlaka kisika kod HBO dolazi do jasnog porasta parcijalnog tlaka kisika u tkivima (pO_2), kao i hidrostatskog tlaka (39). Povišenje hidrostatskog tlaka dovodi do porasta parcijalnih tlakova plinova i do smanjenja volumena plinom ispunjenih prostora, prema Boyleovom zakonu (39). Porast pO_2 u tkivima izmjeren je u različitim eksperimentima. Primjerice, van Hulst i sur. su utvrdili linearan porast pO_2 u mozgu svinje (41). Korhonen je našao značajan porast tkivnog pO_2 u štakora te u zdravim i inficiranim tkivima ljudskih pacijenata s nekrotizirajućim fasciitisom tijekom HBO pri tlaku od 2.5 bara (42). Kessler i sur. prikazali su porast transkutanog pO_2 izmjerenog oko neishemijskih kroničnih dijabetičnih ulkusa stopala u ljudi (43). Vršne razine pO_2 u ranama i trajanje povišenja pO_2 značajno se mijenjaju tijekom HBO tretmana, kao što su pokazali Rollins i sur (44). Oni su kvantificirali pO_2 na modelu rane u štakora i ustanovili da je vršna razina pO_2 tijekom izlaganja HBO i jedan sat nakon izlaganja značajno manja petnaesti dan HBO tretmana u odnosu na peti dan tretmana.

Prema Henryevom zakonu, količina danog plina koji se otopi u danom volumenu i vrsti tekućine izravno je proporcionalna s parcijalnim tlakom toga plina, koji je u ravnoteži s danom tekućinom (45, 46). Stoga, količina fizički otopljenog kisika u plazmi raste s porastom pO_2 . Pri normalnoj tjelesnoj temperaturi, 0.03 ml kisika po litri krvi fizički će se otopiti ako je pO_2 1 mmHg (pri pO_2 od 100 mmHg 1 litra krvi će sadržavati 3 ml kisika) (47). Osim što dovodi do porasta fizički otopljenog kisika u plazmi, HBO je također sposobna održavati maksimalni stupanj saturacije hemoglobina kisikom u mikrocirkulaciji (kao što su izmjerili Meirovithz i sur. u tkivu mozga), s maksimalnom razinom dostignutom pri tlaku od oko 2.5 bara (48). U bazalnim

uvjetima, tkiva preuzmu ukupno otprilike 50 ml kisika iz litre krvi (47). U hiperbaričnim uvjetima (s tlakom od otprilike 2.5 bara 100% kisika) količina fizički otopljenog kisika pokriva te potrebe, a pri alveolarnom pO_2 iznad otprilike 2 bara, puferski mehanizam hemoglobin-kisik zataji i tkivni pO_2 tada može narasti i do razine nekoliko stotina ili tisuća mmHg (36). Uz tako potpuno zasićeni venski hemoglobin, odnošenje CO_2 iz tkiva je smanjeno, što može dovesti do povećanja pCO_2 u tkivima (42, 49). Ovo (potencijalno toksično) nakupljanje CO_2 također čini dio fizičkih učinaka HBO u tkivima i može imati dodatne posljedice koje uključuju pomake u acido-baznoj ravnoteži, stimulaciju stanične CO_2 kemorepcije ili indukciju redoks reakcija (50). Protoni stvoreni hidracijom CO_2 i disocijacijom ugljične kiseline mogu pogoditi i modificirati proteine i lipide vezane za membrane. Molekularni CO_2 također reagira s peroksinitritom (reaktivni radikal dušika), stvarajući pak dodatne dušične i oksidativne reaktivne međuooblake (50). Ovo su zasigurno učinci koji mogu djelomično objasniti neka od djelovanja HBO, ali oni također predstavljaju utjecaje koji mogu biti štetni. Važno je, međutim, napomenuti kako djelovanje HBO nije ograničeno na izravne fizičke učinke, nego može uzrokovati promjene proteinske ekspresije i mijenjati signalne putove.

1.1.4. Utjecaj hiperbarične oksigenacije na vaskularnu reaktivnost

Eksperimentalno je ustanovljeno da HBO primijenjena *in vitro* i *in vivo* može utjecati na vaskularnu funkciju. Primjerice, Hink i sur. su pokazali da HBO *in vitro* atenuira kontraktilne odgovore torakalnih aortnih prstenova štakora na noradrenalin putem mehanizama nezavisnih o endotelu koji uključuju ekstra-endotelijalnu proizvodnju NO (51). HBO pojačava napetost prstenova u mirovanju i smanjuje relaksaciju na acetilkolin smanjujući bioraspoloživost endotelnog NO, neovisno o proizvodnji superoksida (51). Imperatore i sur. su provodili pokuse sa zimosanom, spojem koji uzrokuje vazoplegični šok, promjene srednjeg arterijskog krvnog tlaka, smanjenje kontrakcije na noradrenalin i endotelin-1, kao i smanjenje relaksacije na acetilkolin torakalnih aortnih prstenova štakora (52). U tim pokusima *in vivo* tretman s HBO je atenuirao vazoplegični odgovor na zimosan - došlo je do značajno jače kontrakcije aortnih prstenova na noradrenalin i endotelin-1 te izraženije relaksacije na acetilkolin u usporedbi s prstenovima štakora koji nisu podvrgnuti HBO tretmanu (52). HBO je također učinkovit u modulaciji cerebralnog vazospazma nakon subarahnoidalnog krvarenja, smanjujući time dodatno moždano oštećenje koje prouzrokuje vazospazam, što je utvrđeno u štakorskim modelima kao i u kliničkim

studijama (18). U akutnoj intrakranijalnoj hipertenziji HBO popravlja vaskularnu reaktivnost moždanih krvnih žila na CO₂ u anestetiziranim umjetno ventiliranim psima te obnavlja vazomotorni tonus nakon naglog snižavanja intrakranijalnog tlaka (53). Zanimljivo je da je ustanovljeno kako HBO smanjuje oštećenje tibijalne endotelne funkcije (smanjenje vazodilatacije uzrokovane proizvodnjom NO) uzrokovane pušenjem cigareta u pokusima na zečevima (54). U ovom israživanju, osim povoljnog djelovanja HBO, prestanak pušenja je također imao povoljne učinke (54). Evidentno je da uloga HBO u moduliranju vaskularnih odgovora na brojne fiziološke vazodilatatore (kao što je acetilkolin) i vazokonstriktore (kao što je noradrenalin) može biti ključna za razumijevanje učinaka HBO u raznim patološkim stanjima, s obzirom da je funkcija otporničkih krvnih žila središnji čimbenik koji regulira regionalni protok krvi i dostavu kisika tkivima (36). Dosadašnja saznanja o vaskularnim mehanizmima učinaka HBO su ograničena, a oksigenacija kao eksperimentalno oruđe u animalnim modelima može proširiti uvid u ovo područje, što je od koristi ne samo u kliničkim uvjetima, nego predstavlja i temelj za bolje razumijevanje fiziološke uloge kisika kao signalnog faktora.

1.1.5. Daljnji molekularni učinci hiperbarične oksigenacije

Sposobnost HBO da utječe na molekularne signalne putove očituje se kroz pozitivnu ili negativnu regulaciju brojnih ključnih molekularnih faktora u zdravlju i bolesti. Asano i sur. su našli da HBO potiče bazalnu proteinsku ekspresiju faktora rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor* - FGF) i faktora rasta hepatocita (engl. *hepatocyte growth factor* - HGF) te poboljšava perfuziju i regeneraciju mišića ishemičnih stražnjih udova u miša (55). U ishemičnim udovima miša HBO je također prolazno povećala razinu transkripcijskog faktora EGR-1 (engl. *Early growth response protein 1*) (55). Osim pozitivne regulacije faktora rasta, HBO može uzrokovati negativnu regulaciju citokina i regulirati upalu - HBO suprimira citokinsku proizvodnju potaknutu proinflamatornim stimulusima, utječe na ekspresiju endotelnih staničnih adhezijskih molekula (engl. *cell adhesion molecules* - CAMs) i oslobađanje TNF α (tumor necrosis factor alpha) i endotelina (56, 57). Značajno snižava razinu mRNA prostaglandina E2 i ciklooksigenaze-2 (56). Sposobnost utjecaja na veći broj citokina i upalnih medijatora potvrđena je u istraživanjima na animalnim modelima i ljudima te je povezana s potencijalno korisnim učincima u patološkim stanjima koja uključuju kronične rane, ishemiju, hipoksiju, ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu, regulirajući upalni odgovor (56-58). Povišene razine vaskularnog

endotelnog faktora rasta uzrokovane s HBO povezane su sa stimulacijom angiogeneze (56), a cirkulirajuće matične/progenitorne stanice i promjene u izvanstaničnom matriksu također su ključne u formiranju novih krvnih žila (59).

Smatra se da su mitohondrijski apoptotični signalni putovi potencijalno važne mete djelovanja HBO (60). Prekondicioniranje štakora sa serijom HBO izlaganja prije izazivanja ishemije kralješnične moždine dovodi do nekoliko promjena mitohondrijske signalizacije. HBO povećava ekspresiju Bcl-2 (važnog proteina koji potiče stanično preživljenje u apoptotičnim putovima) u mitohondrijima kralješnične moždine, prije izazivanja ishemije (61). Nakon reperfuzije, u štakora koji su prekondicionirani s HBO, snižene su razine superoksida i vodikovog peroksida u mitohondrijima, smanjeno je otpuštanje citokroma c u citosol i smanjena je aktivacija kaspaze-3 i kaspaze-9 (61). Suprotno tome, neke studije s hematopoetičnim stanicama su pokazale da HBO može inducirati apoptozu. Na primjer, u Jurkat-T-staničnim kulturama, koje su izložene kratkotrajnoj HBO, došlo je do gubitka mitohondrijskog membranskog potencijala i do aktivacije kaspaze-9 (62). Jednokratno izlaganje HBO uzrokovalo je apoptozu limfocita putem mitohondrijskog mehanizma, a autori su zaključili da se izmjereno povećanje Bcl-2 ekspresije može tumačiti kao protektivna mjera stanice (62). Izlaganje HBO potaknulo je apoptozu HL-60 staničnih kultura (humane stanice promijelocitne leukemije) i timocita glodavaca (63). Čini se da su učinci HBO na apoptozu djelomično dvoznačni, složeni i potencijalno različiti u različitim stanicama. Neki od drugih mitohondrijskih učinaka HBO uključuju porast razine ATP-a i sniženje razine AMP-a u poprečnoprugastom mišićju zdravih štakora (64), porast razine enzima za popravak oštećenja mitohondrijske DNA u očnoj leći ostarjelih štakora (65), porast u regionalnoj mitohondrijskoj DNA transkripciji, replikaciji i mitohondrijskoj biogenezi u hipokampusu štakora (66).

Klinički nutritivni dodatak alfa-lipoična kiselina u kombinaciji s HBO terapijom dovodi do modulacije ekspresije matriks metaloproteinaze u ljudskih pacijenata s dijabetičkim ulkusima i ishemijskim vaskulopatijskim ulkusima (67). Ove studije su također potvrdile negativnu regulaciju upalnih citokina pomoću HBO te je HBO povezan i s promjenama ekspresije važnih gena za angiogenezu (67). Smatra se da svi ti mehanizmi pridonose cijeljenju rana i dijabetičnih ulkusa, kao i da utječu na upalne odgovore u traumi i drugim stanjima (56). Svakako je moguće

promišljati o tome da modulacija proteinske ekspresije i upalnih odgovora može djelomično objasniti poboljšanje vaskularne funkcije putem HBO u dijabetesu i drugim patološkim stanjima.

HBO može utjecati na signalne putove ovisne o NO, kao i na stvaranje metabolita arahidonske kiseline ili utjecati na vaskularnu senzitivnost na njih (oni uključuju vrlo važne vazodilatatore i vazokonstriktore koji sudjeluju u regulaciji mikrocirkulacije) (68, 69). To je prvenstveno vidljivo na primjeru promjena ekspresije endotelne NO sintaze (eNOS) i ciklooksigenaze-2 uzrokovane s HBO u animalnim i *in vitro* pokusima (12, 58). U *in vitro* endotelijalnom staničnom modelu ishemijsko-reperfuzijske ozljede kojega su razvili Buras i sur., HBO je poticala sintezu eNOS u humanim umbilikalnim endotelnim stanicama i goveđim aortalnim endotelnim stanicama i suprimirala ekspresiju ICAM-1, koja je bila potaknuta hipoksijom i hipoglikemijom (58). Zanimljivo je istraživanje Xu i suradnika koji su proučavali ekspresiju eNOS u endotelnim stanicama moždane mikrovaskulature *in vitro* nakon izlaganja HBO (70). Ekspresija eNOS u tim pokusima bila je povišena 24 sata nakon izlaganja, ali ne i neposredno nakon izlaganja, što je možda odraz potrebnog vremena za novu sintezu proteina. Autori su potom istražili i odnos između epileptičnih napadaja uzrokovanih HBO i promjena moždanog krvnog protoka *in vivo*. Zaključili su, s obzirom na sporu pozitivnu regulaciju eNOS *in vitro*, da je eventualna uloga NO u zapaženim *in vivo* promjenama vjerojatno ograničena (70). Budući da je opaženo kako je HBO bila učinkovita kao dodatna terapija bolesti unutarnjeg uha vezanih za ishemiju, Lin. i sur. su proučavali stanične promjene koje se događaju nakon ponavljanih hiperbaričnih izlaganja u zamoraca. Nađena je indukcija eNOS u podstrukturama pužnice (71).

U neuroprotektivne molekularne mehanizme, koji su važni u zaštitnim učincima HBO kod hipoksijsko-ishemijskih moždanih lezija, uključena je inhibicija neuralne apoptoze, što pokazuju studije s prekondicioniranjem pomoću HBO u neonatalnih štakora (72) te ranije spomenuti korisni učinci prekondicioniranja prije izazivanja lezija kralješnične moždine. HBO popravlja i staničnu vijabilnost i moždani metabolizam podizanjem razina ATP-a i GTP-a (73). Redukcija ekspresije ciklooksigenaze-2 putem prekondicioniranja s HBO pruža protektivni učinak u modelu globalne cerebralne ishemije štakora (74). Gu i sur. istraživali su učinak prekondicioniranja s HBO na molekularne mehanizme neuroprotekcije u modelu žarišne cerebralne ishemije štakora (75). Našli su da je za toleranciju ishemije omogućenu

prekondicioniranjem s HBO odgovorna indukcija HIF-1 α (engl. *hypoxia-inducible factor-1alpha*) i eritropoetina (75). To je zanimljivo jer nalikuje na ishemijsko prekondicioniranje, u kojemu ishemijski stimulus, slabiji od praga koji izaziva oštećenje, dovodi do ishemijske tolerancije. Ovo sugerira da intermitentna HBO možda predstavlja signale koji se percipiraju kao neka vrsta pseudohipoksije. Smanjenje ekspresije integrina LFA-1 (engl. *Lymphocyte function-associated antigen 1*) i ICAM-1 također je bitan mehanizam u protektivnom učinku HBO u ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi (76).

1.1.6. Uloga u oksidativnom stresu

Na temelju saznanja iz dosadašnjih istraživanja, postoje dvojbe vezane uz potencijalnu toksičnost HBO u kontekstu stvaranja oksidativnog stresa, a u odnosu na potencijalno ključnu ulogu HBO u smislu oksidativne signalizacije i pozitivne regulacije antioksidativnih mehanizama. Široko je prihvaćeno da udisanje kisika pri tlaku iznad 1 bara neizbježno povećava proizvodnju reaktivnih kisikovih oblika (engl. *Reactive oxygen species* - ROS), što može biti od velike važnosti u analizi i objašnjenju brojnih mehanizama HBO djelovanja (36, 39, 59). Primjerice, Matsunami i sur. su u ispitivanjima na dijabetičkim pacijentima i na dijabetičkim štakorima našli da HBO potiče stvaranje ROS, moguće putem pozitivne regulacije kompleksa NADPH oksidaze, koji je važan izvor ovih oblika (77). Druga istraživanja fokusirala su se na određivanje promjena u indikatorima lipidne peroksidacije te u razini i/ili aktivnosti antioksidativnih enzima kao što su superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza i sl. uzrokovanih s HBO u različitim tkivima, uz vrlo velike razlike u dobivenim rezultatima (78-80) - moguće kao posljedica korištenja različitih protokola. Potrebno je, stoga, dodatno istražiti ovu problematiku i za pojedine HBO protokole pažljivo utvrditi razmjer i dinamiku oksidativnih zbivanja kako bi se što kvalitetnije mogla tumačiti opažanja o HBO učincima u vaskularnoj funkciji. To još više dobiva na važnosti ako se uzme u obzir da su ROS povezani s animalnim modelima hipertenzije i s poticanjem vaskularnog odgovora na konstriktore (81-83). Iz ranijih istraživanja se zna da oksidativni stres može izravno utjecati na vaskularnu reaktivnost (84-87), stoga će se i u ovom radu obratiti pozornost na ulogu oksidativnog stresa u analizi učinaka HBO.

Osim regulacije antioksidativnih sustava putem HBO, koji bi mogli biti vrlo korisni u patološkim stanjima kao što je ateroskleroza, ishemija ekstremiteta ili reperfuzijska ozljeda,

važna je i poznata uloga oksidativnog stresa u određenim signalnim kaskadama. Primjer za to je OSR-1 (Oxidative Stress Response 1), koji je važan u regulaciji embrionalnog razvoja kardiovaskularnog sustava, što je eksperimentalno pokazano na miševima *in utero* (88). Ovaj signalni put može imati značajan utjecaj na angiogenezu (koja pak ima važnu ulogu u kroničnim ranama, dijabetičkim ulkusima i ishemiji), kao i u formiranju srčanih defekata (88). Jedan drugi ilustrativni primjer sposobnosti oksidativnog stresa da igra ulogu okidača signalnih putova je inaktivacija deubikvitinirajućih enzima (koji imaju široki utjecaj na brojne biološke i patološke procese) od strane ROS (89). Deubikvitinacija je visoko reguliran proces, povezan s različitim bolestima, od malignih tumora do neuroloških poremećaja, a ROS predstavljaju važne signalne molekule u staničnoj proliferaciji i preživljenju (89). Značaj uloge ROS u promjenama vaskularne reaktivnosti posredovane s HBO još nije potpuno poznat te su potrebna dodatna istraživanja.

1.2. Dijabetes melitus

1.2.1. Poremećena vaskularna reaktivnost i učinci hiperbarične oksigenacije

Dijabetes melitus (DM) ili šećerna bolest je sindrom poremećaja metabolizma ugljikohidrata, masti i bjelancevina, uzrokovan nedostatnim lučenjem inzulina ili smanjenom osjetljivošću tkiva na inzulin (36). Postoje dva oblika - dijabetes tipa 1, koji nastaje zbog nedostatnog lučenja inzulina iz beta-stanica Langerhansovih otočića gušterače, i dijabetes tipa 2, koji nastaje zbog *inzulinske rezistencije* (smanjene osjetljivosti ciljnih tkiva na metaboličke učinke inzulina) (36). Dugotrajni neliječeni DM uzrokuje tkivnu hipoksiju i ishemičnu ozljedu tkiva uslijed mikroangiopatije, ubrzava aterosklerozu i dobro je poznat rizični čimbenik za koronarnu bolest i nastanak moždanog udara (9, 90, 91). Brojne studije su dokumentirale poremećaje vaskularne reaktivnosti u DM - pojačanu reaktivnost na fiziološke vazokonstriktore i smanjenu reaktivnost na vazodilatatore (92-98), kao i kronično oštećenu autoregulaciju moždanog krvnog protoka (99). U štakora u kojima je DM izazvan streptozocinom (molim vidjeti kasnije), vazodilatacija na acetilkolin bila je oštećena, kao i dilatacija arteriola posredovana protokom (engl. *flow mediated dilation*) (97, 100, 101). U takvim štakorskim modelima dijabetesa, kontrakcija na noradrenalin u aorti, skeletnim arterijama i mezenteričnim arterijama bila je pojačana (92, 102, 103). Smatra se da su brojni mehanizmi uključeni u nastanak ove

endotelne disfunkcije koju uzrokuje DM. Oni uključuju oštećenje NO-ovisne dilatacije (104-106), promjene u metabolizmu arahidonske kiseline (104, 107), stvaranje uznapredovalih krajnjih produkata glikacije (108), upalu (109, 110), pozitivnu regulaciju određenih transkripcijskih faktora kao što je NF-kB (110), porast oksidativnog stresa (87), promjene u konduktivnim vazomotornim odgovorima (111) i druge.

Terapija HBO pokazala se u kliničkom smislu učinkovitom u liječenju dijabetičnih pacijenata s kroničnim ranama, ona pospješuje i cijeljenje kroničnih ulkusa stopala, iako je potrebno učiniti dodatna istraživanja za donošenje potpuno nedvojbenih zaključaka (112-115). U dijabetičnih pacijenata također se pokazalo da HBO ima povoljne učinke na razvoj ateroskleroze i kontrolu glikemije te da dovodi do poboljšanja markera upale (25). Prikaz slučaja dramatičnog poboljšanja postpartalnog nekrotizirajućeg fasciitsa u području rane nakon carskog reza u trudnice s DM još je jedan primjer ekonomične učinkovitosti u uporabi HBO (116). S obzirom da je primjerena vaskularna funkcija preduvjet za zadovoljavajuću perfuziju tkiva, učinak HBO na vaskularnu reaktivnost na razne fiziološke vazokonstriktore i vazodilatatore kao što su noradrenalin, eikozanoidi, NO ili acetilkolin dolazi u fokus pri pokušaju objašnjenja djelovanja HBO.

U eksperimentalnim ispitivanjima u nepretilih dijabetičnih miševa (engl. *nonobese diabetic* -NOD mice) HBO može prevenirati razvoj autoimunog dijabetesa. Tretman s HBO je reducirao incidenciju dijabetesa urokovanog ciklofosfamidom i spontanog dijabetesa u NOD miševa, a usporedno smanjio inzulitis i očuvao beta-stanice smanjenjem apoptoze i pojačanjem proliferacije (117). Među drugim korisnim učincima u DM, Oliveira i sur. izvijestili su o poboljšanju cijeljenja kosti oko implantata nakon HBO u štakora u kojih je DM izazvan aloksanom, čak do razine kao što je kod zdravih štakora (118). Nagatomo i sur. zapazili su odgođeno formiranje katarakte uzrokovane dijabetesom i usporenje njene progresije u miševa s DM tipa 2 koji su tretirani s HBO (119). Prethodno je postulirano kako će hiperbarična oksigenacija imati pogodan učinak na vaskularnu funkciju jer će modulirati mehanizme vaskularnih odgovora na različite dilatatorne i konstriktorne agoniste, popravljajući vaskularnu reaktivnost (38). U sklopu navedene hipoteze, hiperbarična oksigenacija bi utjecala na produkciju ili osjetljivost krvnih žila na vazokonstriktorne i vazodilatacijske metabolite arahidonske kiseline i dušičnog oksida (NO) pri odgovoru na fiziološke stimulanse (38). Rezultati istraživanja

vaskularne reaktivnosti pokazali su da HBO popravlja vazodilataciju na acetilkolin u izoliranoj i perfundiranoj srednjoj moždanoj arteriji (*a. cerebri media*), koja je pak bila smanjena u dijabetičnim štakorima koji nisu tretirani s HBO (120). Kontrakcija srednje moždane arterije na serotonin bila je očuvana nakon inhibicije ciklookigenaze u štakora tretiranih s HBO, dok je u štakora bez HBO tretmana i u zdravih štakora ta kontrakcija nakon inhibicije ciklooksigenaze bila eliminirana (120). Dok je NO posredovao vazodilataciju srednje moždane arterije u odgovoru na acetilkolin u kontrolnih štakora, vazodilacijski i vazokonstriktorni metaboliti arahidonske kiseline bili su upleteni u vaskularnim odgovorima štakora tretiranih s HBO (120). Drugi pokusi su pokazali da HBO u dijabetičnih štakora pojačava vazodilataciju izolirane arterije *cerebri media* uzrokovanu hipoksijom (121). Glibenklamid, inhibitor kalijevih kanala reguliranih ATP-om (K_{ATP} kanala), eliminirao je dilataciju izazvanu hipoksijom u svim skupinama, što ukazuje na to da je dilatacija uzrokovana hipoksijom posredovana ovim kanalima (121).

Budući da je DM jedan od najvažnijih kroničnih patoloških stanja u kojima nastaju poremećaji vaskularne reaktivnosti, te je jedan od glavnih kliničkih entiteta u kojima je HBO pokazala korisne efekte, u ovom radu će se, osim na zdravim animalnim jedinkama, istražiti učinci HBO i na animalnom modelu dijabetesa. To će pridonijeti razumijevanju fiziološkog utjecaja HBO na vaskularnu funkciju, ali i proširiti naša saznanja o sukladnim učincima u bolesnom organizmu.

1.2.2. Animalni modeli dijabetesa

Unazad dugo vremena animalni modeli su od iznimne važnosti u istraživanju DM. Farmakološko ili kirurško oštećenje pankreasa može biti vrlo učinkovito u stvaranju animalnog modela dijabetesa tipa 1. U većini pokusa koriste se glodavci, premda su tijekom povijesti korištene i druge životinje, kao na primjer pankreatektomirani psi (122). Toksini, kao što su streptozocin ili aloksan, selektivno uništavaju beta-stanice Langerhansovih otočića u miševa, štakora i nekih drugih vrsta, time dovode do nemogućnosti lučenja inzulina i stvaraju izvrstan animalni model dijabetesa tipa 1 (122). Tako se i u ovom radu koristi animalni model dijabetesa tipa 1 baziran na streptozocinu, u Sprague-Dawley štakora, koji učinkovito i brzo izaziva hiperglikemiju, simptome i znakove dijabetesa i razvoj komplikacija. Streptozocin se izvorno proučavao kao antibiotik kasnih 1950-ih godina (123), otkriven u vrsti *Streptomyces*

achromogenes, a nakon što su otkrivena njegova svojstva selektivnog toksina za beta-stanice počeo se koristiti kao lijek za karcinom beta-stanica (124) te za stvaranje modela dijabetesa.

Selektivni uzgoj i srođivanje životinja omogućio je stvaranje sojeva koji su relativno dobri modeli za dijabetes tipa 1, tipa 2 i vezanih fenotipova kao što su pretilost i inzulinska rezistencija. Razvoj molekularnih bioloških metoda doveo je do stvaranja velikog broja novih animalnih modela kao što su knock-in, generalizirani knock-out i tkivno specifični knock-out miševi (122).

Za model dijabetesa tipa 1 korisni su NOD miš, dijabetesu skloni BB (engl. *Biobreeding*) štakor i LETL (Long Evans Tokushima Lean) štakor (ova tri modela nastala su srođivanjem životinja u uzgoju). Stvoren je i KDP (Komeda diabetes-prone) štakor koji je podvarijanta LETL štakora s većom pouzdanošću razvoja spontanog dijabetesa (125). Nešto noviji je kongenični LEW.1AR1/Ztm-iddm štakor, koji je nastao spontanom mutacijom i kod kojega se dijabetes često razvija, otprilike oko 60. dana života (125). Za model dijabetesa tipa 2 postoji veći broj sojeva, uključujući Ob/ob i db/db miševe i fa/fa štakore koji se ubrajaju u skupinu pokusnih životinja s monogenskom mutacijom za leptinski gen ili leptinski receptor te stoga postaju pretili i skloni su razvoju dijabetesa sukladnog tipu 2 (125). ZDF (Zucker diabetic fatty rat) je soj štakora koji je nastao srođivanjem s fa/fa štakorom i pokazuje izrazito teški dijabetes jer dolazi i do apoptoze beta-stanica te je onemogućena kompenzatorna hiperinzulinemija (125). KK (Kuo Kondo) miš, NZO (New Zealand obese) miš, OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty) štakor i NSY (Nagoya-Shibata-Yasuda) miš su pokusni modeli koji imaju poligenski uvjetovani razvoj dijabetesa zbog pretilosti. Postoje i modeli za dijabetes tipa 2 koji nisu bazirani na pretilosti, kao što je na primjer GK (Goto-Kakizaki) štakor (126). To je poligenski nepretili model nastao probranim uzgojem Wistar štakora kroz niz naraštaja koji su bili umjereno intolerantni za glukozu. Osim glodavaca, modeli spontanog dijabetesa razvijeni su i na drugim vrstama, uključujući mačke, svinje i primat (125).

1.3. Sustav renin-angiotenzin

1.3.1. Fiziološka uloga

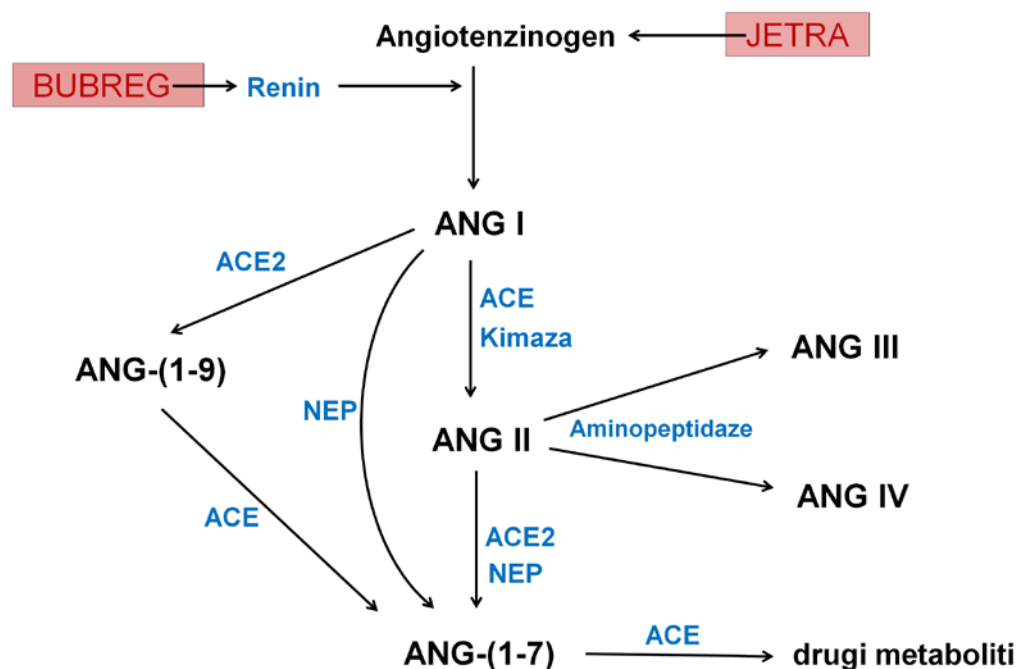
Uključenost sustava renin-angiotenzin u regulaciji krvnog tlaka, vaskularnoj funkciji, regulaciji izvanstaničnog volumena tekućine i ravnoteži natrija široko je poznata (127-130).

Renin se oslobađa iz jukstaglomerularnih stanica, nakon podražaja kao što je sniženi aterijski tlak, ostaje u krvi 30 do 60 minuta i potiče stvaranje angiotenzina I (ANG I) iz angiotenzinogena (proizvedenog u jetri) (36). Iz ANG I nastaje oktapeptid koji se naziva angiotenzin II (ANG II), pretežito u malim krvnim žilama pluća posredstvom enzima za pretvorbu (engl. *angiotensin converting enzyme* - ACE) koji se nalazi, ne samo u cirkulaciji, nego i u tkivima. Nastali oktapeptid se veže za svoje ciljne receptore - angiotenzin tip 1 (AT1) i angiotenzin tip 2 (AT2) receptore (vezani za G proteine). ANG II ima brojne učinke u cirkulaciji i bubrezima, uključujući vazokonstrikciju (najjača u arteriolama, slabija u venama), smanjenje izlučivanja vode i soli u bubrezima, poticanje lučenja aldosterona, povećanje volumena izvanstanične tekućine i povišenje tlaka (36, 127). U posljednjih nekoliko godina proširena su naša saznanja o sustavu renin-angiotenzin pa je otkrivena je i uloga ANG II kao proinflamatorne molekule i faktora koji potiče fibrozu (127). Vezanje ANG II za njegove receptore (posebice za AT1 receptor) posreduje unutarstanično stvaranje ROS koji pridonose mitohondrijskoj disfunkciji. Blokiranje ANG II signalizacije dovodi i do zaštitnih učinaka u neurodegenerativnim procesima i produljuje život u glodavaca (127). Osim cirkulirajućeg ANG II, važni su i lokalni (tkivni) i unutarstanični sustav renin-angiotenzin, čija uloga nije relevantna za hemodinamske promjene, već prvenstveno za inflamatorne i proliferativne učinke, te za regulaciju genske ekspresije i signalnih putova. Ova su otkrića potaknula istraživanja ANG II signalizacije u terapijskim intervencijama kod patoloških stanja vezanih za upalne procese i starenje (127).

Složenosti sustava pridonose dodatne biološki aktivne komponente/metaboliti i alternativni enzimi. Najvažniji je heptapeptid Angiotenzin-(1-7) (skraćeno ANG-(1-7)), metabolit koji nastaje iz ANG II posredstvom enzima ACE2 ili alternativno neutralnom endopeptidazom - NEP, a pomoću enzima NEP može direktno nastati i iz ANG I. ANG-(1-7) ima vazodilatacijsku aktivnost, suprotno od ANG II, djeluje i suprotno od ANG II kao signalizacijski faktor (131-135), a oba peptida imaju kompleksne mehanizme djelovanja. Tako je balans između ACE i ACE2 značajan u konačnoj regulaciji učinaka ANG II. U animalnim istraživanjima ANG-(1-7) je pokazao i kardioprotektivno djelovanje, smanjuje incidenciju i trajanje aritmija uzrokovanih ishemijsko-reperfuzijskom ozljedom i popravljja postishemijsku srčanu funkciju (136). ANG-(1-7) može djelovati kao angiotenzinski AT1 receptorski agonist i kao antagonist, ovisno o prisutnosti ANG II (132), a djeluje i preko vlastitog Mas receptora (vezanog za G proteine) - oslobađajući NO i prostaglandine (136-138). Djelovanje ANG-(1-7) na Mas receptor dovodi do

popravljanja endotelne funkcije, između ostaloga potencirajući acetilkolinske vaskularne učinke u normotenzivnih štakora (138).

Enzim kimaza je alternativni enzim koji dovodi do stvaranja ANG II, neovisno o ACE, posebice u srcu, vaskulaturi i bubrezima gdje je kimaza prvenstveno eksprimirana (127). ANG II se može (osim pomoću enzima ACE2) razgraditi i aminopeptidazama u crikulaciji, te nastaju metaboliti ANG III i ANG IV. ANG III ima slične učinke kao ANG II, ali vrlo male potentnosti, dok ANG IV ima protektivnu ulogu jer povećava protok u bubrezima (127). Angiotenzin-(1-9) (skraćeno ANG-(1-9)) nastaje iz ANG I pomoću enzima ACE2 (139). ANG-(1-9) je prema nekim navodima opisan kao slabi vazokonstriktor u izoliranoj aorti štakora, on potencira vazokonstrikciju posredovanu angiotenzinom II u izoliranim aortnim prstenovima. Međutim, originalna referenca koja prezentira ove navode poziva se na neobjavljene podatke (139), bez navedenih detalja. ANG-(1-9) razgrađuje se pomoću ACE na manje angiotenzinske metabolite (jedan od njih je i ANG-(1-7)), a istovremeno djeluje i kao inhibitor na ACE (140).



Slika 1.1. Pregledni prikaz najvažnijih komponenti sustava renin-angiotenzin

1.3.2. Dosadašnje poveznice s hiperbaričnom oksigenacijom

Zanimljivo je da postoje istraživanja koja izvještavaju kako okolišni čimbenici mogu utjecati na komponente sustava renin-angiotenzin. Utjecaj hiperbarične oksigenacije na otpuštanje renina proučavano je u nekoliko studija. U zdravih ljudskih ispitanika akutna HBO pri tlaku od 2.5 bara u mirovanju nije mijenjala razinu renina (141), a pri tlaku od 46 bara reninska aktivnost plazme u bazalnim uvjetima i pri maksimalnom vježbanju također nije bila promijenjena (142). Jedno je manje istraživanje pokazalo da izlaganje HBO starijih pacijenata, s kroničnim zatajenjem srca prvog i drugog stupnja, dovodi do normalizacije reninske aktivnosti plazme, vjerojatno zbog popravljanja bubrežnog protoka krvi (143). U pokusima na prisvjesnim psima izmjereno je da akutna HBO pri tlaku 2-3 bara suprimira otpuštanje renina (144). U nedavnoj studiji, koja je određivala ljudski serumski proteomski profil, u uvjetima hiperbaričnog izlaganja mješavini kisika, dušika i argona, izmjeren je porast koncentracije ANG II, uz promjene drugih serumskih proteina, nastalih kao posljedica takvog izlaganja (145). Utvrđeno je da udisanje 100% kisika u anestetiziranih pasa dovodi do jačeg odgovora srednjeg arterijskog tlaka na injiciranje ANG I ili ANG II u bolusu (porast za 41% /43% u odnosu na kontrolu), što upućuje na to da hiperoksija pojačava sposobnost sustava renin-angiotenzin da utječe na kardiovaskularnu funkciju (146). ANG II bi također mogao igrati važnu ulogu u srčanim promjenama koje su uzrokovane ponovljenim hiperbaričnim izlaganjima u štakora, a koje uključuju hipertrofiju lijeve klijetke, nekrozu miokarda i hemodinamske promjene (147). U ovim pokusima štakori su izlagani izrazito visokim tlakovima kisika (5 bara), kroz 40 ponavljanja, a losartan (antagonist AT1 receptora) prevenirao je ove promjene (147). Akutna HBO pri tlaku od 2.5 bara (prije žrtvovanja životinje) pogoršava reperfuzijsko oštećenje miokarda nakon ishemije uzrokovane smanjenim protokom u izoliranom srcu štakora, a vazopresorni učinak ANG II na koronarni perfuzijski tlak u ovim je pokusima bio značajno izmijenjen u odnosu na kontrolu (148). Izmjene koje su opažene uključivale su moguće oštećenje vaskularne relaksacije ovisne o endotelu (148). Ovi rezultati sugeriraju da bi HBO mogla imati učinak na vaskularni odgovor na ANG II u koronarnim arterijama i nameću potrebu daljnjeg proučavanja.

Prijašnja istraživanja dokazala su i presudnu ulogu normalno funkcionirajućeg sustava renin-angiotenzin u održavanju vaskularne funkcije u hipoksiji (128). Aktivacija AT1 receptora ima ključnu ulogu u otpuštanju vaskularnih prostaglandina, odgovornih za posredovanje vaskularne

dilatacije na hipoksiju, što je utvrđeno u mikrocirkulaciji skeletnog mišićja. Losartan, premda nije utjecao na vaskularne odgovore na acetilkolin, iloprost i natrijev nitroprusid, neočekivano je obrnuo dilataciju na sniženi pO_2 i pretvorio ju u konstrikciju (128). Dahl SS (engl. *salt-sensitive*) štakori, koji su osjetljivi na sol i imaju poremećenu funkciju sustava renin-angiotenzin, imaju reduciranu vaskularnu relaksaciju na acetilkolin i hipoksiju. Nadomještanje 13. kromosoma (koji sadrži gen za renin) u genetski ustroj ovih životinja eliminirao je ovu poremećenu vazodilataciju. Losartan je poništio ovaj učinak, što govori u prilog tome da je sustav renin-angiotenzin neophodan i za normalnu vazodilataciju u hipoksiji i u odgovoru na fiziološki stimulans kao što je acetilkolin (129). Supresija ANG II visokim unosom soli u ovih životinja također je poništila oporavak vazodilatacije, ali je intravenska infuzija ANG II tijekom 3 dana ponovo povratila relaksacijske odgovore (149). Povećanje oksidativnog stresa suodgovorno je za redukciju vaskularne relaksacije na hipoksiju u Dahl SS štakora (149).

Ako se uzmu u obzir dosadašnji eksperimentalni podatci, nije sasvim jasan mehanizam kojim hiperbarična oksigenacija može utjecati na promjene u cirkulaciji i na vaskularnu funkciju, te utječe li i na koji način na reaktivnost krvnih žila na ANG II i metabolite ANG-(1-7) i ANG-(1-9). Iz prijašnjih studija, jasno je da hiperbarična oksigenacija može izazvati promjene u komponentama sustava renin-angiotenzin. Budući da je ovaj sustav jedan od najvažnijih regulatornih sustava cirkulacije, a njegove komponente važni fiziološki stimulansi u vaskularnom ponašanju, za bolje razumijevanje učinaka hiperbarične oksigenacije u zdravlju i bolesti važno je istražiti i poznavati njezin utjecaj na vaskularni odgovor induciran tim komponentama.

1.3.3. Učinak angiotenzina-(1-7) u dijabetesu melitusu

Na štakorskim modelima dijabetesa tipa 1, izazvanih streptozocinom, proučavan je učinak egzogeno apliciranog ANG-(1-7) i endogenog ANG-(1-7) na srčana oštećenja i na vaskularnu reaktivnost (korišteni su pretežno prstenovi karotidnih i renalnih arterija, te mezenterične arterije). Nakon izazivanja ishemijsko-reperfuzijske ozljede srca u dijabetičnih štakora, ANG-(1-7) je posredovao oporavak srčane funkcije (150). Apliciranje ANG-(1-7) dovelo je do ublažavanja abnormalne vaskularne reaktivnosti, primjerice na endotelin-1, noradrenalin, karbakol (agonist acetilkolina) i histamin, dok je inhibitor endogenog stvaranja ANG-(1-7)

pogoršavao poremećaje vaskularne funkcije u dijabetesu (150, 151). Losartan, koji pak antagonizira djelovanje ANG II također je imao povoljne učinke. Utvrđeno je i da su prostaglandini važan intermedijarni čimbenik u učincima ANG-(1-7) za popravljjanje vaskularne reaktivnosti, što naglašava važnu ulogu metabolita arahidonske kiseline (150). ANG-(1-7) utječe i na smanjenje oštećenja prouzrokovanog oksidativnim stresom u dijabetesu (152), na smanjenje upalnih promjena u bubregu i ublažavanje bubrežne nefropatije (153). Popravak endotelne funkcije posredstvom ANG-(1-7) uočen je i u drugim patološkim stanjima, kao npr. u endotelnoj disfunkciji apolipoproteinE knockout miševa, koji su animalni model za aterosklerozu (154). Sintetički agonist ANG-(1-7) naziva NorLeu(3)-angiotensin (1-7) pokazao se učinkovitim i u cijeljenju dijabetičnih rana (155).

Prikazani podatci posebice su zanimljivi jer HBO pokazuje pozitivne učinke u dijabetesu u kojemu je vaskularna funkcija oštećena. Nameće se pitanje je li utjecaj HBO na pojačanje djelovanja ANG-(1-7) jedan od mogućih učinaka, to bi djelomice objasnilo pozitivne učinke HBO u dijabetesu. Namjera je ovog rada približiti se toj problematici.

1.4. Potencijalna uloga CYP enzima i njihovih metabolita

S obzirom na moguću ulogu metabolita arahidonske kiseline kao medijatora vaskularnih promjena, a u svjetlu saznanja kako u stanjima promjene parcijalnog tlaka kisika može doći do promjena u sintezi ovih metabolita (smanjenje tkivnog pO_2 inhibira sintezu metabolita arahidonske kiseline) (156, 157), nameće se pitanje imaju li ovi metaboliti važnu ulogu u promjenama induciranim hiperbaričnom oksigenacijom. Specifični metaboliti arahidonske kiseline nazvani epoksieikozatrienoične kiseline (engl. *epoxyeicosatrienoic acids* - EETs) uzrokuju vaskularnu relaksaciju i pojačavaju ulazak kalijevih iona u glatke mišićne stanice, uz druge (proangiogenične, protuupalne, antiapoptotične i profibrinolitičke) učinke (158-161). Poznato je da se sinteza ovih kiselina (a također i vazokonstriktornih 20-hidroksieikozatetraenoičnih kiselina - 20-HETE) smanjuje pri nižim vrijednostima pO_2 u štakora (156). Ovo je potvrđeno od strane Hardera i sur. u pokusima na štakorima, kada su istraživali promjer arteriola u mišiću kremastera, uz superfuziju otopine s različitim pO_2 , a analizirali su i mikrovaskulaturu bubrega. Nađena je jasna linearna međuovisnost pO_2 s razinom EETs i 20-

HETE (156). Pojedini citokrom P450 (CYP) enzimi, koji sintetiziraju metabolite arahidonske kiseline, identificirani su kao senzori za kisik (156, 157). Tako je sintetska aktivnost enzima iz CYP 450 4A skupine ovisna o parcijalnom tlaku kisika (156). U istraživanjima Hardera i sur. inhibicija enzima iz CYP 4A skupine onemogućila je vaskularne odgovore na promijenjen pO_2 u kremasteru, što je onemogućilo regulaciju vaskularnog promjera u svrhu regulacije tkivnog protoka zbog razlike u oksigenaciji. Nedavno je i CYP450 3A13 opisan kao senzor za kisik, koji posreduje zatvaranje ductusa arteriosusa u odgovoru na kisik u miševa, zajedno s endotelinom-1 (162). Kada se ovo uzme u obzir, uz interakciju signalnih puteva arahidonske kiseline s putevima dušičnog oksida u senzitivnosti na kisik (157), te uz regionalne razlike u ulogama metabolita arahidonske kiseline i brojne proturječne dokaze (157), jasno je da je uloga CYP enzima u homeostazi kisika vrlo složena.

U metabolizmu arahidonskih kiselina, koja se oslobađa iz stanične membrane nakon podražaja različitim fiziološkim stimulansima pomoću aktiviranih fosfolipaza i postaje slobodna unutar stanice, sudjeluju ciklooksigenaza, lipooksigenaza ili CYP enzimi (163). Biološka uloga ciklooksigenaznog i lipooksigenaznog puta dobro je istražena i široko poznata, ali poznavanje uloga CYP enzima je do 1980-ih godina bilo suženo i prvenstveno fokusirano na njihovu jetrenu ulogu u detoksifikaciji (163). Danas se zna da je uloga ovih metaboličkih puteva izuzetno važna u vaskularnoj funkciji. Reakcijama epoksidacije olefinskih veza arahidonske kiseline pomoću specifičnih CYP enzima (epoksigenaza) nastaju EETs, a reakcijama omega (ω) - hidroksilacije i alil oksidacije nastaju HETE (163). Postoje četiri oblika EETs koje se sintetiziraju pomoću CYP epoksigenaza: 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET, 14,15-EET, a za njihovu sintezu je nužna prisutnost NADPH i molekularnog kisika. Biološke uloge EETs u vaskularnoj funkciji vrlo su značajne. Funkcioniraju kao čimbenik hiperpolarizacije endotelnog podrijetla, a njihov vazodilatacijski učinak može biti usporediv i s onim acetilkolina (164). Pojedine EETs se u svojoj ulozi regulacije protoka krvi mogu ponašati i vazokonstriksijski, npr. u bubregu gdje mogu dovesti i do konstrikcije aferentne arteriole (164, 165). EETs su sposobne modulirati vaskularne odgovore na druge stimulanse, kao npr. na hormonalne i parakrine agense. Tako se vazopresinom-inducirano povećanje citosolnog kalcija u mezangijskim stanicama bubrega pojačava djelovanjem EETs, a smanjuje inhibicijom njihove sinteze. Odgovori aferentnih arteriola na ANG II, endotelin-1 i noradrenalin pojačavaju se inhibicijom sinteze EETs (164). U transgeničnom modelu štakora s hipertenzijom ovisnom o ANG II, EETs djeluju

antihipertenzivno i kardioprotektivno (166). Inhibicija stvaranja EETs smanjuje odgovor moždanog krvnog protoka na glutamat, koji je signal za povećanje protoka (167). Dijabetes tipa 1 uzrokovan streptozocinom u štakora smanjuje razinu protektivnih EETs, a smanjena razina EETs dovodi do pogoršanja posljedica moždanog udara (168). Slična je i uloga EETs u dijabetičkoj nefropatiji (169) i aterosklerozi (170), a EETs su korisne i u očuvanju srčane funkcije kod ishemijsko-reperfuzijske ozljede u dijabetičnih štakora (171). Smatra se da bi EETs mogle biti ključna veza između inzulinske rezistencije i endotelne disfunkcije (172). Zbog njihovih važnih uloga, namjera ovog rada je istražiti upravo EETs i njihovo sudjelovanje u mehanizmima utjecaja HBO na vaskularnu reaktivnost. Postoji mnoštvo izoformi CYP enzima (podijeljenih u skupine) u brojnim tkivima (npr. jetri i krvnim žilama), a i velik broj izoformi ovih enzima je sposoban katalizirati reakcije koje stvaraju EETs - epoksidacija je manje specifična od ω - hidroksilacije (163, 165). Također, izoforme se među vrstama razlikuju, pa glavne izoforme koje kataliziraju stvaranje EETs nisu identične u ljudi, štakora ili drugih istraženih vrsta. Neke od glavnih CYP izoformi, koji u štakora stvaraju EETs, su CYP2C11, CYP 2J3 i CYP 4A2 i CYP4A3 (163, 173-175). Ove specifične izoforme će stoga biti istražene u ovom radu. Također će se istražiti i ekspresija CYP 4A1 kod kojega predominira aktivnost ω - hidroksilacije. Višestruka djelovanja pojedinih izoformi nisu neobična, pa npr. CYP 4A2 i CYP 4A3 mogu uz ulogu epoksigenaze katalizirati i ω - hidroksilaciju i proizvoditi 20-HETE (165). EETs se u svom metaboličkom putu dalje mogu epoksidnim hidrolazama degradirati u dihidroksieikozatrienoične kiseline (engl. *dihydroxyeicosatrienoic acids* - DHETs) koje imaju značajno manju aktivnost (163).

Promjene u ekspresiji nekih CYP enzima, koji proizvode EETs, povezane su s povoljnim učincima u cirkulaciji. Primjerice, povećanje ekspresije CYP2J3 inhibira apoptozu kardiomiocita kod kardijalne ishemije neonatalnih štakora, a visoko selektivni inhibitor epoksidacije *N-methylsulphonyl-6-(2-propargyloxyphenyl) hexanamide* (MS-PPOH) reducira ovaj kardioprotektivni učinak (176). Ovo je posebno izraženo i za ishemijsko kondicioniranje (neletalnim izlaganjima ishemiji) (176), što je moguća poveznica s intermitentnom HBO, nju se hipotetski i signalizacijski može tumačiti kao intermitentnu pseudohipoksiju, kao što je ranije navedeno. U štakora osjetljivih na sol, koji razvijaju spontanu hipertenziju i sklone su moždanom udaru, opterećenje sa soli smanjuje ekspresiju CYP2C11, dok pojačanje ekspresije ovog enzima klorofibratom ima protektivni učinak (174). Ovo pojačanje ekspresije imalo je učinak i na povećanje promjera krvnih žila (174). Povećanje ekspresije enzima iz CYP2J skupine u miševa

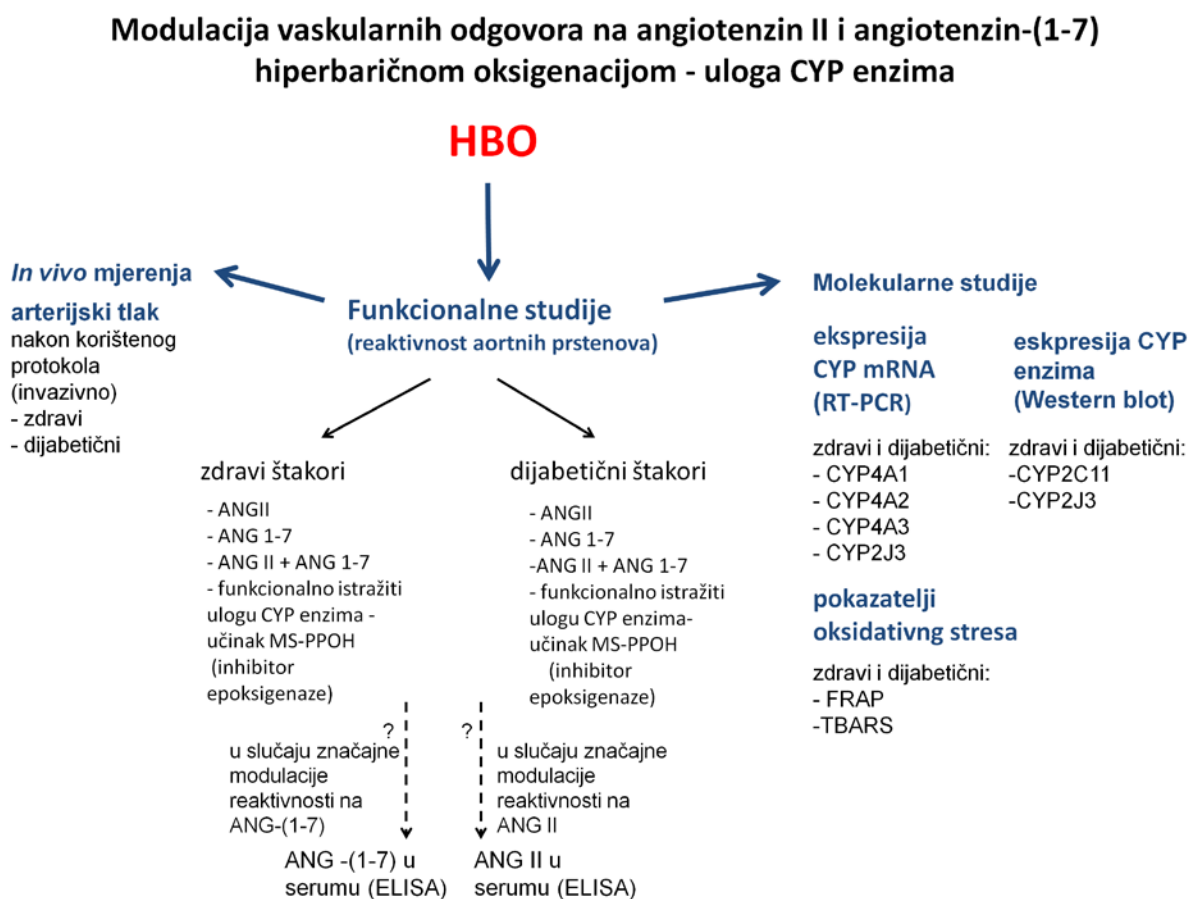
dovodi do ublažavanja dijabetičke nefropatije izazvane streptozocinom (177) te sprječava u apoE knockout miševa (model za aterosklerozu) nastanak aneurizme aorte uzrokovane s ANG II (178). Ako se uzmu u obzir ovi rezultati u patoloških stanja u kojima HBO i ANG-(1-7) mogu imati pozitivan učinak, te ulogu CYP enzima kao senzora za kisik, nameće se pitanje moguće uloge protektivnih EETs i enzima koji ih sintetiziraju u mehanizmima djelovanja HBO. Ovaj rad će nastojati ispitati dio navedene problematike.

2. HIPOTEZA

Hipoteza predložene doktorske disertacije je da hiperbarična oksigenacija modulira vaskularni odgovor na angiotenzin II i angiotenzin-(1-7), na način da pojačava vaskularni odgovor na angiotenzin II i njegov metabolit angiotenzin-(1-7). Prema toj hipotezi, hiperbarična oksigenacija bi, kako u zdravih, tako i u dijabetičnih štakora, pojačavala konstriktorni vaskularni odgovor na angiotenzin II, vazodilatatorni učinak angiotenzina-(1-7) te poticala inhibitorni učinak angiotenzina-(1-7) na kontrakciju izazvanu angiotenzinom II. Također je pretpostavka da specifični CYP enzimi i metaboliti arahidonske kiseline (prvenstveno epoksieikozatrienoične kiseline) imaju važnu ulogu u djelovanju hiperbarične oksigenacije, te da ona svoje potencijalne učinke barem djelomice vrši putem promjena specifičnih CYP enzima, pojačavajući njihovu ekspresiju.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je predloženog istraživanja: a) odrediti utjecaj hiperbarične oksigenacije na vaskularnu reaktivnost na ANG II i ANG-(1-7) u zdravih štakora, b) odrediti utjecaj hiperbarične oksigenacije na vaskularnu reaktivnost na ANG II i ANG-(1-7) u animalnom modelu diabetesa, c) u slučaju značajnog utjecaja na vaskularnu reaktivnost na ANG II ili ANG-(1-7) istražiti utjecaj hiperbarične oksigenacije na serumsku razinu ANG II ili ANG-(1-7), u zdravih i dijabetičnih štakora, d) izmjeriti utjecaj specifičnog protokola hiperbarične oksigenacije na arterijski krvni tlak i pokazatelje oksidativnog stresa, u zdravih i dijabetičnih štakora i e) istražiti ulogu specifičnih CYP enzima u djelovanju hiperbarične oksigenacije



Slika 3.1. Pregledna shema plana istraživanja

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Eksperimentalne životinje

U ovom radu korišteni su zdravi laboratorijski Sprague-Dawley štakori muškog spola starosti 12-16 tjedana, uzgajani po dva u prozirnim kavezima sa standardnom hranom i neograničeno dostupnom vodom s 12h : 12h ciklusom svjetlo-tama. Životinje su podijeljene u dvije skupine - kontrolnu i skupinu koja je podvrgnuta hiperbaričnoj oksigenaciji (HBO skupina).

Osim na zdravim štakorima, istraživanje učinaka HBO vršilo se i u dijabetičnih štakora. U tu svrhu korišten je animalni model dijabetesa tipa 1 izazvan streptozocinom. Životinje koje su bile predviđene za ispitivanje kao animalni model dijabetesa su u dobi od 6 tjedana tretirane intraperitonealnom injekcijom streptozocina u dozi 60 mg/kg (toksinom koji selektivno uništava β -stanice Langerhansovih otočića gušterače te na taj način uzrokuje DM). Nakon 7-10 dana mjerenjem koncentracije glukoze u krvi glukometrom (One Touch ultra, Life Scan, Inc.) utvrdila se uspješnost izazivanja DM. Kod štakora koji nisu imali razinu GUK-a iznad 15 mmol/l smatralo se da nije uspjelo izazivanje DM te su eutanazirani u dubokoj anesteziji, a preostali su čuvani uz neograničenu standardnu hranu i vodu još 8 tjedana te tada podvrgnuti pokusima (ili kao kontrolna ili kao HBOT grupa nakon izlaganja hiperbaričnom protokolu). Prije svakog pokusa još jednom je kontrolirana vrijednost GUK-a.

Cjelokupni postupak čuvanja eksperimentalnih životinja bio je u skladu s Europskom konvencijom o zaštiti kralješnjaka koji se koriste u eksperimentalne i druge znanstvene svrhe (Vijeće Europe br.123, Strasbourg 1985.). Cjelokupno istraživanje provedeno je uz pozitivno mišljenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek.

4.2. Hiperbarični protokol

U ovom radu korištena je istraživačka hiperbarična komora za male životinje proizvedena u tvrtki Đuro Đaković, redovito atestirana, koja je priključena na spremnik stlačenog 100% kisika (slika 4.1.). Komora ima regulatorne ventile za dovod i odvod plinova, reguliranje protoka te pokazatelja temperature i tlaka unutar komore. Cjelokupna unutrašnjost tako se ispuni 100% kisikom u kojemu se nalaze životinje, uz potpunu i preciznu kontrolu tlaka pomoću ventila i

mjernih instrumenata. Sa svake se strane komore nalazi okrugli prozor koji omogućuje vizualizaciju unutrašnjosti i praćenje stanja eksperimentalne životinje. Kao adsorbens ugljičnog dioksida u hiperbaričnoj komori korišten je Drägersorb 800 Plus, proizveden od tvrtke Dräger (Lübeck, Njemačka), a sadrži indikatorsku boju koja ukazuje na istrošenost adsorbensa koji se potom zamijeni svježim.



Slika 4.1. Hiperbarična komora za eksperimentalne životinje. Atestirani mjerni instrumenti omogućuju precizno upravljanje.

U sklopu protokola HBO štakori se tijekom četiri uzastopna dana jednom dnevno stavljaju u hiperbaričnu komoru (koja sadrži i CO₂ adsorbens) i izlažu 100% kisikom pod tlakom od 2 bara u trajanju od dva sata, uz dodatnih 15 minuta za kompresiju te 15 minuta za dekompresiju. Zatim se pokusi izvode peti dan (dan nakon zadnjeg izlaganja HBO).

4.3. Pokusi vaskularnih odgovora s izoliranim torakalnim aortalnim prstenovima

4.3.1. Kirurški postupci

Štakori se prije pokusa anesteziraju kombinacijom ketamina 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2ml, Pfizer) i midazolama 2,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma); kombinacija se aplicira intraperitonealno. U svrhu pokusa s izoliranim aortalnim prstenovima duboko anestezirani štakori se najprije dekapitiraju pomoću giljotine. Tijelo štakora postavi se na vertikalni operacijski stolić, a zatim se kirurški (korištenjem instrumenata za male životinje proizvođača Fine Science Tools) promptno otvore abdomen i toraks, odstrani se prednja prsna stijenka, te se srce, pluća, jednjak i pridružena tkiva odstrane. Torakalna aorta se pažljivo i promptno ispreparira i izolira te se stavi u oksigeniranu Krebs-Hanseleitovu otopinu, gdje se očisti od suvišnog tkiva. Jednak je postupak za kontrolnu skupinu i skupinu životinja koja je prethodno podvrgnuta HBO.

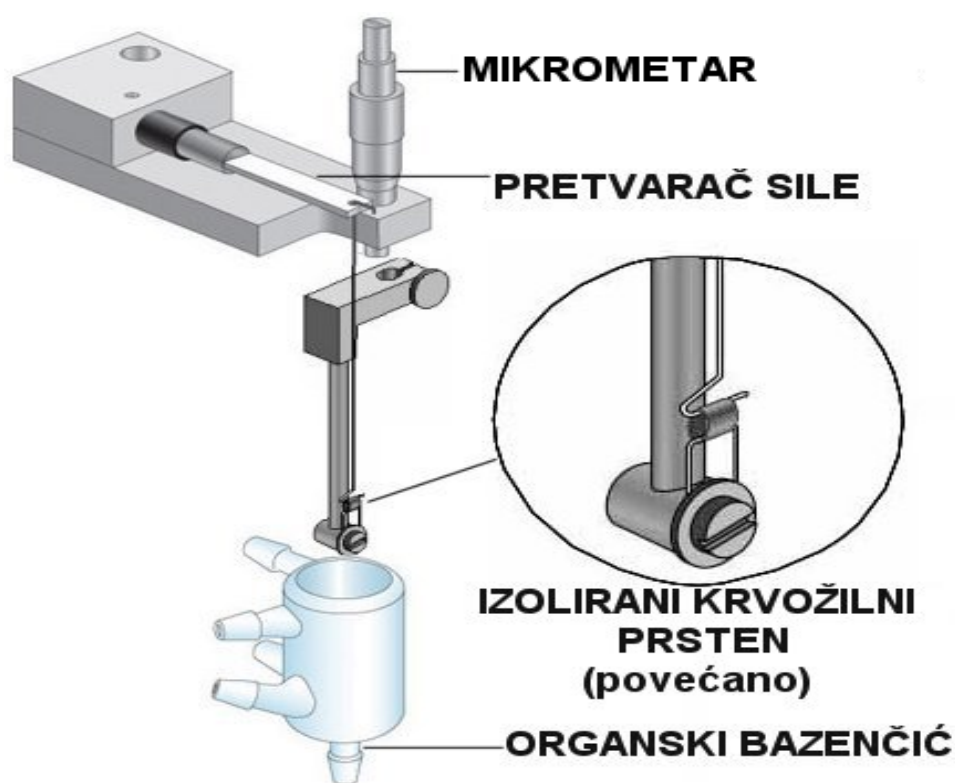
4.3.2. Korišteni reagensi

ANG II i ANG-(1-7), noradrenalin i acetilkolin su kupljeni od Sigma Aldrich, ANG-(1-9) od Phoenix pharmaceuticals, Inc., USA. Ketamin i midazolam su od tvrtki Pfizer i Torrex Chiesi Pharma. Modificirana Krebs-Henseleit otopina (sastav: 113 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 22 mM NaHCO_3 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 11 mM glucose, 2.5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.026 mM EDTA; pH 7,4) bila je pripremljena od EDTA kupljenog od Sigma Aldrich, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i NaHCO_3 od Merck KGaA, a ostatak kemikalija kupljen je u tvrtki Kemika Zagreb, Hrvatska. *N*-methylsulfonyl-6-(2-propargyloxyphenyl)hexanamide (MS-PPOH), visoko selektivni inhibitor epoksidacije (uključujući one katalizirane s CYP4A2 i CYP4A3) (165, 179), bio je dar Johna R. Falcka, UT Southwestern Medical Center, Dallas, Texas.

4.3.3. Sustav za ispitivanje reaktivnosti torakalnih aortalnih prstenova

Kratki segmenti sa svakog kraja torakalne aorte odstranili su se i odbacili, a preostali dio žile se izrezao u tri do četiti prstena (duljine oko 3 - 4 mm). Tako dobiveni prstenovi su *in vitro* montirani na izometrične pretvarače sile u komoricama s Krebs-Hanseleitovom otopinom (održavanom na temperaturi 37,0°C), kroz koju se kontinuirano propuštala komprimirana mješavina plinova (95% O_2 / 5% CO_2). Slika 4.2. shematski prikazuje princip sustava. Pretvarači

su spojeni sa specijaliziranim sustavom za mjerenje (kupljen od tvrtke Experimetria LTD, Budimpešta, Mađarska) pri čemu se podatci kontinuirano bilježe prikladnim softwareom na računalu i naknadno analiziraju. Korišteni sustav sastojao se od četiri zasebne komorice i pretvarača sile, priključenih spremnika otopine i plinskih mješavina, otpadnih spremnika, aparature za održavanje konstantne temperature u cijelom sustavu, dovodnih i odvodnih cijevi i regulatora, aparature za akviziciju i obradu signala te računala za prikaz i analizu dobivenih podataka/krivulja. Pasivna tenzija za svaki prsten postavi se na 2,0 g, zatim se provede ekvilibracija u trajanju od 60 minuta, pri čemu se ispire svakih 15 minuta sa svježom otopinom i pasivna tenzija se, po potrebi, prilagođava na razinu od 2,0 g.



Slika 4.2. Shematski prikaz dijela sustava za ispitivanje reaktivnosti aortalnih prstenova (ilustracija korištena uz dopuštenje doc.dr.sc. Ivice Brizića). Komorice (bazenčiće) s Krebs-Henseleitovom otopinom opskrbljuju dovodni i odvodni kanali te omogućuju ispiranje odnosno zamjenu otopine svježom (zagrijanom na 37,0°C) Krebs-Henseleitovom otopinom. Također postoji i dovodni kanal za plinsku mješavinu koja se propušta kroz otopinu u komorici. Suspendirani aortalni prsten spojen je na pretvarač sile koji je pak priključen na sustav za akviziciju i obradu signal te na računalo za prikaz i analizu krivulje (nije prikazano).

Nakon perioda ekvibracije ovako suspendiranih torakalnih aortalnih prstenova pristupilo se fazi testiranja intaktnosti endotela. Intaktnost endotela testirala se tako da su se žile prekontrahirale s 10^{-7} M noradrenalina (finalna koncentracija u komorici), pustile se da se stabiliziraju tijekom 5 minuta te se izazvala relaksacija s 10^{-5} M acetilkolina. U slučaju da se žilni prsten nije relaksirao, nije se upotrebljavao dalje za pokuse. Potom je uslijedilo ispiranje 3x zaredom te zatim svakih 10 minuta u razdoblju od 30 minuta, kako bi se žilni prstenovi stabilizirali. Inducira se maksimalna kontrakcija sa 60mM KCl + 10^{-7} M noradrenalina. Nakon postizanja platoa slijedi ispiranje 3x zaredom, a zatim svakih 10 minuta u razdoblju od 30 minuta. Slika 4.3. prikazuje komorice sustava za ispitivanje odgovora aortalnih prstenova u kojemu su se izvodili opisani postupci.



Slika 4.3. Korišteni sustav u kojemu su montirani torakalni aortalni prstenovi za vrijeme ispitivanja vaskularnih odgovora

Nakon posljednjeg ispiranja testirali su se odgovori aortalnih prstenova na ANG II i metabolite od interesa, tako da se svaki pojedini prsten svakog štakora tretirao s drugim

peptidom/protokolom i to samo jednom. Koncentracije peptida odabrane su na temelju prijašnjih istraživanja gdje su se te koncentracije pokazale učinkovitima (131, 133, 180). U jednu komoricu se dodaje 10^{-6} M ANG II. Drugi prsten se tretira s 10^{-6} M ANG II + 10^{-6} M ANG-(1-7) - kako bi se istražio negativni utjecaj ANG-(1-7) na kontrakciju izazvanu s ANG II. Sljedeći aortalni prsten se tretira s noradrenalinom u trajanju od 5 minuta, nakon čega se dodaje 10^{-6} M ANG-(1-7), te se tenzija očita nakon 3 minute. U sljedećoj komorici prsten se tretira s 10^{-6} M ANG-(1-9) ili 10^{-5} M ANG-(1-9) ili 10^{-6} M ANG II + 10^{-5} M ANG-(1-9). Ovim metodama postiže se optimalna uporaba štakora i aortalnih prstenova jer za svaki pojedini pokus kojim se mjeri vaskularna reaktivnost na određenu tvar (npr. odgovor na ANG II ili odgovor na ANG II + ANG-(1-7) broj 'N' predstavlja istovremeno i broj štakora i broj aortalnih prstenova (jer je svaki aortalni prsten koji se testira za određenu tvar podrijetlom od zasebne životinje). Najviša kontrakcijska sila u pojedinim odgovorima na ANG II ili ANG II + ANG-(1-7) izražava se kao postotak maksimalne kontrakcije pojedinog aortalnog prstena i na taj način se kontraktilni odgovori za određenu tvar normaliziraju prema maksimalnoj kontrakciji tog prstena. Odgovori na ANG-(1-7) izražavaju se kao postotak sniženja prekontrakcije (nakon 3 minute prisutnosti ANG-(1-7)). Aortalni odgovori na sam noradrenalin također se analiziraju.

U kasnijim pokusima, kako bi se ispitala uloga EETs i specifičnih CYP izoenzima koji ih sintetiziraju, u modulaciji relaksacijskih odgovora na ANG-(1-7) hiperbaričnom oksigenacijom, upotrijebit će se visoko specifični inhibitor epoksidacije naziva *N*-methylsulfonyl-6-(2-propargyloxyphenyl)hexanamide (skraćeno: MS-PPOH). Ispitala se uloga ATP-ovisnih K^{+} kanala (K_{ATP} kanala) u potencijalnoj facilitaciji vazodilatacijskih efekata ANG-(1-7) putem HBO, budući da ovi kanali sudjeluju u vazodilataciji pri hipoksiji i ishemiji (dakle u stanjima promjenjenih parcijalnih tlakova kisika) i nalaze se u raznim tkivima (91, 181). U tu je svrhu upotrijebljen specifični inhibitor K_{ATP} kanala - glibenklamid. U seriji pokusa s HBO štakorima, MS-PPOH (10^{-5} M finalne koncentracije) dodao se 15 minuta prije aplikacije ANG II ili ANGII + ANG-(1-7) ili prekontrakcije s noradrenalinom (i potonjim dodavanjem ANG-(1-7)). U drugim serijama HBO štakora dodavao se glibenklamid (10^{-6} M finalne koncentracije), 15 minuta prije dodavanja ANGII + ANG-(1-7) ili prekontrakcije s noradrenalinom (i potonjim dodavanjem ANG-(1-7)). Utjecaj HBO istraživao se na sukladan način između kontrolne i HBO skupine dijabetičnih štakora. Također se posebnim serijama HBO štakora analizirala uloga EETs pomoću

MS-PPOH u relaksacijskim učincima ANG-(1-7), gdje je uočena značajna modulacija djelovanjem HBO.

4.4. Ispitivanje serumskih koncentracija ELISA metodom

U kasnijim pokusima je, s obzirom na značajnu modulaciju ANG-(1-7) odgovora, određivan i učinak HBO na serumsku razinu ANG-(1-7) u zasebnim serijama štakora. Korišten je ELISA kit za štakorski ANG-(1-7) proizvođača USCN Life Sciences Inc. Uzorci seruma prikupljeni su i analizirani prema uputama proizvođača, na jednak način u kontrolnim i HBO skupinama, kako u zdravih tako i u dijabetičnih životinja. Monoklonska su protutijela, specifična za ANG-(1-7), bila vezana za jažice mikrotitarske pločice u koje se stavljao uzorak. Pomoću pridruženih reagensa stvorena je kompetitivna reakcija između ANG-(1-7) s vezanim biotinom (standard) i neobilježenim ANG-(1-7) (iz uzorka) za vezanje uz specifično protutijelo. Nakon inkubacije, nevezani konjugat je odstranjen ispiranjem. Nakon toga dodan je avidin za kojega je bila vezana peroksidaza iz hrena (engl. *Horseradish Peroxidase* - HRP). Količina vezanog HRP konjugata tako je obrnuto proporcionalna koncentraciji ANG-(1-7) iz uzorka. Nakon dodavanja otopine sa supstratom, intenzitet nastale boje zbog toga je obrnuto proporcionalan s ispitivanom koncentracijom ANG-(1-7). Apsorbancija je utvrđena pomoću čitača za mikrotitarske pločice pri valnoj duljini od 450 nm. Uz pomoć razrjeđenja standarda prema uputama načinjena je standardna krivulja i pomoću nje iz apsorbancije uzoraka i standarda određena koncentracija ANG-(1-7) iz uzoraka. Nije bilo potrebno razrjeđivati uzorke jer su apsorbancije uzoraka upadale u optimalni segment standardne krivulje.

4.5. Invazivno mjerenje arterijskog tlaka

4.5.1. Kirurški postupci

Posebne skupine kontrolnih i HBO-štakora korištene su za utvrđivanje utjecaja HBO na arterijski tlak. Također se djelovanje HBO na jednak način istraživalo i u dijabetičnih životinja. Nakon što su životinje dovedene u stanje opće anestezije ranije navedenom kombinacijom midazolama i ketamina, bez reakcija na bolne podražaje, započet je kirurški postupak. Korišteni su posebni kirurški instrumenti za male životinje proizvođača Fine Science Tools i metalne kopče

za zatvaranje kirurške rane. Životinja je fiksirana za podlogu koja je činila operacijski stolić, a koja je bila zagrijana kako bi se održavala stalna tjelesna temperatura. Krzno štakora je većim dijelom obrijano ili skraćeno u području abdomena i proksimalnih dijelova stražnjih udova. Škarama je razrezana koža i potkožno tkivo sve do mišićne fascije. Peanima su se uhvatili rubovi kože i razmaknuli, kako bi se povećalo operacijsko polje. Pažljivo su, atraumatski, razmaknuta mišićna vlakna, kako bi se isprepariralo područje na kojemu se nalazi femoralna arterija, femoralna vena i femoralni živac (slika 4.4). Posebna pažnja usmjerena je na sprječavanje izazivanja krvarenja. Femoralna arterija se finim kirurškim instrumentima, uz pomoć operacijskog mikroskopa, pažljivo ispreparirala i odvojila od femoralne vene i živca. Ispod arterije je postavljena pinceta kako bi se arterija nategnula i odvojila od mišićne podloge te se na taj način zaustavio i protok krvi kroz arteriju. Postavljena su tri konca oko isprepariranog segmenta arterije. Distalnim koncem je odmah čvrsto zavezan distalni dio femoralne arterije. Proksimalni konac je privremeno zategnut peanom kako bi spriječio dolazak krvi u ispreparirani segment arterije. Srednji konac je zavezan u labavu omču koja nije do kraja stegnuta, a služila je stezanju katetera i arterije, nakon uvođenja katetera.



Slika 4.4. U svrhu intraarterijskog mjerenja tlaka potrebno je pažljivo, bez uzrokovanja bitnog krvarenja, ispreparirati femoralnu arteriju, kako bi se u nju mogao uvesti pripremljeni kateter

U sredini isprepariranog segmenta arterije učini se mali okomiti rez mikroškaricama tako da se cirkumferencija arterije prereže do pola (ne prereže se cijela arterija) i time načini otvor za uvođenje katetera. Kao znak probijanja arterijske stijenke, pojavljuje se mala kapljica krvi, ali bez daljnjeg istjecanja krvi jer je protok kroz arteriju zaustavljen koncima i pincetom koja ju odiže od podloge. Pripremljeni kateter se odreže na vrhu tako da poprimi oblik šiljka (na taj se način lakše umeće u arteriju), a drugi kraj katetera je spaljen i potpuno zatvoren. Prigodom pažljivog umetanja katetera u arteriju, drugom se pincetom navlači stijenka arterije na kateter, a popušta proksimalni konac kako bi kateter mogao ući otprilike 1.5 – 2.0cm u arteriju. Stegne se srednji konac (koji je bio pripremljen i savijen u omču) te se tako osigura postavljeni kateter. Potom se zaveže i proksimalni konac oko kanulirane arterije te dodatno osigura pozicija katetera. Peani, koji su natezali rubove kože i potkožnog tkiva, se popuštaju te se pristupi zatvaranju rane. Operacijska rana se zatvori pomoću nekoliko metalnih kopči, ostavi se mali otvor kroz koji izazi kateter koji se priključuje na mjerni sustav.

4.5.2. Monitoriranje arterijskog tlaka

Kako bi se invazivno izmjerio arterijski tlak, korišten je Spacelab sustav za kontinuirano monitoriranje tlaka (Spacelabs Medical, Inc., Redmond, WA, USA). Dio sustava je pretvarač sile koji se preko odgovarajuće igle izravno priključi na postavljeni femoralni kateter štakora, pri čemu se spaljeni vrh katetera odreže, a istjecanje krvi spriječi privremenim stezanjem katetera pomoću peana. Pretvarač sile priključen je na Spacelab jedinicu za monitoriranje (slika 4.5.). Tjelesna se temperatura štakora održava konstantnom. Učini se kalibracija i potom popusti pean, a na zaslonu uređaja prikaže se krivulja arterijskog tlaka. Nakon 10-15 minuta mirovanja, arterijski se tlak očitava svakih 10 sekundi u trajanju od jedne minute, pri čemu se uzima prosječna vrijednost tlaka.



Slika 4.5. Anestezirana životinja je priključena na sustav za monitoriranje arterijskog tlaka preko intraarterijski postavljenog femoralnog katetera

4.6. Određivanje pokazatelja oksidativnog stresa

Budući da oksidativni stres može utjecati na moduliranje vaskularnih odgovora (33-35, 84-86), važno je promotriti ovaj faktor u analizi djelovanja HBO. U svrhu procjene stanja oksidativnog stresa koristila su se dva specifična pokazatelja – FRAP (engl. *Ferric Reducing Ability of Plasma*) i TBARS (engl. *ThioBarbituric Acid Reactive Substances*). FRAP je indirektni pokazatelj antioksidativnog, odnosno reducirajućeg, kapaciteta plazme (182). Koristi Trolox kao standard. Osnovni princip je promjena boje koja nastaje kada se $\text{Fe}^3\text{-TPTZ}$ (2,4,6-tripiridil-s-triazine) reducira do $\text{Fe}^2\text{-TPTZ}$ uz prisustvo antioksidansa. Pri tome nastaje plavo obojenje čiju apsorbanciju mjerimo na 593 nm. Glavni radni reagensi: acetatni pufer (Kemika, Zagreb), 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazine) otopina u HCl (TPTZ kupljen od Sigma Aldrich), 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich). TBARS mjeri produkte lipidne peroksidacije (183). Oni se vežu za

TBA (tiobarbiturna kiselina) pri niskom pH. Kako je metoda nespecifična jer se i druge tvari vežu za TBA (uključujući i proteine), prvo se dodaje TCA (trikloroctena kiselina) u uzorak kako bi se istaložili proteini i koristio supernatant za mjerenje. Kao standard se upotrebljava malonildialdehid (MDA). Glavni radni reagensi: 0.02 M HCl, 0.6 M HCl (Kemika, Zagreb), 0.67% TBA (Sigma Aldrich), 20% TCA (Sigma Aldrich), 1,1,3,3-Tetramethoxypropane (Sigma Aldrich). Korišteni su uzorci seruma kontrolnih i HBO-skupina štakora, kako zdravih tako i dijabetičnih radi određivanja opisanih pokazatelja.

4.7. Određivanje ekspresije mRNA specifičnih CYP enzima

4.7.1. Izolacija RNA

Uzorci aorte uzeti su od kontrolnih i HBO životinja (zdravih i dijabetičnih) jednakim kirurškim postupkom kao i za dobivanje aortalnih uzoraka za pokuse na aortalnim prstenovima. Pohranjeni su u RNeasy lysis buffer (Qiagen) na -80°C do postupka izolacije RNA. Kako bi se izolirala RNA, tkiva su homogenizirana u sterilnom tarioniku nakon smrzavanja pomoću tekućeg dušika. Nakon toga nastavila se izolacija pomoću TRI reagensa (Molecular Research Center, INC). U homogenizirano tkivo dodaje se 1mL Tri reagensa, snažno promiješa, inkubira na sobnoj temperaturi 5 minuta. Dodaje se 100 µL bromo-3-kloropropana (Sigma, Njemačka) te inkubira na sobnoj temperaturi 8 minuta. Uzorci se centrifugiraju na 12000 x g tijekom 15 minuta, pri temperaturi od +4°C. Nakon centrifugiranja dolazi do stvaranja slojeva: donji - crveni, fenol - kloroform međusloj, bezbojna vodena faza u kojoj se nalazi RNA. Vodena fazu s RNA se prenese u novu Eppendorf epruvetu i dodaje se izopropanol 0,5 ml na 1 ml Tri reagenta. Uzorci se ponovo inkubiraju na sobnoj temperaturi 5 minuta, ponovo centrifugiraju na 12000 x g tijekom 8 minuta, pri temperaturi +4°C. RNA je nakon centrifugiranja u talogu. Supernatant se odstrani, a dodaje se 1mL 75%-tnog etanola, centrifugira na 7500x g tijekom 5 minuta. Postupak se ponovi. Nakon ponovljenog postupka, RNA se otapa u vodi (Sigma, Njemačka). Izolirana i otopljena RNA pohranjuje se na - 80 °C. Integritet uzoraka provjeren je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 230, 260 i 280 nm i mjerenjem koncentracije na NanoDrop 1000 uređaju (Thermo scientific, USA) te gel elektroforezom.

4.7.2. Pročišćavanje RNA pomoću deoksiribonukleaze

Radi osiguravanja da se u lančanoj reakciji polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction* - PCR) umnoži RNA, a ne i DNA, prije reverzne transkripcije RNA je bila pročišćena pomoću Amplification grade DNase I (Sigma, Njemačka). Kako bi se utvrdilo da je RNA zaista pročišćena od DNA, napravljena je lančana reakcija polimerazom s uzorkom RNA tretiranim DNazom bez reakcije reverzne transkripcije. Nije dobiven nikakav PCR produkt, što je potvrdilo da su uzorci bili pročišćeni od DNA.

4.7.3. Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija je postupak kojim se iz mRNA dobije komplementarna molekula DNA (cDNA). On se zasniva na svojstvu molekule RNA da pri određenim uvjetima veže komplementarne nizove koji će poslužiti kao početnice za sintezu novog lanca reverznom transkriptazom, te će kao produkt nastati cDNA. U ovom pokusu korišten je High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) s inhibitorom RNase (Applied Biosystems, SAD), prema uputama proizvođača na MyCycler thermal cycler (BioRad) uređaju.

4.7.4. PCR u realnom vremenu

PCR je metoda umnažanja određenog odsječka DNA uzastopnim ciklusima podizanja i spuštanja temperature reakcijske smjese koja sadrži cDNA, par početnica (i hibridizacijskih proba), otopinu $MgCl_2$, smjesu dNTP-a, termostabilnu DNA polimerazu i njoj odgovarajući pufer, a kako bi PCR produkt bilo vidljiv upotrebljava se SYBR Green boja (ili FAM u slučaju korištenja hibridizacijskih proba). Od jedne kopije DNA moguće je sintetizirati 2^n novih kopija, a n je broj ciklusa reakcije. PCR metodom istražena je mRNA ekspresija gena za CYP2j3, CYP4A1, CYP4A2 i CYP4A3 u uzorcima aorte. Kvantitativna PCR u realnom vremenu (engl. *quantitative polymerase chain reaction* - qPCR, a kako se ovdje koristila reverzna transkripcija u uporabi je i naziv *quantitative reverse-transcription PCR* - qRT-PCR) provedena je na AB7500 (Applied Biosystems) uređaju.

Pomoću PCR umnoženi su željeni dijelovi cDNA početnicama za određeni gen, CYP2j3, CYP4A1, CYP4A2 i CYP4A3. Za kvantifikaciju CYP4A1, CYP4A2 i CYP4A3 korišteni su

TaqMan Gene Expression Assay proizvodi (Rn04224034_s1, Rn01417068_g1 i Rn00598412_m1) prema uputama proizvođača, dok je CYP2j3 mRNA ekspresija određena uporabom jedinstveno dizajniranih ('custom made') primera na Primer Express (Applied Biosystems) sustavu i uporabom ABsolute QPCR SYBR Green low ROX master mixa (Thermo scientific). Provjera PCR produkata napravljena je gel elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu. Prigodom nanošenja na gel, u prvu jažicu stavljen je DNA marker (Lonza 50-1000, SAD) razrijeđen 2x. Za nanošenje uzoraka korišteno je 1,5 µL pufera za nanošenje na gel Blue Juice (Invitrogen, SAD) s 5 µL uzorka. mRNA ekspresija gena (CYP ekspresija) izražena je u odnosu na dvije vrste „housekeeping gena“ - HPRT i 18S, za koje se smatra da imaju stabilnu ekspresiju u svim stanicama te na taj način služe kao kvantitativna kontrola za svaki pojedini uzorak.

4.8. Određivanje proteinske ekspresije specifičnih CYP enzima

4.8.1. Homogenizacija uzoraka

Uzorci aorte dobiveni su promptnom ekscizijom u skladu s ranije opisanim kirurškim postupcima. Označeni uzorci u Eppendorf epruvetama brzo su zamrznuti u tekućem dušiku, a potom čuvani na -80°C. Za homogeniziranje tkiva korišten je homogenizacijski pufer (1 mM EDTA, 10 mM Tris [Fisher Scientific, Belgija], 0.4% SDS [Acros Organics, SAD], koktel inhibitora proteaza 0.4ul/100ul [Sigma Aldrich]). Koktel inhibitora proteaza pomaže sprječavanju razgradnje proteina, a mete im uključuju proteaze, kalpain II, katepsin B, elastaze, papain, plazmin, termolizin, tripsin. Homogenizacija se vršila na ledu, uz pomoć mehaničkog homogenizatora (slika 4.6.), tako da je jedna aorta korištena za jedan uzorak (bez „poolinga“).

Nakon mehaničkog homogeniziranja uslijedilo je centrifugiranje uzoraka 30 minuta na 17 000 x g na temperaturi od 4°C. Otpipetiran je supernatant koji će se koristiti za daljnju analizu. Uzorci (supernatanti) su alikvotirani i pohranjeni na -80°C.



Slika 4.6. Homogenizator *ULTRA-TURRAX* pomoću kojega su pripremani uzorci

4.8.2. Određivanje ukupne koncentracije proteina u uzorcima

Za određivanje ukupne koncentracije proteina u svakom uzorku koristila se Bradford metoda (Bradfordov reagens proizvođača AppliChem - protokol prema uputama proizvođača). Rađena je analiza pomoću mikrotitarskih pločica. Kao standardna krivulja korištena su serijska razrjeđenja BSA (Sigma Aldrich), prema uputama proizvođača. Duplikati uzoraka u potrebnim razrjeđenjima kombinirali su se s Bradfordovim reagensom u odvojenim jažicama, te apsorbancija očitavala spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 595 nm (čitač mikrotitarskih pločica BioRad). Na temelju podataka apsorbancije uzoraka i standardne krivulje određena je koncentracija ukupnih proteina u svakom uzorku.

4.8.3. Western blot metoda - jednodimenzionalna SDS gel elektroforeza (SDS- PAGE)

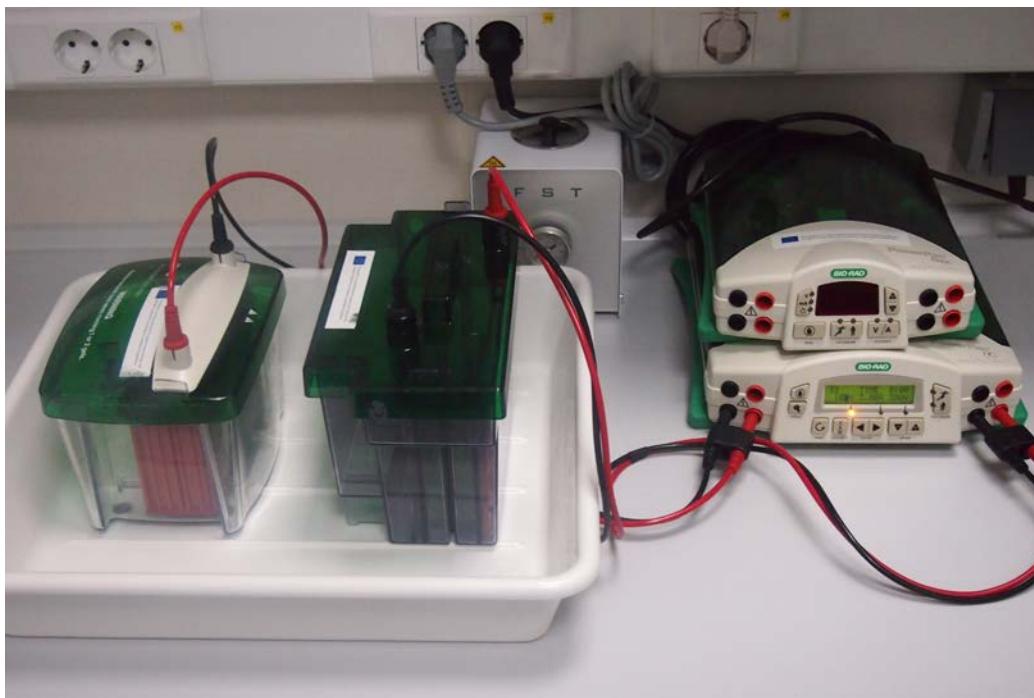
Proteinska ekspresija istražena je Western blot metodom, analitičkom tehnikom koja se koristi za detekciju specifičnih proteina u određenom tkivu, a zasniva se na prepoznavanju i ostvarivanju kompleksa između antigena i protutijela. Kako bi se proteini razdvojili pomoću SDS-PAGE elektroforeze, pripremljene su sljedeće otopine: Pufer za donji gel (1.5 M Tris -HCl, pH 8.8), pufer za gornji gel (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8), pufer za elektroforezu (10x stock: 30.3 g

Tris baze, 144 g glicina [Sigma Aldrich], 10 g SDS za volumen od 1 l otopine, pH 8.3), 10% amonij-persulfat (APS) (vodena otopina), 10% SDS (vodena otopina), pufer za nanošenje uzoraka na gel (za 600 ul uzorka: 475 ul Laemmli Sample Buffer [BioRad], 25 ul β -merkaptotetanol [Sigma Aldrich], 100 ul glicerola [Sigma Aldrich]), otopina akrilamid/bisakrilamid (Acros Organics, SAD). Na postolje za izlijevanje gelova složena su stakla i pričvršćena, a vodom je provjereno ima li curenja. Voda je odlivena, a stakla posušena filter papirom. Otpipetirana je potrebna količina reagensa za priprepu 10%-tnog donjeg gela (gela za razdvajanje): 4.1 ml dH_2O , 3.3. ml otopine akrilamid/bisakrilamida, 2.5 ml pufera za donji gel, 100 ul 10% SDS. Nakon miješanja na magnetskoj mješalici 30-45 minuta i zagrijavanja na sobnu temperaturu dodano je 50 ul APS-a i 5 ul TEMED-a (Acros Organics, SAD) koji kataliziraju brzu polimerizaciju. Smjesa je brzo otpipetirana i pažljivo ulivena između staklenih ploča, pazeći da ne ostanu mjehurići zraka, do potrebne razine za donji gel. Gel se nadosvodi izopropanolom (Sigma Aldrich), jer kontakt sa zrakom sprječava polimerizaciju, i ostavi da polimerizira 45 minuta. Otpipetirani su reagensi za 4% gornji gel (gel za sabijanje): 6.1 ml dH_2O , 1.3 ml otopine akrilamid/bisakrilamida, 2.5 ml pufera za gornji gel, 100 ul 10% SDS. Nakon miješanja i zagrijavanja na sobnu temperaturu dodano je 50 ul 10% APS i 10 ul TEMED-a. Izopropanol se odlio i dobro isprao s donjeg gela, te se pažljivo ulio gornji gel do vrha staklenih ploča i umetnuo češljic za stvaranje jažica. Ostavljen je da polimerizira oko 1 - 1.5 h. Slika 4.7. prikazuje postavljene staklene ploče i umetnut češljic za stvaranje jažica u gelu.



Slika 4.7. Pripremanje gela za SDS-PAGE

Nakon polimerizacije sustav za elektroforezu je postavljen u kadicu koja je zatim napunjena puferom za elektroforezu. Važno je paziti da kraće stakalce bude okrenuto prema unutrašnjosti kadice kako bi se omogućila vodljivost. Češljic je pažljivo uklonjen, a jažice isprane puferom za elektroforezu, kako bi se uklonio nepolimerizirani akrilamid. Uzorci su pripremljeni tako da se volumen uzorka odredio na temelju podataka o ukupnim koncentracijama proteina dobivenima Bradford metodom, a taj volumen se pomiješao s jednakim volumenom pripremljenog pufera za nanošenje uzoraka (omjer 1 : 1). Ova mješavina je prokuhana na 95°C u trajanju od 5 minuta, a zatim kratko centrifugirana na 10 000 g sljedeće 2 minute. Ovako pripremljeni uzorci nanesti su u pojedine jažice, uz vođenje bilješki za identifikaciju nanesenih uzoraka, a u posljednju jažicu na gelu nanesen je standard za Western blot obilježen sa Strep-tag biljekom (Precision Plus Protein WesternC Standard tvrtke BioRad). Elektroforeza je provedena na 4°C kako bi se spriječio „smiling“ efekt koji nastaje ako je prejaka struja ili ako je temperatura gela u sredini viša nego na krajevima. Elektroforeza je provedena oko 2,5 h pri naponu od 100 V. Slika 4.8. prikazuje postavljeni sustav za elektroforezu.



Slika 4.8. Sustav za elektroforezu (BioRad). Lijevo se mogu uočiti kadice u koje se umeću gelovi, a desno je vidljiva aparatura koja omogućuje preciznu kontrolu elektroforeze

4.8.4. Prijenos proteina na membranu

Rabljen je mokri prijenos („blotting“) na membranu korištenjem sustava sa slike 4.9., ali uz uporabu posebnih kaset za prijenos pomoću kojih se gelovi, PVDF (poliviniliden difluorid) membrane i spužvice slože u sendvič za prijenos. Pripremljen je pufer za prijenos (25 mM Tris, 193 mM glicin [Acros Organics, SAD], 20% v/v metanol [Carlo Erba Reagenti], pH 8.3) i ohlađen na 4°C. Prije završetka elektroforeze PVDF membrane (prethodno aktivirane metanolom) namočene su zajedno s filter papirima i spužvicama u pufer za prijenos i ohlađene na 4 °C. Nakon završetka elektroforeze, stakla su izvađena iz sustava i gornji gel odstranjen špatulom. U kasete se na crni šupljikavi okvir poslože spužvica, filter papir, i donji gel, na njih potom PVDF membrana, drugi filter papir i druga spužvica te se crveni okvir kasete preklopi i time dobije sendvič za prijenos. Važno je pažljivo ukloniti mjehuriće. Sendvič za prijenos postavljen je u kadicu s puferom za prijenos tako da je crna strana kasete okrenuta na crnu stranu kadice. Prijenos se provodio 2 h s jakošću struje od 200 mA, na 4°C. Po završetku prijenosa membrana se bojala Amido Black bojom (Sigma Aldrich), kako bi se vizualizirali preneseni proteini, a nakon toga u nekoliko faza odbojavale u otopini za odbojavanje (25% izopropanol, 10% octena kiselina [Sigma Aldrich] u vodi).

4.8.5. Inkubacija s protutijelima i detekcija

Nakon odbojavanja, membrana je isprana u TBST-u (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20 [Sigma Aldrich], pH 7.5) 2 x 15 minuta, a zatim blokirana u otopini za blokiranje (4% bezmasno mlijeko u prahu [Fluka Analytical, Njemačka] u TBST-u) u trajanju od jednog sata na sobnoj temperaturi na tresilici. Membrana je nakon toga inkubirana primarnim protutijelom koje je razrijeđeno otopinom za primarna protutijela (3% bezmasno mlijeko u prahu u TBST-u) tijekom noći u hladnjaku (4°C) na rotary shakeru. Primarno protutijelo se ispiralo 4 x 15 minuta u TBST-u na tresilici, a zatim je membrana inkubirana sekundarnim protutijelom koje je rarjeđeno u otopini za sekundarna protutijela (50 mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.5, uz dodatak 5% v/v BM Chemiluminescence Blotting Substrate - Blocking reagent (3) Roche, cat. No: 1 500 708) u trajanju od 2 sata, na sobnoj temperaturi. U otopinu je dodano i protutijelo StrepTactin (BioRad) za detekciju Step-tag aminokiselinske sekvence standarda, prema uputama proizvođača. Membrane su isprane 4 x 15 minuta u TBST-u.

Za analizu ekspresije CYP2C11 korišteno je mišje monoklonsko protutijelo tvrtke Gentauro (Belgija) u razrjeđenju 1 : 2000. Kao sekundarno protutijelo korišteno je kozje protumišje IgG protutijelo s vezanim HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc., SAD) u razrjeđenju 1 : 5000, prema uputama proizvođača. Za analizu ekspresije CYP2J3 protutijela korišteno je poliklonsko zečje protutijelo koje ima vezan HRP (antibodies-online Inc., SAD), u razrjeđenju 1 : 200, sukladno uputama proizvođača. Budući da ovo protutijelo već ima vezan HRP, izostavljen je korak s inkubacijom sekundarnog protutijela, te je samo korištena otopina za sekundarno protutijelo kako bi se razrijedilo protutijelo na CYP2J3. Detekcija se izvršila pomoću kemiluminiscencijske metode, korištenjem Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific), prema uputama proizvođača. Ovom metodom HRP katalizira stvaranje aktiviranog intermedijarnog reakcijskog produkta, radikala luminola (endoperoksid), koji se vraća u primarno stanje (3-aminoftalatni ion) tako što emitira svjetlost. Detekcija i snimanje na rendgenski film učinjena je korištenjem tamne komore Odjela za radiologiju KBC Osijek.

Ekspresija CYP enzima izražena je u odnosu na ekspresiju kontrolnog proteina β -aktina. Analiza ekspresije β -aktina vršila se na jednak način, tako da su iste membrane, na kojima je detektiran CYP enzim, isprane u TBST-u i učinjen je „stripping“, tj. odstranjivanje pretodno vezanih protutijela. Membrana je 2 x 10 minuta tretirana otopinom za stripping (15 g glicina, 1 g SDS, 10 ml Tween-20 na volumen od 1 litre otopine, uz spužtanje pH na 2.2), zatim 2 x 10 minuta ispirana u PBS-u (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) i 2 x 5 minuta u TBST-u na tresilici. Korištena su primarna monoklonska mišja protutijela na β -aktin u razrjeđenju 1 : 5000 (Sigma Aldrich), te sekundarno kozje protumišje IgG protutijelo s vezanim HRP (Santa Cruz Biotechnology) u razrjeđenju 1 : 7500, jednakim postupkom kao za detekciju CYP enzima. Kvantitativna analiza ekspresije CYP enzima u odnosu na ekspresiju β -aktina učinjena je računalno pomoću ImageJ programa za Western blot analizu.

4.9. Statistička analiza

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom. Analiza se vršila uz pomoć SigmaPlot 11.2 (Systat Software, Inc.) programa. Kontrakcija na ANG II (postotak maksimalne kontrakcije) usporedio se između HBO i kontrolne skupine. Slično, u pokusima koji određuju kontrakciju na ANG II + ANG-(1-7) postotak maksimalne kontrakcije se

usporedio između te dvije grupe, a sukladno tome, analizirali su se i pokusi koji određuju postotak sniženja prekontrakcije, nakon dodavanja ANG-(1-7). Unutar kontrolnih i unutar HBO štakora analizirala se razlika između kontrakcije nakon ANG II i nakon ANG II + ANG-(1-7) (budući da se svaki peptid dodavao zasebnom aortnom prstenu). Shapiro-Wilk test upotrijebljen je se za određivanje raspodjele. U slučaju normalne raspodjele koristio se Studentov t-test, sa značajnom razlikom pri vrijednosti $P < 0.05$, a u protivnom se koristito neparametrijski Mann-Whitney U test sa značajnom razlikom pri vrijednosti $P < 0.05$. Sukladno tome, usporedili su se rezultati HBO štakora gdje nije dodan MS-PPOH s odgovorima HBO prstenova kojima je dodan MS-PPOH. Usporedba odgovora HBO grupe s HBO/glibenklamid i HBO/MS-PPOH grupama (nakon dodavanja ANG II + ANG-(1-7) ili ANG-(1-7) nakon noradrenalinske prekontrakcije) učinila se pomoću One way ANOVA analize.

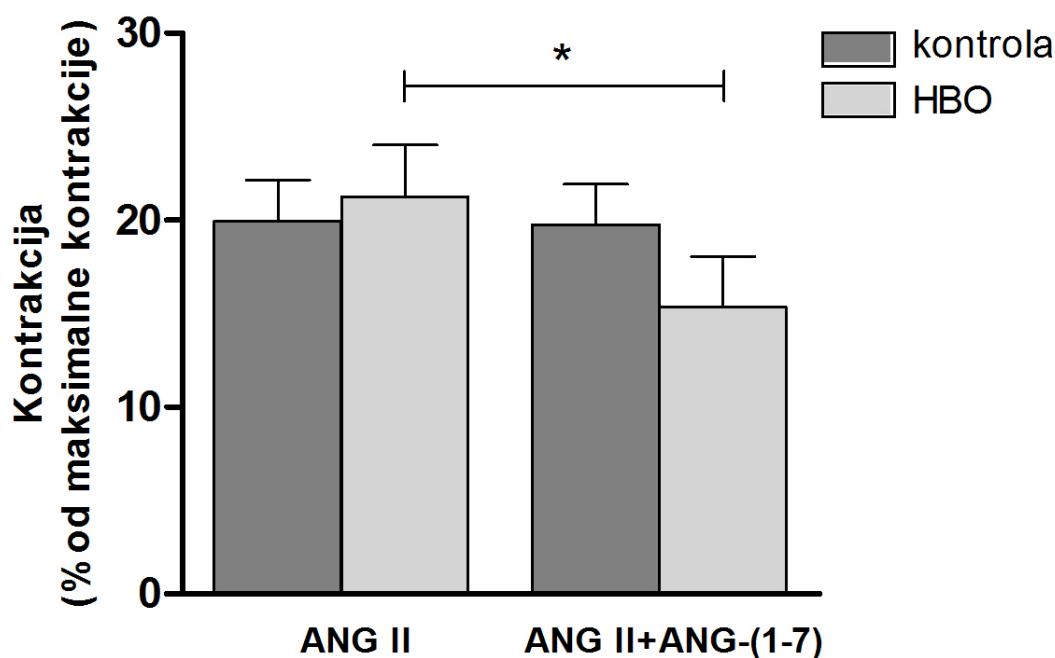
Statistička analiza u pokusima određivanja CYP ekspresije, arterijskog tlaka, pokazatelja oksidativnog stresa i serumske koncentracije ANG-(1-7), pri usporedbi između HBO i kontrolne skupine, učinila se pomoću Studentovog t-testa ili Mann-Whitney U testa, ovisno o ishodu Shapiro-Wilk testa, sa značajnošću pri vrijednosti $P < 0.05$. Jednako je provedena i statistička analiza pri usporedbi kontrolne i HBO skupine u dijabetičnih štakora.

5. REZULTATI

5.1. Zdravi štakori

5.1.1. Vaskularni odgovori izoliranih aortalnih prstenova na ANG II i ANG II + ANG-(1-7)

Kontrakcija torakalnih aortalnih prstenova zdravih životinja u odgovoru na ANG II (izražena kao postotak maksimalne kontrakcije) bila je $20\% \pm 9$ u kontrolnoj skupini (medijan = 17.0%) i $21\% \pm 11$ u HBO skupini (medijan = 18.7%). Nije bilo statistički značajne razlike između skupina ($P > 0.05$, Mann Whitney U test). Na slici 5.1. uspoređeni su kontraktilni odgovori na ANG II u odnosu na kontraktilne odgovore kombinacije ANG II + ANG-(1-7).



N - broj štakora

ANG II kontrola N=16, HBO N=17

ANG II+ANG-(1-7) kontrola N=17, HBO N=14

* $P=0.029$ HBO ANG II vs. HBO ANG-(1-7)

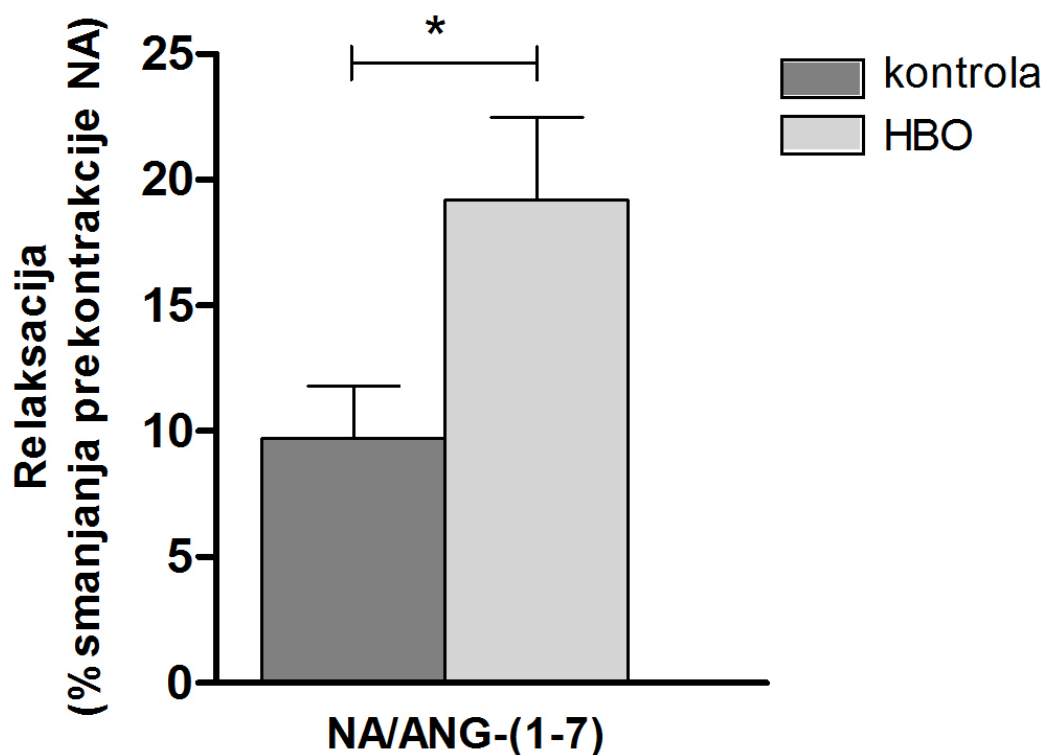
Slika 5.1. Kontraktilni odgovori (izraženi kao % maksimalne kontrakcije) na ANG II ili na kombinaciju ANG II + ANG-(1-7) ispitano na aortalnim prstenovima zdravih štakora. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. HBO - skupina podvrgnuta HBO tretmanu. Zvezdica (*) označava statistički značajnu razliku ($P < 0.05$, Mann Whitney U test).

Sila kontrakcije za kombinaciju peptida torakalnih aortalnih prstenova štakora, koji su podvrgnuti HBO, imala je tendenciju biti niža u HBO skupini ($15\% \pm 10$) u usporedbi s kontrolnom skupinom ($20\% \pm 9$), ali razlika nije bila statistički značajna ($P > 0.05$, Studentov t - test). Kontrakcija na ANG II + ANG-(1-7) u HBO štakora bila je statistički značajno niža u odnosu na čistu ANG II kontrakciju u HBO štakora ($P = 0.029$, Mann Whitney U test). Takve značajne razlike nije bilo između ANG II + ANG-(1-7) vaskularnih odgovora u odnosu na čiste ANG II odgovore u štakora koji nisu tretirani s HBO ($P > 0.05$, Studentov t - test).

Nakon apliciranja ANG-(1-9) (pri koncentracijama 10^{-6} M i 10^{-5} M) nisu zabilježeni nikakvi kontrakcijski odgovori na nekoliko aortalnih prstenova/eksperimentalnih životinja, niti je zabilježeno potenciranje kontraktilnih odgovora na ANG II te su ovi pokusi stoga prekinuti.

5.1.2. Vaskularni odgovori na ANG-(1-7) nakon prekontrakcije s noradrenalinom

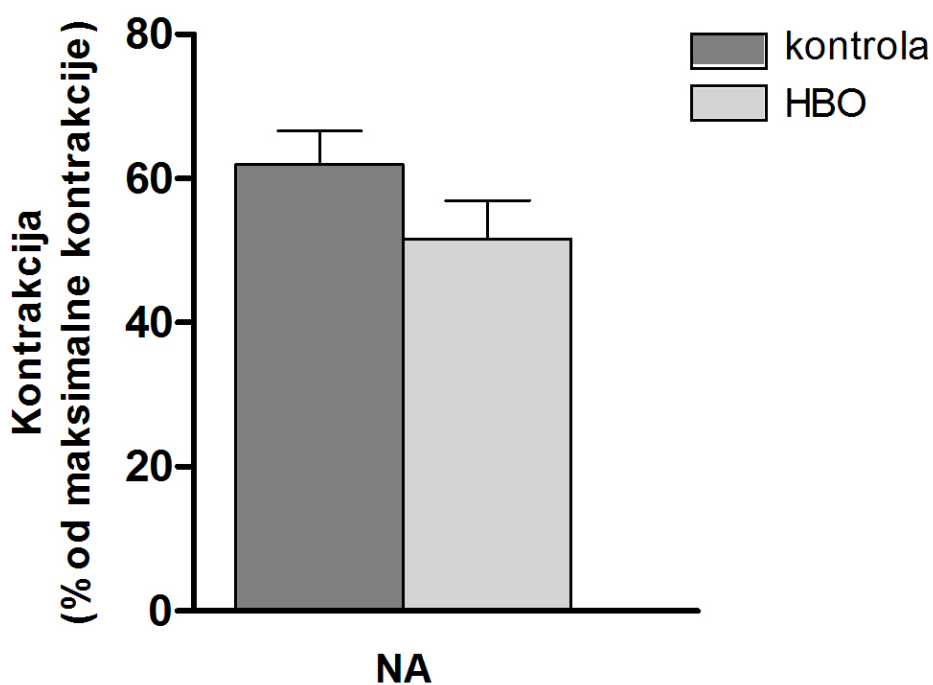
Na slici 5.2. prikazani su relaksacijski odgovori izoliranih torakalnih aortalnih prstenova zdravih štakora na čisti ANG-(1-7) nakon prekontrakcije s noradrenalinom, izraženih kao postotak sniženja prekontrakcije, 3 minute nakon dodavanja ANG-(1-7). Relaksacija u kontrolnoj skupini iznosila je $10\% \pm 9$, a u HBO skupini $19\% \pm 11$. HBO je značajno pojačao relaksacijski odgovor vaskularnih prstenova na ANG-(1-7) u odnosu na kontrolnu skupinu ($P = 0.017$, Studentov t - test).



N - broj štakora, NA - noradrenalin
kontrola N=17, HBO N=12
* P=0.017

Slika 5.2. Relaksacija (postotak sniženja noradrenalinske prekontrakcije, 3 minute nakon dodavanja ANG-(1-7)) izoliranih aortalnih prstenova zdravih štakora. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. Zvezdica (*) označava statistički značajnu razliku ($P < 0.05$, Studentov t - test); HBO značajno pojačava relaksacijski učinak ANG-(1-7).

Na Slici 5.3. prikazuje se učinak HBO na vaskularne odgovore na sam noradrenalin u izoliranih torakalnih aortalnih prstenova zdravih štakora. Pri usporedbi između kontrolne i HBO skupine kontraktilni odgovori na noradrenalin (izraženi kao postotak maksimalne kontrakcije pojedinog aortalnog prstena) su slični, bez statistički značajne razlike ($P > 0.05$, Studentov t-test).

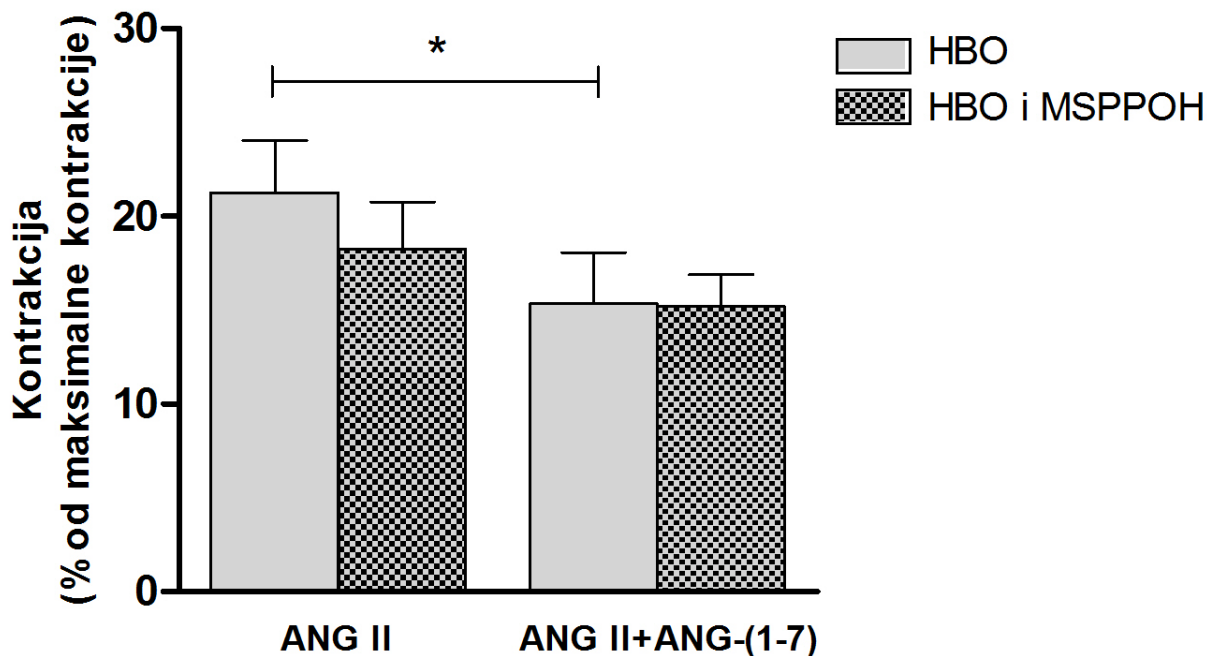


N - broj štakora, NA - noradrenalin
kontrola N=17, HBO N=12

Slika 5.3. Kontraktilni odgovori aortalnih prstenova na sam noradrenalin. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. HBO nije mijenjao samu kontrakciju na noradrenalin.

5.1.3. Potencijalna uloga EETs u modulaciji vaskularne reaktivnosti

U pokusima u kojima je korišten visoko selektivni inhibitor epoksidacije MS-PPOH, kontrakcija na ANG II u HBO štakora ($18\% \pm 7$) bila je slična kontrakciji HBO prstenova kojima nije dodan MS-PPOH. Kontraktilni odgovor na kombinaciju ANG II + ANG-(1-7) bio je sličan u prisustvu MS-PPOH ($15\% \pm 5$) ($P > 0.05$, Mann Whitney U test). MS-PPOH je eliminirao statistički značajnu razliku između vaskularnih odgovora na ANG II i odgovora na kombinaciju (ANG II + ANG-(1-7)) u HBO štakora. Slika 5.4. prikazuje rezultate učinka MS-PPOH na kontraktilne odgovore aortalnih prstenova.



N - broj štakora

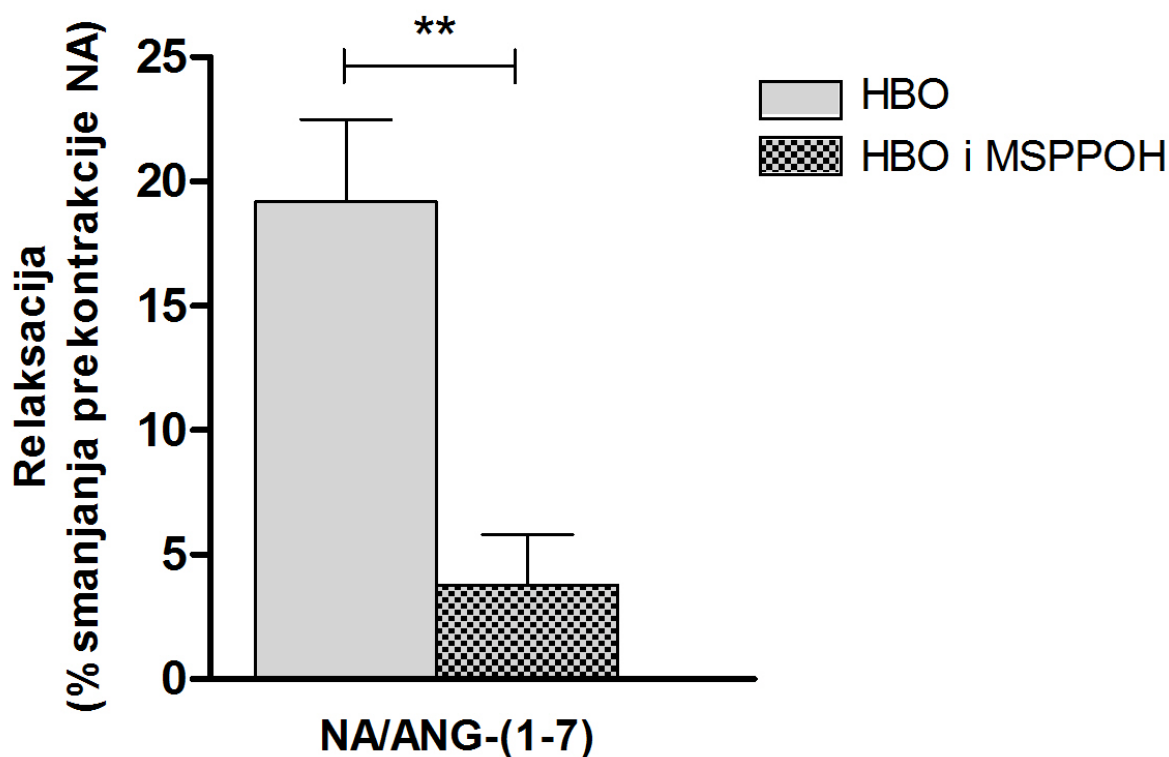
ANG II HBO N=17, HBO i MSPPOH N=7

ANG II+ANG-(1-7) HBO N=14, HBO i MSPPOH N=7

* $P=0.029$ HBO ANG II vs. HBO ANG-(1-7)

Slika 5.4. Kontraktilni odgovori (izraženi kao postotak maksimalne kontrakcije) nakon dodavanja ANG II ili ANG II + ANG-(1-7) izoliranim aortalnim prstenovima zdravih štakora - učinak MS-PPOH u HBO štakora. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. Zvezdica (*) označava statistički značajnu razliku ($P < 0.05$, Mann Whitney U test).

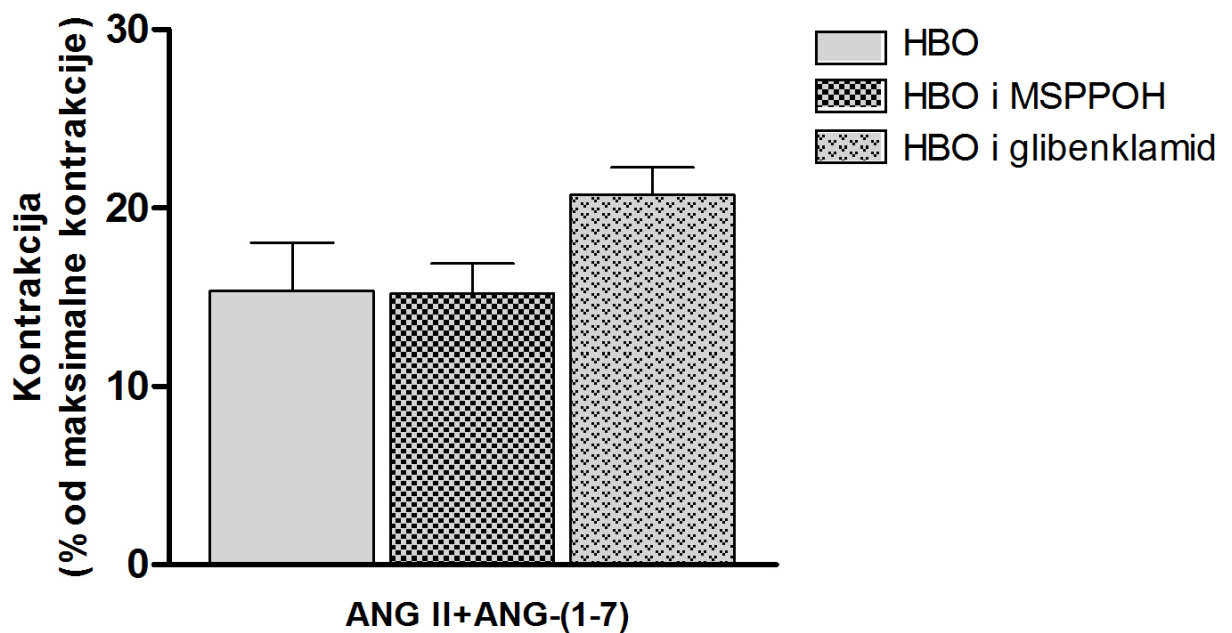
Aplikacija MS-PPOH uzrokovala je značajnu redukciju relaksacije na ANG-(1-7) aortalnih prstenova HBO štakora ($4\% \pm 5$), eliminiravši učinak HBO. Slika 5.5. prikazuje podatke s učincima MS-PPOH na vaskularni odgovor na ANG-(1-7) u HBO štakora. Postoji statistički značajna razlika između HBO skupine bez uporabe MS-PPOH u odnosu na HBO skupinu s uporabom MS-PPOH ($P = 0.004$, Studentov t-test).



N - broj štakora, NA - noradrenalin
 HBO N=12, HBO i MSPPOH N=7
 ** P=0.004

Slika 5.5. Relaksacija (sniženje noradrenalinske prekontrakcije 3 minute nakon dodavanja ANG-(1-7)) aortalnih prstenova zdravih štakora - učinak MS-PPOH u HBO štakora. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. Zvezdice (**) označavaju statistički značajnu razliku ($P < 0.05$, Studentov t - test).

Uloga K_{ATP} kanala u relaksacijskim odgovorima na ANG-(1-7) u HBO štakora bila je od interesa. Kontraktilni odgovori na ANG II + ANG-(1-7), uz uporabu inhibitora K_{ATP} kanala glibenklamida, bili su $21\% \pm 4$. Relaksacija (% sniženja noradrenalinske prekontrakcije) na ANG-(1-7) bila je $15\% \pm 7$. Srednje vrijednosti kontraktilnih odgovora, nakon dodavanja ANG II + ANG-(1-7), bile su slične pri usporedbi HBO, HBO/glibenklamid i HBO/MS-PPOH skupine ($P > 0.05$, One way ANOVA).

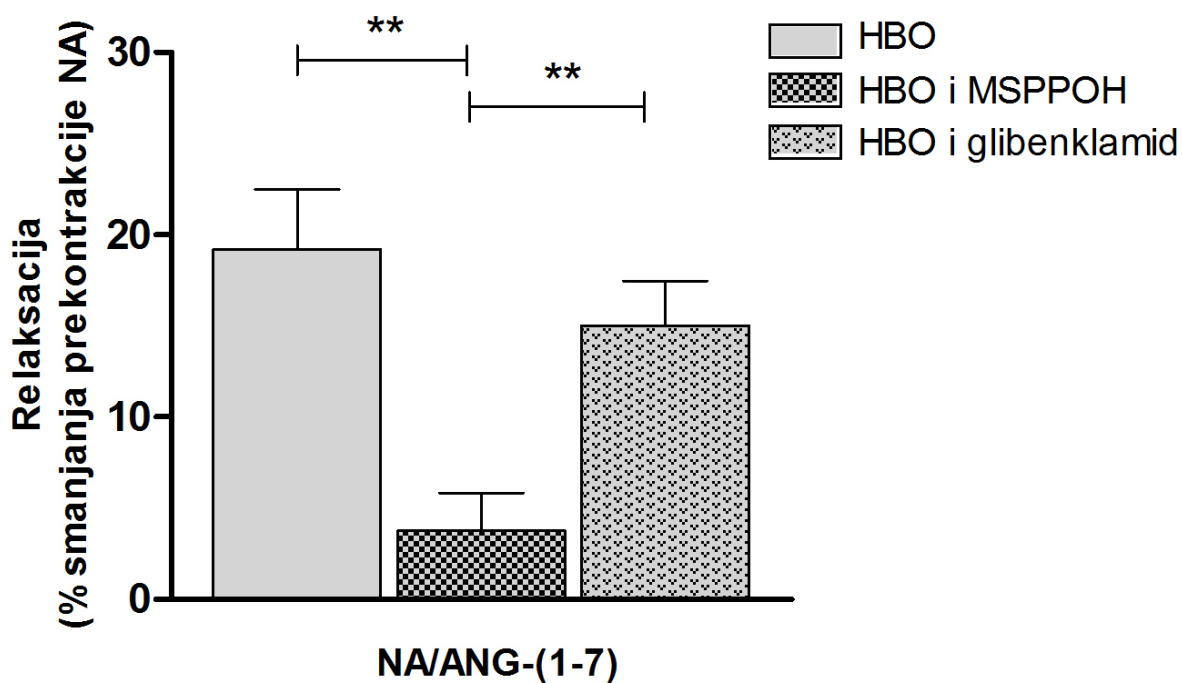


N - broj štakora

HBO N=14, HBO i MSPPOH N=7, HBO i glibenklamid N=8

Slika 5.6. Usporedba kontraktilnih odgovora nakon dodavanja ANG II + ANG-(1-7) između HBO, HBO/MS-PPOH i HBO/glibenklamid skupine. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. Vaskularni odgovori nakon aplikacije MS-PPOH ili glibenklamida HBO štakorima su slični ($P > 0.05$, One way ANOVA).

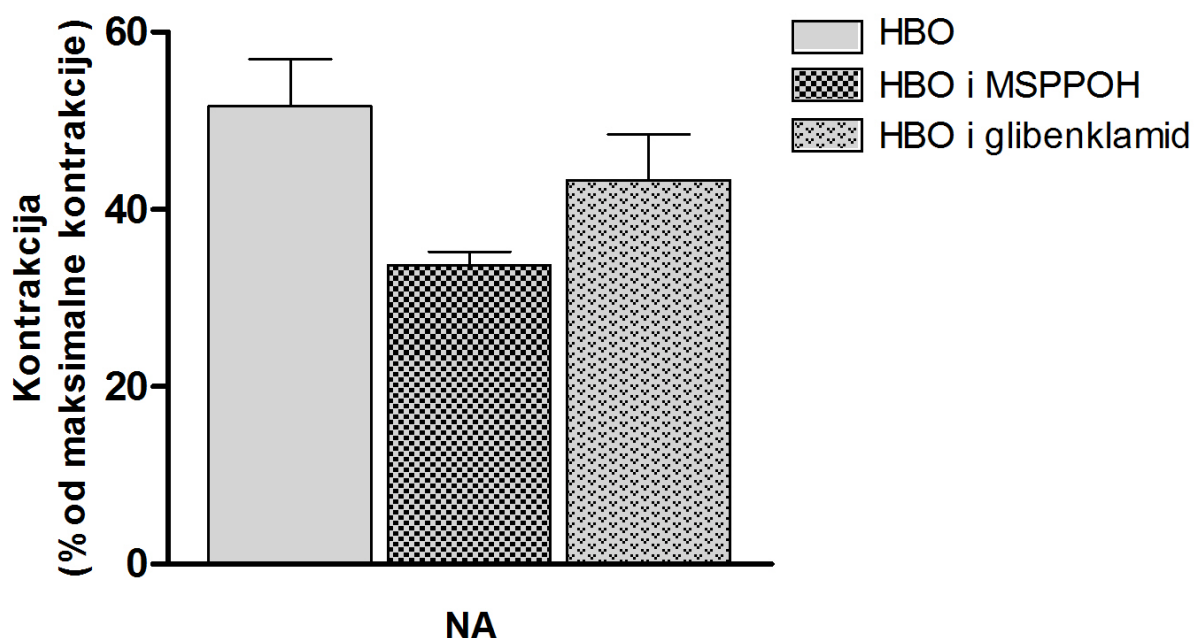
Pri uspoređivanju rezultata relaksacijskih odgovora torakalnih aortalnih prstenova između HBO, HBO/glibenklamid i HBO/MS-PPOH skupine, relaksacija na ANG-(1-7) u HBO/MS-PPOH skupini bila je niža nego u HBO skupini i HBO/glibenklamid skupini, ova razlika je bila statistički značajna ($P = 0.006$, One way ANOVA), a glibenklamid nije imao značajan učinak na relaksacijske odgovore u HBO štakora. Slika 5.7. prikazuje rezultate analize.



N - broj štakora, NA - noradrenalin
HBO N=12, HBO i MSPPOH N=7, HBO i glibenklamid N=8
** P=0.006 One-Way ANOVA

Slika 5.7. Usporedba srednjih vrijednosti relaksacijskih odgovora na ANG-(1-7) između HBO, HBO/MS-PPOH i HBO/glibenklamid skupine. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. Zvijezdice (**) označavaju statistički značajnu razliku ($P < 0.05$, One way ANOVA).

Na slici 5.8. analiziran je utjecaj MS-PPOH i glibenklamida na sam noradrenalinski kontraktilni odgovor u HBO štakora. Usporedba je pokazala da HBO ne mijenja značajno sam kontraktilni odgovor na noradrenalin ($P > 0.05$, One way ANOVA).

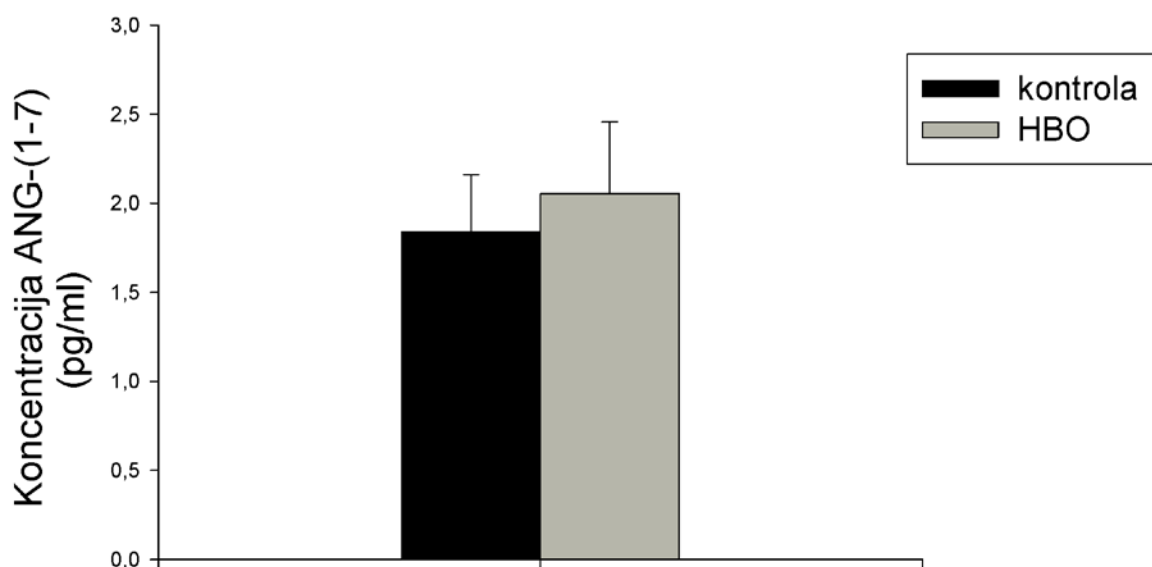


N - broj štakora, NA - noradrenalin
HBO N=12, HBO i MSPPOH N=7, HBO i glibenklamid N=8

Slika 5.8. Usporedba kontraktilnih odgovora nakon dodavanja samog noradrenalina između HBO, HBO/MS-PPOH i HBO/glibenklamid skupine. $N [HBO] = 12$, $N [HBO/MS-PPOH] = 7$, $N [HBO/glibenklamid] = 8$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. HBO - skupina podvrgnuta HBO protokolu, HBO + MS-PPOH - skupina podvrgnuta HBO protokolu, s aplikacijom MS-PPOH; HBO + glibenklamid - skupina podvrgnuta HBO protokolu, s aplikacijom glibenklamida. Nema statistički značajne razlike ($P > 0.05$, One way ANOVA).

5.1.4. Utjecaj HBO na serumsku koncentraciju ANG-(1-7)

ELISA metodom analiziran je učinak HBO na serumsku koncentraciju ANG-(1-7) u zdravih štakora. Slika 5.9. prikazuje rezultate. Nema statistički značajne razlike u koncentraciji ANG-(1-7) između kontrolne ($1.840 \text{ pg/ml} \pm 0.320$) i HBO skupine ($2.053 \text{ pg/ml} \pm 0.403$) ($P > 0.05$, Studentov t - test).



Slika 5.9. Serumska koncentracija ANG-(1-7) u zdravih štakora, određena ELISA metodom. N [kontrola] = 8, N [HBO] = 9. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. HBO nije značajno mijenjao serumsku koncentraciju ($P > 0.05$, Studentov t - test).

5.1.5. Utjecaj HBO na srednji arterijski tlak i pokazatelje oksidativnog stresa

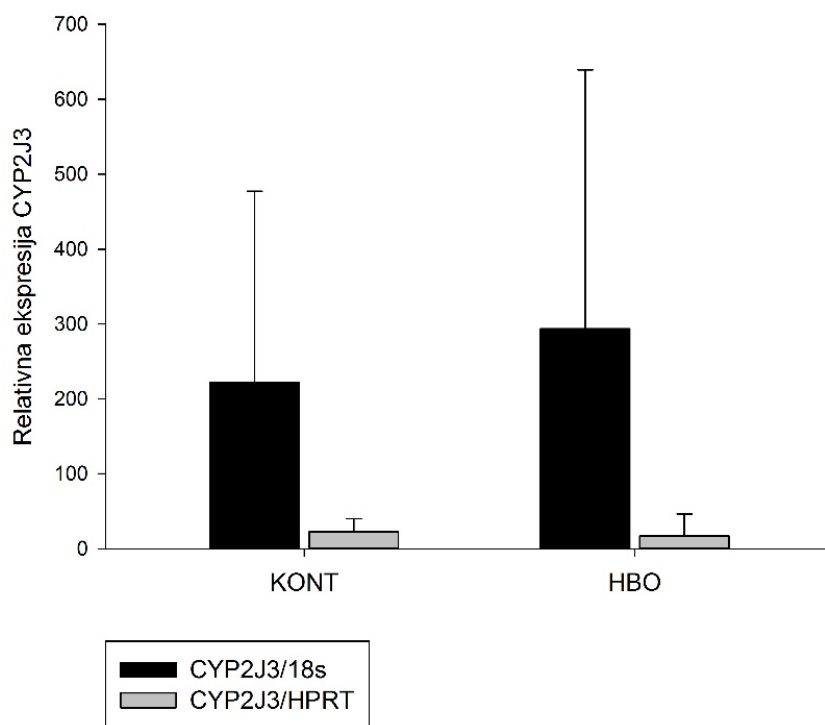
Podatci o starosti, tjelesnoj masi, srednjem arterijskom tlaku (engl. mean arterial pressure), i pokazateljima oksidativnog stresa (FRAP i TBARS) zasebne serije zdravih kontrolnih i HBO životinja prikazani su u tablici 1. Korišteni HBO protokol nije značajno mijenjao navedene vrijednosti.

Tablica 1. Rezultati tjelesne mase, srednjeg arterijskog tlaka te pokazatelja oksidativnog stresa (FRAP i TBARS). Podatci su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. N (kontrolna) = 6, N (HBO) = 6. FRAP - Ferric Reducing Ability of Plasma; TBARS - Thiobarbituric Acid Reactive Substances.

eksperimentalna skupina	starost (tjedni)	tjelesna masa (g)	srednji arterijski tlak (mmHg)	FRAP (mM Trolox)	TBARS (μ mol MDA)
kontrolna	12.33 $\pm$ 0.47	383.8 $\pm$ 12.0	113.0 $\pm$ 3.4	0.156 $\pm$ 0.021	0.270 $\pm$ 0.077
HBO	12.33 $\pm$ 0.75	380.7 $\pm$ 16.5	118.9 $\pm$ 8.4	0.155 $\pm$ 0.021	0.234 $\pm$ 0.039

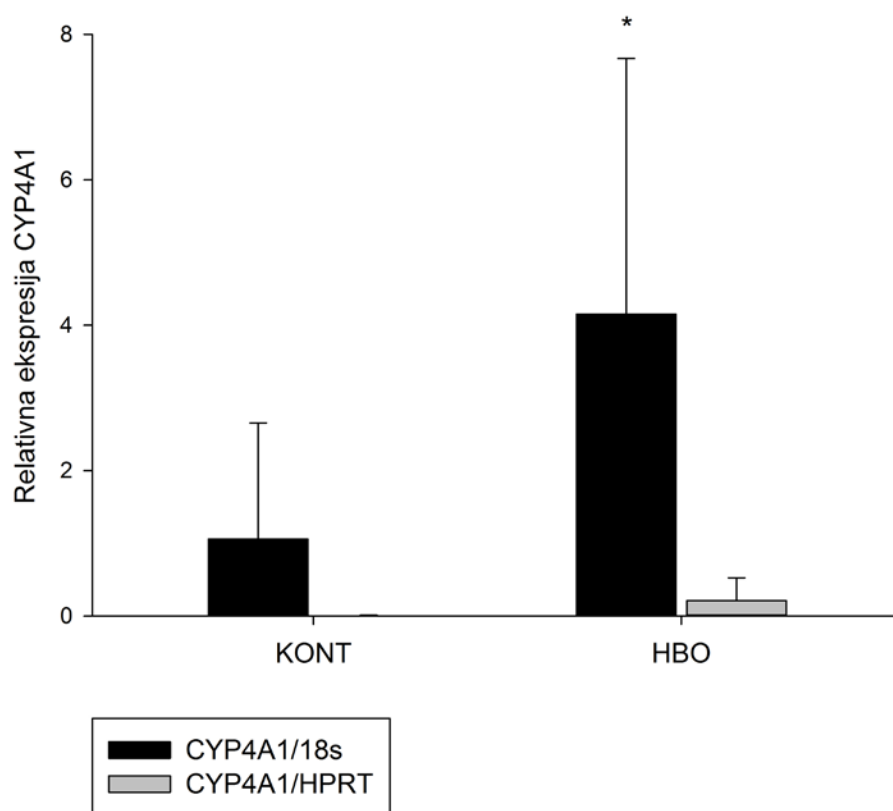
5.1.6. Utjecaj HBO na mRNA ekspresiju CYP enzima

Relativna mRNA ekspresija CYP2J3 izoforme, mjerena pomoću kvantitativne PCR analize, iskazana u odnosu na ekspresiju dvaju housekeeping gena (18S i HPRT), prikazana je na slici 5.10. HBO nije imao značajan utjecaj na promjenu ekspresije CYP2J3 koja je u uzorcima zdravih štakora slična između kontrolne i HBO skupine ($P > 0.05$, Mann Whitney U test).



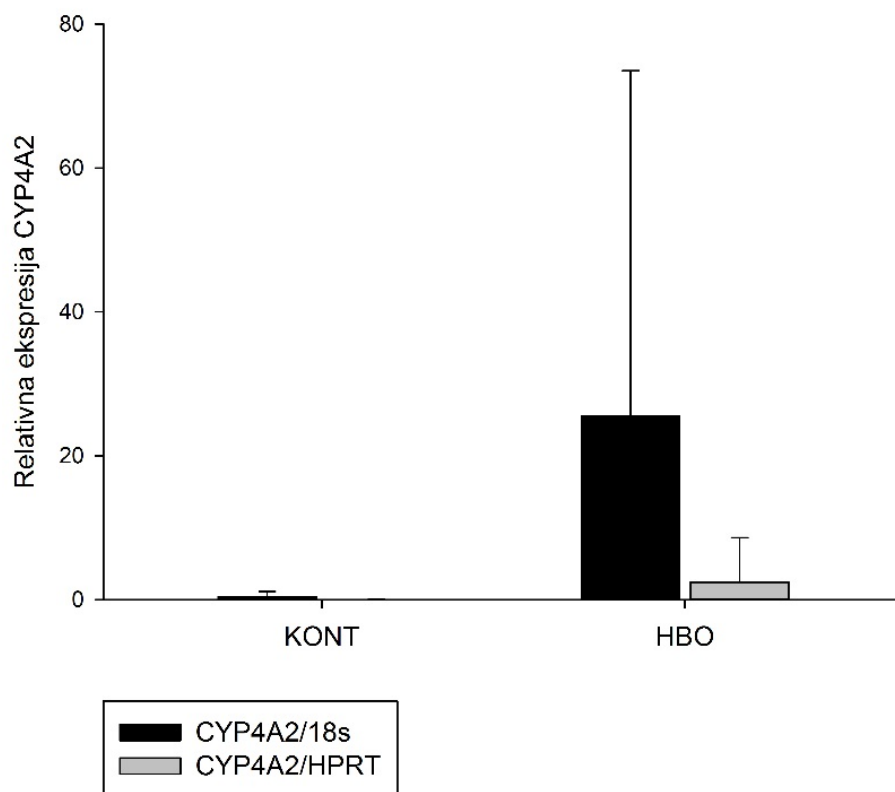
Slika 5.10. Relativna mRNA ekspresija za CYP2J3 u aorti zdravih štakora, iskazana u odnosu na ekspresiju housekeeping gena 18s (CYP2J3/18s) ili HPRT (CYP2J3/HPRT). N (KONT) = 8, N (HBO) = 9. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. KONT - kontrolna skupina; HBO - skupina podvrgnuta HBO protokolu.

Relativna mRNA ekspresija CYP4A1 izoforme, iskazana u odnosu na ekspresiju dvaju housekeeping gena (18S i HPRT), prikazana je na slici 5.11. Zabilježena je značajna pozitivna regulacija ekspresije CYP4A1 mRNA putem HBO za housekeeping gen 18s ($P = 0.040$, Mann Whitney U test). Ekspresija CYP4A1 mRNA iskazana u odnosu na HPRT housekeeping gen je veća u HBO skupini, ali bez statističke značajnosti ($P > 0.05$, Mann Whitney U test).



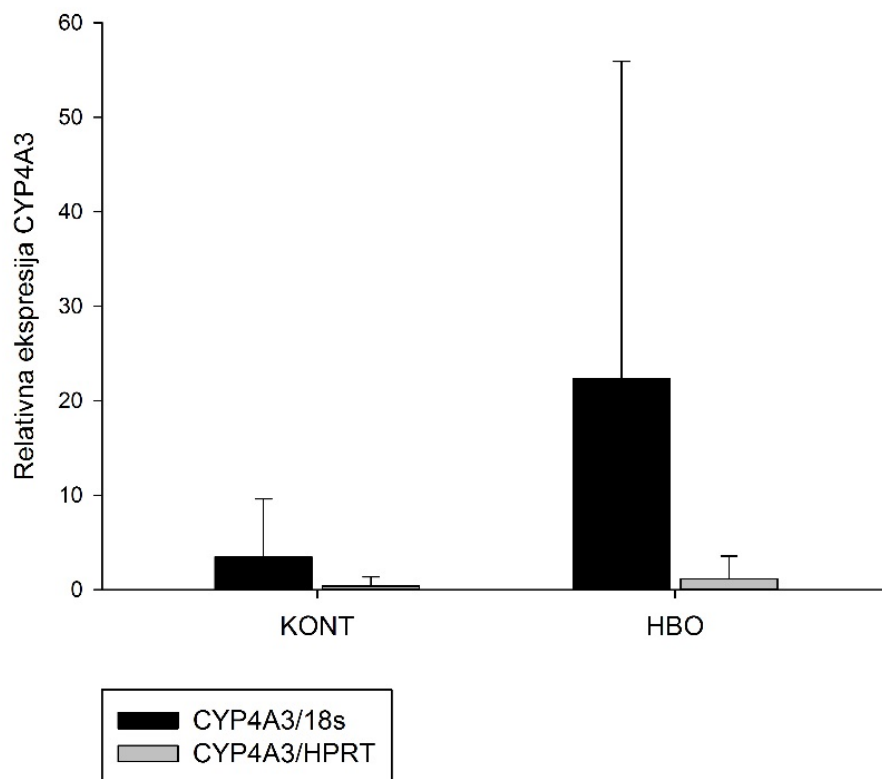
Slika 5.11. Relativna mRNA ekspresija za CYP4A1 u zdravih štakora, iskazana u odnosu na ekspresiju housekeeping gena 18s (CYP4A1/18s) ili HPRT (CYP4A1/HPRT). N (KONT) = 8, N (HBO) = 7. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. KONT - kontrolna skupina; HBO - skupina podvrgnuta HBO protokolu. HBO je značajno povećao ekspresiju CYP4A1.

Relativna aortalna mRNA ekspresija CYP4A2 izoforme u kontrolnoj i HBO skupini zdravih štakora, iskazana u odnosu na ekspresiju dvaju housekeeping gena (18S i HPRT), prikazana je na slici 5.12. Ekspresija CYP4A2 viša je u HBO skupini, ali razlika nije statistički značajna ($P > 0.05$, Mann Whitney U test).



Slika 5.12. Relativna mRNA ekspresija za CYP4A2 u zdravih štakora, iskazana u odnosu na ekspresiju housekeeping gena 18s (CYP 4A2/18s) ili HPRT (CYP4A2/HPRT). N (KONT) = 8, N (HBO) = 9. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. KONT - kontrolna skupina; HBO - skupina podvrgnuta HBO protokolu.

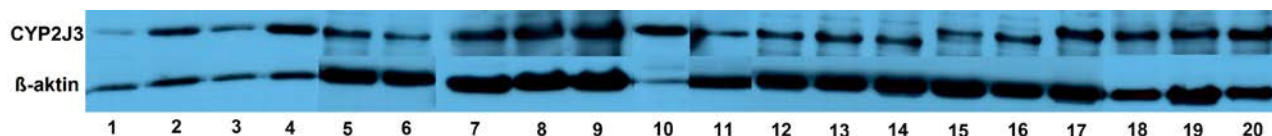
Relativna aortalna mRNA ekspresija CYP4A3 izoforme u kontrolnoj i HBO skupini zdravih štakora, iskazana u odnosu na ekspresiju dvaju housekeeping gena (18S i HPRT), prikazana je na slici 5.13. Ekspresija CYP4A3 je viša u HBO skupini, ali bez statističke značajnosti ($P > 0.05$, Mann Whitney U test).



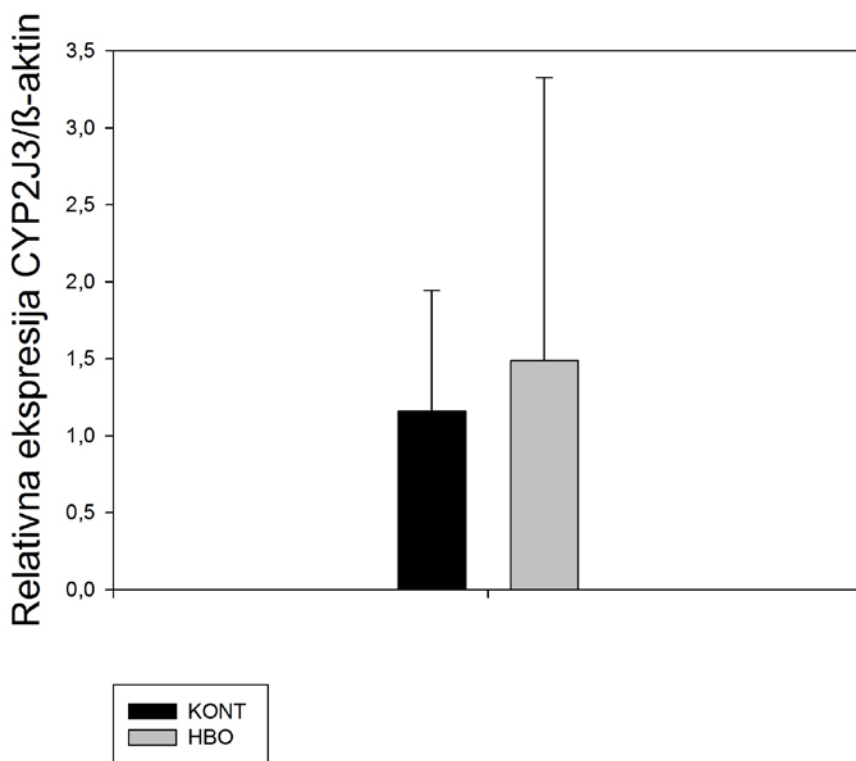
Slika 5.13. Relativna mRNA ekspresija za CYP4A3 u zdravih štakora, iskazana u odnosu na ekspresiju housekeeping gena 18s (CYP4A3/18s) ili HPRT (CYP4A3/HPRT). N (KONT) = 8, N (HBO) = 8. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. KONT - kontrolna skupina; HBO - skupina podvrgnuta HBO protokolu.

5.1.7. Utjecaj HBO na proteinsku ekspresiju CYP enzima

Western blot analiza proteinske ekspresije CYP2J3 izoforme u aorti zdravih štakora prikazana je na slikama 5.14. i 5.15. i iskazana u odnosu na stabilnu ekspresiju kontrolnog proteina β -aktina. Proteinska ekspresija CYP2J3 bila je viša u HBO skupini, ali razlika nije bila statistički značajna ($p > 0.05$, Mann Whitney U test).

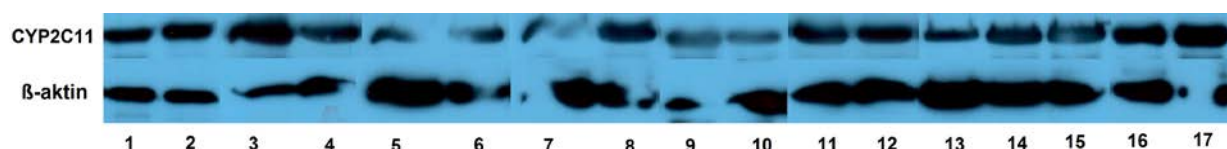


Slika 5.14. Prikaz Western blot detekcije CYP2J3 i β -aktinske ekspresije u aorti zdravih štakora. Uzorci brojeva od 1 do 9 su iz kontrolne skupine, a uzorci od 10 do 20 su iz HBO skupine

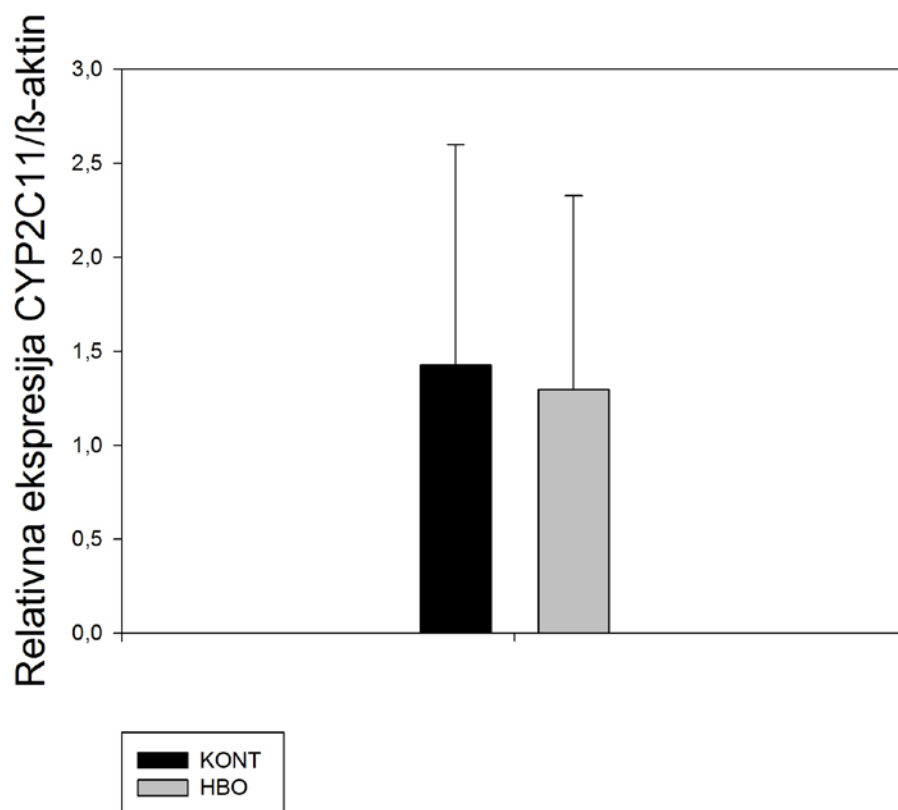


Slika 5.15. Rezultati Western blot analize proteinske ekspresije CYP2J3, iskazane u odnosu na kontrolnu β -aktinsku ekspresiju. N (KONT) = 9, N (HBO) = 11. Podatci su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. KONT - kontrolna skupina; HBO - skupina podvrgnuta HBO protokolu.

Western blot analiza proteinske ekspresije CYP2C11 izoforme u aorti zdravih štakora prikazana je na slikama 5.16. i 5.17. i iskazana u odnosu na stabilnu ekspresiju kontrolnog proteina β -aktina. Proteinska ekspresija CYP2C11 bila je slična u HBO i kontrolnoj skupini ($p > 0.05$, Mann Whitney U test).



Slika 5.16. Prikaz Western blot detekcije CYP2C11 i β -aktinske ekspresije u aorti zdravih štakora. Uzorci brojeva od 1 do 8 su iz kontrolne skupine, a uzorci od 9 do 17 su iz HBO skupine.

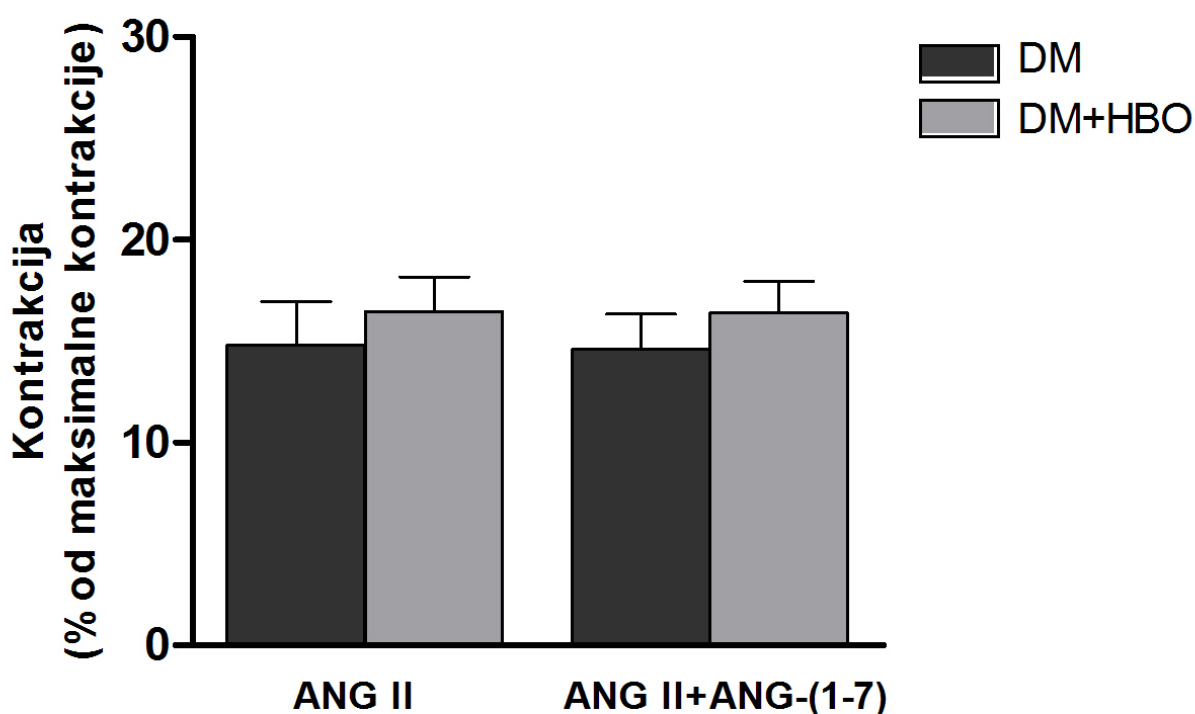


Slika 5.17. Rezultati Western blot analize proteinske ekspresije CYP2C11, iskazane u odnosu na kontrolnu β -aktinsku ekspresiju. N (KONT) = 8, N (HBO) = 9. Podatci su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. KONT - kontrolna skupina; HBO - skupina podvrgnuta HBO protokolu.

5.2. Rezultati na animalnom modelu dijabetesa

5.2.1. Vaskularni odgovori izoliranih aortalnih prstenova na ANG II i ANG II + ANG-(1-7)

Kontrakcija torakalnih aortalnih prstenova dijabetičnih životinja u odgovoru na ANG II (izražena kao postotak od maksimalne kontrakcije) bila je $14.8\% \pm 7.1$ u kontrolnoj skupini i $16.4\% \pm 5.9$ u HBO skupini. Nije bilo statistički značajne razlike između skupina ($P > 0.05$, Studentov t - test). Na slici 5.18. uspoređeni su kontraktilni odgovori na ANG II u odnosu na kontraktilne odgovore kombinacije ANG II + ANG-(1-7).



N - broj štakora

ANG II DM N=11, DM+HBO N=12

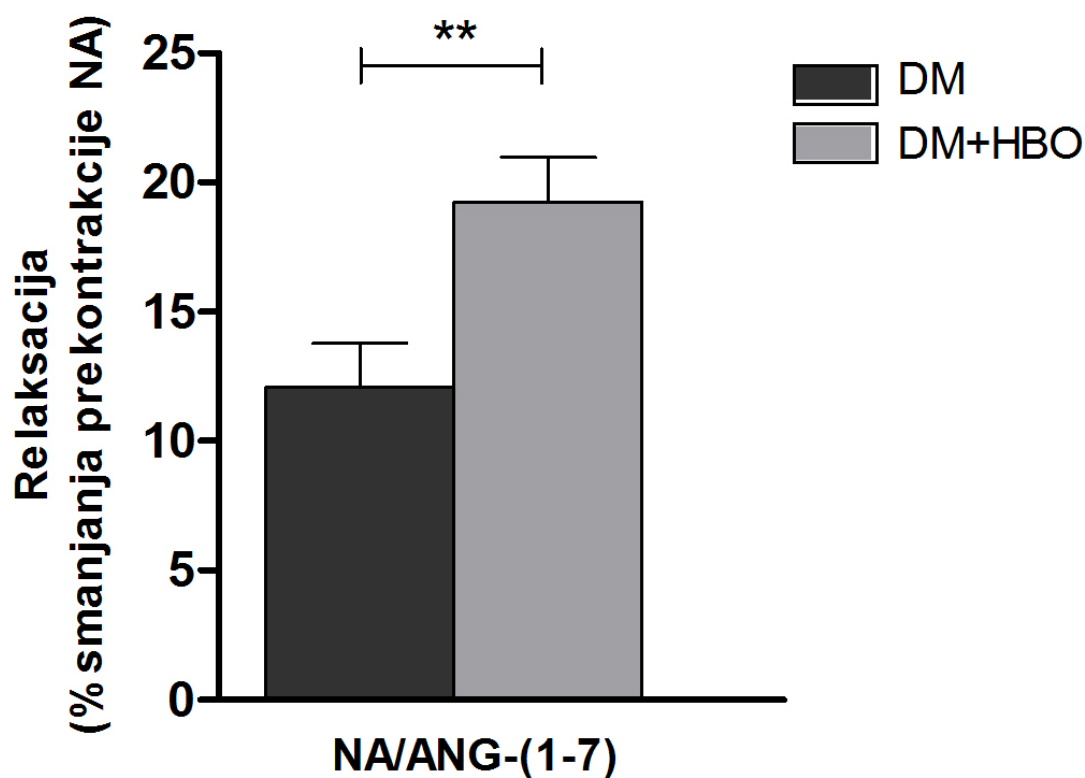
ANG II+ANG-(1-7) DM N=19, DM+HBO N=19

Slika 5.18. Kontraktilni odgovori (izraženi kao % maksimalne kontrakcije) na ANG II ili na kombinaciju ANG II + ANG-(1-7) ispitano na aortalnim prstenovima dijabetičnih štakora. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. DM - kontrola skupina dijabetičnih štakora; DM + HBO - skupina dijabetičnih štakora podvrgnuta HBO tretmanu.

Kontrakcije torakalnih aortalnih prstenova na kombinaciju peptida bile su slične između kontrolne i HBO skupine ($P > 0.05$, Studentov t - test). Također, nije bilo statistički značajne razlike između kontrakcije na kombinaciju ANG II + ANG-(1-7) u odnosu na ANG II kontrakciju u HBO štakora ($P > 0.05$, Studentov t - test).

5.2.2. Vaskularni odgovori na ANG-(1-7) nakon prekontrakcije s noradrenalinom

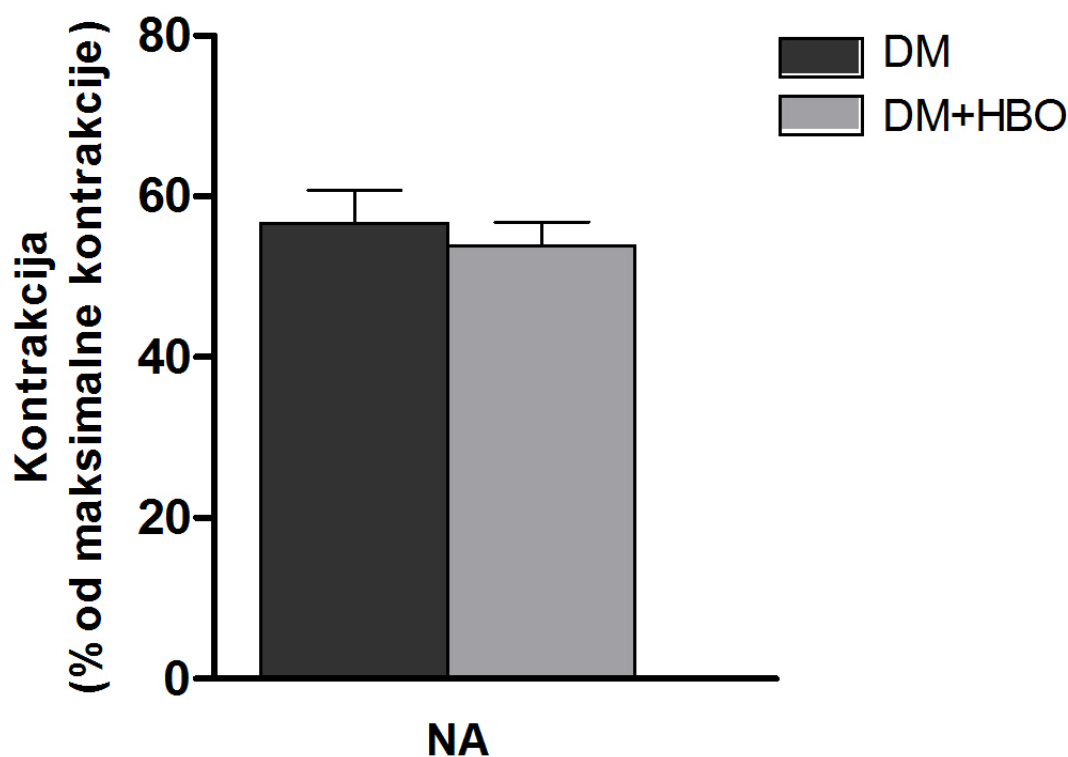
Na slici 5.19. prikazani su relaksacijski odgovori izoliranih torakalnih aortalnih prstenova dijabetičnih štakora na čisti ANG-(1-7) nakon prekontrakcije s noradrenalinom, izraženih kao postotak sniženja prekontrakcije 3 minute nakon dodavanja ANG-(1-7). Relaksacija u kontrolnoj skupini dijabetičnih životinja iznosila je $12.1\% \pm 6.4$, a u HBO skupini $19.2\% \pm 7.3$. HBO je značajno pojačao relaksacijski odgovor vaskularnih prstenova na ANG-(1-7) u odnosu na kontrolnu skupinu ($P = 0.007$, Studentov t - test).



N - broj štakora, NA - noradrenalin
 DM N=14, DM+HBO N=18
 * P=0.007

Slika 5.19. Relaksacija (postotak sniženja noradrenalinske prekontrakcije, 3 minute nakon dodavanja ANG-(1-7)) izoliranih torakalnih aortalnih prstenova dijabetičnih štakora. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. DM - kontrolna skupina dijabetičnih štakora; DM + HBO - skupina dijabetičnih štakora podvrgnuta HBO tretmanu. Zvezdice (**) označavaju statistički značajnu razliku ($P < 0.05$, Studentov t - test); HBO značajno pojačava relaksacijski učinak ANG-(1-7).

Na Slici 5.20. prikazuje se učinak HBO na vaskularne odgovore samog noradrenalina u izoliranih torakalnih aortalnih prstenova zdravih štakora. Pri usporedbi između kontrolne dijabetične i HBO skupine kontraktilni odgovori na noradrenalin (izraženi kao postotak maksimalne kontrakcije pojedinog aortalnog prstena) su slični, bez statistički značajne razlike ($P > 0.05$, Studentov t-test).

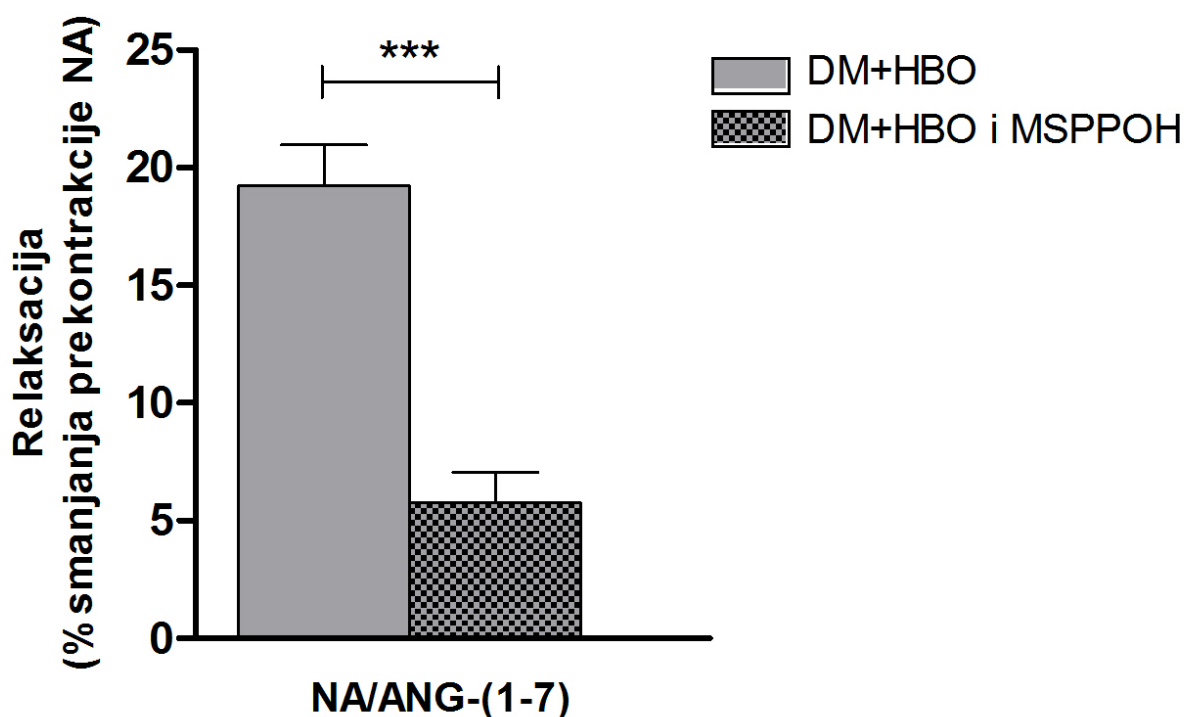


N - broj štakora, NA - noradrenalin
DM N=14, DM+HBO N=18

Slika 5.20. Kontraktilni odgovori aortalnih prstenova na sam noradrenalin u dijabetičnih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. DM - kontrolna skupina dijabetičnih štakora; DM + HBO - skupina dijabetičnih štakora podvrgnuta HBO tretmanu. HBO nije mijenjao samu kontrakciju na noradrenalin.

5.2.3. Potencijalna uloga EETs u modulaciji vaskularne reaktivnosti

U pokusima u kojima je korišten visoko selektivni inhibitor epoksidacije MS-PPOH u dijabetičnih životinja, MS-PPOH je uzrokovao značajnu redukciju relaksacije na ANG-(1-7) aortalnih prstenova HBO štakora ($5.7\% \pm 5.1$), eliminiravši učinak HBO. Slika 5.21. prikazuje podatke s učincima MS-PPOH na vaskularni odgovor na ANG-(1-7) u HBO štakora. Postoji statistički značajna razlika između HBO skupine bez uporabe MS-PPOH u odnosu na HBO skupinu s uporabom MS-PPOH ($P < 0.001$, Studentov t-test).

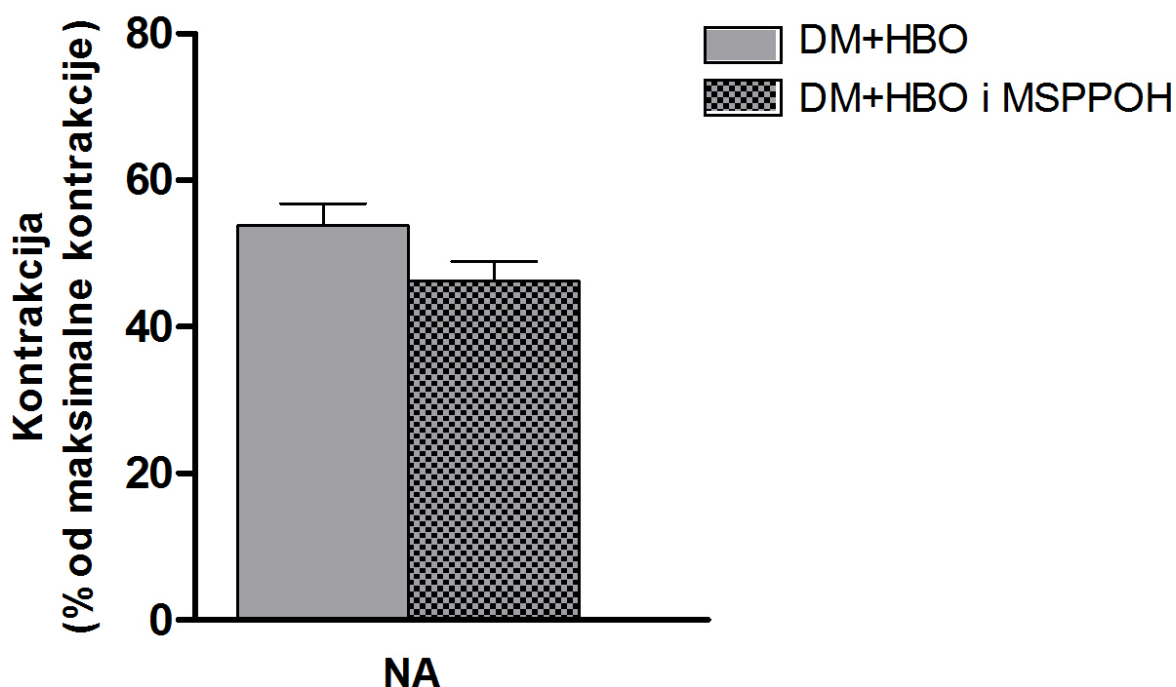


N - broj štakora, NA - noradrenalin
 DM+HBO N=18, DM+HBO i MSPPOH N=16
 * $P < 0.001$

Slika 5.21. Relaksacija (sniženje noradrenalinske prekontrakcije 3 minute nakon dodavanja ANG-(1-7)) aortalnih prstenova štakora s animalnim modelom dijabetesa - učinak MS-PPOH u HBO štakora. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. DM - kontrolna skupina dijabetičnih štakora; DM + HBO - skupina dijabetičnih štakora podvrgnuta HBO tretmanu. Zvezdice (***) označavaju statistički značajnu razliku ($P < 0.001$, Studentov t - test).

Budući da u dijabetičnih životinja nije izmjerena razlika između odgovora na ANG II + ANG-(1-7) u HBO skupini u odnosu na ANG II, nisu provedene aplikacije MS-PPOH za ovu peptidnu kombinaciju.

Na slici 5.22. analiziran je utjecaj MS-PPOH na sam noradrenalinski kontraktilni odgovor u dijabetičnih HBO štakora. Usporedba je pokazala da HBO ne mijenja značajno sam kontraktilni odgovor na noradrenalin ($P > 0.05$, Studentov t - test).

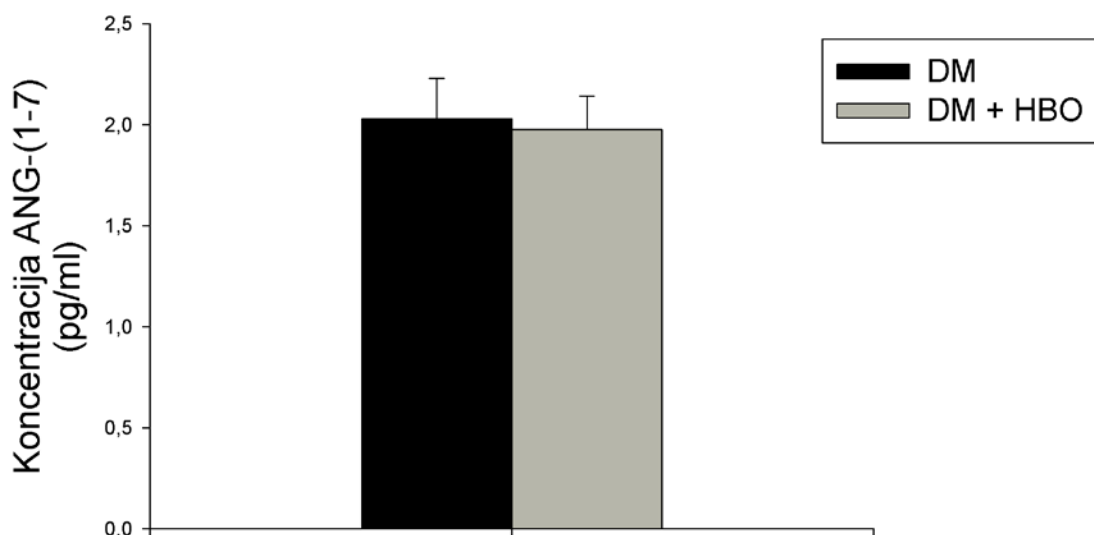


N - broj štakora, NA - noradrenalin
 DM+HBO N=18, DM+HBO i MSPPOH N=16

Slika 5.22. Kontraktilni odgovori aortalnih prstenova na sam noradrenalin u dijabetičnih HBO životinja - utjecaj MS-PPOH. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. DM - kontrolna skupina dijabetičnih štakora; DM + HBO - skupina dijabetičnih štakora podvrgnuta HBO tretmanu. HBO nije mijenjao samu kontrakciju na noradrenalin.

5.2.4. Utjecaj HBO na serumsku koncentraciju ANG-(1-7)

ELISA metodom analiziran je učinak HBO na serumsku koncentraciju ANG-(1-7) u štakora s animalnim modelom dijabetesa tipa 1. Slika 5.23. prikazuje rezultate. Nema statistički značajne razlike u koncentraciji ANG-(1-7) između netretirane dijabetične ($2.028 \text{ pg/ml} \pm 0.201$) i skupine dijabetičnih štakora tretiranih s HBO ($1.976 \text{ pg/ml} \pm 0.165$) ($P > 0.05$, Mann Whitney U test).



Slika 5.23. Serumska koncentracija ANG-(1-7) u dijabetičnih štakora, određena ELISA metodom. N [kontrolna] = 8, N [HBO] = 8. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. DM - kontrolna skupina dijabetičnih štakora; DM + HBO - skupina dijabetičnih štakora podvrgnuta HBO tretmanu. HBO nije značajno mijenjao koncentraciju ($P > 0.05$, Mann Whitney U test).

5.2.5. Utjecaj HBO na srednji arterijski tlak i pokazatelje oksidativnog stresa

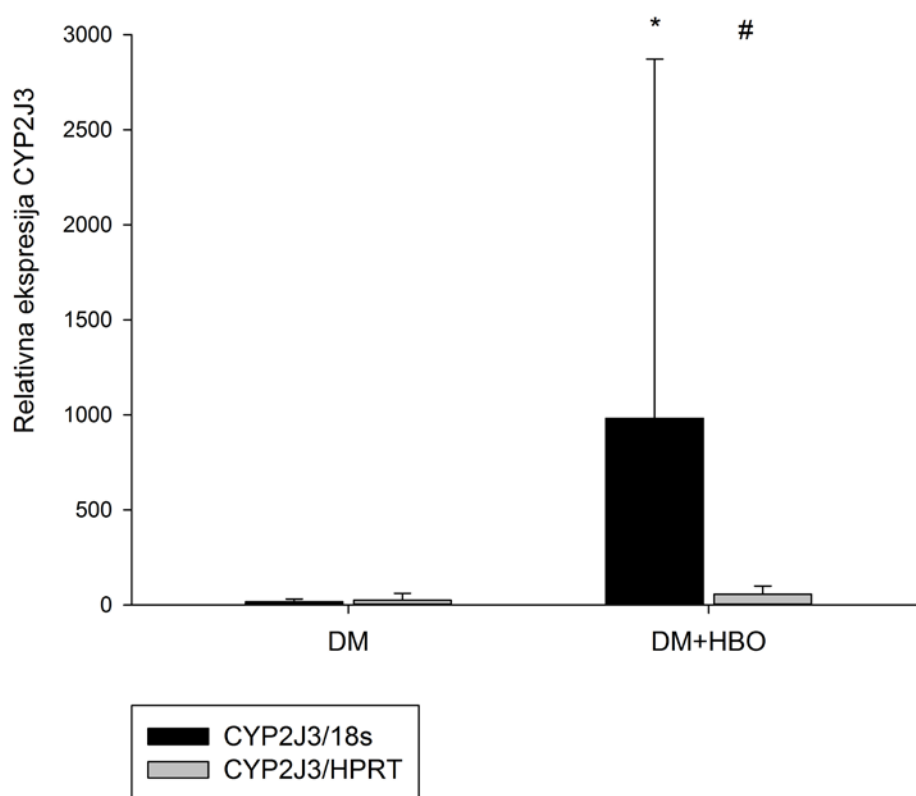
Podatci o starosti, tjelesnoj masi, srednjem arterijskom tlaku (engl. mean arterial pressure), i pokazateljima oksidativnog stresa (FRAP i TBARS) zasebne serije kontrolnih i HBO životinja s animalnim modelom dijabetesa tipa 1 prikazani su u tablici 2. Korišteni HBO protokol nije statistički značajno mijenjao navedene vrijednosti.

Tablica 2. Rezultati tjelesne mase, srednjeg arterijskog tlaka te pokazatelja oksidativnog stresa (FRAP i TBARS). N (kontrolna) = 6, N (HBO) = 6. Podatci su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. DM - skupina kontrolnih dijabetičnih životinja; DM + HBO - skupina dijabetičnih životinja podvrgnutih HBO protokolu.

eksperimentalna skupina	starost (tjedni)	tjelesna masa (g)	srednji arterijski tlak (mmHg)	FRAP (mM Trolox)	TBARS (μ mol MDA)
DM	16 $\pm$ 0	240.0 $\pm$ 36.4	102.3 $\pm$ 5.0	0.176 $\pm$ 0.033	0.179 $\pm$ 0.049
DM + HBO	16.0 $\pm$ 0.81	259.3 $\pm$ 23.3	105.9 $\pm$ 4.7	0.181 $\pm$ 0.028	0.261 $\pm$ 0.135

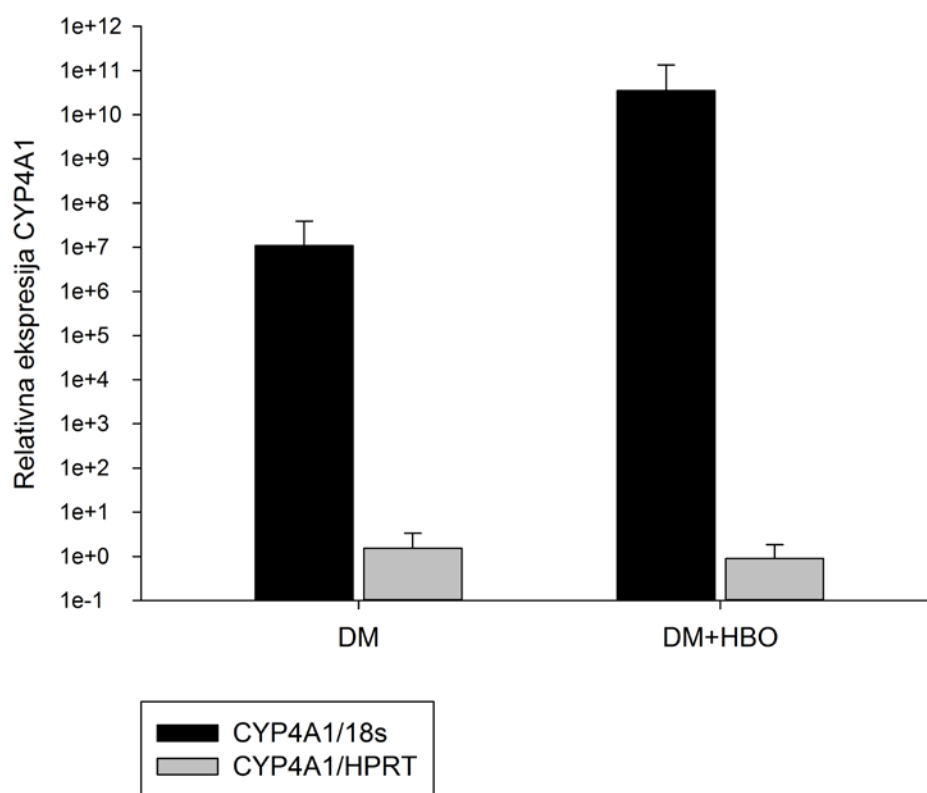
5.2.6. Utjecaj HBO na mRNA ekspresiju CYP enzima

Relativna mRNA ekspresija CYP2J3 izoforme, mjerena pomoću kvantitativne PCR analize, iskazana u odnosu na ekspresiju dviju housekeeping gena (18S i HPRT), prikazana je na slici 5.24. HBO je u aortalnim uzorcima dijabetičnih štakora uzrokovao statistički značajno povećanje mRNA ekspresije CYP2J3 izoforme, što je bilo mjerljivo pri analizi i pomoću 18s ($P = 0.08$, Mann Whitney U test) i HPRT ($P = 0.042$, Mann Whitney U test) housekeeping gena.



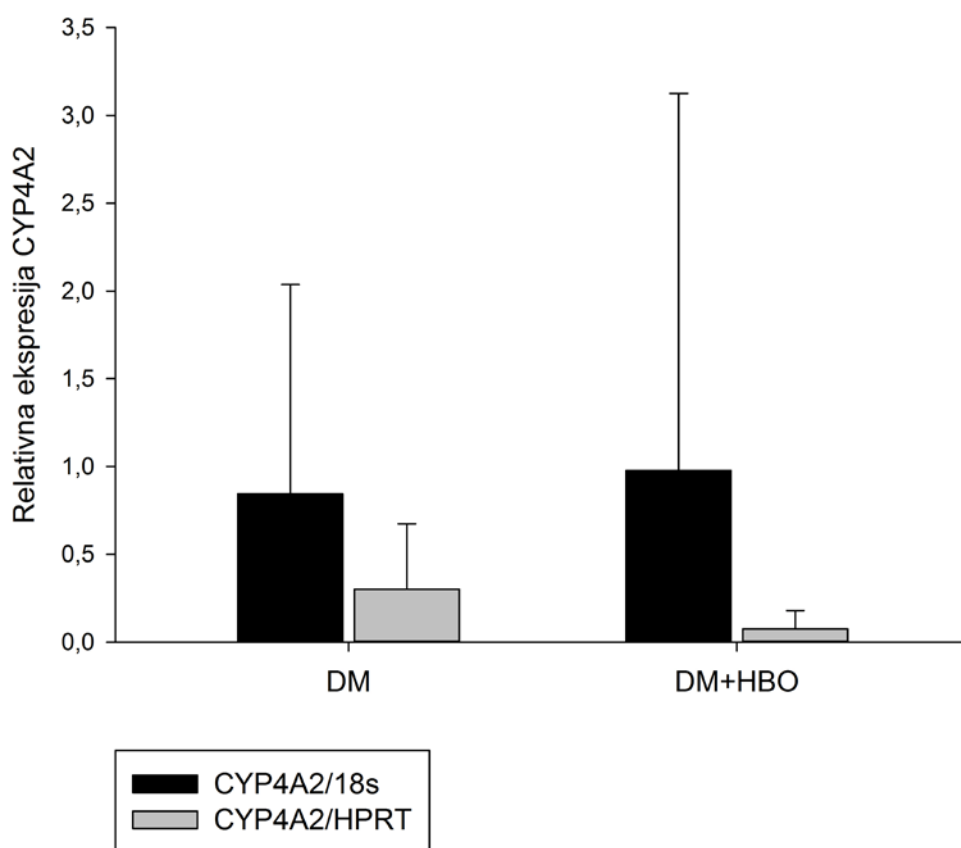
Slika 5.24. Relativna mRNA ekspresija za CYP2J3 u dijabetičnih štakora, iskazana u odnosu na ekspresiju housekeeping gena 18s (CYP2J3/18s) ili HPRT (CYP2J3/HPRT). N (DM)=9, N (DM+HBO)=9. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. DM - kontrolna skupina dijabetičnih štakora; DM+HBO - skupina dijabetičnih štakora podvrgnutih HBO protokolu. Zvijezdica (*) i ljestve (#) predstavljaju statistički značajnu razliku ($P < 0.05$). HBO je značajno povećao mRNA ekspresiju CYP2J3.

Relativna aortalna mRNA ekspresija CYP4A1 izoforme u kontrolnoj i HBO skupini dijabetičnih štakora iskazana u odnosu na ekspresiju dviju housekeeping gena (18S i HPRT) prikazana je na slici 5.25. Nije izmjerena statistički značajna razlika u mRNA ekspresiji CYP4A1 gena između kontrolne i HBO skupine dijabetičnih štakora ($P > 0.05$, Mann Whitney U test).



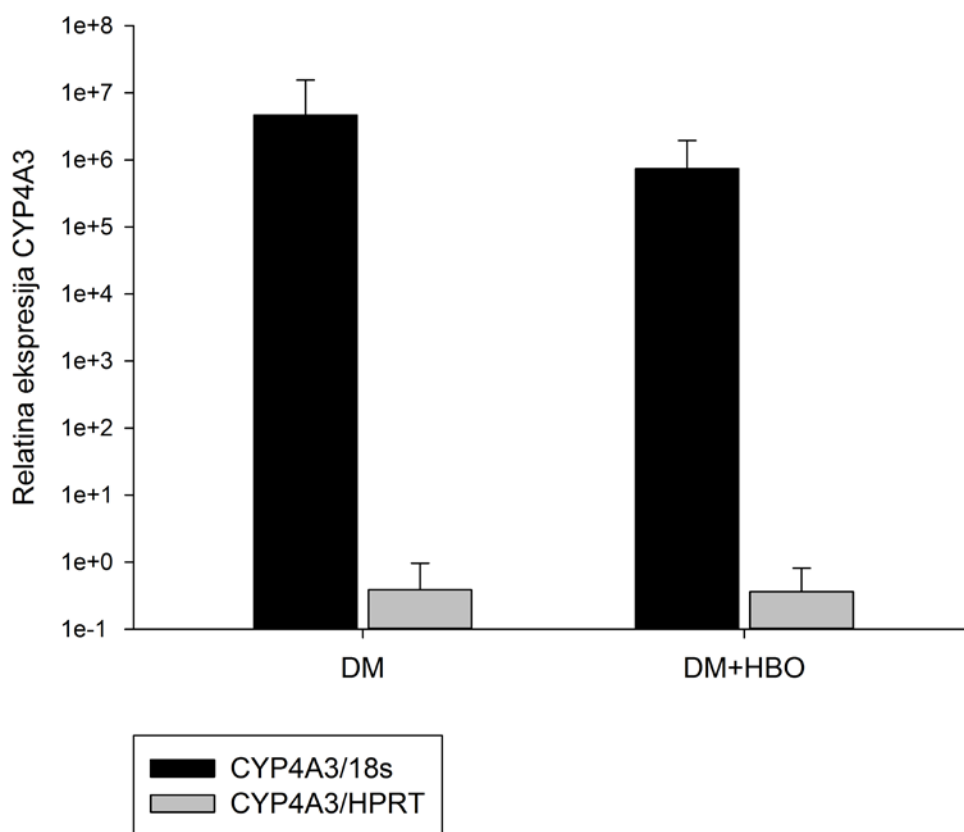
Slika 5.25. Relativna mRNA ekspresija za CYP4A1 u dijabetičnih štakora, iskazana u odnosu na ekspresiju housekeeping gena 18s (CYP4A1/18s) ili HPRT (CYP4A1/HPRT). N (DM) = 9, N (DM+HBO) = 9. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. DM - kontrolna skupina dijabetičnih štakora; DM+HBO - skupina dijabetičnih štakora podvrgnutih HBO protokolu.

Relativna mRNA ekspresija CYP4A2 izoforme, mjerena pomoću kvantitativne PCR analize, iskazana u odnosu na ekspresiju dvaju housekeeping gena (18S i HPRT), prikazana je na slici 5.26. Ekspresija mRNA CYP4A2 gena bila je slična u kontrolnoj i HBO skupini dijabetičnih štakora ($P > 0.05$, Mann Whitney U test).



Slika 5.26. Relativna mRNA ekspresija za CYP4A2 u dijabetičnih štakora, iskazana u odnosu na ekspresiju housekeeping gena 18s (CYP4A2/18s) ili HPRT (CYP4A2/HPRT). N (DM) = 8, N (DM+HBO) = 9. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. DM - kontrolna skupina dijabetičnih štakora; DM+HBO - skupina dijabetičnih štakora podvrgnutih HBO protokolu.

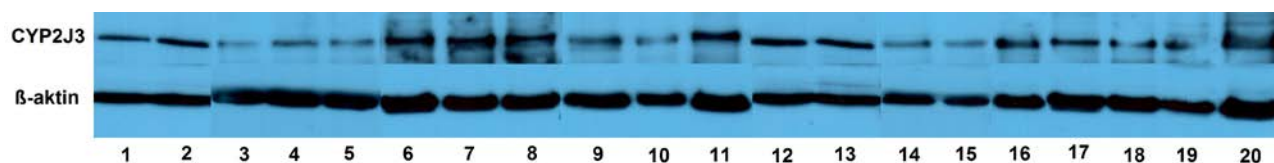
Relativna aortalna mRNA ekspresija CYP4A3 izoforme u kontrolnoj i HBO skupini dijabetičnih štakora, iskazana u odnosu na ekspresiju dvaju housekeeping gena (18S i HPRT), prikazana je na slici 5.27. Ekspresija CYP4A3 je slična u HBO skupini u odnosu na kontrolnu skupinu dijabetičnih životinja ($P > 0.05$, Mann Whitney U test).



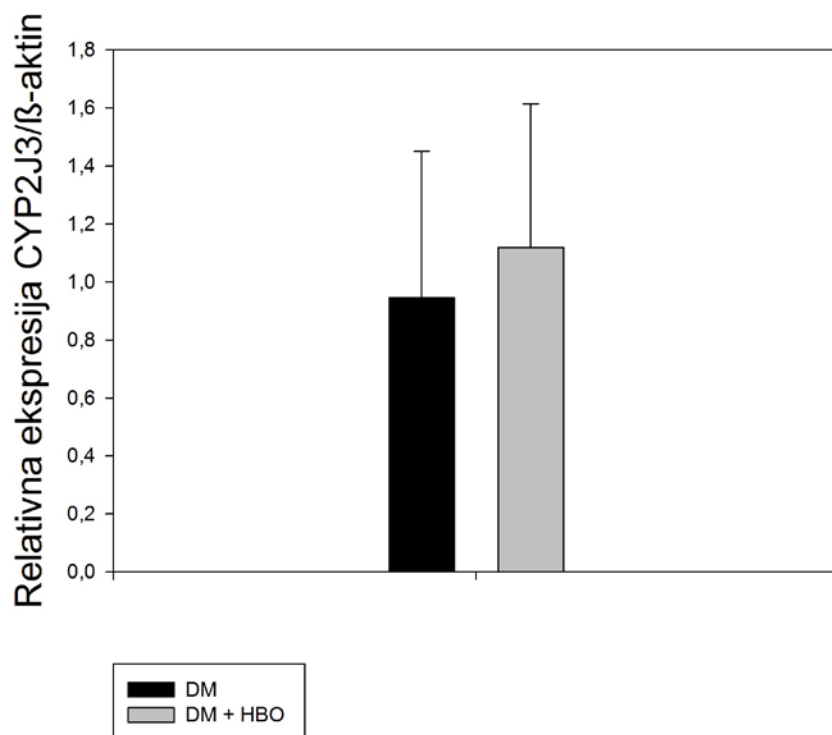
Slika 5.27. Relativna mRNA ekspresija za CYP4A3 u dijabetičnih štakora, iskazana u odnosu na ekspresiju housekeeping gena 18s (CYP4A3/18s) ili HPRT (CYP4A3/HPRT). N (DM) = 9, N (DM+HBO) = 9. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. DM - kontrolna skupina dijabetičnih štakora; DM+HBO - skupina dijabetičnih štakora podvrgnutih HBO protokolu.

5.2.7. Utjecaj HBO na proteinsku ekspresiju CYP enzima

Western blot analiza proteinske ekspresije CYP2J3 izoforme u aorti štakora s animalnim modelom dijabetesa tipa 1 prikazana je na slikama 5.28. i 5.29. i iskazana u odnosu na stabilnu ekspresiju kontrolnog proteina β -aktina. Proteinska ekspresija CYP2J3 bila je viša u HBO skupini, ali razlika nije bila statistički značajna ($p > 0.05$, Studentov t - test).

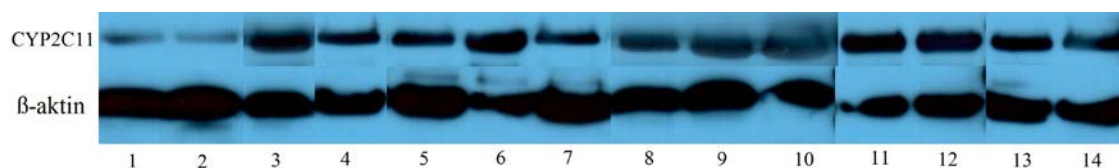


Slika 5.28. Prikaz Western blot detekcije CYP2J3 i β -aktinske ekspresije u aorti dijabetičnih štakora. Uzorci brojeva od 1 do 11 su iz kontrolne skupine, a uzorci od 12 do 20 su iz HBO skupine dijabetičnih životinja.

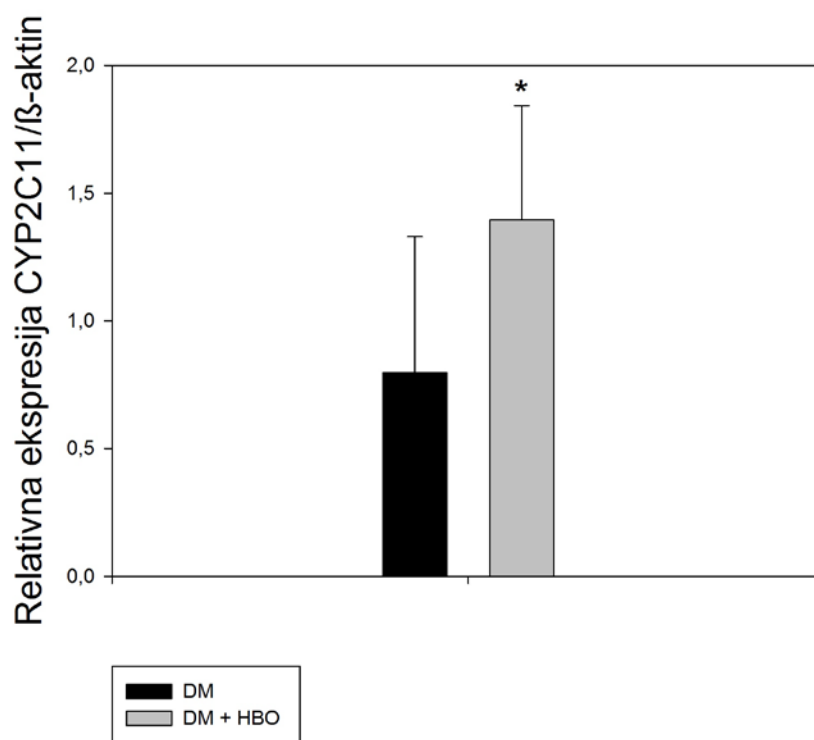


Slika 5.29. Rezultati Western blot analize proteinske ekspresije CYP2J3 iskazane u odnosu na kontrolnu β -aktinsku ekspresiju. N (kontrolna) = 11, N (HBO) = 9. Podatci su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. DM - kontrolna skupina dijabetičnih štakora; DM + HBO - skupina podvrgnuta HBO protokolu.

Western blot analiza proteinske ekspresije CYP2C11 izoforme u aorti štakora s animalnim modelom dijabetesa tipa 1 prikazana je na slikama 5.30. i 5.31. i iskazana u odnosu na stabilnu ekspresiju kontrolnog proteina β -aktina. HBO je uzrokovao pojačanje proteinske ekspresije CYP2C11 izoforme u dijabetičnih štakora, a razlika je bila statistički značajna ($p = 0,042$, Studentov t - test).



Slika 5.30. Prikaz Western blot detekcije CYP2C11 i β -aktinske ekspresije u aorti dijabetičnih štakora. Uzorci brojeva od 1 do 7 su iz kontrolne skupine, a uzorci od 8 do 14 su iz HBO skupine dijabetičnih životinja.



Slika 5.31. Rezultati Western blot analize proteinske ekspresije CYP2C11, iskazane u odnosu na kontrolnu β -aktinsku ekspresiju. N (kontrolna) = 7, N (HBO) = 7. Podatci su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ STDEV. DM - kontrolna skupina dijabetičnih štakora; DM + HBO - skupina podvrgnuta HBO protokolu.

6. RASPRAVA

6.1. Utjecaj hiperbarične oksigenacije na vaskularne odgovore na ANG II i ANG-(1-7)

U kontekstu ovog istraživanja važno je napomenuti da HBO treba promatrati kao čimbenik koji stvara povećanu raspoloživost kisika kao aktivne molekule u mijenjanju vaskularne funkcije. Analiza djelovanja HBO, prema tome, pridonosi kako boljem razumijevanju fiziološke uloge kisika kao signala u regulaciji vaskularne reaktivnosti, tako i proširivanju uvida u točna djelovanja HBO kada se koristi u terapijske svrhe. Bolje znanje učinaka HBO na vaskulaturu preduvjet je za optimalnije korištenje HBO u kliničkim uvjetima, otpimiziranje indikacija i kontraindikacija, poboljšanje efikasnosti korištenja za razna patološka stanja, predviđanje poželjnih i nepoželjnih učinaka te interakcija (npr. s lijekovima koji modificiraju komponente sustava renin-angiotenzin ili pak lijekovima koji utječu na metabolizam arahidonske kiseline koji su vrlo važni i često propisivani lijekovi upravo u bolesnika koji boluju od dijabetesa, metaboličkih i drugih kroničnih bolesti i u kojih bi se hiperbarična oksigenacija mogla uskoro češće upotrebljavati u terapiji).

Kako bi se istražili učinci HBO na sam ANG-(1-7), u ovom radu su se ispitali učinci na ANG-(1-7) djelovanje nakon prekontrakcije krvožilnih prstenova s noradrenalinom (takva prekontrakcija s noradrenalinom se koristila za istraživanje djelovanja ANG-(1-7) u raznim prijašnjim radovima (131, 133)). Nadalje, mjereni su odgovori na kombinaciju ANG II i ANG-(1-7) peptida jer je nađeno da se ANG-(1-7) suprotstavlja konstrikciji izazvanoj s ANG II i mogao bi se ponašati drukčije ako je prisutan ANG II (raspravljeno kasnije). U ovom radu ispitan je i učinak HBO na samo djelovanje ANG II.

Rezultati istraživanja su pokazali da HBO ne mijenja značajno konstriktorne odgovore izazvane s ANG II ni u zdravih ni u dijabetičnih štakora, nasuprot prvobitnoj hipotezi gdje je predviđeno pojačanje vaskularne reaktivnosti općenito - na fiziološke stimulanse i vazokonstriktornog i vazodilatatornog djelovanja. Međutim, izmjereno je značajno pojačanje relaksacije na ANG-(1-7) u HBO štakora, što je bilo konzistentno i u zdravih i u dijabetičnih životinja. Relaksacija na dodani ANG-(1-7) u aortalnih prstenova kontrolnih štakora bila je sličnog reda veličine za korištenu koncentraciju kao u prijašnjim radovima koji su ispitali djelovanja ANG-(1-7) metodom aortalnih prstenova štakora, uključujući primjerice nedavne

pokuse Silve i sur. (184) ili pokuse Kluskensa i sur. (185). Ovo potvrđuje tehničku ispravnost pokusa. Nepostojanje značajne promjene kontrakcije na sam noradrenalin također je važno jer potvrđuje da zapažena značajna razlika u ANG-(1-7) odgovorima u HBO skupini nije posljedica različite prekontrakcije ili nespecifičnog učinka HBO na prekontrakciju. Vršna kontrakcijska sila za kombinaciju ANG II + ANG-(1-7) bila je niža u zdravih HBO štakora, ali bez statističke značajnosti. Puno veća potentnost ANG II peptida u usporedbi s ANG-(1-7) mogla bi objasniti da se učinci vidljivi sa samim ANG-(1-7) (nakon prekontrakcije s noradrenalinom) ne mogu tako lako mjeriti kada je prisutan i ANG II. Zanimljivo je da, kada su uspoređeni odgovori na ANG II s odgovorima na ANG II + ANG-(1-7) kombinaciju u zdravih HBO štakora, kontrakcija na kombinaciju peptida (ANG II + ANG-(1-7)) bila je značajno niža nego kontrakcija na ANG II. Ovakva značajna razlika u zdravih kontrolnih štakora, koji nisu izloženi HBO tretmanu, nije postojala. Ovo, također, ukazuje na to da HBO ima zaista značajan učinak na vaskularnu reaktivnost na ANG-(1-7) i moguće je spekulirati da je HBO dovela na vidjelo ili potencirala suprotstavljajuće djelovanje ANG-(1-7) na kontrakciju izazvanu s ANG II, koja pak nije bila jednostavno mjerljiva u netretiranih štakora pri danim koncentracijama peptida. Prema nekim ranijim navodima iz literature, ANG-(1-7) bi mogao djelovati i kao agonist i kao antagonist AT₁ receptora, ovisno o prisutnosti ANG II (132), ali je također i ligand za vlastiti Mas receptor - oslobađajući NO i prostaglandine (136-138). Uzimajući to u obzir, jasno je da su njegovi učinci složeniji i da bi u prisutnosti ANG II moglo doći do drukčijih i manje predvidivih ishoda nego kada se učinci ANG-(1-7) promatraju neovisno o ANG II (npr. nakon prekontrakcije s noradrenalinom, kao u ovome radu). Potvrđeni učinak HBO i u dijabetičnih štakora, u smislu pojačanja učinaka ANG-(1-7), izuzetno je zanimljiv ako se imaju u vidu ranija saznanja da ANG-(1-7) može u dijabetesu popraviti poremećenu vaskularnu funkciju i srčano oštećenje te dovesti i do drugih pozitivnih promjena (150-153, 171). Time se nameće zaključak, na temelju rezultata ovog istraživanja, da bi jedan od glavnih mehanizama pozitivnog djelovanja HBO u dijabetesu i dijabetičkim ulkusima mogao biti facilitacijski učinak na ANG-(1-7). Daljnja istraživanja ovog područja bi zasigurno bila od koristi. U dijabetičnih štakora nije bila izmjerena razlika u djelovanju kombinacije ANG II + ANG-(1-7) nakon HBO tretmana, niti je bila izmjerena razlika u odnosu na ANG II kontrakciju u HBO štakora. Moguće je spekulirati da je u dijabetičnih žila, koje su oštećene i imaju poremećenu reaktivnost, teže pomoću HBO prikazati facilitirajući učinak na ANG-(1-7) kada je uz njega prisutan i mnogo potentniji ANG II.

6.2. Uloga EETs u modulaciji vaskularnih odgovora

Na temelju dosadašnjih podataka iz literature, točna uloga HBO u promjenama vaskularne strukture i funkcije nije jasna, a mogući (vjerojatno mnogostruki mehanizmi) djelovanja HBO su nepoznati. Korak u rasvjetljavanju ove problematike predstavljaju pokusi prezentirani u ovome radu te korištenje visoko selektivnog inhibitora epoksigenaza MS-PPOH. Mnogo studija se bavilo istraživanjem vazodilatatornih EETs i otkrilo njihovu ulogu u modulaciji vaskularne reaktivnosti na razne stimulanse (163-165) te njihovu antihipertenzivnu i kardioprotektivnu ulogu (166), pozitivne učinke u oštećenju pri moždanom udaru (168), a značajno je i da upravo EETs djeluju kardioprotektivno i korisno pri raznim poremećajima s vaskularnom patologijom u dijabetesu, uključujući ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu miokarda, moždani udar, aterosklerozu, dijabetičku nefropatiju (168-171, 177) i druge. Animalni model dijabetesa tipa 1, uzrokovan streptozocinom koji je korišten i u ovom radu, dovodi do smanjenja protektivnih EETs (168).

Kada se aplicirao MS-PPOH, relaksacija aortalnih prstenova HBO štakora, nakon dodavanja ANG-(1-7), bila je značajno niža u usporedbi s aortalnim prstenovima HBO štakora kojima nije apliciran MS-PPOH (slika 5.5.). Naprotiv, vrijednosti su bile slične kontrolnima, dok je relaksacija HBO prstenova, kojima nije dodan MS-PPOH, bila jače izražena u odnosu na kontrolnu. Čini se, stoga, da inhibicija stvaranja EETs poništava učinak HBO na vaskularnu reaktivnost, što ukazuje na to da HBO povećava vaskularnu reaktivnost na ANG-(1-7), barem dijelom utječući na sintezu EETs. Odgovor na ANG II u HBO štakora nakon dodavanja MS-PPOH i dalje je bio nepromijenjen. Međutim, razlika između ANG II kontrakcije i kontrakcije nakon dodavanja ANG II + ANG-(1-7) aortalnih prstenova zdravih HBO štakora, izgubila se korištenjem MS-PPOH, eliminirajući zapaženi facilitirajući učinak HBO na suprotstavljajuće djelovanje ANG-(1-7) na kontrakciju izazvanu ANG II (slika 5.4.). Ovo impresivno poništavanje učinaka HBO pomoću MS-PPOH svakako govori u prilog mehanizmu koji uključuje metabolite arahidonske kiseline i u skladu je s postavljenom hipotezom rada. U dijabetičnih štakora učinci MS-PPOH na relaksaciju izazvanu s ANG-(1-7) bili su jednako impresivni i potvrđuju opažanja u zdravih štakora. I u zdravih i u dijabetičnih životinja, MS-PPOH nije imao učinak na samu kontrakciju na noradrenalin, što je važno jer potvrđuje da nije bilo nespecifičnog učinka MS-PPOH na prekontrakciju, koji bi bio odgovoran za promijenjene ANG-(1-7) odgovore. Budući da u dijabetičnih životinja nije izmjerena razlika između odgovora na ANG II + ANG-(1-7) u HBO

skupini u odnosu na ANG II, nisu provedeni pokusi s MS-PPOH za ovu peptidnu kombinaciju. Uključivanje uloge EETs, na temelju rezultata ovoga rada, u moguće mehanizme putem kojih HBO djeluje povoljno u dijabetesu, jako dobro se slaže s teorijskim okvirom iz literature prema kojemu upravo EETs manjkaju u dijabetesu (168) i prema kojima EETs igraju protektivnu ulogu u vaskularnoj patologiji dijabetičara (150, 168-171). Pozitivna regulacija (pojačanje) sinteze ovih kiselina putem HBO ili pak pojačanje vaskularne osjetljivosti na njih moglo bi objasniti i koristan klinički učinak HBO u dijabetesu. Navedena opažanja također se izvrsno uklapaju i u prijašnja saznanja da određeni CYP enzimi mogu igrati ulogu senzora za kisik (primjerice enzimi iz skupine CYP 4A ili enzim CYP3A13) (156, 157, 162) te s prijašnjim mjerenjima, prema kojima smanjenjem tkivnog pO_2 dolazi do smanjenja sinteze EETs (156).

Raniji preliminarni rezultati istraživanja Manojlovića i sur. (186, 187) na torakalnim aortalnim prstenovima dijabetičnih i zdravih ženki štakora pokazali su da se relaksacija aortalnih prstenova na acetilkolin, koja je oštećena u dijabetesu, oporavlja utjecajem HBO. Inhibicija CYP enzima klotrimazolom (pretežito inhibicija epoksigenaza) značajno je reducirala relaksacijske odgovore na acetilkolin i u zdravih i u dijabetičnih ženki tretiranih s HBO, u usporedbi s njihovim kontrolama (186). Redukcija je ukazala na djelomičnu ulogu EETs u djelovanju HBO, što se dobro slaže s rezultatima iz ovog istraživanja.

Uzimajući u obzir da su K^+ kanali regulirani ATP-om dio veze između staničnog metabolizma i membranske ekscitabilnosti (181), a i važni su u vazodilatacijskom odgovoru na hipoksiju i ishemiju (reagirajući na više različitih vazodilatatora i vazokonstriktora) (91, 181, 188), postavlja se pitanje imaju li ovi kanali ulogu u zapaženom djelovanju HBO na relaksaciju izazvanu pomoću ANG-(1-7). Preliminarni objavljeni podatci Grosa i sur. ukazali su na ulogu K_{ATP} kanala u posredovanju vazodilatacije u odgovoru na hipoksiju u izoliranoj arteriji cerebri media (189). Blokiranje K_{ATP} kanala može dovesti do vazokonstrikcije ili oštećene vazodilatacije ili do poremećene autoregulacije u nekim vaskularnim mrežama (181). Rezultati prezentirani u ovom radu pokazali su da glibenklamid ne mijenja promjene aortalne reaktivnosti na ANG-(1-7) koju je uzrokovala HBO. Odgovori na ANG-(1-7), nakon dodatka glibenklamida, slični su odgovorima HBO skupine, a značajno su viši nego u HBO/MS-PPOH skupini (slika 5.7.). Budući da glibenklamid inhibira K_{ATP} kanale, a dodatak glibenklamida nije poništio facilitirajući učinak HBO na relaksacijske odgovore aortalnih prstenova izazvanih s ANG-(1-7), može se

zaključiti da K_{ATP} kanali nisu involvirani u posredovanje djelovanja HBO na vaskularnu reaktivnost na ovaj dilatirajući peptid te je djelovanje HBO posredovano drugim signalnim putovima. Ovo je zanimljiv nalaz, jer EETs mogu potentno aktivirati K_{ATP} kanale u vaskulaturi (190), ali mogu djelovati i putem K^+ kanala reguliranih kalcijem (Ca^{2+}) (191). Podatci iz ovog rada ukazuju na uključenost EETs kao posrednika djelovanja HBO na učinke ANG-(1-7), ali ne putem K_{ATP} kanala, nego moguće putem Ca^{2+} - aktiviranih K^+ kanala.

6.3. Krvni tlak, oksidativni stres i serumska razina ANG-(1-7)

Još jedno važno pitanje koje se postavlja u vezi HBO je djelovanje HBO na arterijski krvni tlak i na oksidativni stres. Povećanje i jednog i drugog moglo bi značajno utjecati na vaskularnu reaktivnost, kao što je dokumentirano u brojnim prijašnjim radovima (33-35, 84-86). Ranije je navedeno kako su prijašnji objavljeni podaci o utjecaju HBO na arterijski tlak izrazito kontradiktorni te su vjerojatno povezani s razlikama u protokolima, ispitanicima i prisutnim patološkim stanjima (27-32). Stoga je od ključne važnosti za razumijevanje učinaka HBO za određeni protokol i eksperimentalne uvjete istražiti njegovo djelovanje na arterijski tlak i oksidativni stres. Nadalje, provode se brojna istraživanja mehanizama djelovanja ANG-(1-7) i funkcije njegovog Mas receptora te su se počele otkrivati poveznice prema drugim faktorima kao što su oksidativni stres (192), upala i ishemijsko-reperfuzijska ozljeda (193, 194), što sve mogu biti poveznice i s utjecajem HBO. Potrebna su dodatna istraživanja ovog područja. Primjerice, zanimljivo je da je nedavno nađeno kako ANG-(1-7) reducira razine vaskularnih superoksida i popravljja dilataciju ovisnu o NO koja je izgubljena u arteriji cerebri media nakon što su štakori hranjeni dijetom s visokim udjelom soli (195). Ovaj pozitivni učinak blokiran je antagonistom Mas receptora (195). Ta poveznica između endotelne disfunkcije, vaskularne reaktivnosti i opterećenja sa soli mogla bi biti važna u patogenezi hipertenzije.

Rezultati u ovome radu pokazali su da korišteni HBO protokol, pri kojemu se pokusi izvode dan nakon posljednjeg izlaganja oksigenaciji, ne mijenja značajno srednji arterijski tlak niti pokazatelje oksidativnog stresa (FRAP i TBARS) ni u zdravih ni u dijabetičnih štakora. Razine mjerenih tlakova u rangu su ranije objavljenih razina za zdrave Sprague-Dawley štakore. Ovo se također dobro slaže s drugim objavljenim podacima našeg laboratorija gdje se istraživao

učinak jednog akutnog HBO izlaganja pri tlaku od 2 bara u trajanju od 2 sata, s dodatnih 15 minuta za kompresiju i 15 minuta za dekompresiju (196). Navedeni rezultati pokazali su da se inicijalne promjene arterijskog tlaka, acido-baznog statusa, statusa arterijskih plinova i pokazatelja oksidativnog stresa najvećim dijelom izgube nakon 24 sata od izlaganja (196). Budući da su u ovom radu istraženi učinci HBO jedan dan nakon posljednjeg izlaganja, dobiveni rezultati, koji potvrđuju da nema značajne promjene arterijskog tlaka i oksidativnog stresa, jako se dobro slažu s podacima o vrijednostima 24 sata nakon jednog akutnog HBO izlaganja.

Na temelju rezultata iz ovog rada može se stoga zaključiti da promjene u metabolizmu arahidonske kiseline, sinteze EETs i promjene vaskularne reaktivnosti nisu jednostavno objašnjive promjenama srednjeg arterijskog tlaka ili oksidativnog stresa. Postoje očigledno drugi mehanizmi djelovanja HBO koji dovode do promjena vaskularne reaktivnosti, vaskularne osjetljivosti na EETs i/ili pojačanje EETs sinteze. To je također u skladu s postuliranom ulogom CYP enzima kao senzora za kisik.

Široko je poznato da ligandi (agonisti) mogu vezanjem uzrokovati internalizaciju i desenzitizaciju svojih receptora, ovisno o promjeni količine prisutnog liganda, što pak može utjecati na učinkovitost liganda (jačinu signalnog učinka) (197, 198). Budući da je nađeno kako je reaktivnost aortalnih prstena na ANG-(1-7) značajno promijenjena, bilo je od interesa istražiti nije li možda promjena serumske koncentracije ANG-(1-7) utjecajem HBO mogla dovesti do drukčijeg vaskularnog odgovora na ANG-(1-7). Prijašnji radovi su pokazali da bi hiperbarični uvjeti mogli dovesti do promjena koncentracije nekih komponenti sustava renin-angiotenzin, npr. koncentracije renina (143-145), međutim utjecaj HBO na koncentraciju ANG-(1-7) do sada nije bio istraživani. Rezultati ELISA metode, kako u zdravih tako i u dijabetičnih štakora, pokazali su da HBO ne mijenja značajno serumsku razinu ANG-(1-7), što ukazuje da modulacija vaskularnih odgovora na ANG-(1-7) u zdravih i dijabetičnih životinja putem HBO nije objašnjiva eventualnom promjenom koncentracije ANG-(1-7). To dodatno govori u prilog istraženoj ulozi CYP enzima i EETs za koje je zapaženo da igraju važnu ulogu u ovoj modulaciji.

6.4. Ekspresija CYP enzima

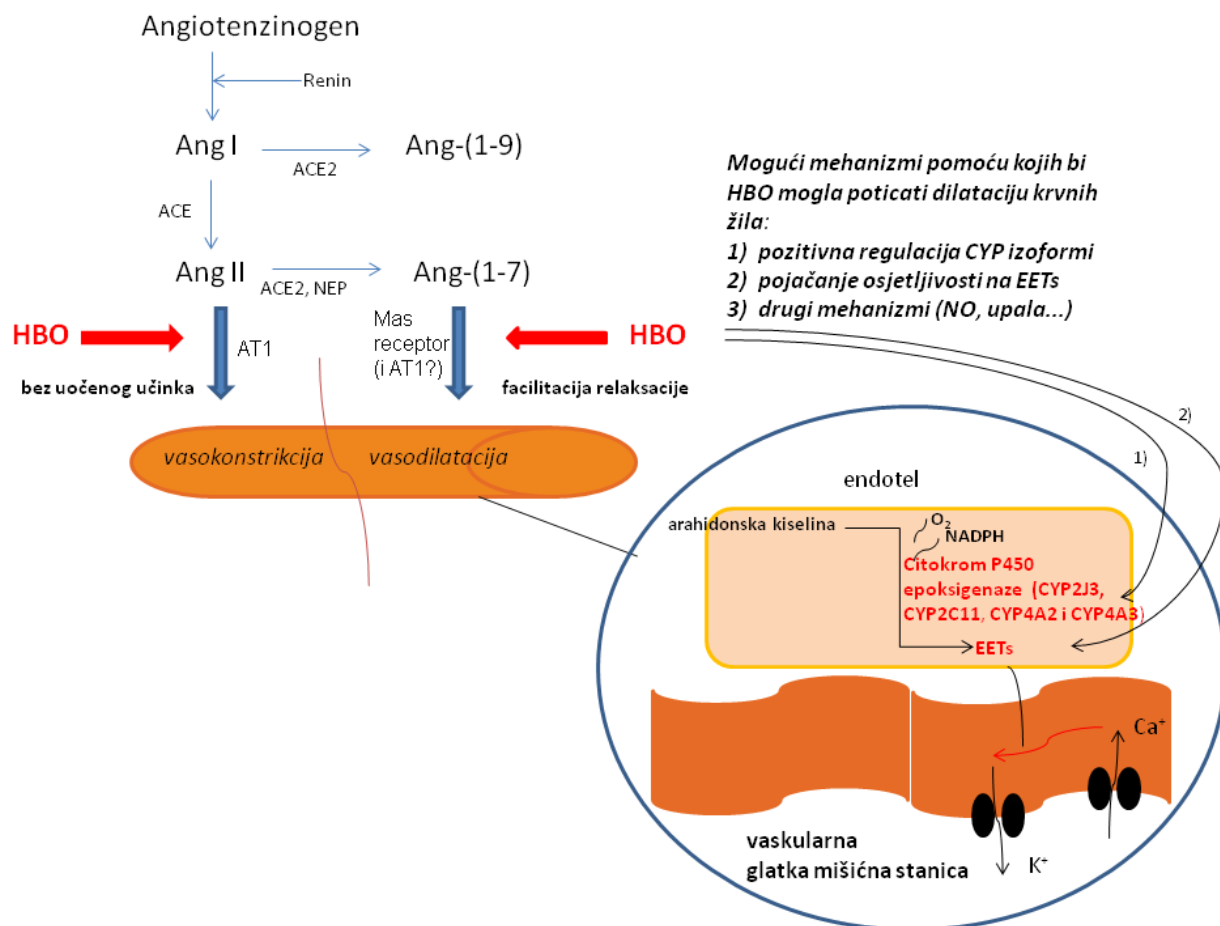
Prethodno raspravljena uloga CYP enzima kao senzora za kisik, sniženje sinteze EETs paralelno sa spuštanjem pO_2 (156, 157, 162) te važna protektivna uloga EETs u vaskularnoj funkciji, dijabetesu i drugim stanjima u kojima je HBO povoljna, stavlja CYP enzime u središte problematike istraživanja HBO i njezinog utjecaja na vaskularnu funkciju. U ovom istraživanju analiziran je utjecaj HBO na specifične CYP enzime na dvije razine - na razini mRNA ekspresije (analiziranoj pomoću kvantitativne PCR) i na razini proteinske ekspresije (analiziranoj pomoću Western blot metode). Kao što je navedeno, neki od najvažnijih CYP enzima koji kataliziraju epoksidaciju i proizvode EETs, su CYP2J3, CYP2C11, CYP4A2 i CYP4A3, dok CYP4A1 peretežno vrši ω -hidroksilaciju, ali je ovdje također analiziran jer je blisko udružen s CYP 4A2 i CYP4A3, te ovim izoformama vrlo sličan (pa primjerice i protutijelo u Western blot metodi praktički ne može razlikovati ove tri izoforme iz 4A skupine). Istražene su ekspresije CYP enzima u zdravih i dijabetičnih štakora. Rezultati su pokazali da u zdravih štakora na razini mRNA ekspresije postoji tendencija nešto veće ekspresije u HBO skupini za CYP2J3, CYP4A2 i CYP4A3, međutim ova razlika nije bila statistički značajna. Moguće je da je razlika u ekspresiji u zdravih štakora vrlo mala pa ju je teško dokazati. S druge strane, može se spekulirati da, u slučaju nepostojanja značajnog povećanja ekspresije ovih enzima HBO (uzimajući u obzir funkcionalne rezultate s MS-PPOH), povećava vaskularnu osjetljivost na same EETs. Naime, ako MS-PPOH poništava učinke HBO (na pojačanje relaksacije uzrokovane s ANG-(1-7)), inhibirajući sintezu EETs, a sinteza EETs nije značajno povećana pomoću HBO, to ukazuje na to da HBO povećava osjetljivost krvožilnih prstenova na EETs. Ovo bi također objasnilo neke od pozitivnih učinaka HBO, s obzirom da EETs imaju važnu protektivnu ulogu u očuvanju vaskularne funkcije i u poremećajima koji uključuju vaskularnu patologiju i dijabetes (163-166, 168-171, 176, 177). Naravno, na temelju rezultata nema definitivnog dokaza da ne postoji pozitivna regulacija ovih izoformi putem HBO te su oba mehanizma moguća - pozitivna regulacija CYP enzima i pojačanje vaskularne osjetljivosti na EETs. Konačna presuda mogla bi u budućnosti biti donesena istraživanjima drugih vaskularnih mreža - otporničkih, manjih arterija (kao što su arterija gracilis ili mezenterične arterije) i u mikrocirkulaciji, gdje bi učinci HBO mogli biti puno jače izraženi nego u aorti. Također je vrlo zanimljivo da su rezultati u zdravih štakora pokazali značajno povećanje mRNA ekspresije CYP4A1 izoforme u HBO skupini. Ovaj enzim koji proizvodi 20-HETE pripada skupini čiji su članovi već ranije okarakterizirani kao potencijalni senzori za kisik

u mikrocirkulaciji, kao što je ranije raspravljeno (156, 157). Budući da su ranije studije pokazale smanjenje i EETs i HETE pri smanjenju pO_2 , trenutni rezultati se dobro uklapaju u taj model jer je HBO barem povećao ekspresiju CYP4A1 u zdravih štakora, premda EET sinteza ostaje donekle upitna. Štoviše, smanjenje sinteze EETs u prijašnjim radovima bilo je očito tek nakon većih smanjenja pO_2 , dok su promjene 20-HETE bile lakše mjerljive i statistički značajne već pri manjim promjenama pO_2 (156). Trenutno rezentirani rezultati očito naglašavaju izrazitu složenost uloga CYP enzima u homeostazi kisika.

U dijabetičnih štakora, analiza mRNA ekspresije pokazala je statistički značajno povećanje ekspresije za CYP2J3 izoformu, koja je jedna od glavnih epoksigenaza. Time je evidentna, barem u dijabetičnih štakora, moguća pozitivna regulacija epoksigenaza koja može objasniti modulaciju vaskularne reaktivnosti putem HBO, ali i brojne druge korisne učinke HBO u dijabetesu. Nejasno je je li ova pozitivna regulacija svojstvena samo dijabetičkim štakorima, u kojih je dokazana, ili u manjoj mjeri ipak postoji i u zdravih jedinki.

Western blot metodom dodatno je analizirana aortalna proteinska ekspresija CYP2J3 i CYP2C11 izoformi u zdravih i dijabetičnih štakora. U zdravih ponovno nije detektirana statistički značajna razlika, ali u dijabetičnih štakora postoji pozitivna regulacija CYP2C11 enzima (još jedne važne epoksigenaze u štakora) čija je proteinska ekspresija povećana u HBO skupini. Ovo dodatno govori u prilog ključnoj ulozi CYP enzima u mehanizmima HBO učinaka u vaskulaturi. Ranija istraživanja u našem laboratoriju bavila su se proteinskom ekspresijom CYP4A1/4A2/4A3 izoformi Western blot metodom (jer poliklonsko protutijelo ne može razlikovati pojedine izoforme u ovoj skupini) (199). Izuzetno je zanimljivo da je i u zdravih i u dijabetičnih životinja detektirana povećana združena proteinska ekspresija CYP4A1/4A2/4A3 u HBO skupinama (199). Ti podatci se dobro slažu s mRNA ekspresijom prezentiranom u ovom radu, ali i s tendencijom pozitivne regulacije mRNA ekspresije za koju u ovom radu nije bila dokazana statistička značajnost. Također, navedeni podatci pozitivne regulacije CYP4A1/4A2/4A3 u aorti i zdravih i dijabetičnih štakora snažan su dodatan dokaz o važnoj ulozi CYP enzima i EETs u vaskularnim učincima HBO. Slika 6.1. shematski sažeto prikazuje neke od najvažnijih istraženih učinaka HBO na vaskularnu reaktivnost u ovom radu. Zbog prezentiranih novih saznanja, zajedno s činjenicom da postoji interakcija između signalnih putova arahidonske kiseline i NO u senzitivnosti na kisik (157), regionalne razlike u ulogama metabolita arahidonske

kiseline i brojnim kontradiktornim dokazima (157), postaje jasno da je uloga CYP enzima u homeostazi kisika izrazito složena i da ta uloga može predstavljati značajan faktor u posredovanju učinaka HBO.



Slika 6.1. Novoistraženi utjecaj HBO na vaskularne odgovore na ANG II i ANG-(1-7) i mogući mehanizmi djelovanja

Prezentirani rad po prvi puta istražuje utjecaj HBO na vaskularnu reaktivnost na ANG II i ANG-(1-7) u zdravih i dijabetičnih štakora te ispituje ulogu specifičnih CYP enzima i metabolita arahidonske kiseline (prvenstveno EETs) u djelovanju HBO. Navedeno istraživanje doprinosi boljem poznavanju učinaka HBO na vaskularnu funkciju i barem djelomično rasvjetljava mehanizme tih učinaka. Dobivena saznanja mogu biti od velike važnosti za razumijevanje uloge kisika u vaskularnoj funkciji u zdravlju i bolesti, ali su također preduvjet za kvalitetniju uporabu hiperbarične oksigenacije u kliničkim uvjetima u budućnosti.

7. ZAKLJUČCI

- Konstriktorni vaskularni odgovori izoliranih aortalnih prstenova zdravih štakora i štakora s animalnim modelom dijabetesa tipa 1 na ANG II ne mijenjaju se značajno utjecajem HBO
- Relaksacijski vaskularni odgovori izoliranih aortalnih prstenova zdravih štakora na ANG-(1-7) značajno su pojačani utjecajem HBO, a jednak učinak HBO također je prisutan i u štakora s animalnim modelom dijabetesa tipa 1
- Vaskularna reaktivnost na kombinaciju ANG II + ANG-(1-7) nešto je niža utjecajem HBO, ali razlika nije statistički značajna. Međutim, unutar HBO skupine kontrakcija na ANGII + ANG-(1-7) statistički je značajno niža nego na ANG II u zdravih štakora, dok unutar kontrolne skupine nema takve razlike - ovo sugerira utjecaj HBO na vaskularnu reaktivnost. Kontrakcija na ANG II + ANG-(1-7) slična je u dijabetičnih štakora između kontrolne i HBO skupine i slična je samoj ANG II kontrakciji
- Inhibicija epoksidacije visoko selektivnim inhibitorom poništava facilitacijski učinak HBO na relaksaciju uzrokovanu s ANG-(1-7), što ukazuje na to da EETs imaju važnu ulogu u modulaciji vaskularnih odgovora na ANG-(1-7) hiperbaričnom oksigenacijom. Jednaka pojava mjerena je i u dijabetičnih štakora, što ukazuje na to da i u dijabetičnih HBO životinja EETs imaju važnu ulogu u modulaciji vaskularne reaktivnosti
- K_{ATP} kanali nemaju važnu ulogu u ovim mehanizmima (vjerojatno K_{Ca} kanali imaju)
- Vrijednosti arterijskog tlaka slične su nakon HBO tretmana u odnosu na kontrolnu skupinu, kako u zdravih tako i u dijabetičnih životinja, što znači da se zapaženi učinci HBO ne mogu objasniti promjenom arterijskog tlaka u zdravih i dijabetičnih životinja
- Vrijednosti pokazatelja oksidativnog stresa slične su nakon HBO tretmana u odnosu na kontrolnu skupinu, kako u zdravih tako i u dijabetičnih životinja, što znači da se zapaženi

učinci HBO ne mogu objasniti pojačanjem oksidativnog stresa u zdravih i dijabetičnih životinja

- Povećanje ekspresije nekih od relevantnih CYP izoformi (statistički značajno za mRNA CYP4A1 u zdravih i CYP2J3 u dijabetičnih te proteinska ekspresija CYP2C11 u dijabetičnih štakora), zajedno s rezultatima dobivenima pomoću visoko selektivnog inhibitora epoksidacije na aortalnim prstenovima, govori u prilog mogućoj pozitivnoj regulaciji CYP enzima kao mehanizmu djelovanja HBO. Međutim, budući da kod nekih relevantnih CYP izoformi nije dokazano povećanje ekspresije, mogući mehanizam modulacije vaskularne reaktivnosti putem HBO uključuje i povećanje vaskularne osjetljivosti na EETs

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Istražiti modulira li hiperbarična oksigenacija (HBO) vaskularnu reaktivnost na angiotenzin II (ANG II) i angiotenzin-(1-7) (ANG-(1-7)) u zdravih i dijabetičnih štakora te ispitati ulogu epoksieikozatrienoičnih kiselina (EETs) i CYP enzima u modulaciji vaskularne reaktivnosti putem HBO. Također, cilj je bio provjeriti imaju li eventualne promjene arterijskog tlaka ili oksidativnog stresa ulogu u modulaciji vaskularnih odgovora.

Metode: Istraživanje je provedeno ispitivanjem vaskularnih odgovora izoliranih torakalnih aortalnih prstenova (funkcionalne studije) na ANG II i ANG-(1-7) u zdravih ili dijabetičnih štakora (tretiranih protokolom s intermitentnom HBO u odnosu na netretirane) te uporabom visoko selektivnog inhibitora sinteze EETs (MS-PPOH), radi funkcionalnog ispitivanja uloge EETs. Nadalje, provedene su *in vivo* studije utjecaja HBO na arterijski tlak

te molekularne studije utjecaja HBO na pokazatelje oksidativnog stresa, serumske koncentracije ANG-(1-7) (ELISA), mRNA ekspresije CYP enzima (kvantitativna PCR) i proteinske ekspresije CYP enzima (Western blot) u zdravih i dijabetičnih štakora. Pomoću streptozocina izazvan je animalni model dijabetesa tipa 1. u Sprague-Dawley štakora.

Rezultati: HBO nije značajno mijenjala aortalnu reaktivnost na sam ANG II u zdravih i dijabetičnih štakora, ali je vaskularni odgovor na kombinaciju ANG II+ANG-(1-7) bio značajno niži u odnosu na ANG II kontrakciju u zdravih HBO štakora, dok takve razlike nije bilo u netretiranih štakora. HBO je značajno pojačavao aortalni odgovor na sam ANG-(1-7) (nakon prekontrakcije noradrenalinom) u zdravih i dijabetičnih životinja. MS-PPOH poništio je sve učinke HBO na facilitaciju vaskularnih odgovora na ANG-(1-7). Nije bilo značajnih promjena arterijskog tlaka, oksidativnog stresa ili serumske razine ANG-(1-7). HBO je imala tendenciju povećavati ekspresiju CYP enzima, a značajno povećanje mRNA ekspresije izmjereno je za CYP4A1 u zdravih i CYP2J3 u dijabetičnih. Proteinska ekspresija bila značajno povećana za CYP2C11 u dijabetičnih štakora.

Zaključak: HBO značajno pojačava vaskularni odgovor na ANG-(1-7), što može objasniti njezine pozitivne učinke u patološkim stanjima. EETs imaju važnu ulogu u posredovanju ove modulacije. HBO povećava ekspresiju pojedinih CYP izoformi, a moguće je da povećava i osjetljivost žile na EETs. Promjene vaskularne reaktivnosti nisu posljedica promjena arterijskog

tlaka, oksidativnog stresa ili razine ANG-(1-7). HBO ne mijenja značajno reaktivnost na ANG II u zdravih niti u dijabetičnih štakora.

9. SUMMARY

MODULATION OF VASCULAR RESPONSES TO ANGIOTENSIN II AND ANGIOTENSIN-(1-7) WITH HYPERBARIC OXYGENATION - ROLE OF CYP ENZYMES

Objectives: To investigate whether hyperbaric oxygenation (HBO) modulates vascular reactivity to angiotensin II (ANG II) and angiotensin-(1-7) (ANG-(1-7)) in healthy and diabetic rats and to assess the role of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and CYP enzymes in the modulation of vascular reactivity by HBO. Additionally, the goal was to examine if possible changes in arterial blood pressure and oxidative stress play a role in such modulation of vascular responses.

Methods: The study was conducted using isolated thoracic aortic ring preparations to test vascular reactivity (functional studies) to ANG II and ANG-(1-7) in healthy and diabetic rats (treated with an intermittent HBO protocol compared to nontreated), and using a highly selective inhibitor of EETs synthesis (MS-PPOH) to assess the functional role of EETs. Furthermore, *in vivo* studies of HBO effects on arterial blood pressure were conducted, as well as molecular studies of the effects of HBO on oxidative stress indicators, serum concentration of ANG-(1-7), mRNA expression of CYP enzymes (quantitative PCR) and protein expression of CYP enzymes (Western blot) in healthy and diabetic rats. With the use of streptozocin, an animal model of type 1 diabetes was caused in Sprague-Dawley rats.

Results: HBO did not significantly change aortic reactivity to ANG II alone in healthy and diabetic rats, but vascular responses to the combination of ANG II + ANG-(1-7) was significantly lower compared to ANG II contractions in healthy HBO rats, whereas such a difference was not present in untreated rats. HBO significantly increased aortic responses to ANG-(1-7) alone (after precontraction with noradrenaline) in healthy and diabetic animals. MS-PPOH reversed all effects of HBO on facilitation of vascular responses to ANG-(1-7). There were no significant changes in arterial pressure, oxidative stress and serum ANG-(1-7) levels. HBO had a tendency to increase CYP enzyme expression, and a statistically significant increase of mRNA expression was measured for CYP4A1 in healthy and CYP2J3 in diabetic rats, while protein expression was significantly increased by HBO for CYP2C11 in diabetic rats.

Conclusion: HBO significantly increases vascular responses to ANG-(1-7) , what could explain some of the observed positive effects of HBO in pathologic conditions. EETs seem to play an important role in the mechanism of this modulation. HBO increases the expression of specific CYP isoforms, but it is also possible that it increaees the vascular sensitivity to EETs. The changes in vascular reactivity were not a consequence of a possible change in arterial pressure, oxidative stress or ANG-(1-7) blood levels. HBO does not significantly alter reactivity to ANG II in either healthy or diabetic rats.

10. LITERATURA

1. Londahl M. Hyperbaric oxygen therapy as treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab Res Rev.* 2012; 28 Suppl 1:78-84.
2. Chng J, Low CT, Kang WL. The development of hyperbaric and diving medicine in Singapore. *Singapore Med J.* 2011; 52:901-5.
3. Oter S, Korkmaz A, Topal T, Ozcan O, Sadir S, Ozler M, et al. Correlation between hyperbaric oxygen exposure pressures and oxidative parameters in rat lung, brain, and erythrocytes. *Clin Biochem.* 2005; 38:706-11.
4. Hampson NB, Dunford RG, Ross DE, Wreford-Brown CE. A prospective, randomized clinical trial comparing two hyperbaric treatment protocols for carbon monoxide poisoning. *Undersea Hyperb Med.* 2006; 33:27-32.
5. Byrne BT, Lu JJ, Valento M, Bryant SM. Variability in hyperbaric oxygen treatment for acute carbon monoxide poisoning. *Undersea Hyperb Med.* 2012; 39:627-38.
6. Gill AL, Bell CN. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM.* 2004; 97:385-95.
7. Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in wound healing--more than a nutrient. *World J Surg.* 2004; 28:294-300.
8. Jacoby I. Emergency medicine: indications for hyperbaric oxygen therapy. *West J Med.* 1987; 146:608.
9. Kudchodkar BJ, Wilson J, Lacko A, Dory L. Hyperbaric oxygen reduces the progression and accelerates the regression of atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:1637-43.
10. Camporesi EM. Hyperbaric oxygen therapy: committee report of the Undersea and Hyperbaric Medical Society. 1996.
11. Bakker DJ. Hyperbaric oxygen therapy and the diabetic foot. *Diabetes Metab Res Rev.* 2000; 16 Suppl 1:S55-8.
12. Yin W, Badr AE, Mychaskiw G, Zhang JH. Down regulation of COX-2 is involved in hyperbaric oxygen treatment in a rat transient focal cerebral ischemia model. *Brain Res.* 2002; 926:165-71.
13. McCormick JG, Houle TT, Saltzman HA, Whaley RC, Roy RC. Treatment of acute stroke with hyperbaric oxygen: time window for efficacy. *Undersea Hyperb Med.* 2011; 38:321-34.
14. Hankey G, Bennett M, Wasiak J, French C, Kranke P, Schnabel A. Hyperbaric Oxygen Therapy of Acute Ischemic Stroke. *Stroke.* 2006; 37:1953-4.
15. Rusyniak DE, Kirk MA, May JD, Kao LW, Brizendine EJ, Welch JL, et al. Hyperbaric oxygen therapy in acute ischemic stroke: results of the Hyperbaric Oxygen in Acute Ischemic Stroke Trial Pilot Study. *Stroke.* 2003; 34:571-4.
16. Jain KK. Hyperbaric oxygen in acute ischemic stroke. *Stroke.* 2003; 34:e153; author reply e-5.
17. Henninger N, Kuppers-Tiedt L, Sicard KM, Gunther A, Schneider D, Schwab S. Neuroprotective effect of hyperbaric oxygen therapy monitored by MR-imaging after embolic stroke in rats. *Exp Neurol.* 2006; 201:316-23.
18. Ostrowski RP, Zhang JH. Hyperbaric Oxygen for Cerebral Vasospasm and Brain Injury Following Subarachnoid Hemorrhage. *Transl Stroke Res.* 2011; 2:316-27.

19. Kim CH, Choi H, Chun YS, Kim GT, Park JW, Kim MS. Hyperbaric oxygenation pretreatment induces catalase and reduces infarct size in ischemic rat myocardium. *Pflugers Arch.* 2001; 442:519-25.
20. Cabigas BP, Su J, Hutchins W, Shi Y, Schaefer RB, Recinos RF, et al. Hyperoxic and hyperbaric-induced cardioprotection: role of nitric oxide synthase 3. *Cardiovasc Res.* 2006; 72:143-51.
21. Yogaratnam JZ, Laden G, Madden LA, Seymour AM, Guvendik L, Cowen M, et al. Hyperbaric oxygen: a new drug in myocardial revascularization and protection? *Cardiovasc Revasc Med.* 2006; 7:146-54.
22. Han C, Lin L, Zhang W, Zhang L, Lv S, Sun Q, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning alleviates myocardial ischemic injury in rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008; 233:1448-53.
23. Yogaratnam JZ, Laden G, Guvendik L, Cowen M, Cale A, Griffin S. Hyperbaric oxygen preconditioning improves myocardial function, reduces length of intensive care stay, and limits complications post coronary artery bypass graft surgery. *Cardiovasc Revasc Med.* 2010; 11:8-19.
24. Kudchodkar BJ, Pierce A, Dory L. Chronic hyperbaric oxygen treatment elicits an anti-oxidant response and attenuates atherosclerosis in apoE knockout mice. *Atherosclerosis.* 2007; 193:28-35.
25. Karadurmus N, Sahin M, Tasci C, Naharci I, Ozturk C, Ilbasimis S, et al. Potential benefits of hyperbaric oxygen therapy on atherosclerosis and glycaemic control in patients with diabetic foot. *Endokrynol Pol.* 2010; 61:275-9.
26. Grolman RE, Wilkerson DK, Taylor J, Allinson P, Zatina MA. Transcutaneous oxygen measurements predict a beneficial response to hyperbaric oxygen therapy in patients with nonhealing wounds and critical limb ischemia. *Am Surg.* 2001; 67:1072-9.
27. Al-Waili NS, Butler GJ, Beale J, Abdullah MS, Finkelstein M, Merrow M, et al. Influences of hyperbaric oxygen on blood pressure, heart rate and blood glucose levels in patients with diabetes mellitus and hypertension. *Arch Med Res.* 2006; 37:991-7.
28. Bergo GW, Tyssebotn I. Cerebral blood flow distribution during exposure to 5 bar oxygen in awake rats. *Undersea Biomed Res.* 1992; 19:339-54.
29. Demchenko IT, Luchakov YI, Moskvina AN, Gutsaeva DR, Allen BW, Thalmann ED, et al. Cerebral blood flow and brain oxygenation in rats breathing oxygen under pressure. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005; 25:1288-300.
30. Nagatomo F, Fujino H, Takeda I, Ishihara A. Effects of hyperbaric oxygenation on blood pressure levels of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens.* 2010; 32:193-7.
31. Bergo GW, Risberg J, Tyssebotn I. Effect of 5 bar oxygen on cardiac output and organ blood flow in conscious rats. *Undersea Biomed Res.* 1988; 15:457-70.
32. Nakada T, Koike H, Katayama T, Watanabe H, Yamori Y. Increased adrenal epinephrine and norepinephrine in spontaneously hypertensive rats treated with hyperbaric oxygen. *Hinyokika Kiyo.* 1984; 30:1357-66.
33. Boegehold MA. Microvascular structure and function in salt-sensitive hypertension. *Microcirculation.* 2002; 9:225-41.
34. Falcone JC, Granger HJ, Meininger GA. Enhanced myogenic activation in skeletal muscle arterioles from spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1993; 265:H1847-55.
35. Mayhan WG, Faraci FM, Heistad DD. Impairment of endothelium-dependent responses of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Am J Physiol.* 1987; 253:H1435-40.
36. Guyton AC, Hall, JE. *Medicinska fiziologija. Jedanaesto izdanje: Medicinska naklada, Zagreb; 2006.*

37. Thackham JA, McElwain DL, Long RJ. The use of hyperbaric oxygen therapy to treat chronic wounds: A review. *Wound Repair Regen.* 2008; 16:321-30.
38. Unfirer S, Kibel A, Drenjancevic-Peric I. The effect of hyperbaric oxygen therapy on blood vessel function in diabetes mellitus. *Med Hypotheses.* 2008; 71:776-80.
39. Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J Appl Physiol.* 2009; 106:988-95.
40. Milovanova TN, Bhopale VM, Sorokina EM, Moore JS, Hunt TK, Hauer-Jensen M, et al. Hyperbaric oxygen stimulates vasculogenic stem cell growth and differentiation in vivo. *J Appl Physiol.* 2009; 106:711-28.
41. van Hulst RA, Haitsma JJ, Klein J, Lachmann B. Oxygen tension under hyperbaric conditions in healthy pig brain. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2003; 23:143-8.
42. Korhonen K. Hyperbaric oxygen therapy in acute necrotizing infections. With a special reference to the effects on tissue gas tensions. *Ann Chir Gynaecol.* 2000; 89 Suppl 214:7-36.
43. Kessler L, Bilbault P, Ortega F, Grasso C, Passemard R, Stephan D, et al. Hyperbaric oxygenation accelerates the healing rate of nonischemic chronic diabetic foot ulcers: a prospective randomized study. *Diabetes Care.* 2003; 26:2378-82.
44. Rollins MD, Gibson JJ, Hunt TK, Hopf HW. Wound oxygen levels during hyperbaric oxygen treatment in healing wounds. *Undersea Hyperb Med.* 2006; 33:17-25.
45. Taylor CD. Solubility of oxygen in a seawater medium in equilibrium with a high-pressure oxy-helium atmosphere. *Undersea Biomed Res.* 1979; 6:147-54.
46. Prausnitz JM, Lichtenthaler RN, de Azevedo EG. *Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria*; Pearson Education; 1998.
47. Marino PL, Sutin KM. *The ICU Book*; Wolters Kluwer Health; 2012.
48. Meirovithz E, Sonn J, Mayevsky A. Effect of hyperbaric oxygenation on brain hemodynamics, hemoglobin oxygenation and mitochondrial NADH. *Brain Res Rev.* 2007; 54:294-304.
49. Korhonen K, Kuttala K, Niinikoski J. Subcutaneous tissue oxygen and carbon dioxide tensions during hyperbaric oxygenation: an experimental study in rats. *Eur J Surg.* 1999; 165:885-90.
50. Dean JB. Hypercapnia causes cellular oxidation and nitrosation in addition to acidosis: implications for CO₂ chemoreceptor function and dysfunction. *J Appl Physiol.* 2010; 108:1786-95.
51. 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 Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291:H1988-98.
52. Imperatore F, Cuzzocrea S, Luongo C, Liguori G, Scafuro A, De Angelis A, et al. Hyperbaric oxygen therapy prevents vascular derangement during zymosan-induced multiple-organ-failure syndrome. *Intensive Care Med.* 2004; 30:1175-81.
53. Nagao S, Okumura S, Nishimoto A. Effects of hyperbaric oxygenation on cerebral vasomotor tone in acute intracranial hypertension: an experimental study. *Resuscitation.* 1975; 4:51-9.
54. Yen CY, Tu YK, Ma CH, Yeh JH, Kao FC, Yu SW, et al. Measurement of tibial endothelial cell function after cigarette smoking, cessation of smoking and hyperbaric oxygen therapy. *Injury.* 2008; 39 Suppl 4:40-6.
55. Asano T, Kaneko E, Shinozaki S, Imai Y, Shibayama M, Chiba T, et al. Hyperbaric oxygen induces basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor expression, and

enhances blood perfusion and muscle regeneration in mouse ischemic hind limbs. *Circ J.* 2007; 71:405-11.

56. Al-Waili NS, Butler GJ. Effects of hyperbaric oxygen on inflammatory response to wound and trauma: possible mechanism of action. *ScientificWorldJournal.* 2006; 6:425-41.

57. Buras J. Basic mechanisms of hyperbaric oxygen in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Int Anesthesiol Clin.* 2000; 38:91-109.

58. Buras JA, Stahl GL, Svoboda KK, Reenstra WR. Hyperbaric oxygen downregulates ICAM-1 expression induced by hypoxia and hypoglycemia: the role of NOS. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 278:C292-302.

59. Thom SR. Hyperbaric oxygen: its mechanisms and efficacy. *Plast Reconstr Surg.* 2011; 127 Suppl 1:131S-41S.

60. Poli S, Veltkamp R. Oxygen therapy in acute ischemic stroke - experimental efficacy and molecular mechanisms. *Curr Mol Med.* 2009; 9:227-41.

61. Wang L, Li W, Kang Z, Liu Y, Deng X, Tao H, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates early apoptosis after spinal cord ischemia in rats. *J Neurotrauma.* 2009; 26:55-66.

62. Weber SU, Koch A, Kankeleit J, Schewe JC, Siekmann U, Stuber F, et al. Hyperbaric oxygen induces apoptosis via a mitochondrial mechanism. *Apoptosis.* 2009; 14:97-107.

63. Ganguly BJ, Tonomura N, Benson RM, Osborne BA, Granowitz EV. Hyperbaric oxygen enhances apoptosis in hematopoietic cells. *Apoptosis.* 2002; 7:499-510.

64. Kurt B, Kurt Y, Karslioglu Y, Topal T, Erdamar H, Korkmaz A, et al. Effects of hyperbaric oxygen on energy production and xanthine oxidase levels in striated muscle tissue of healthy rats. *J Clin Neurosci.* 2008; 15:445-50.

65. Zhang Y, Ouyang S, Zhang L, Tang X, Song Z, Liu P. Oxygen-induced changes in mitochondrial DNA and DNA repair enzymes in aging rat lens. *Mech Ageing Dev.* 2010; 131:666-73.

66. Gutsaeva DR, Suliman HB, Carraway MS, Demchenko IT, Piantadosi CA. Oxygen-induced mitochondrial biogenesis in the rat hippocampus. *Neuroscience.* 2006; 137:493-504.

67. Alleva R, Tomasetti M, Sartini D, Emanuelli M, Nasole E, Di Donato F, et al. alpha-Lipoic acid modulates extracellular matrix and angiogenesis gene expression in non-healing wounds treated with hyperbaric oxygen therapy. *Mol Med.* 2008; 14:175-83.

68. Gauthier KM, Goldman DH, Aggarwal NT, Chawengsub Y, Falck JR, Campbell WB. Role of arachidonic acid lipoxygenase metabolites in acetylcholine-induced relaxations of mouse arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 300:H725-35.

69. Campbell WB, Falck JR. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension.* 2007; 49:590-6.

70. Xu X, Wang Z, Li Q, Xiao X, Lian Q, Xu W, et al. Endothelial nitric oxide synthase expression is progressively increased in primary cerebral microvascular endothelial cells during hyperbaric oxygen exposure. *Oxid Med Cell Longev.* 2009; 2:7-13.

71. Lin CD, Wei IH, Lai CH, Hsia TC, Kao MC, Tsai MH, et al. Hyperbaric oxygen upregulates cochlear constitutive nitric oxide synthase. *BMC Neurosci.* 2011; 12:21.

72. Li Z, Liu W, Kang Z, Lv S, Han C, Yun L, et al. Mechanism of hyperbaric oxygen preconditioning in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Brain Res.* 2008; 1196:151-6.

73. Gunther A, Manaenko A, Franke H, Wagner A, Schneider D, Berrouschot J, et al. Hyperbaric and normobaric reoxygenation of hypoxic rat brain slices--impact on purine nucleotides and cell viability. *Neurochem Int.* 2004; 45:1125-32.

74. Cheng O, Ostrowski RP, Wu B, Liu W, Chen C, Zhang JH. Cyclooxygenase-2 mediates hyperbaric oxygen preconditioning in the rat model of transient global cerebral ischemia. *Stroke*. 2011; 42:484-90.
75. Gu GJ, Li YP, Peng ZY, Xu JJ, Kang ZM, Xu WG, et al. Mechanism of ischemic tolerance induced by hyperbaric oxygen preconditioning involves upregulation of hypoxia-inducible factor-1 α and erythropoietin in rats. *J Appl Physiol*. 2008; 104:1185-91.
76. Namazi H. Decreasing the expression of LFA-1 and ICAM-1 as the major mechanism for the protective effect of hyperbaric oxygen on ischemia-reperfusion injury. *Microsurgery*. 2008; 28:300.
77. Matsunami T, Sato Y, Hasegawa Y, Ariga S, Kashimura H, Sato T, et al. Enhancement of reactive oxygen species and induction of apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. *Int J Clin Exp Pathol*. 2011; 4:255-66.
78. Dennog C, Radermacher P, Barnett YA, Speit G. Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat Res*. 1999; 428:83-9.
79. Ay H, Topal T, Uysal B, Ozler M, Oter S, Korkmaz A, et al. Time-dependent course of hyperbaric oxygen-induced oxidative effects in rat lung and erythrocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007; 34:787-91.
80. Simsek K, Ay H, Topal T, Ozler M, Uysal B, Ucar E, et al. Long-term exposure to repetitive hyperbaric oxygen results in cumulative oxidative stress in rat lung tissue. *Inhal Toxicol*. 2011; 23:166-72.
81. Wilcox CS. Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function. *Curr Hypertens Rep*. 2002; 4:160-6.
82. Racasan S, Braam B, Koomans HA, Joles JA. Programming blood pressure in adult SHR by shifting perinatal balance of NO and reactive oxygen species toward NO: the inverted Barker phenomenon. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 288:F626-36.
83. Montezano AC, Touyz RM. Molecular mechanisms of hypertension--reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. *Can J Cardiol*. 2012; 28:288-95.
84. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med*. 2002; 346:1954-62.
85. Swee A, Lacy F, DeLano FA, Schmid-Schonbein GW. Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension*. 1997; 30:1628-33.
86. Zicha J, Dobesova Z, Kunes J. Relative deficiency of nitric oxide-dependent vasodilation in salt-hypertensive Dahl rats: the possible role of superoxide anions. *J Hypertens*. 2001; 19:247-54.
87. Pieper GM, Langenstroer P, Siebeneich W. Diabetic-induced endothelial dysfunction in rat aorta: role of hydroxyl radicals. *Cardiovasc Res*. 1997; 34:145-56.
88. Xie J, Yoon J, Yang SS, Lin SH, Huang CL. WNK1 Protein Kinase Regulates Embryonic Cardiovascular Development through the OSR1 Signaling Cascade. *J Biol Chem*. 2013; 288:8566-74.
89. Cotto-Rios XM, Bekes M, Chapman J, Ueberheide B, Huang TT. Deubiquitinases as a signaling target of oxidative stress. *Cell Rep*. 2012; 2:1475-84.
90. Kaarisalo MM, Raiha I, Sivenius J, Immonen-Raiha P, Lehtonen A, Sarti C, et al. Diabetes worsens the outcome of acute ischemic stroke. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005; 69:293-8.
91. Miura H, Wachtel RE, Loberiza FR, Jr., Saito T, Miura M, Nicolosi AC, et al. Diabetes mellitus impairs vasodilation to hypoxia in human coronary arterioles: reduced activity of ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res*. 2003; 92:151-8.

92. Pieper GM. Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes: protective role of arginine on endothelial dysfunction. *Hypertension*. 1998; 31:1047-60.
93. Katusic ZS. Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 281:H981-6.
94. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*. 2001; 88:E14-22.
95. Zenere BM, Arcaro G, Saggiani F, Rossi L, Muggeo M, Lechi A. Noninvasive detection of functional alterations of the arterial wall in IDDM patients with and without microalbuminuria. *Diabetes Care*. 1995; 18:975-82.
96. Gazis A, White DJ, Page SR, Cockcroft JR. Effect of oral vitamin E (alpha-tocopherol) supplementation on vascular endothelial function in Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 1999; 16:304-11.
97. Bagi Z, Koller A. Lack of nitric oxide mediation of flow-dependent arteriolar dilation in type I diabetes is restored by sepiapterin. *J Vasc Res*. 2003; 40:47-57.
98. Benter IF, Yousif MH, Canatan H, Akhtar S. Inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II, RAS-GTPase and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid attenuates the development of diabetes-induced vascular dysfunction in the rat carotid artery. *Pharmacol Res*. 2005; 52:252-7.
99. Bentsen N, Larsen B, Lassen NA. Chronically impaired autoregulation of cerebral blood flow in long-term diabetics. *Stroke*. 1975; 6:497-502.
100. Lash JM, Bohlen HG. Structural and functional origins of suppressed acetylcholine vasodilation in diabetic rat intestinal arterioles. *Circ Res*. 1991; 69:1259-68.
101. Sartoretto JL, Melo GA, Carvalho MH, Nigro D, Passaglia RT, Scavone C, et al. Metformin treatment restores the altered microvascular reactivity in neonatal streptozotocin-induced diabetic rats increasing NOS activity, but not NOS expression. *Life Sci*. 2005; 77:2676-89.
102. Ungvari Z, Pacher P, Kecskemeti V, Papp G, Szollar L, Koller A. Increased myogenic tone in skeletal muscle arterioles of diabetic rats. Possible role of increased activity of smooth muscle Ca²⁺ channels and protein kinase C. *Cardiovasc Res*. 1999; 43:1018-28.
103. Savage MW, Bodmer CW, Walker AB, Buchan IE, Masson EA, Williams G. Vascular reactivity to noradrenaline and neuropeptide Y in the streptozotocin-induced diabetic rat. *Eur J Clin Invest*. 1995; 25:974-9.
104. Csanyi G, Lepran I, Flesch T, Telegdy G, Szabo G, Mezei Z. Lack of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) up-regulation in endothelial dysfunction in aorta in diabetic rats. *Pharmacol Rep*. 2007; 59:447-55.
105. Bohlen HG, Nase GP, Jin JS. Multiple mechanisms of early hyperglycaemic injury of the rat intestinal microcirculation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002; 29:138-42.
106. Lash JM, Nase GP, Bohlen HG. Acute hyperglycemia depresses arteriolar NO formation in skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1999; 277:H1513-20.
107. Peredo HA, Rodriguez R, Susemihl MC, Villarreal I, Filinger E. Long-term streptozotocin-induced diabetes alters prostanoid production in rat aorta and mesenteric bed. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2006; 26:355-60.
108. Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005; 67:3-21.
109. Hattori Y, Kakishita H, Akimoto K, Matsumura M, Kasai K. Glycated serum albumin-induced vascular smooth muscle cell proliferation through activation of the mitogen-activated

protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 281:891-6.

110. Hattori Y, Suzuki M, Hattori S, Kasai K. Vascular smooth muscle cell activation by glycated albumin (Amadori adducts). *Hypertension.* 2002; 39:22-8.

111. Rai A, Riemann M, Gustafsson F, Holstein-Rathlou NH, Torp-Pedersen C. Streptozotocin-induced diabetes decreases conducted vasoconstrictor response in mouse cremaster arterioles. *Horm Metab Res.* 2008; 40:651-4.

112. Kranke P, Bennett M, Roeckl-Wiedmann I, Debus S. Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004:CD004123.

113. Kranke P, Bennett MH, Martyn-St James M, Schnabel A, Debus SE. Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012; 4:CD004123.

114. Hinchliffe RJ, Valk GD, Apelqvist J, Armstrong DG, Bakker K, Game FL, et al. A systematic review of the effectiveness of interventions to enhance the healing of chronic ulcers of the foot in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008; 24 Suppl 1:S119-44.

115. Londahl M, Katzman P, Nilsson A, Hammarlund C. Hyperbaric oxygen therapy facilitates healing of chronic foot ulcers in patients with diabetes. *Diabetes Care.* 2010; 33:998-1003.

116. Hung JH, Wang JH, Chen CY, Chao KC, Yang MJ, Hung J. Hyperbaric oxygen therapy for cesarean section wound in diabetes mellitus gravida. *J Chin Med Assoc.* 2008; 71:373-6.

117. Faleo G, Fotino C, Bocca N, Molano RD, Zahr-Akrawi E, Molina J, et al. Prevention of autoimmune diabetes and induction of beta-cell proliferation in NOD mice by hyperbaric oxygen therapy. *Diabetes.* 2012; 61:1769-78.

118. Oliveira PA, Oliveira AM, Pablos AB, Costa FO, Silva GA, Santos JN, et al. Influence of hyperbaric oxygen therapy on peri-implant bone healing in rats with alloxan-induced diabetes. *J Clin Periodontol.* 2012; 39:879-86.

119. Nagatomo F, Roy RR, Takahashi H, Edgerton VR, Ishihara A. Effect of exposure to hyperbaric oxygen on diabetes-induced cataracts in mice. *J Diabetes.* 2011; 3:301-8.

120. Unfirer S, I. D. The mechanisms of vascular reactivity to ACh and serotonin are modulated by hyperbaric oxygen treatment in cerebral resistance arteries of diabetic rats (abstract). Joint meeting European Society of Microcirculation (ESM) and Society of Microcirculation and Vascular Biology (GfMBVV). *Journal of Vascular Research.* 2011; 48(S1):276.

121. Gros M, Drenjancevic I, editors. Hyperbaric oxygen treatment improves hypoxia-induced reactivity of isolated cerebral vessels of diabetic rats: role of ATP sensitive potassium channels. *FAME 2011; Pecs, Hungary: Acta physiologica* 202 2011 (S684).

122. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2005; 22:359-70.

123. Vavra JJ, Deboer C, Dietz A, Hanka LJ, Sokolski WT. Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiot Annu.* 1959; 7:230-5.

124. Murray-Lyon IM, Eddleston AL, Williams R, Brown M, Hogbin BM, Bennett A, et al. Treatment of multiple-hormone-producing malignant islet-cell tumour with streptozotocin. *Lancet.* 1968; 2:895-8.

125. Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo.* 2009; 23:245-58.

126. Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J Exp Med.* 1976; 119:85-90.

127. Benigni A, Cassis P, Remuzzi G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol Med*. 2010; 2:247-57.
128. Phillips SA, Drenjancevic-Peric I, Frisbee JC, Lombard JH. Chronic AT(1) receptor blockade alters mechanisms mediating responses to hypoxia in rat skeletal muscle resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287:H545-52.
129. Drenjancevic-Peric I, Lombard JH. Introgression of chromosome 13 in Dahl salt-sensitive genetic background restores cerebral vascular relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287:H957-62.
130. Drenjancevic-Peric I, Jelakovic B, Lombard JH, Kunert MP, Kibel A, Gros M. High-salt diet and hypertension: focus on the renin-angiotensin system. *Kidney Blood Press Res*. 2011; 34:1-11.
131. Grobe JL, Katovich MJ. Alterations in aortic vascular reactivity to angiotensin 1-7 in 17-beta-estradiol-treated female SD rats. *Regul Pept*. 2006; 133:62-7.
132. van Esch JH, Oosterveer CR, Batenburg WW, van Veghel R, Jan Danser AH. Effects of angiotensin II and its metabolites in the rat coronary vascular bed: is angiotensin III the preferred ligand of the angiotensin AT2 receptor? *Eur J Pharmacol*. 2008; 588:286-93.
133. Zhi JM, Chen RF, Wang J, Jiao XY, Zhao RR. Comparative studies of vasodilating effects of angiotensin-(1-7) on the different vessels. *Sheng Li Xue Bao*. 2004; 56:730-4.
134. Zhu Z, Zhong J, Zhu S, Liu D, Van Der Giet M, Tepel M. Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-induced signal transduction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002; 40:693-700.
135. Jalil JE, Ocaranza MP, Oliveri C, Cordova S, Godoy I, Chamorro G, et al. Neutral endopeptidase and angiotensin I converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism in humans. *J Hum Hypertens*. 2004; 18:119-25.
136. Castro CH, Santos RA, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. *Hypertension*. 2005; 46:937-42.
137. Rabelo LA, Xu P, Todiras M, Sampaio WO, Buttgereit J, Bader M, et al. Ablation of angiotensin (1-7) receptor Mas in C57Bl/6 mice causes endothelial dysfunction. *J Am Soc Hypertens*. 2008; 2:418-24.
138. Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*. 2007; 49:185-92.
139. Huang L, Sexton DJ, Skogerson K, Devlin M, Smith R, Sanyal I, et al. Novel peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem*. 2003; 278:15532-40.
140. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000; 87:E1-9.
141. Lund V, Kentala E, Scheinin H, Klossner J, Koskinen P, Jalonen J. Effect of hyperbaric conditions on plasma stress hormone levels and endothelin-1. *Undersea Hyperb Med*. 1999; 26:87-92.
142. Claybaugh JR, Freund BJ, Luther G, Muller K, Bennett PB. Renal and hormonal responses to exercise in man at 46 and 37 atmospheres absolute pressure. *Aviat Space Environ Med*. 1997; 68:1038-45.
143. Khaidarova G, Borukhova ES, Asinova MI. [Effect of hyperbaric oxygenation on the status of the renin-angiotensin-aldosterone system in chronic circulatory insufficiency in elderly patients with ischemic heart disease]. *Anesteziol Reanimatol*. 1989:33-5. *Vliianie giperbaricheskoi oksigenatsii na sostoianie renin- angiotenzin-al'dosteronovoi sistemy pri*

khronicheskoi nedostatochnosti krovoobrashcheniia u bol'nykh ishemicheskoi bolezniu serdtsa pozhilogo vozrasta.

144. Walker BR, Hong SK, Mookerjee BK, Krasney JA. Suppressed renin release during hyperoxia in the conscious dog. *Undersea Biomed Res.* 1981; 8:137-45.
145. Pakharukova NA, Pastushkova L, Popova YA, Trifonova OP, Larina IM. Study of normal human serum proteomic profile under conditions of hyperbaric oxygen-nitrogen-argon exposure. *Bull Exp Biol Med.* 2010; 149:37-9.
146. Sventek JC, Zambraski EJ. Effects of 100 percent oxygen on the cardiovascular responses to vasoactive compounds in the dog. *Aviat Space Environ Med.* 1985; 56:972-5.
147. Stuhr LE, Maehle BO. The effect of Losartan, an angiotensin II antagonist, on cardiac function, mass and morphology in rats after repeated hyperbaric exposures. *Scand J Clin Lab Invest.* 1997; 57:253-61.
148. Radice S, Rossoni G, Oriani G, Michael M, Chiesara E, Berti F. Hyperbaric oxygen worsens myocardial low flow ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart. *Eur J Pharmacol.* 1997; 320:43-9.
149. Drenjancevic-Peric I, Lombard JH. Reduced angiotensin II and oxidative stress contribute to impaired vasodilation in Dahl salt-sensitive rats on low-salt diet. *Hypertension.* 2005; 45:687-91.
150. Yousif MH, Dhaunsi GS, Makki BM, Qabazard BA, Akhtar S, Benter IF. Characterization of Angiotensin-(1-7) effects on the cardiovascular system in an experimental model of type-1 diabetes. *Pharmacol Res.* 2012; 66:269-75.
151. Benter IF, Yousif MH, Cojocel C, Al-Maghrebi M, Diz DI. Angiotensin-(1-7) prevents diabetes-induced cardiovascular dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292:H666-72.
152. Kilarkaje N, Yousif MH, El-Hashim AZ, Makki B, Akhtar S, Benter IF. Role of angiotensin II and angiotensin-(1-7) in diabetes-induced oxidative DNA damage in the corpus cavernosum. *Fertil Steril.* 2013; 100:226-33.
153. Giani JF, Burghi V, Veiras LC, Tomat A, Munoz MC, Cao G, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates diabetic nephropathy in Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012; 302:F1606-15.
154. Stegbauer J, Potthoff SA, Quack I, Mergia E, Clasen T, Friedrich S, et al. Chronic treatment with angiotensin-(1-7) improves renal endothelial dysfunction in apolipoproteinE-deficient mice. *Br J Pharmacol.* 2011; 163:974-83.
155. Rodgers K, Verco S, Bolton L, Dizerega G. Accelerated healing of diabetic wounds by NorLeu(3)-angiotensin (1-7). *Expert Opin Investig Drugs.* 2011; 20:1575-81.
156. Harder DR, Narayanan J, Birks EK, Liard JF, Imig JD, Lombard JH, et al. Identification of a putative microvascular oxygen sensor. *Circ Res.* 1996; 79:54-61.
157. Kerkhof CJ, Bakker EN, Sipkema P. Role of cytochrome P-450 4A in oxygen sensing and NO production in rat cremaster resistance arteries. *Am J Physiol.* 1999; 277:H1546-52.
158. Alkayed NJ, Birks EK, Hudetz AG, Roman RJ, Henderson L, Harder DR. Inhibition of brain P-450 arachidonic acid epoxygenase decreases baseline cerebral blood flow. *Am J Physiol.* 1996; 271:H1541-6.
159. Liclican EL, Doumad AB, Wang J, Li J, Falck JR, Stier CT, Jr., et al. Inhibition of the adenosine2A receptor-epoxyeicosatrienoic acid pathway renders Dahl salt-resistant rats hypertensive. *Hypertension.* 2009; 54:1284-90.

160. Pozzi A, Macias-Perez I, Abair T, Wei S, Su Y, Zent R, et al. Characterization of 5,6- and 8,9-epoxyeicosatrienoic acids (5,6- and 8,9-EET) as potent in vivo angiogenic lipids. *J Biol Chem.* 2005; 280:27138-46.
161. Xu X, Zhang XA, Wang DW. The roles of CYP450 epoxygenases and metabolites, epoxyeicosatrienoic acids, in cardiovascular and malignant diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63:597-609.
162. Baragatti B, Ciofini E, Scebbba F, Angeloni D, Sodini D, Luin S, et al. Cytochrome P-450 3A13 and endothelin jointly mediate ductus arteriosus constriction to oxygen in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 300:H892-901.
163. Lianos EA. *Methods in Molecular Biology*, Volume 120. Eicosanoid Protocols: Springer, Humana Press; 1999.
164. Zhao X, Imig JD. Kidney CYP450 enzymes: biological actions beyond drug metabolism. *Curr Drug Metab.* 2003; 4:73-84.
165. Wang MH, Brand-Schieber E, Zand BA, Nguyen X, Falck JR, Balu N, et al. Cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolism in the rat kidney: characterization of selective inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 284:966-73.
166. Neckar J, Kopkan L, Huskova Z, Kolar F, Papousek F, Kramer HJ, et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase by cis-4-[4-(3-adamantan-1-ylureido)cyclohexyl-oxy]benzoic acid exhibits antihypertensive and cardioprotective actions in transgenic rats with angiotensin II-dependent hypertension. *Clin Sci (Lond).* 2012; 122:513-25.
167. Bhardwaj A, Northington FJ, Carhuapoma JR, Falck JR, Harder DR, Traystman RJ, et al. P-450 epoxygenase and NO synthase inhibitors reduce cerebral blood flow response to N-methyl-D-aspartate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279:H1616-24.
168. Jouihan SA, Zuloaga KL, Zhang W, Shangraw RE, Krasnow SM, Marks DL, et al. Role of soluble epoxide hydrolase in exacerbation of stroke by streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013; 33:1650-6.
169. Chen G, Xu R, Wang Y, Wang P, Zhao G, Xu X, et al. Genetic disruption of soluble epoxide hydrolase is protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012; 303:E563-75.
170. Theken KN, Schuck RN, Edin ML, Tran B, Ellis K, Bass A, et al. Evaluation of cytochrome P450-derived eicosanoids in humans with stable atherosclerotic cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2012; 222:530-6.
171. Yousif MH, Benter IF, Roman RJ. Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid play a role in the enhanced cardiac dysfunction in diabetic rats following ischaemic reperfusion injury. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2009; 29:33-41.
172. Mustafa S, Sharma V, McNeill JH. Insulin resistance and endothelial dysfunction: Are epoxyeicosatrienoic acids the link? *Exp Clin Cardiol.* 2009; 14:e41-50.
173. El-Sherbeni AA, Aboutabl ME, Zordoky BN, Anwar-Mohamed A, El-Kadi AO. Determination of the dominant arachidonic acid cytochrome p450 monooxygenases in rat heart, lung, kidney, and liver: protein expression and metabolite kinetics. *AAPS J.* 2013; 15:112-22.
174. Ying CJ, Noguchi T, Aso H, Ikeda K, Yamori Y, Nara Y. The role of cytochrome p-450 in salt-sensitive stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2008; 31:1821-7.
175. Ma F, Lin F, Chen C, Cheng J, Zeldin DC, Wang Y, et al. Indapamide lowers blood pressure by increasing production of epoxyeicosatrienoic acids in the kidney. *Mol Pharmacol.* 2013; 84:286-95.

176. Wang HX, Zhang DM, Zeng XJ, Mu J, Yang H, Lu LQ, et al. Upregulation of cytochrome P450 2J3/11,12-epoxyeicosatrienoic acid inhibits apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes by a caspase-dependent pathway. *Cytokine*. 2012; 60:360-8.
177. Chen G, Wang P, Zhao G, Xu G, Gruzdev A, Zeldin DC, et al. Cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2 attenuates nephropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2011; 96:63-71.
178. Cai Z, Zhao G, Yan J, Liu W, Feng W, Ma B, et al. CYP2J2 overexpression increases EETs and protects against angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in mice. *J Lipid Res*. 2013; 54:1448-56.
179. Brand-Schieber E, Falck JF, Schwartzman M. Selective inhibition of arachidonic acid epoxidation in vivo. *J Physiol Pharmacol*. 2000; 51:655-72.
180. Do KH, Kim MS, Kim JH, Rhim BY, Lee WS, Kim CD, et al. Angiotensin II-induced aortic ring constriction is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/L-type calcium channel signaling pathway. *Exp Mol Med*. 2009; 41:569-76.
181. Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res*. 2008; 44:65-81.
182. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996; 239:70-6.
183. Oakes KD, Van Der Kraak GJ. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat Toxicol*. 2003; 63:447-63.
184. Silva DM, Gomes-Filho A, Olivon VC, Santos TM, Becker LK, Santos RA, et al. Swimming training improves the vasodilator effect of angiotensin-(1-7) in the aorta of spontaneously hypertensive rat. *J Appl Physiol* (1985). 2011; 111:1272-7.
185. Kluskens LD, Nelemans SA, Rink R, de Vries L, Meter-Arkema A, Wang Y, et al. Angiotensin-(1-7) with thioether bridge: an angiotensin-converting enzyme-resistant, potent angiotensin-(1-7) analog. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009; 328:849-54.
186. Manojlovic D, Cavka A, Drenjancevic I, editors. Vascular relaxation to acetylcholine in female diabetic rats that underwent hyperbaric oxygenation ; the role of EETs and 20-HETE. *Proceedings of The Physiological Society 27 (2012) PC180*; Edinburgh, UK.
187. Manojlovic D, Cavka A, Ivanovic Z, Drenjancevic I, editors. Hyperbaric oxygen treatment modifies the mechanisms eliciting vasorelaxation to acetylcholine in female diabetic rats. *FAME 2011; Pecs, Hungary: Acta Physiologica 202 (2011) (S684)*.
188. Brayden JE. Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002; 29:312-6.
189. Gros M, Drenjančević I, editors. Hyperbaric oxygen treatment improves hypoxia-induced reactivity of isolated cerebral vessels of diabetic rats: role of ATP sensitive potassium channels (Abstracts of FAME 2011). *Acta physiologica 202 2011 (S684)*; Pecs, Hungary.
190. Ye D, Zhou W, Lu T, Jagadeesh SG, Falck JR, Lee HC. Mechanism of rat mesenteric arterial KATP channel activation by 14,15-epoxyeicosatrienoic acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290:H1326-36.
191. Spector AA. Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *J Lipid Res*. 2009; 50 Suppl:S52-6.
192. Moon JY, Tanimoto M, Gohda T, Hagiwara S, Yamazaki T, Ohara I, et al. Attenuating effect of angiotensin-(1-7) on angiotensin II-mediated NAD(P)H oxidase activation in type 2 diabetic nephropathy of KK-A(y)/Ta mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 300:F1271-82.

193. Castro CH, Santos RA, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP. Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. *Life Sci.* 2006; 80:264-8.
194. Esteban V, Heringer-Walther S, Sterner-Kock A, de Bruin R, van den Engel S, Wang Y, et al. Angiotensin-(1-7) and the g protein-coupled receptor MAS are key players in renal inflammation. *PLoS One.* 2009; 4:e5406.
195. Durand MJ, Raffai G, Weinberg BD, Lombard JH. Angiotensin-(1-7) and low-dose angiotensin II infusion reverse salt-induced endothelial dysfunction via different mechanisms in rat middle cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; 299:H1024-33.
196. 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.
197. Charlton SJ. Agonist efficacy and receptor desensitization: from partial truths to a fuller picture. *Br J Pharmacol.* 2009; 158:165-8.
198. Oliveira L, Costa-Neto CM, Nakaie CR, Schreier S, Shimuta SI, Paiva AC. The angiotensin II AT1 receptor structure-activity correlations in the light of rhodopsin structure. *Physiol Rev.* 2007; 87:565-92.
199. Parađiković I. Utjecaj hiperbarične terapije na ekspresiju enzima CYP450 omega hidroksilaze u diabetesu mellitusu tipa 1. Osijek: Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku; 2011.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Aleksandar Kibel

Datum rođenja: 07.05.1985.

J.J.Strossmayera 198, 31000 Osijek

Tel. 091 925 1229

Elektronička pošta : aleksandar_mf@yahoo.com

alekibel@mefos.hr

Radno iskustvo

- rujan 2009. – rujan 2010.
pripravnički staž za doktore medicine u KBC Zagreb
- listopad 2010. – siječanj 2011. (u dijelu radnog vremena do srpnja 2011.)
liječnik - Hitna medicinska pomoć Osječko-baranjske županije
- siječanj 2011. -
liječnik specijalizant interne medicine u KBC Osijek
- 14.04.2011. – (povremeno)
liječnik u Savjetovalištu za pretilost - Hrvatski crveni križ (volontiranje)
- studeni 2009. -
naslovni asistent Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek
- rujan 2012. -
nastavnik predmeta 'Interna medicina' u Medicinskoj školi Osijek (smjer fizioterapeuta)

Obrazovanje

Datum: 1991.-1995.

Mjesto: Aalen, Bopfingen (Baden-Württemberg), Savezna Republika Njemačka

Ustanova: Grundschule Greutschule Aalen, Grundschule Stadtmitte Bopfingen

Datum: 1995.-1997.
Mjesto: Bopfingen (Baden-Württemberg), Savezna Republika Njemačka
Ustanova: Ostalb-Gymnasium Bopfingen

Datum: 1997.-1999.
Mjesto: Osijek, Republika Hrvatska
Ustanova: Osnovna škola Ljudevita Gaja

Datum: 1999.-2003.
Mjesto: Osijek, Republika Hrvatska
Ustanova: III.gimnazija Osijek

Datum: 2003. – 2009.
Mjesto: Osijek, Republika Hrvatska
Ustanova: Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku (dr.med.)

Datum: 2010. -
Mjesto: Osijek, Republika Hrvatska
Ustanova: Medicinski fakultet Osijek, Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i
zdravstvo

Znanstveno usavršavanje u inozemstvu

Godina: 2006.
Mjesto: Hamburg, Savezna Republika Njemačka
Ustanova: Universitatsklinikum Hamburg-Eppendorf, Odjel za andrologiju
Područje: molekularne istraživačke metode – PCR analiza, stanične kulture, Western blot, imunohistokemijska ispitivanja ljudskih biopsija testisa, molekularna andrologija

Godina: 2007.
Mjesto: Bangkok, Kraljevina Tajland

Ustanova: Sveučilište Chulalongkorn, Zavod za anatomiju, laboratorij za istraživanje Alzheimerove bolesti

Područje: molekularno istraživanje neuroinflamacije na staničnim kulturama, Alzheimerova bolest

Godina: 2008.

Mjesto: Milwaukee, Wisconsin, Sjedinjene Američke Države

Ustanova: Medical College of Wisconsin, Department of Physiology

Područje: kardiovaskularna fiziologija, Laser Doppler flowmetry, autoregulacija protoka krvi kroz mozak u genetski modificiranih štakora, torakalni aortalni prstenovi

Godina: 2011.

Mjesto: Barcelona, Španjolska

Ustanova: Ljetna škola Europske udruge za hipertenziju

Područje: hipertenzija

Strani jezici

Jezik Njemački jezik (školovanje u Njemačkoj, položena škola stranih jezika u RH iznad VIII.stupnja (C2))

Govori da

Piše da

Čita da

Jezik Engleski jezik (položen TOEFL s rezultatima iznad 98.percentile)

Govori da

Piše da

Čita da

Aktivnosti u znanstvenim projektima

sudjelovanje na znanstvenom projektu „Molecular diagnosis of idiopathic male infertility“ na Sveučilišnoj klinici Hamburg-Eppendorf, laboratoriji za molekularnu andrologiju, pod vodstvom prof.dr.rer.nat.Christiane Kirchhoff i prof.dr.med.Wolfgang Schulze.

sudjelovanje na znanstvenom projektu „Brain iron and neuroinflammation“ na Sveučilištu Chulalongkorn u Bangkoku (Tajland), pod vodstvom prof.dr.Poonlarp Cheepsunthorna.

sudjelovanje na znanstvenom projektu na „Medical College of Wisconsin“ u SAD-u, s temom istraživanja autoregulacije moždanog protoka krvi u hemoragijskom stresu na consomičnim laboratorijskim štakorima. Vodstvo prof.dr.Julian H. Lombarda.

istraživanja vezana za znanstveni projekt prof.dr.sc.Ines Drenjančević pod naslovom „Djelovanje kisika na vaskularnu funkciju u zdravlju i bolesti“; Ministarstvo znanosti, obrazovanja i sporta #219-2160133-2034, pri Katedri za fiziologiju i imunologiju u sklopu laboratorija za fiziologiju cirkulacije Medicinskog fakulteta Osijek

studija u sklopu projekta „Rad i zdravlje“, Program prekogranične suradnje Mađarska-Hrvatska 2007. - 2013.

kliničko istraživanje u KBC Zagreb – u Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju, sažetak s rezultatima istraživanja prezentiran na glavnom europskom sastanku (UEGW) u Barceloni 2010.g.

sudjelovanje u Kliničkim ispitivanjima (kao sub-investigator) novih lijekova za metastatski karcinom želuca u sklopu projekata Klinike za unutarnje bolesti KBC Osijek (glavni istraživač prof.dr.sc.Silvio Mihaljević).

Druge aktivnosti

za vrijeme studija demonstrator na katedrama za anatomiju, fiziologiju i imunologiju, medicinsku biologiju, histologiju i embriologiju, te na Katedri za mikrobiologiju i parazitologiju

istraživanja na Katedri za histologiju i embriologiju (utjecaj medija in vitro kulture na diferencijaciju neuralnog tkiva štakorkih embrija) te na Katedri za medicinsku biologiju

Festival znanosti, Osijek, travanj 2005.g. – poster u Rektoratu Sveučilišta o 13. kromosomu i Patauovom sindromu, organizator radionice iz anatomije pod naslovom „Antropometrija”

Festival znanosti, Osijek, travanj 2006.g. – predavanje pod naslovom „Oksitocin: hormon vjerovanja i dugotrajnih veza”, voditelj radionice iz anatomije pod naslovom „Oblivion-anatomija i rekonstrukcija lica”

Festival znanosti, Osijek, travanj 2007. g. – organizator radionice iz anatomije pod naslovom „Što ne treba jesti?”

Festival znanosti, Osijek, travanj 2011.g. - predavanje s prof.Drenjančević - „Svjetlost ljubi kožu - ili ne?”

sudjelovao u projektima u sklopu studentskih udruga EMSA i CroMSIC.

recenzent za časopis Medicinski glasnik (SCI, Scopus, Medline)

brojna pasivna sudjelovanja na međunarodnim znanstvenim skupovima i tečajevima trajnog usavršavanja

Aktivna sudjelovanja na znanstvenim skupovima

vidljivo u publikacijama

Nagrade i stipendije

TOP stipendija za TOP studente 2007.

Nagrada za radionicu Festivala znanosti 2006.

Nagrada za znanstveni rad na Danu medicinara Osijek (Dameo) 2007.

Nagrada Lions Cluba 2008. za najbolje studente Sveučilišta

Nagrada Fakultetskog vijeća 2008. za izniman uspjeh

ostale stipendije (Grada Osijeka, Ministarstva znanosti, Sveučilišta, zaklada 'prof Zlata Bartl')

Članstva

prije diplomiranja na Medicinskom fakultetu Osijek:

SSHLZ (studentska sekcija Hrvatskog liječničkog zbora)

EMSA (European Medical Student Association)

CroMSIC (Croatian Medical Student's International Committee), koji je dio

IFMSA (International Federation of Medical Students' Associations)

nakon diplomiranja postao član:

HDF (Hrvatsko društvo fiziologa)

HDH (Hrvatsko društvo za hipertenziju)

ESH (Europska udruga za hipertenziju)

HLK (Hrvatska liječnička komora)

Strani/Standardizirani ispiti

GRE (Graduate Records Examination)

TOEFL (Test Of English as a Foreign Language)

IACUC tečaj za rad s laboratorijskim životinjama

GCP (Good Clinical Practice guidelines)

Publikacije

Poglavlja u knjizi

1. Drenjančević, Ines; Kibel, Aleksandar; Tovjanin, Bojan. Mišljenje stanovništva i poslodavaca o zaštiti zdravlja s obje strane mađarsko-hrvatske granice - stanje u Hrvatskoj // Rad i zdravlje studija o dodirnim područjima zapošljavanja i zdravstva u jednoj pograničnoj regiji / Zsolt Nemeskeri (ur.). Budapest : Edge 2000 Kiado, 2011. Str. 51-87.

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

1. Drenjancevic, Ines; Kibel, Aleksandar; Kibel, Dijana; Seric, Vatroslav; Cosic, Anita. Blood pressure, acid-base and blood gas status and indicators of oxidative stress in healthy male rats exposed to acute hyperbaric oxygenation. // Undersea & hyperbaric medicine. 40 (2013) , 4; 319-328 (članak, znanstveni).

2. Kibel, Aleksandar; Čavka, Ana; Čosić, Anita; Falck, John R.; Drenjančević, Ines. Effects of hyperbaric oxygenation on vascular reactivity to angiotensin II and angiotensin-(1-7) in rats. // Undersea & hyperbaric medicine. 39 (2012) , 6; 1053-1066 (članak, znanstveni).

3. Drenjančević-Perić, Ines; Jelaković, Bojan; Lombard, Julian H; Kunert, Mary Pat; Kibel, Aleksandar; Gros, Mario. High-Salt Diet and Hypertension : Focus on the Renin-Angiotensin System. // Kidney & blood pressure research. 34 (2011) ; 1-11 (pregledni rad, znanstveni).

4. Atalić, Bruno; Unfirer, Sanela; Kibel, Aleksandar; Drenjančević-Perić, Ines. Different Roles of Sex Steroid Hormones in the Pathogenesis of Vascular Dysfunction and the Development of Cardiovascular Disease in Men and Women. // Collegium Antropologicum. 33 (2009) , 2; 673-680 (pregledni rad, znanstveni).

5. Drenjančević-Perić, Ines; Gros, Mario; Kibel, Aleksandar. Influence of Hyperbaric Oxygen on Blood Vessel Reactivity: Concept of Changes in Conducted Vasomotor Response. // Collegium Antropologicum. 33 (2009) , 2; 681-685 (članak, znanstveni).
6. Kibel, Aleksandar; Belovari Tatjana; Drenjančević-Perić, Ines. The role of transferrin in atherosclerosis. // Medical Hypotheses. 70 (2008) , 4; 793-797 (članak, znanstveni).
7. Kibel, Aleksandar; Drenjančević-Perić, Ines. Impact of glucocorticoids and chronic stress on progression of Parkinson's disease. // Medical hypotheses. 71 (2008) ; 952-956 (članak, znanstveni).
8. Unfirer, Sanela; Kibel, Aleksandar; Drenjančević-Perić, Ines. The effect of hyperbaric oxygen therapy on blood vessel function in diabetes mellitus. // Medical Hypotheses. 71 (2008) , 5; 776-780 (članak, znanstveni).

Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. Bačun Tatjana; Kibel Aleksandar; Jelić Krešimir; Pavić Roman; Degmečić Dunja; Sidorov Dajana. From hypoglycemia to right heart infarction: treatment of hypoglycemia in type 1 diabetes.. // Medicinski glasnik : official publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina. 9 (2012) , 2; 402-405 (prikaz, znanstveni).
2. Bačun Tatjana; Kibel Aleksandar; Pavić Roman. Impressive results of teriparatide treatment of postgastrectomy osteoporosis. // Medicinski glasnik : official publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina. 8 (2012) , 2; 305-308 (prikaz, znanstveni).
3. Kibel Aleksandar. Monoclonal antibodies in angiogenesis inhibition – Bevacizumab and Vitaxin to fight cancer. // Journal of EMSA on Medical and Scientific Affairs. 2007 (2007) ; 21-25 (pregledni rad, znanstveni).

4. Belovari, Tatjana; Kibel, Aleksandar; Kostović-Knežević, Ljiljana. Transferin u zdravlju i bolesti. // Medicinski vjesnik. 38 (2006) ; 21-24 (pregledni rad, znanstveni).

Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu

1. Kibel, Aleksandar; Čuković-Čavka, Silvija; Rustemović, Nadan; Ladić, Agata; Krznarić, Željko; Vucelić, Boris. Is thrombocytosis a valuable marker of activity in inflammatory bowel disease? // Gut (Suppl. III) A292 P0920 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).

Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima

1. Drenjancevic, Ines; kibel, Aleksandar; Unfirer, Sanela; Cosic, Anita; Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Gros, Mario; Manojlovic, Dragan; Mihaljevic, Zrinka; Mihalj, Martina; Misir, Mihael; Novak, Sanja; Paradzikovic, Ivana. Hyperbaric oxygenation - the role of EETs // Periodicum Biologorum Vol 115, Suppl 2 / Vitale, Branko ; Drenjancevic, Ines (ur.). Zagreb, 2013. 26 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

2. Dumancic, Dijana; Kibel, Aleksandar; Seric, Vatroslav; Cosic, Anita; Drenjancevic, Ines. Immediate effects of hyperbaric oxygenation on blood pressure, acid-base and blood gas status and parameters of oxidative stress in healthy male rats // Proceedings of The Physiological Society 27. London, UK, 2012. PC157 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

3. Kibel, Aleksandar; Cavka, Ana; Novak, Sanja; Mihalj, Martina; Cosic, Anita; Falck, JR; Drenjancevic, Ines. Modulation of aortic reactivity to angiotensin-(1-7) with intermittent hyperbaric oxygenation in diabetic rats // Proceedings of The Physiological Society 27. London, UK, 2012. PC177 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

4. Kibel, Aleksandar; Cavka, Ana; Drenjancevic, Ines. Effects of hyperbaric oxygen therapy on reactivity of rat aortic rings to angiotensin II and angiotensin-(1-7) // Proceedings of The Physiological Society Physiology 2011. Oxford, UK, 2011. PC229-PC229 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

Radovi u postupku objavljivanja

1. Drenjancevic, Ines; Kibel Aleksandar. Restoring vascular function with hyperbaric oxygen treatment- recovery mechanisms. // Journal of vascular research. (2013) (prihvaćen za objavljivanje).

Sažeci u zbornicima skupova

1. Bačun, tatjana; Degmečić, Dunja; Kibel, Aleksandar; Kibel, Dijana; Pavić, Roman. From Obesity to Hypothyroidism: Approach to an Obese Patient // I. Međunarodni kongres nutricionista "Metabolički sindrom", Zbornik radova. Osijek, 2013. 50-51 (poster, sažetak, stručni).

2. Bačun, Tatjana; Degmečić, Dunja; Kibel, Aleksandar; Kibel, Dijana; Pavić, Roman. From Metabolic Syndrome to Insulinoma: Approach to a Patient with Metabolic Syndrome // I. Međunarodni kongres nutricionista "Metabolički sindrom", Zbornik radova. Osijek, 2013. 51-52 (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).

3. Bačun Tatjana; Kibel Aleksandar; Jelić Krešimir; Pavić Roman; Degmečić Dunja; Sidorov Dajana. Od hipoglikemije do infarkta desne klijetke: pristup hipoglikemiji u dijabetesu tipa 1 // 5. Hrvatski dijabetološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, knjiga sažetaka. Pula, 2013. (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

4. Bačun, Tatjana; Kibel, Aleksandar; Wertheimer, Vjekoslav; Kibel, Dijana; Degmečić, Dunja; Pavić, Roman. FROM POSTPARTUM METASTATIC CANCER TO PARATHYROID ADENOMA - A CASE REPORT // International scientific conference on endocrinology and metabolism 2013. Poreč, 2013. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).

5. Ćosić, Anita; Kibel, Aleksandar; Čavka, Ana; Drenjančević, Ines. Oxidative stress in Sprague-Dawley healthy rats that underwent hyperbaric oxygenation // 1st International Doctoral

Workshop on Natural Sciences of the University of Pécs (1st IDWoNS / UP), Book of Abstracts. Pečuh, Mađarska, 2012. 18-19 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

6. Novak, Sanja; Ćosić, Anita; Mihaljević, Zrinka; Kibel, Aleksandar; Drenjančević, Ines. Influence of hyperbaric oxygen treatment on vascular gene expression in healthy Sprague-Dawley rats // 1st International Doctoral Workshop on Natural Sciences of the University of Pécs (1st IDWoNS / UP), Book of Abstracts. Pečuh, Mađarska, 2012. 30-31 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

7. Kibel, Aleksandar; Čavka, Ana; Drenjančević, Ines. Effects of hyperbaric oxygen therapy on reactivity of rat aortic rings to angiotensin II and angiotensin-(1-7) // International Meeting of Croatian Physiological Society Abstract book. Osijek, 2011. 19-20 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak).