# Utjecaj akutne hiperbarične oksigenacije na razinu oksidativnog stresa u HeLa staničnim kulturama

**Perica, Ante**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:028955

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska dijagnostika**

**Ante Perica**

# UTJECAJ AKUTNE HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA RAZINU OKSIDATIVNOG STRESA U HELA STANIČNIM KULTURAMA

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska dijagnostika**

**Ante Perica**

# UTJECAJ AKUTNE HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA RAZINU OKSIDATIVNOG STRESA U HELA STANIČNIM KULTURAMA

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Zavod i Katedra za fiziologiju i imunologiju
Mentorica rada: prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med., predsjednica Zavoda i pročelnica Katedre za fiziologiju i imunologiju
Neposredna voditeljica: Nataša Kozina, prof.
Rad ima 28 listova i 11 slika.

# ZAHVALA

Veliku zahvalu dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med. na ukazanoj pomoći, strpljenju i poticanju tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem, također neposrednoj voditeljici Nataši Kozini, prof. na savjetima i velikoj pomoći pri izradi praktičnog dijela rada.

Na kraju se zahvaljujem svojoj obitelji, posebno roditeljima koji su mi bili najveći oslonac i bezuvjetna podrška tijekom studiranja.

# SADRŽAJ

Popis kratica ..... III

1. UVOD ..... 1

1.1. Oksidativni stres ..... 1

1.1.1 Slobodni radikali i kisikove reaktivne vrste (ROS) ..... 1

1.1.2 Antioksidansi ..... 2

1.2 Hiperbarična oksigenacija ..... 3

1.3 HeLa stanične kulture ..... 5

2. HIPOTEZA ..... 7

3. CILJ ..... 8

4. MATERIJALI I METODE ..... 9

4.1 Materijali ..... 9

4.1.1 Stanične linije ..... 9

4.1.2 Kemikalije ..... 9

4.2 Metode ..... 10

4.2.1 Uzgoj HeLa stanične kulture ..... 10

4.2.2 Protokol istraživanja ..... 10

4.2.3 TBARS ..... 13

4.2.4 FRAP ..... 14

4.3 Statističke metode ..... 15

5. REZULTATI ..... 16

5.1 TBARS ..... 16

5.2 FRAP ..... 18

6. RASPRAVA ..... 21

7. ZAKLJUČAK ..... 23

8. SAŽETAK ..... 24
9. SUMMARY ..... 25
10. LITERATURA ..... 26
11. ŽIVOTOPIS ..... 28

## Popis kratica

**ROS** (engl. *reactive oxygen species*) - reaktivne kisikove vrste

**$O_2^-$** - superoksidni anion

**OH** - hidroksilni radikal

**$HO_2$** - hidroperoksilni radikal

**$H_2O_2$** - vodikov peroksid

**HOCl** - hipokloritna kiselina

**$O_2$** - singletni kisik

**NADPH** (engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) - Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

**SOD** - superoksid dismutaza

**CAT** - katalaza

**GPx** - glutation peroksidaza

**GRx** - glutation reduktaza

**$HBO_2$** (engl. *hyperbaric oxygen*) - hiperbarična oksigenacija

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

**TBARS** (engl. Thiobarbituric Acid Reactive Substances)

**FRAP** (engl. ferric reducing ability of plasma)

**FBS** (engl. fetal bovine serum)

**PBS** (engl. phosphate-buffered saline)

**HCl** - klorovodična kiselina

**KCl** - kalijev klorid

**TCA** - trikloroctena kiselina

**TBA** - tiobarbiturna kiselina

**TMP** - 1,1,3,3-tetrametoksipropan

**TPTZ** - 2,4,6-tripiridil-s-triazin

# 1. UVOD

## 1.1. Oksidativni stres

Oksidativni stres definira se kao poremećaj ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama prema oksidaciji ili prekomjernom stvaranju radikala, odnosno gubitak je ravnoteže stvaranja radikala i mogućnosti stanice da ih ukloni antioksidacijskim sustavom. Tijekom normalnoga staničnog metabolizma antioksidacijski sustav obrane odgovarajuće reagira s nastalim količinama slobodnih radikala i održava se homeostaza (1). Slobodni radikali su iznimno reaktivne kemijske vrste koje imaju jedan nespareni elektron u vanjskoj orbitali i kratkotrajnim vremenom poluživota koje teže brzoj stabilizaciji pa trenutačno reagiraju s drugim atomima ili molekulama iz neposredne okoline (2). Nespareni elektron se može povezivati s gotovo svim atomima, ali od najvećeg biološkog interesa su atomi kisika, dušika i ugljika (1). Tako susjedne molekule postaju nestabilne i dalje ulaze u reakcije s drugim molekulama iz okruženja što rezultira oštećenjem staničnih strutkura (3). Utjecaj oksidativnog stresa ovisi o vrsti oksidansa, mjestu i intenzitetu stvaranja, sastavu i djelovanju različitih antioksidanata i o sposobnosti organizma na oporavak. Postoje različite laboratorijske spektrofotometrijske metode pomoću kojih možemo izmjeriti ukupnu razinu oksidativnog stresa ili antioksidativnog kapaciteta, ali takve se metode ne koriste u rutinskoj laboratorijskoj praksi iako bi mogle biti korisne kod praćenja terapije arterijske hipertenzije (4).

### 1.1.1 Slobodni radikali i kisikove reaktivne vrste (ROS)

Slobodni radikali se mogu brzo i nepredvidivo spajati s bilo kojom prostorno bliskom molekulom proteina, lipida, ugljikohidrata ili nukleinske kiseline i pokrenuti nastajanje novih spojeva te niza neenzimskih lančanih reakcija. Najveći broj slobodnih radikala nastaje od kisikovih reaktivnih vrsta (engl. *reactive oxygen species,* ROS). ROS je zajednički naziv za radikale kisika i njegove reaktivne neradikalne vrste (3). Tijekom normalnoga aerobnog metabolizma reaktivne kisikove vrste stvaraju se u odgovarajućim koncentracijama, jer su potrebne za niz fizioloških funkcija, npr.: esencijalne su za stvaranje energije, potrebne su za proces fagocitoze u imunosnom sustavu, sudjeluju u održavanju vaskularnog tonusa i imaju vitalnu ulogu u prijenosu signala važnih za komunikaciju i funkciju stanica. Kod povećanih koncentracija ROS-a dolazi do oštećenja u stanici kao što su bubrenje stanice, oštećenja membrane, oštećenje DNA, povećanje stanične propusnosti što rezultira ulaskom kalcija ($Ca^2$) u stanicu što uzrokuje daljnje oštećenje mitohondrija (1).

U ROS se ubrajaju superoksidni radikal ($O_2^-$), hidroksilni radikal (OH), hidroperoksilni radikal ($HO_2•$). Vodikov peroksid ($H_2O_2$), hipoklorit (HOCl) i singletni kisik ($^1O_2$) spadaju u reaktivne neradikalne vrste kisika, ali iz kojih kroz kemijske reakcije vrlo lako mogu nastati slobodni radikali (5). Hidroksilni radikal (OH) je najreaktivniji slobodni radikal koji nastaje tijekom katalitičke reakcije superoksidnog radikala ($O_2^-$) i vodikovog peroksida ($H_2O_2$) u prisutnosti željeza ($Fe^{2+}$) ili bakra ($Cu^+$). Ova reakcija je poznata i kao Fentonova reakcija.

Slobodni kisikovi radikali prema izvoru nastajanja dijele se na endogene i egzogene (5). U stanici mogu nastati tijekom uobičajenih staničnih procesa, odnosno endogeno, ili mogu biti inducirani određenim egzogenim tvarima. Tako izvore stvaranja superoksidnog radikala ($O_2^-$) možemo podijeliti na enzimske (nastale tijekom katalitičkih reakcija NADPH oksidaze, NADPH-P450 reduktaze, ksantin oksidaze, superoksid dismutaze), stanične (radom makrofaga, leukocita, u respiratornom lancu, djelovanjem mikrosomalne oksigenaze) i na izvore nastale djelovanjem vanjskog okruženja (UV-svjetlo, X-zrake, toksične kemikalije, aromatski nitrospojevi i drugo) (6). Zbog potencijalno velike mogućnosti stvaranja slobodnih radikala organizam je razvio brojne prirodne mehanizme obrane od štetnog djelovanja ROS-a. Potencijalnu toksičnost tih vrsta u fiziološkim uvjetima sprječava velik broj citoprotektivnih enzima i antioksidansa (1).

### 1.1.2 Antioksidansi

Antioksidansi su tvari koje su prisutne u maloj koncentraciji, a koje u kratkom vremenu neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i drugih oksidansa. Nastaju u stanici (endogeni antioksidansi) ili se u organizam unose hranom ili u obliku dodataka antioksidansa u hrani ili tekućini za piće (egzogeni antioksidansi). Antioksidansi djeluju tako da onemogućuju stvaranje novih slobodnih radikala u organizmu, uništavaju već stvorene radikale ili popravljaju oštećenja u stanici nastala djelovanjem radikala (3).

Endogene antioksidanse dijelimo na enzimske antioksidanse i neenzimske antioksidanse. Glavni enzimski antioksidansi koji su izravno uključeni u proces neutralizacije ROS-a su: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx) i glutation reduktaza (GRx). Neenzimski antioksidansi su metabolički antioksidansi i dio su prirodne antioksidacijske obrane u organizmu. U njih ubrajamo glutation, koenzim Q10, melatonin, mokraćna kiselina, bilirubin, transferin, albumin i dr.

Vitamin E, vitamin C, karotenoidi, flavonoidi, omega-3 i omega-6 masne kiseline i dr. su egzogeni antioksidansi koje organizam ne može sam proizvesti pa ih se u tijelo unosi putem hrane ili dodataka hrani (5).

Mehanizam antioksidansa može djelovati na dva načina: kidanjem lanaca i prevencijom. Kidanje lanaca je proces otpuštanja ili uzimanja elektrona od drugih molekula stvarajući nove radikale sve dok se ne formiraju stabilni radikali. Lipidna peroksidacija je klasičan primjer kidanja lanaca. Prevencija kao drugi način djelovanja antioksidansa koristi antioksidativne enzime poput SOD, CAT, i GPx koji mogu preventivno djelovati na slobodne radikale tako da ni ne dođe do pokretanja lančane reakcije slobodnih radikala (5).

## 1.2 Hiperbarična oksigenacija

Hiperbarična oksigenacija (engl. *hyperbaric oxygen,* $HBO_2$) je medicinska i eksperimentalna metoda u kojoj se nastoji povećati razina kisika u krvi. Princip metode se temelji na primjeni čistog 100 % kisika pod tlakom većim od atmosferskog tlaka (7). Terapija $HBO_2$ odvija se u posebno dizajniranim komorama različitih veličina za jednu ili više osoba. Manje komore ili komore za jednu osobu obično su komprimirane 100 % kisikom, a komore za više osoba su pod tlakom zraka i pacijenti dišu čisti $O_2$ preko maske za lice (8). Udisanjem kisika pod povećanim tlakom za 100 kPa (1 bar) u 100 mL krvi organizmu se doprema oko 2,4 mL fizikalno otopljenog kisika. Fizikalno otopljeni kisik brže difundira u tkiva što omogućuje difuziju kisika tamo gdje je ona otežana i na taj se način smanjuje hipoksija (9). Fizikalno otopljeni kisik održava metabolički minimum, stabilizira membranu arteriola i prekapilarnih sfinktera i oporavlja njihovu reaktivnost. To osigurava bolju oksigenaciju tkiva u stanju hipoperfuzije. Zbog povećane koncentracije kisika difuzijski gradijent između kapilara i stanica tkiva je višestruko povećan, pa kisik dolazi do stanica i onda kada su one udaljene od kapilara (9).

Za liječenje $HBO_2$ ne postoji standardan protokol. Vrijeme izlaganja $HBO_2$ ovisi o kliničkoj indikaciji. Tretmani obično traju od 90 do 120 minuta pod tlakom od 2,0 do 2,5 bara uz moguća ponavljanja do tri puta na dan (10).

U kliničkoj praksi $HBO_2$ se koristi kod raznih patoloških stanja kao što su plinska gangrena, trovanje ugljičnim monoksidom ili cijanidom, dekompresijska bolest kod ronioca i dr. Posljednjih godina terapija 100 % kisikom se posebno pokazala učinkovitom u cijeljenju

ishemičnih ulceracija kod dijabetičara, kod oporavka od infarkta miokarda i moždanog udara, akutne periferne ishemije ekstremita i smanjenju aterosklerotskih plakova (7). Kod cijeljenja rana visoka koncentracija kisika potpomaže u formiranju kolagenskog matriksa potrebnog za angiogenezu u svrhu što bolje prokrvljenosti kod oštećenog tkiva. Proces cijeljenja tkiva uključuje interakciju mnogih različitih tipova stanica i biokemijskih medijatora. $HBO_2$ povećava tkivnu oksigenaciju i pojačava gradijent kisika na perifernim ishemičnim tkivnim oštećenjima. Dokazano je - visoki gradijent kisika važan je čimbenik u angiogenezi i cijeljenju rana. Reperfuzijska ozljeda je stanje koje pridonosi pogoršanju ishemijskih (tzv. „crush“) ozljeda, neuspješnog presađivanja kože i slično. U ovom patološkom procesu neutrofili imaju važnu ulogu. Neutrofili se adheriraju na stijenku krvnih žila kod oštećenog tkiva te otpuštaju proteaze i stvaraju slobodne radikale što dovodi do patološke vazokonstrikcije i daljnjeg oštećenja tkiva. Korištenje $HBO_2$ kod reperfuzijske ozljede dovodi do stvaranja molekula (tzv. „scavengers“) koje imaju ulogu u detoksikaciji tkiva od slobodnih radikala, sprječavanja lipidne peroksidacije staničnih membrana i poticanja sekvestracije leukocita u plućima sprječavajući tako njihovo nakupljanje u oštećenom tkivu (11).

$HBO_2$ ima i pozitivno djelovanje protiv bakterija. Terapija $HBO_2$ ima direktno bakteriostatsko i baktericidno djelovanje na anaerobne bakterije. Kisik djeluje kao specifični antibiotik na bakterije ometajući njihov metabolizam (9, 11). Povećanim stvaranjem slobodnih kisikovih radikala, $HBO_2$ djeluje toksično na bakterije oksidirajući proteine i membranske lipide, oštećuje DNA i inhibira metaboličke funkcije neophodne za rast bakterija (11). Povećana osjetljivost anaeroba na terapiju kisikom je zbog oslabljenoga antioksidativnog mehanizma obrane. Fakultativni anaerobni mikroorganizmi imaju sposobnost oduprijeti se toksičnom djelovanju kisika povećavajući sintezu anioksidativnih enzima.

Indirektni je učinak $HBO_2$ na bakterije da poboljšava fagocitnu sposobnost leukocita i na taj način djeluje kao nespecifični antibiotik. Smatra se učinkovitijim od direktnoga baktericidnog i bakteriostatskog djelovanja. Hipoksija značajno smanjuje fagocitnu sposobnost leukocita. Hiperoksija i $HBO_2$, također pozitivno utječu na aktivnost nekih antibiotika povećavajući njihovu učinkovitost (11).

$HBO_2$ se smatra sigurnim i bez štetnih djelovanja na organizam ukoliko se koristi pod tlakom manjim od 3 bara. Kod ekstremno visokih hiperbaričnih uvjeta moguća su štetna djelovanja (12). Jedina apsolutna kontraindikacija je neliječeni pneumotoraks. Najčešća komplikacija $HBO_2$ je barotrauma srednjeg uha. Barotrauma unutarnjeg uha je vrlo rijetka komplikacija koja može prouzročiti gubitak sluha, tinitus i vrtoglavicu. Bol u sinusima je druga

najčešća pojava kod terapije $HBO_2$. Obično se javlja u pacijenata s infekcijama gornjih dišnih putova. U izloženosti kisiku pri većem tlaku od 3 bara moguća je i toksičnost kisika na središnji živčani sustav, iako je to moguće i pri manjem tlaku što uglavnom ovisi o dužem vremenu izloženosti. To stanje je opisano kao Bertov efekt. Rane manifestacije su promjenjive, ali se najčešće izražavaju trzanjem perioralnih mišića i grčevima malih mišića na rukama. Duža izloženost može dovesti do vrtoglavica i mučnina koje su najčešće praćene promjenom ponašanja i nekordinatnim pokretima, također može dovesti do epilepsije. Toksični učinak kisika na pluća, poznat kao „Smithov" efekt, javlja se kod dugotrajnog izlaganja kisiku pri tlaku većem od 0,5 bara. Simptomi se pojavljuju nakon latentnog perioda, čije se trajanje skraćuje s povećanjem parcijalnog tlaka kisika. Prvi znakovi toksičnosti kisika se pojavljuju nakon 10 sati terapije kisikom pri tlaku od 1 bara. Visoka koncentracija kisika može dovesti do oštećenja plućnog epitela i tako izazvati pojavu intraalveolarnog edema i intersticijalnog zadebljanja alveola, a kasnije i fibroza što u krajnjem ishodu rezultira atelektazom pluća (13). Moguća je i reverzibilna miopija, odnosno kratkovidnost, u pacijenata izloženih $HBO_2$. Zubobolja je moguća tijekom kompresije i dekompresije, a uzrokovana je prethodno loše ispunjenim zubom, tj. ostankom zraka ispod zubne ispune (11).

### 1.3 HeLa stanične kulture

HeLa stanice prve su humane stanice raka vrata maternice uzgojene u kulturi stanica. Stanični biolog George Gey 1951. godine uspješno ih je kultivirao u laboratoriju bolnice John Hopkins (Baltimore) *in vitro*. Ime su dobile po Henrieti Lacks, 31-godišnjakinji, koja je umrla od raka iz kojeg su te stanice i izolirane (14,15). Uzrok raka vrata maternice povezan je s infekcijom humanim papiloma virusom 18 (HPV 18) (14). Za razliku od normalnih ljudskih stanica koje imaju 46 kromosoma, HeLa stanice imaju od 76 do 80 mutiranih kromosoma što ih čini posebnim. Za vrijeme diobe zdravih ljudskih stanica njihove kromosomske telomere se skraćuju i dolazi do staničnog starenja a što dalje dovodi do apoptoze, odnosno stanične smrti. U HeLa stanica to nije slučaj, jer one sadrže enzim telomerazu koji ponovno izgrađuje njihove telomere nakon diobe i na taj način zaobilaze proces starenja i apoptozu. Samo takve stanice koje imaju neku gensku mutaciju ili su transformirane virusom mogu postati besmrtne (16).

HeLa je bila veoma popularna među znanstvenicima za razna istraživanja kao prva i dugi niz godina jedina stanična linija koja se može neograničeno dijeliti *in vitro.* Među prvim istraživanjima, 1952. godine, virolog Jonas Salk ih je koristio u razvijanju cjepiva protiv dječje paralize. Zbog svog snažnog rasta i neograničene diobe u kratkom vremenu, ali i zbog jednostavne transfekcije poliovirusa u stanice, HeLa stanična linija je bila idealan model za

istraživanje (16). Znanstvenici su je koristili za razvoj staničnog kloniranja, *in vitro* oplodnje, izolacije matičnih stanica. HeLa stanice imaju, također veliki doprinos u istraživanju tumora, AIDS-a, HPV-a, tuberkuloze i u ispitivanju utjecaja zračenja i otrovnih tvari na stanice (16).

## 2. HIPOTEZA

Pretpostavka je da će akutna hiperbarična oksigenacija povećati razinu oksidativnog stresa u HeLa staničnim kulturama.

# 3. CILJ

Cilj ovog istraživanja je utvrditi promjene razine oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta stanica mjerenjem TBARS-a (engl. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) i FRAP-a (engl. *Ferric Reducing Ability of Plasma*) u HeLa staničnim kulturama izloženim akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji.

# 4. MATERIJALI I METODE

## 4.1 Materijali

### 4.1.1 Stanične linije

U ovom istraživanju korištena je HeLa stanična linija. Za potrebe ovog istraživanja HeLa stanice su bile podijeljene u dvije skupine:

1) Kontrolna skupina - stanična kultura izložene zraku na sobnoj temperaturi (stanice N = 4, medij N = 4)
2) Stanične kulture izložene akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (stanice N = 8, medij N = 8)

### 4.1.2 Kemikalije

Potrebne kemikalije i reagensi za ovo istraživanje su:

- medij RPMI 1640 + L-glutamin (Lonza, Basel, Switzerland),
- fetalni goveđi serum (10 % FBS, GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija),
- 0,25 % tripsin EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD),
- 100 U/ mL penicilin i 100 µg/mL streptomicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD),
- fosfatni pufer (PBS),
- tripansko plavilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD),
- 36,5 % klorovodična kiselina (HCl, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD),
- 1,15 % kalijev klorid (KCl, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD),
- triklorooctena kiselina $C_2HCl_3O_2$ (TCA, T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska),
- tiobarbituratna kiselina $C_4H_4N_2O_2S$ (TBA, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD),
- 1,1,3,3-tetrametoksipropan $C_7H_{16}O_4$ (TMP, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD),
- 2,4,6-tripiridil-s-triazin $C_{18}H_{12}N_6$ (TPTZ, Acros Organics, New Jersey, SAD),
- željezov (III) klorid heksahidrat $FeCl_3x6H_2O$ (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- natrijev acetat $C_2H_3NaO_2$ (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska),
- octena kiselina $CH_3COOH$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD),
- askorbinska kiselina $C_6H_8O_6$ (Vitamin C, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD).

## 4.2 Metode

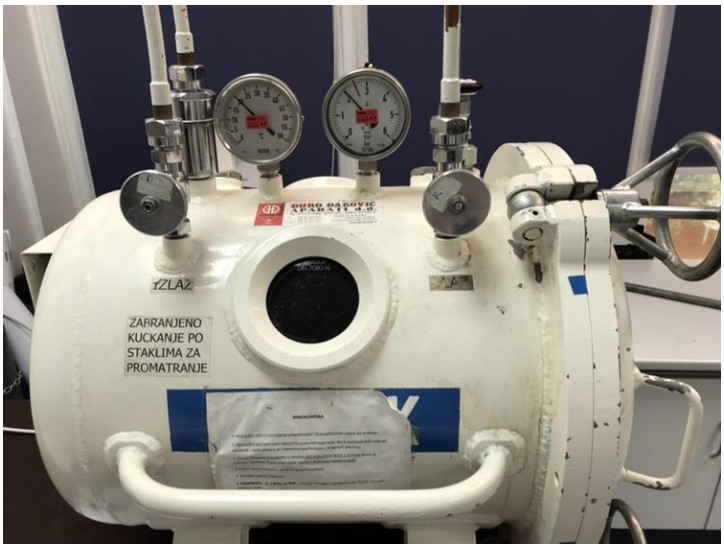
### 4.2.1 Uzgoj HeLa stanične kulture

Stanice su kultivirane u kabinetu za rad u aseptičnim uvjetima i laminarnim protokom zraka.

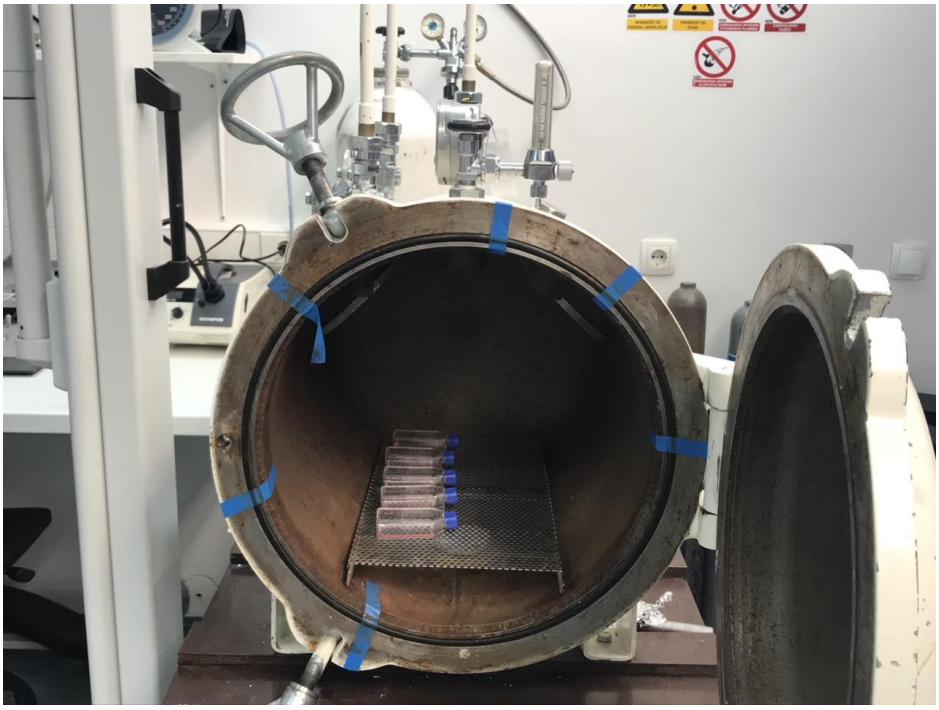
Za potrebe pokusa HeLa stanice su uzgajane u plastičnim bocama za kulturu stanica površine 75 $cm^2$ u hranjivom mediju (RPMI 1640 uz dodatak 10 % FBS, 1 % Pen/Strep, 2 mM L-glutamin). Stanice su svakodnevno provjeravane pod mikroskopom da bi se utvrdila njihova konfluentnost i iskorištenost medija.

### 4.2.2 Protokol istraživanja

Za ovo istraživanje bilo je potrebno da stanične kulture postignu konfluentost od 80 %, jer se tek tada može provesti izlaganje $HBO_2$. Stanične kulture su bile podijeljene u dvije skupine. Jedna skupina (N = 8) je bila izložena akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji. Stanične kulture u barokomori su bile izložene 100 % kisiku na temperaturi od + 20 °C u trajanju od dva sata pri tlaku od 2,0 bara. Kontrolna skupina (N = 4) je u isto vrijeme bila dva sata na zraku pri sobnoj temperaturi u laboratoriju za fiziologiju i imunologiju.




*Slika 1*. Hiperbarična komora za potrebe pokusa. (Izvor slike: Slikano u laboratoriju za fiziologiju i imunologiju, Katedra za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku)



*Slika 2*. Stanične kulture HeLa stanica smještene u hiperbaričnu komoru. (Izvor slike: Slikano u laboratoriju za fiziologiju i imunologiju, Katedra za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku)

#### 4.2.2.1 Tripsinizacija i brojanje stanica

Nakon dva sata izlaganja akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji stanice su izbrojane. Nakon tripsinizacije 0,25 % tripsinom i ispiranja s fosfatnim puferom (PBS) stanice su izbrojane. Medij je sačuvan i iskorišten za analizu TBARS-a i FRAP-a.

Nakon uklanjanja medija stanice su oprane s PBS-om i zatim odljepljene od podloge pomoću 0,25 % EDTA-tripsina tako da su oprane u tripsinu i zatim je tripsin uklonjen. Pod mikroskopom provjeravamo djelovanje tripsina. Djelovanjem tripsina na stanice dolazi do cijepanja međustanične i adhezijske veze što omogućava odvajanje stanica od podloge. Nakon 3 do 6 minuta stanice su se odljepile i pomoću medija za uzgoj stanica su prebačene u Falcon epruvetu.

Određivanje broja živih stanica određuje se korištenjem otopine tripan plavila i Bürker-Türk komorice. Tripan plavilo boji mrtve stanice koje primaju boju zbog oštećene stanične membrane, dok žive stanice aktivno izbacuju boju kroz neoštećenu membranu i tako ostaju neobojene. Kako bismo dobili točan broj živih stanica, resuspendiramo 50 µL stanične

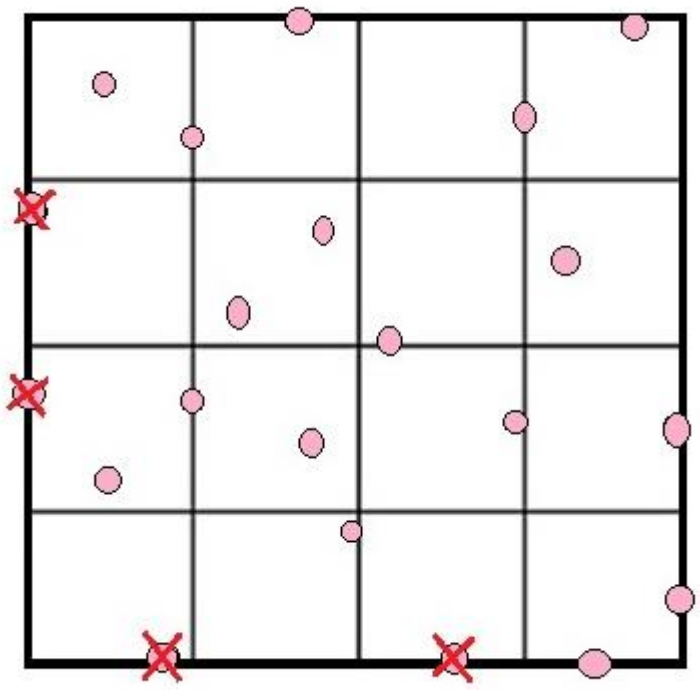
supenzije i 100 µL otopine tripan plavila. Tako pomiješanu staničnu suspenziju i tripan plavilo nanosimo na Bürker-Türk komoricu koju postavljamo na invertni mikroskop. U Bürker-Türk komorici pod invertnim mikroskopom brojimo neobojene žive stanice koje se nalaze unutar četiri kvadratića uključujući stanice koje se nalaze na gornjem i na jednom od postraničnog brida kvadratića. Broj stanica u 1 mL izračunamo pomoću formule:

$$broj\ stanica \frac{N}{4} \times 3 = X \times 10^4\ stanica/mL$$

N - broj stanica

4 - broj kvadrata u komorici

3 – faktor razrjeđenja



*Slika 3*. Skica stanica pod mikroskopom unutar jednog kvadratića. Izradio autor.

4.2.2.2 Homogenizacija uzoraka

Kada smo izbrojali stanice i prilagodili da u svakom uzorku izloženom 100 % kisiku, uključujući i kontrolne uzorke, bude isti broj stanica (N = 1,54 x $10^6$), potrebno je homogenzirati uzorke. Prethodno homogenizaciji uzorke je trebalo centrifugirati (7 minuta na 130 x g) da bismo odvojili medij od stanica. Stanice je bilo potrebno 2x isprati u PBS-u. Za homogenizaciju

HeLa stanica korišten je 1,15 % kalijev klorid (KCl). U svaki uzorak treba dodati 540 µl KCl-a (za TBARS metodu potreban je volumen od 500 µl dok je za FRAP potrebno 37,5 µl uzorka). Nakon dodavanja KCl-a, uzorke je potrebno uroniti u tekući dušik i nakon toga izvaditi ih. Radnju smo ponovili tri puta. Za potrebe pokusa korišten je i mehanički homogenizator. Homogenizator uronimo u Eppendorf epruvete u kojima se nalazi otopina uzorka. Eppendorf epruvete s otopinom uzorka moraju prethodno biti postavljene u čašici s ledom. Nakon mehaničkog homogeniziranja, uzorci su centrifugirani 20 minuta pri 20000 x g na temperaturi od +4 ºC.



*Slika 4.* Mehanički homogenizator. (Izvor slike: Slikano u laboratoriju za fiziologiju i imunologiju, Katedra za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku)

### 4.2.3 TBARS

TBARS (engl. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) je spektrofotometrijska metoda za određivanje oksidativnog stresa u stanicama. Pomoću ove metode mjeri se peroksidativno oštećenje lipida do kojeg dolazi zbog stvaranja slobodnih radikala. TBARS se temelji na

reakciji malondialdehida (MDA) kao krajnjeg produkta lipidne peroksidacije s tiobarbiturnom kiselinom (TBA) pri niskom pH (17).

Homogenizirane uzorke volumena od 500 µL otpipetiramo u falcon epruvetu od 15 mL. Zatim dodajemo 1 mL trikloroctene kiseline (TCA) i uzorke centrifugiramo 15 minuta pri 5000 rpmi na +4 ºC. Nakon centrifugiranja odvojimo 750 µL supernatanta u novu falcon epruvetu i dodajemo 750 µL TBA. Kada smo sve uzorke pripremili stavljamo ih u vodenu kupelj 10 minuta pri temepraturi od 100 ºC. Uzorke izvađene iz vodene kupelji potrebno je ohladiti na ledu. Uzorci se nakon hlađenja očitavaju na spektrofotometru na valnim duljinama 532 nm i 572 nm. Kako bismo dobili točnu vrijednost apsorbancije reakcije MDA i TBA trebamo oduzeti apsorbancije dobivene na 572 nm od apsorbancija dobivenih na 532 nm. Prije svakog očitavanja uzorka potrebno je očitati i slijepu probu. Za slijepu probu smo koristili vodu. Rezultati su uspoređeni sa kalibracijskom krivuljom izrađenom pomoću različitih koncetracija MDA standarda (*Slika 6.*). Dobivene vrijednosti apsorbancije su bile očitane u nanofotometru P330 UV/VIS, IMPLEN.

### 4.2.4 FRAP

FRAP (engl. Ferric Reducing Ability of Plasma) je spektrofotometrijska metoda pomoću koje se mjeri antioksidativni kapacitet plazme. FRAP mjeri sposobnost antioksidansa da reducira $Fe^{3+}$ ion u $Fe^{2+}$ ion u uzorku (18). Metoda se temelji na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa $Fe^{3}$ – 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) u $Fe^{2}$ – TPTZ kompleks pri čemu nastaje plavo obojeni produkt. Korišten je standardizirani protokol.

Za potrebe pokusa nužan je svježe pripremljen FRAP reagens ukupnog volumena 30 mL pripravljen od 25 mL Na - acetatnog pufera (pH vrijednosti 3,6), 2,5 mL 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), te 2,5 mL željezovog (III) klorida heksahidrata ($FeCl_3$ x $6H_2O$). Reagens je potrebno omotati u aluminijsku foliju zbog fotosenzibilnosti TPTZ-a. Za slijepu probu korišten je FRAP reagens bez dodavanja uzorka. U reagens volumena 1,125 mL dodali smo 37,5 µL uzorka u jednokratnu kivetu za spektrofotometar. Nakon četiri minute očitane su vrijednosti apsorbancije na spektrofotometru na valnoj duljini od 593 nm. Postupak smo ponovili za sve uzorke. Dobivene vrijednosti apsorbancije su bile očitane u nanofotometru P330 UV/VIS, IMPLEN. Rezultati su uspoređeni sa kalibracijskom krivuljom izrađenom uporabom različitih razrijeđenja askorbinske kiseline (vitamin C) i destilirane vode (*Slika 9.*).



*Slika 5*. Nanofotometar P330 UV/VIS, IMPLEN. (Izvor slike: Slikano u laboratoriju za fiziologiju i imunologiju, Katedra za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku)

### 4.3 Statističke metode

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Normalnost distribucije podataka ispitana je Kolmogorov–Smirnovljevim testom. Podatci kontrolnih stanica i stanica izloženih hiperbaričnoj oksigenaciji uspoređeni su t-testom u slučaju normalne distribucije, a Wilcoxon rank-sum testom ukoliko podatci nisu normalno distribuirani. Kao prag statističke značajnosti je $p < 0,05$. Veličina uzorka određena je prema prijašnjim studijama provedenim na Katedri za fiziologiju i imunologiju. Za analizu je korišten SigmaPlot, v11.2 (Systat Software,Inc., Chicago, IL, SAD)

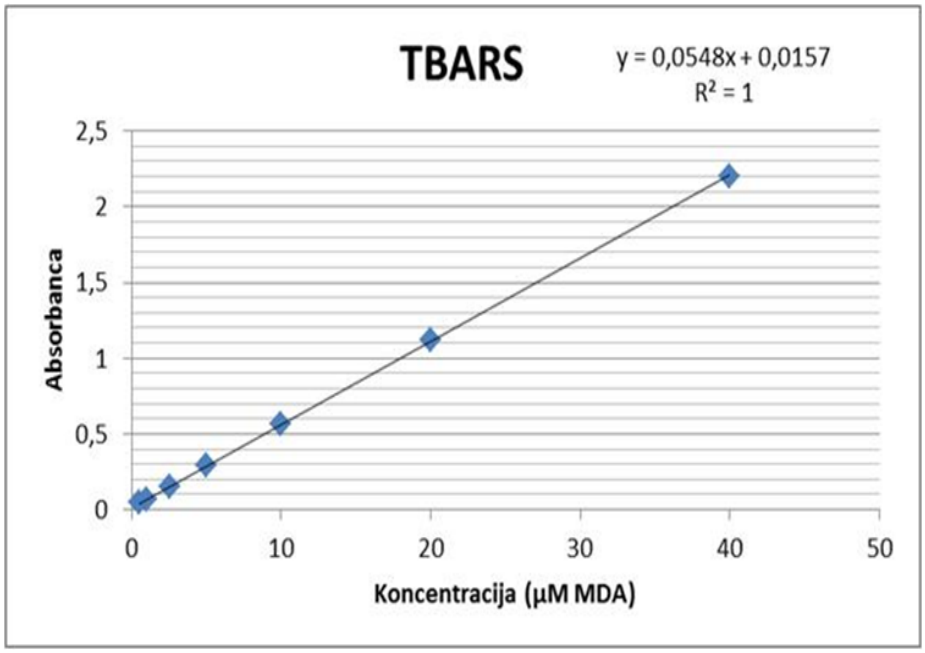
# 5. REZULTATI

Za potrebe istraživanja prikupljena su ukupno 24 uzorka stanica za metodu TBARS, te 23 uzorka za metodu FRAP. Uzorci su bili podijeljeni na kontrolnu skupinu (CTRL, n = 4) i skupinu u kojoj su stanice izložene akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (HBO, n = 8). Spektrofotometrijsko mjerenje provedeno je na uzorcima stanica i medija posebno. Rezultati su uspoređivani Student t-testom.

## 5.1 TBARS

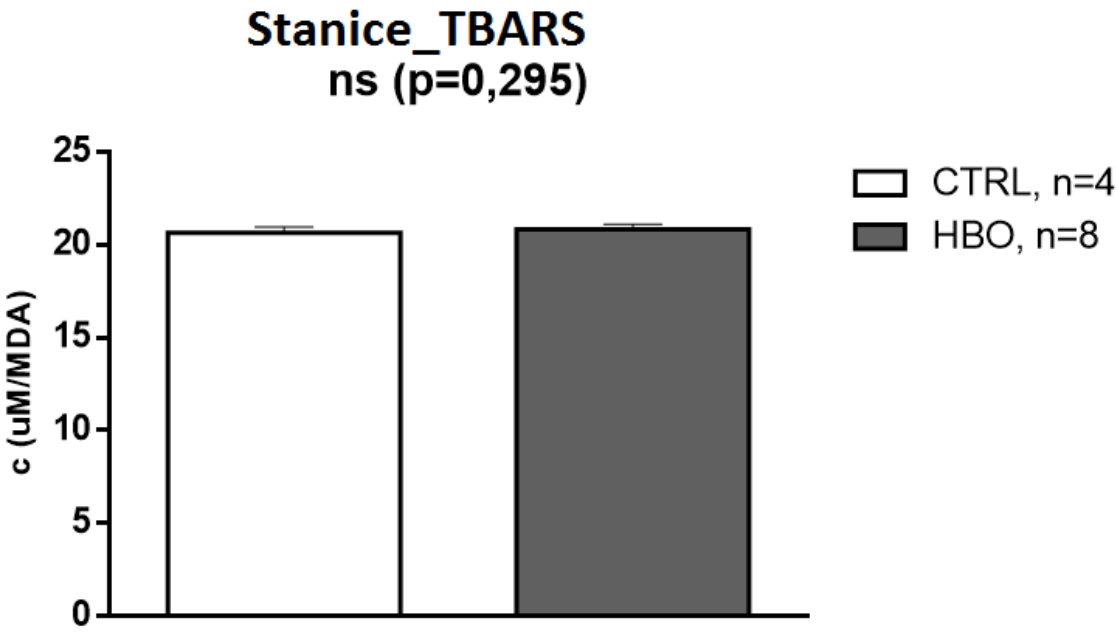
Za metodu TBARS uzorci su bili podijeljeni na kontrolnu skupinu stanica (n = 4) i skupinu stanica izloženih $HBO_2$ (n = 8) te kontrolnu skupinu medija (n = 4) i skupinu medija izloženu $HBO_2$ (n = 8) što su ukupno 24 uzorka.

Dobivene vrijednosti u uzorcima očitane su pomoću kalibracijske krivulje za TBARS (*Slika 6.*). Kalibracijska krivulja prikazuje ovisnost koncentracije MDA (x - os) o apsorbanciji (y - os). Jednadžba pravca je y = 0,0548 x + 0,0157 uz reprezentativnost $R^2 = 1$.



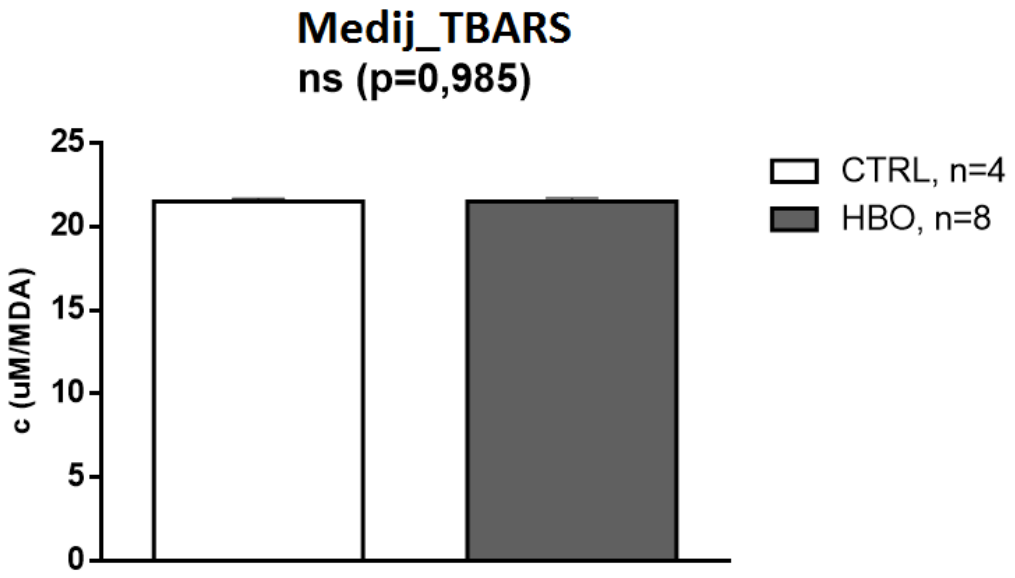

*Slika 6.* Prikaz kalibracijske krivulje za TBARS

Slika 7. prikazuje rezultate ispitivanih skupina stanica za TBARS metodu. Rezultati prikazuju da nema statistički značajne razlike između kontrolne skupine stanica i skupine stanica izložene akutnoj $HBO_2$ ($p = 0,295$). Podatci su predočeni kao aritmetička sredina kojoj je dodana jedna standardna devijacija (SD).




*Slika 7.* Prikaz rezultata ispitivanih skupina stanica za TBARS metodu.

Slika 8. prikazuje rezultate ispitivanih skupina medija za TBARS metodu. Rezultati prikazuju da nema statistički značajne razlike između kontrolne skupine medija i skupine medija izložene akutnoj $HBO_2$ (p = 0,985). Podatci su predočeni kao aritmetička sredina kojoj je dodana jedna standardna devijacija (SD).

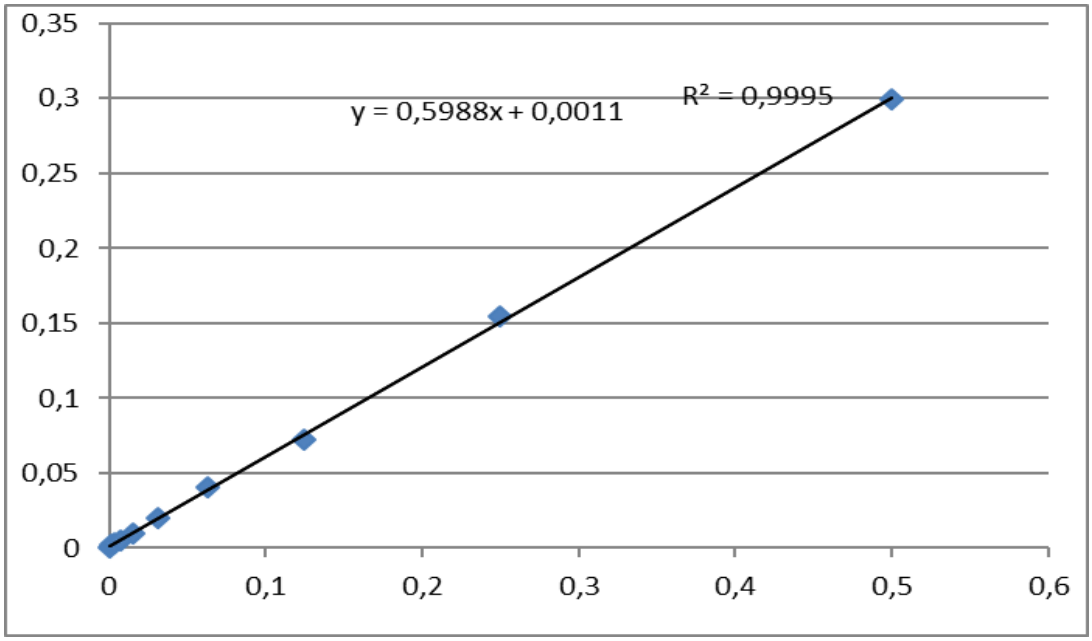



*Slika 8.* Prikaz rezultata ispitivanih skupina medija za TBARS metodu.

## 5.2 FRAP

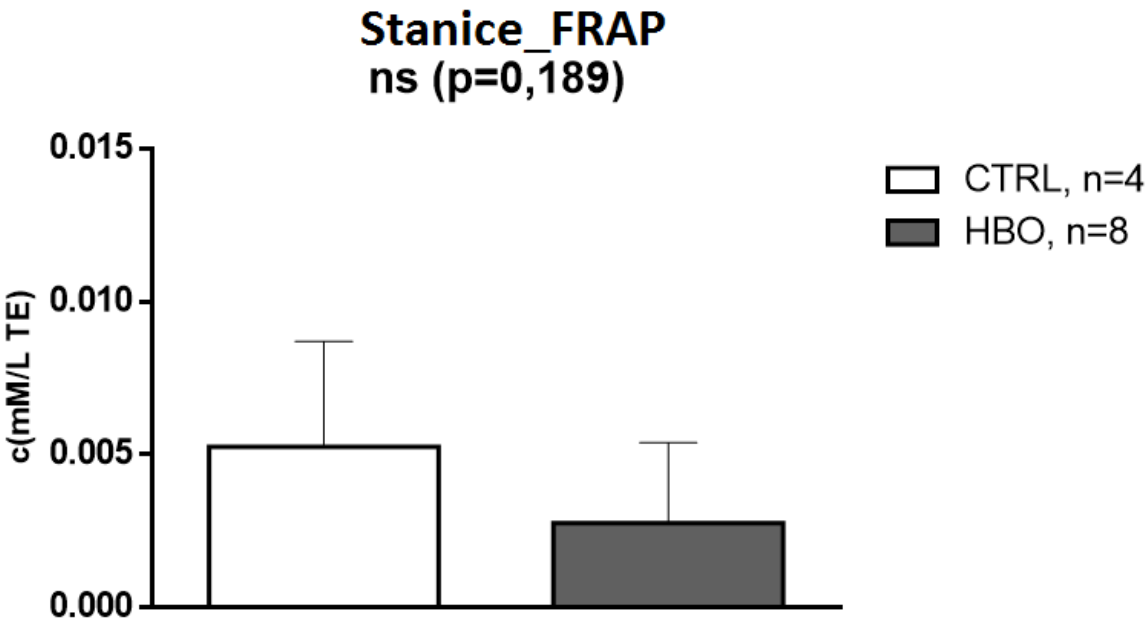
Za metodu FRAP uzorci su bili podijeljeni na kontrolnu skupinu stanica (n = 4) i skupinu stanica izložene $HBO_2$ (n = 8) te kontrolnu skupinu medija (n = 4) i skupinu medija izloženu $HBO_2$ (n = 7) što su ukupno 23 uzorka.

Dobivene vrijednosti u uzorcima očitane su pomoću kalibracijske krivulje za FRAP metodu (*Slika 9.*). Krivulja prikazuje ovisnost koncentracije vitamina C (x - os) o apsorbanciji (y - os). Jednadžba pravca je y = 0,5988 x + 0,0011 uz reprezentativnost $R^2$ = 0.9995



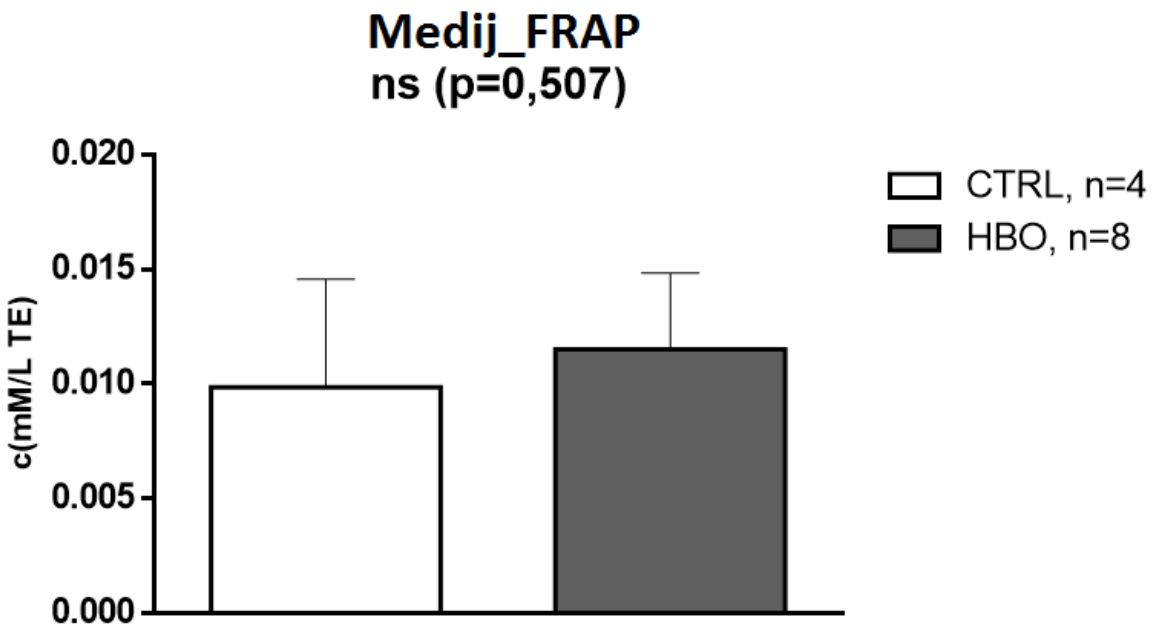

*Slika 9.* Prikaz kalibracijske krivulje za FRAP.

Slika 10. prikazuje rezultate ispitivanih skupina stanica za FRAP metodu. Rezultati prikazuju da nema statistički značajne razlike između kontrolne skupine stanica i skupine stanica izložene akutnoj $HBO_2$ (p = 0,189). Podatci su predočeni kao aritmetička sredina kojoj je dodana jedna standardna devijacija (SD)




*Slika 10.* Prikaz rezultata ispitivanih skupina stanica za FRAP metodu.

Slika 11. prikazuje rezultate ispitivanih skupina medija za FRAP metodu. Rezultati prikazuju da nema statistički značajne razlike između kontrolne skupine medija i skupine medija izložene akutnoj $HBO_2$ ($p = 0.507$). Podatci su predočeni kao aritmetička sredina kojoj je dodana jedna standardna devijacija (SD).




*Slika 11.* Prikaz rezultata ispitivanih skupina medija za FRAP metodu.

# 6. RASPRAVA

Općepoznato je da bez kisika aerobni život ne bi bio moguć (5). Za organizam ima značajnu ulogu jer omogućuje disanje. Kako je važan za vanjsko disanje, odnosno proces izmjene kisika i ugljičnog dioksida, tako je važan i za unutarstanično disanje, što predstavlja oksidacijski proces koji se odvija u stanicama (19). Iako je kisik neophodan za život aerobnih organiziama, brojnim provedenim istraživanjima je dokazano da izloženost visokoj koncetraciji kisika može biti toksična za većinu organizama (9). Posljedica visoke koncetracije kisika stvaranje je kisikovih reaktivnih vrsta (ROS-a), što dovodi do razvoja oksidativnog stresa u stanicama, a što dalje dovodi do ubrzanog starenja, odnosno propadanja stanica. Osnovne osobine molekula ROS-a su vrlo kratak poluživot, niska specifičnost za reaktante i izuzetno velika reaktivnost. Velika kemijska reaktivnost ROS-a, odnosno njihovo štetno djelovanje potječe iz potrebe da postignu elektronsku stabilnost i zato reagiraju s prvom stabilnom molekulom, uzimajući njezin elektron stvarajući novi slobodni radikal. Susjedne molekule postaju nestabilne i dalje reagiraju sa susjednim molekulama što rezultira oštećenjem staničnih struktura (3). Mogu se brzo i nepredvidivo spajati s bilo kojom blisko prostornom molekulom proteina, lipida, ugljikohidrata ili nukleinske kiseline i pokrenuti nastajanje novih spojeva. ROS se stvara prvenstveno tijekom procesa oksidativne fosforilacije u mitohondrijima (3). Velike količine ROS-a u stanici ili njihovo nedovoljno učinkovito uklanjanje izazivaju oksidativni stres koji može oštetiti biološke makromolekule i uzrokovati metaboličke poremećaje (6).

U stanjima oksidativnog stresa dolazi do oštećenja nukleinskih kiselina (DNA), lipida i proteina. Oštećenje DNA u stanicama dovodi do razvoja raznih genskih mutacija, oksidacijom kod proteina dolazi do strukturnih promjena te gube funkciju, a lipidi podliježu lipidnoj peroksidaciji čiji su konačni produkti reaktivni aldehidi (3,5). Oksidativni stres smatra se jednim od važnijih faktora u razvoju kroničnih bolesti i malignih oboljenja. Razvoj raka kod ljudi se smatra jako složenim procesom koji uključuje razne stanične i molekularne promjene koje nastaju raznim endogenim i egzogenim djelovanjima na organizam. U raznim prijašnjim studijama dokazano je da nastanak raka povezan s oksidativnim oštećenjem DNA. Također kod kardiovaskularnih bolesti razne studije *in vivo* i *ex vivo* su pokazale da je oksidativni stres usko povezan u nastanku brojnih kardiovaskularnih bolesti kao što su ateroskleroza, hipertenzija, kardiomiopatija, hipertrofija srca i kongestivno zatajenje srca. Oksidativni stres ima važnu ulogu i u neurološkim stanjima poput Alzhimerove bolesti, Parkinsonove bolesti, multiple skleroze, amiotrofne lateralne skleroze, gubitka pamćenja i depresije. Brojna klinička i eksperimentalna istraživanja kod Alzheimerove bolesti pokazala su da oksidacijska oštećenja

imaju ključnu ulogu u gubitku neurona i razvoju demencije. Također postoje razne studije gdje se oksidativni stres povezuje s plućnim bolestima poput astme i kronične opstruktivne plućne bolesti, reumatoidnog artritisa, bubrežnih bolesti poput glomerulonefritisa i kroničnog zatajenja bubrega, očnih bolesti i drugih (5).

Iako može biti štetan, kisik je danas često primjenjivana terapija kao lijek za razna patološka stanja kao što su upale, infekcije i drugo. $HBO_2$ kao neinvazivna, je često primjenjivana terapija u liječenju raznih stanja u kojima je izražena hipoksija. Tkivna hipoksija ima ulogu u patogenezi mnogih poremećaja, osobito poremećaja mozga (9). $HBO_2$ se jako dugo primjenjuje u liječenju moždanog udara, te se pokazala kao sigurna i uspješna metoda (12). U kliničkoj praksi $HBO_2$ je od posebnog značaja kod postoperativnih infekcija srednjeg živčanog sustava i apscesa mozga. Učinak hiperoksigeniranja tkiva je smanjenje edema. Kisik također ima i baktericidno djelovanje je ometa metabolizam bakterija. Ima najučinkovitije djelovanje kod infekcija anaerobnim mikroroganizmima. Korištenjem $HBO_2$ sposobnost leukocita i fagocitoza se poboljšava. Također može pojačavati djelovanje nekih antibiotika (9). Terapija $HBO_2$ ima pozitivan učinak i kod liječenja od posljedica trovanja ugljičnim monoksidom, plinske gangrene, dekompresijske bolesti, okluzija središnje arterije mrežnice, potiče cijeljenje kroničnih rana (20). Za terapiju $HBO_2$ nema standardnog protokola i vrijeme izlaganja ovisi o stanju koje se liječi. Dosadašnja provedena istraživanja pokazala su različite rezultate primjene terapije $HBO_2$, ovisno o vremenu izlaganja i primjenjenom protokolu.

U ovom istraživanju ispitivan je utjecaj akutne hiperbarične oksigenacije na HeLa staničnoj liniji, a rezultati su uspoređeni s kontrolnom skupinom HeLa stanica koje nisu bile izlagane $HBO_2$. Za potrebe istraživanja kulture su bile izložene dva sata na 2 bara pri temperaturi od 20°C u hiperbaričnoj komori. Mjerenje oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta stanica određeno je po standardiziranom protokolu prethodno opisanim spektrofotometrijskim metodama TBARS i FRAP.

Metodama TBARS-a i FRAP-a provedena su mjerenja oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta i na stanicama i na mediju. Rezultati mjerenja su uspoređeni s standardnom krivuljom. Rezultati prikazuju da izlaganje $HBO_2$ nema statistički značajno velikog utjecaja na razinu oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta na HeLa stanicama što ne potvrđuje početno postavljenu hipotezu ovog istraživanja. Ostaje nepoznanica zašto razina oksidativnog stresa u ispitivanoj skupini nakon akutnog izlaganja $HBO_2$ ostaje gotovo jednaka kao i u kontrolnoj skupini.

# 7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja na HeLa staničnim kulturama te uspoređujući dobivene rezultate kontrolnih skupina HeLa stanica i skupina izloženih akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji dolazimo do sljedećeg zaključka:

Akutna hiperbarična oksigenacija ne podiže razinu oksidativnog stresa u HeLa stanicama.

# 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Utvrditi promjene razine oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta stanica mjerenjem TBARS-a (engl. Thiobarbituric Acid Reactive Substances) i FRAP-a (engl. Ferric Reducing Ability of Plasma) u HeLa staničnim kulturama izloženim akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji.

**Materijali i metode:** U istraživanju korištene su HeLa stanične kulture podijeljene u dvije skupine: Kontrolne (n = 4) i akutno izložene $HBO_2$ (n = 8). Za određivanje razine oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta stanica korištene su spektrofotomerijske metode TBARS i FRAP.

**Rezultati:** Dobiveni rezultati prikazuju da nema statistički značajne razlike između kontrolne skupine i skupine stanica izložene $HBO_2$ (stanice p = 0,295 TBARS, p = 0,189 FRAP i medij p = 0,985 TBARS, p = 0,507 FRAP).

**Zaključak:** Akutna hiperbarična oksigenacija ne podiže razinu oksidativnog stresa u HeLa stanicama.

**Ključne riječi:** oksidativni stres, hiperbarična oksigenacija, HeLa stanice, TBARS, FRAP

# 9. SUMMARY

**Objectives:** The aim of this research was to determine the changes in oxidative stress levels and cellular antioxidant capacity by measuring TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) and FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) in HeLa cell cultures exposed to acute hyperbaric oxygenation.

**Materials and methods:** The study included HeLa cell cultures, divided into two groups: Control (n = 4) and Acute $HBO_2$ (n = 8). TBARS and FRAP spectrophotometric methods were used to determine the oxidative stress level and antioxidant cell capacity.

**Results:** The results show there is no statistically significant difference between the control group and the group of cells exposed to $HBO_2$ (p=0.295 TBARS, p=0.189 FRAP and p=0.985 TBARS, p=0.507 FRAP).

**Conclusion:** Acute hyperbaric oxygenation does not raise the level of oxidative stress in HeLa cells.

**Keywords:** oxidative stress, hyperbaric oxygenation, HeLa cells, TBARS, FRAP

# 10. LITERATURA


1. Štraus B, Barišić K, Čepelak I, Čvorišćec D, Dodig S, Đurić K, Fumić K, Petlevski R,Petrik J, Plavšić F, Plavšić V, Rogić D, Rumora L, Trbojević-Čepe M, Žuntar I, Wolf A. Štrausova Medicinska biokemija. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.

2. Murray RK, Bender DA, Botham KM , Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Haperova ilustrirana biokemija. 28. izd. Lovrić J, Sertić J, urednik. Zagreb: Medicinska Naklada; 2011.

3. P Parčetić -Kostelac I, Bešlo D, Šperanda M, Kopačin T, Jozinović A, Jović T, i sur. Oksidacijski stres u uvjetima intezivnog fizičkog napora u ljudi i životinja. ; 2016.

4. Ćosić A, Novak S, Jukić I, Stupin A, Mihaljević Z, Rašić L, i sur. Primjena laboratorijskih metoda u dijagnosticiranju oksidativnog stresa na primjeru animalnog modela prekomjernog unosa soli. Cardiologia Croatica. 2017; 12(3): str. 78.

5. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. International journal of Biomedical science. 2008; 4(2): str. 89-96.

6. Štefan L, Tepšić T, Zavidić T, Urukalo M, Tota , Domitrović R. Lipidna peroksidacija-uzroci i posljedice. Medicina. 2007;(43): str. 84-93.

7. Kibel A, Novak S, Cosic A, Mihaljevic Z, Falck JR, Drenjancevic I. Hyperbaric oxygenation modulates vascular reactivity to angiotensin-(1-7) in diabetic rats:Potential role of epoxyericosatrienoic acids. Diabetes & Vascular Disease Research. 2015; 1(12): str. 33-45.

8. Heyboer M, Sharma D, Santiago W, McCulloch N. Hyperbaric Oxygen Therapy: Side Effects Defined and Quantified. Advances in Wound Care. 2017; 6(6): str. 210-224.

9. Bilić I Petri NM. Hiperbarična oksigenacija u liječenju infekcija središnjeg živčanog sustava. Croatian Journal of Infection. 2013; 33(4): str. 177-181.

10. Thom SR. Hyperbaric oxygen: Its mechanisms and efficacy. Plastic and Reconstructive Surgery. 2011;(127): str. 131-141.

11. Sharkey S. Current indications for hyperbaric oxygen therapy. ADF Health; 2000.

12. Zhai WW, Sun L, Yu ZQ, Chen G. Hyperbaric oxygen therapy in experimental and clinical stroke. Medical Gas Research. 2016; 6: str. 111-118.

13. Patel DN, Goel A, Agarwal SB, Garg P, Lakhani KK. Oxygen Toxicity. JIACM. 2003; 4(3): str. 234-237.

14. Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM. HeLa Cells and Cell Culture Contamination. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 2009;(133): str. 1463-1467.

15. Landry JJM, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM, i sur.. The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line. G:3 Genes|Genomes|Genetics. 2013; 3(8): str. 1213-1224.

16. The good, the bad, and the HeLa - The Berkeley Science Review. Datum pristupa: 26. 11. 2018 Dostupno na adresi: http://berkeleysciencereview.com/article/good-bad-hela/.

17. 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. Aquatic Toxicology. 2003;(63): str. 447–463.

18. Benzie Iris F F, Strain J J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. ; 1996.

19. N P. http://biologija.com.hr.; 2013 Datum pristupa: 7. 6. 2019. Dostupno na adresi: http://biologija.com.hr/modules/AMS/article.php?storyid=9008.

20. oxy.hr ; Datum pristupa: 8. 7. 2019. Dostupno na adresi: http://oxy.hr/hiperbaricna-oksigenacija-hbot/lijecenje-kisikom/lijecenje-primjenom-hiperbaricne-oksigenacije.

# 11. ŽIVOTOPIS

Ante Perica

Datum rođenja i mjesto rođenja: 18. rujna 1992., Zadar

Adresa: Put kotarskih serdara 30, 23000 Zadar, Hrvatska

Adresa e-pošte: a.perica992@gmail.com

JMBAG: 1003098075

Obrazovanje:

1999. – 2007. Osnovna škola Bartula Kašića, Zadar

2007. – 2011. Srednja zubotehnička škola Dental Centar Marušić, Split

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

2016. – 2019. Diplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku