

Promjene proteinskog izražaja antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora pod utjecajem tretmana hiperbarične oksigenacije

Zucić, Jasminka

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:696586>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Jasminka Zucić

PROMJENE PROTEINSKOG IZRAŽAJA
ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA U
KRVNIM ŽILAMA MOZGA SPRAGUE-
DAWLEY ŠTAKORA POD UTJECAJEM
TRETMANA HIPERBARIČNE
OKSIGENACIJE

Diplomski rad

Osijek, 2019.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Jasminka Zucić

**PROMJENE PROTEINSKOG IZRAŽAJA
ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA U
KRVNIM ŽILAMA MOZGA SPRAGUE-
DAWLEY ŠTAKORA POD UTJECAJEM
TRETMANA HIPERBARIČNE
OKSIGENACIJE**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu Osijek, na Katedri i zavodu za fiziologiju i imunologiju.

Mentorica rada: doc. dr. sc. Anita Matić, dipl. ing., Katedra i zavod za fiziologiju i imunologiju

Neposredna voditeljica: dr. sc. Zrinka Mihaljević, prof.

Rad ima 33 lista, 10 slika i 7 tablica.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Aniti Matić, dipl. ing. koja mi je omogućila sve potrebno za izvođenje istraživanja i pisanje diplomskog rada. Hvala joj na strpljenju, savjetima i pomoći koji su mi pomogli u pisanju rada. Također zahvaljujem i neposrednoj voditeljici dr. sc. Zrinki Mihaljević, prof. na pomoći tijekom provedbe istraživanja i pisanja rada. Posebnu zahvalnost upućujem svojoj obitelji, roditeljima, suprugu Bruni i sinovima Luki i Anti bez kojih sve ovo što sam postigla ne bi bilo moguće.

Velika hvala svima!

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Hiperbarična oksigenacija	1
1.2 Oksidativni stres i slobodni kisikovi spojevi.....	2
1.3 Oksidativni stres.....	2
1.4. Western blot metoda.....	4
1.4.1. Proteini.....	4
2. HIPOTEZA.....	6
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	7
4. MATERIJALI I METODE.....	8
4.1. Materijali.....	8
4.2 Metode.....	9
4.2.1. Protokoli za izlaganje hiperbaričnom kisiku.....	9
4.2.2. Metode.....	9
4.2.3. Izolacija uzorka.....	10
4.2.4. Izolacija proteina.....	10
4.2.5. Kvantifikacija proteina.....	12
4.2.6. Western blot metoda.....	12
4.2.7. Prijenos proteina na membranu.....	14
4.2.8. Inkubacija s protutijelima.....	14
4.2.9. Kemiluminiscencijska detekcija.....	14
4.2.10. Statistička analiza.....	15
5. Rezultati.....	16
5.1 Tjelesna masa životinja.....	16
5.2. Relativan proteinski izražaj antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga...	17
5.2.1. Proteinski izražaj SOD izoformi.....	17
5.2.2. Proteinski izražaj GPx4.....	21
5.2.3. Proteinski izražaj katalaze.....	22
6. RASPRAVA.....	24
7. ZAKLJUČCI.....	27
8. SAŽETAK.....	28

9. SUMMARY.....	29
10. LITERATURA.....	30
11. ŽIVOTOPIS.....	33

Kratice

BSA	albumin goveđeg seruma
CAT	katalaza
GSH	glutation
GpX	glutation peroksidaza
HBOT	hiperbarična oksigenacija
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
O ₃	ozon
OH•	hidroksi radikal
O ₂	singletni kisik
PVDF	poliviniliden difluorid
ROS	reaktivni kisikovi spojevi
SDS	natrijev dodecil sulfat
SOD	superoksid dismutaza

1. UVOD

1.1. Hiperbarična oksigenacija

Nema lijeka koji može povećati količinu kisika u krvi. Jedina znanstveno utemeljena metoda koja se provodi jest udisanje čistog, medicinskog (stopostotnog kisika) u hiperbaričnoj komori pri tlaku većem od jednog bara.

Udisanjem hiperbaričnog kisika dobije se i do dvadeset puta više kisika otopljenog u krvi nego pri normalnom disanju. Difuzijom kisika otopljenog u krvi prema tkivima velikom se brzinom ispravlja hipoksija. Mnogo bolesti i neka stanja u svojoj osnovi imaju nedostatak kisika – hipoksiju. Kako bi stanice preživjele i kako bi se uspostavila normalna funkcija, potrebno je ukloniti taj nedostatak. Kisik je neophodan za odvijanje za svih životnih procesa. Primjena kisika u hiperbaričnoj komori sprječava oštećenje stanica i organizma u cjelini (1).

Djelovanje hiperbarične oksigenacije:

HBO difuzno povećava količinu kisika u stanici na račun otopljenog kisika u plazmi čime se korigira hipoksija i smanjuje upalna reakcija tkiva. HBO poboljšava cirkulaciju krvi, povećava elastičnost membrane eritrocita, smanjuje agregaciju trombocita i leukocita te ubrzava neoangiogenezu. Povećava obrambene sposobnosti organizma, fagocitnu sposobnost leukocita, ima bakteriostatsko i baktericidno djelovanje. Također, potencira djelovanje određenih antibiotika, antiaritmika i citostatika.

Ima snažan antiedematozni učinak, izazivajući vazokonstrikciju i brži oporavak intraendotelnih kompleksa krvnih žila. Podiže razinu antioksidativne obrane organizma i normalizira energetske, metaboličke i funkcionalne procese u stanici. Povećava osjetljivost na ionizirajuće zračenje, ometa stvaranje toksičnih metabolita i potiče detoksikaciju hemoglobina, mioglobina i citokromooksidaze.

HBO omogućava brže zarastanje kroničnih rana, ubrzava regeneraciju živčanoga tkiva, smanjuje grčeve, poboljšava psihofizičku kondiciju i djeluje protustresno pa se koristi kod sportaša za brži oporavak nakon ozljeda (1, 2).

1.2. Oksidativni stres i slobodni kisikovi spojevi

Kisik je neophodan svakom živom organizmu, ali u velikoj je količini štetan i opasan po život. Oksidativni stres može se definirati kao poremećaj ravnoteže između slobodnih kisikovih spojeva i antioksidativne obrane. U ravnotežnim uvjetima slobodni radikali razgrađuju se staničnim antioksidansom uz pomoć enzima, kao što su primjerice superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutacion peroksidaza (GpX) ili neenzimski, uz pomoć glutationa (GSH) (3).

Oksidativni je stres stanje u kojem oksidativni procesi prevladavaju antioksidativne sposobnosti tkiva ili organizma. U konačnici oksidativni stres dovodi do bioloških makromolekula (lipida, proteina, ugljikohidrata ili DNA), do poremećaja homeostaze unutar stanice, a kao posljedica javlja se oštećenje tkiva (4).

Slobodne kisikove spojeve (ROS) stvaraju mitohondriji stanica živih organizama u kojima se nalazi transportni lanac elektrona za proizvodnju energije u stanici. Fiziološki ROS u niskim koncentracijama važan je za rast stanice, diferencijaciju i apoptozu (5).

Unutar stanice tijekom metaboličkih procesa stvara se nekoliko jakih oksidansa: superoksidni anion (O_2^-), hidroksi radikal ($OH\bullet$) i molekule koje nisu slobodni radikali, ali po specifičnim uvjetima to mogu biti: vodikov peroksid (H_2O_2), hiperkloridna kiselina ($HClO$), ozon (O_3) i singletni kisik (O_2). Oni su iznimno reaktivni oksidansi i reagiraju s molekulama proteina, DNA, lipida, ugljikohidrata i mogu uzrokovati poremećaje unutarstaničnih membrana, transformaciju stanice, ubranu proteolizu i apoptozu (6,7).

1.3. Oksidativni stres

Antioksidansi su spojevi koji sprječavaju nastanak prooksidansa, uklanjaju ih iz svoje okoline ili zaustavljaju njihove reakcije. Pod definicijom antioksidansa podrazumijevaju se sve tvari koje mogu spriječiti ili smanjiti oksidaciju supstrata (8). Predstavljaju male molekule koje mogu izbaciti slobodne radikale tako da prihvate ili daju elektrone koji sprječavaju ili ublažavaju štetna stanja uzrokovana ROS-om.

Antioksidanse možemo podijeliti u tri skupine. Primarnu skupinu čine oni koji omogućuju nastajanje ROS-a, a sekundarnu oni koji uništavaju stvorene slobodne radikale. Tercijarnu skupinu čine antioksidansi koji ispravljaju učinjenu štetu, tj. oštećenje stanica (9).

Tablica 1. Podjela antioksidansa (10)

Izvanstanični	
transferin laktoferin	Vežu Fe ³⁺
haptoglobin hemopeksin	Vežu hemoglobin, odnosno hem.
ceruloplazmin	Veže bakar i katalizira oksidaciju Fe ²⁺
urati	Vežu organske i anorganske ROS.
Stanični	
Enzimi: superoksid dismutaza, Sod, Zn, Cu SOD, Mn SOD	Kataliziraju prevođenje superoksidnog radikala u vodikov peroksid.
katalaza glutation peroksidaza	Katalizira prevođenje vodikova peroksida u molekulu vode i kisika. Uz pomoć glutaciona, GSH, uklanja vodikov peroksid i lipidne peroksidge.
askorbinska kiselina	Reverzibilni je oksidoredukcijski sustav – reducira α -tokoferolni radikal, peroksidge i ostale radikale.

Antioksidativna je zaštita važna u uklanjanju slobodnih radikala jer osigurava maksimalnu zaštitu bioloških mjesta poput tiolnih skupina koje su dio aktivnih mjesta u nekim metabolizirajućim enzimima (11, 12).

Antioksidativni obrambeni sustav ima važnu ulogu u opsegu sveukupnog djelovanja oksidacijskog stresa. Prema mehanizmu djelovanja u organizmu antioksidansi se mogu podijeliti na neenzimske i enzimске (8). Enzimski antioksidansi kataliziraju prevođenje superoksidnog radikala u vodikov peroksid, izravno su uključeni u neutralizaciju ROS, a pripadaju im: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPX) i glutation reduktaza (GRx) (13, 14).

Superoksid dismutaza (SOD) katalizira dismutaciju superoksidnog aniona, radikala (O_2^-) u vodikov peroksid (H_2O_2) (14). Katalaza (CAT) se nalazi u svim živim bićima. Sastoji se od četiriju identičnih podjedinica od kojih svaka sadrži atom željeza koji predstavlja aktivno mjesto enzima. Glavna je uloga katalaze razgradnja vodikova peroksida putem katalaznog ili peroksidaznog oblika reakcije (15). Glutation peroksidaza (GPX) skupina je osam (GPx1-8) enzima koji su važni za prevođenje i smanjenje razine H_2O . GPx su selenocistein enzimi koji koriste glutation kao redukcijsko sredstvo. U mozgu se selenoproteini GPx 1-3, GPx 1 i 4 nalaze u mitohondrijima, jezgri i citoplazmi. Glutation peroksidaza smanjuje razinu vodikova peroksida samostalnim djelovanjem, ali učinkovitije smanjuje toksičnost egzogenog vodikova peroksida zajedničkim djelovanjem (16).

Neenzimski se antioksidansi nazivaju još i preventivnim. Oni sprječavaju stvaranje slobodnih radikala u stanicama. U neenzimske – preventivne enzime ubrajaju se specifični tkivni proteini: feritin, laktoferin, metal-kelirajući proteini, koenzim Q10 itd. (17, 18)

1.4. Western blot metoda

Western blot metoda označava metodu identifikacije određenih proteina ili određivanja važnih obilježja proteinskih antigena iz otopine proteina ekstrahiranih iz stanica. Metoda se sastoji od triju postupaka: elektroforeze na poliakrilamidnom gelu (*engl. Polyacrylamide gel, electrophoresis; PAGE*), prijenosa proteina na membranu, imunodetekcije proteina na membrani (19).

1.4.1. Proteini

Proteini (od grčke riječi *protos* – zauzimanje prvo mjesto) građevni su materijal ljudskoga tijela. Vrlo su različiti i specifični za pojedina tkiva i organe. Sastavljeni su od aminokiselina međusobno povezanih peptidnim vezama. Sastoje se od ugljika, vodika, kisika, dušika i katkad sumpora, fosfora i raznih metala. Metali se nalaze uglavnom u enzimima. Za proteine je karakteristično da sadržavaju dušik, i to u poprilično konstantnom omjeru od oko šesnaest posto cjelokupnih proteina (19).

Prema sastavu, proteini se dijele na jednostavne i složene proteine ili proteide. Jednostavni su proteini izgrađeni samo od aminokiselina, a proteidi ili konjugirani proteini sadržavaju, osim svoje proteinske strukture, i tzv. neproteinsku ili prostetičnu skupinu (20).

Slijed (sekvencija) aminokiselina karakterističan je za svaki protein. Drugim riječima, svaki protein ima određeni slijed aminokiselina (19). Varijacije u broju aminokiselina i njihovu slijedu, načinu kako su lanci nabrani i međusobno vezani omogućuju da se u organizmu nalazi vrlo mnogo raznih specifičnih proteina u pojedinim organima, tkivima i stanicama (20).

2. HIPOTEZA

Povremeno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji, u odnosu na akutno izlaganje, ima pozitivan učinak na proteinski izražaj antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga zdravih muških Sprague-Dawley štakora.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog istraživanja utvrditi promjenu proteinskog izražaja važnih antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga muških Sprague-Dawley štakora podvrgnutih različitom broju terapija hiperbaričnim kisikom.

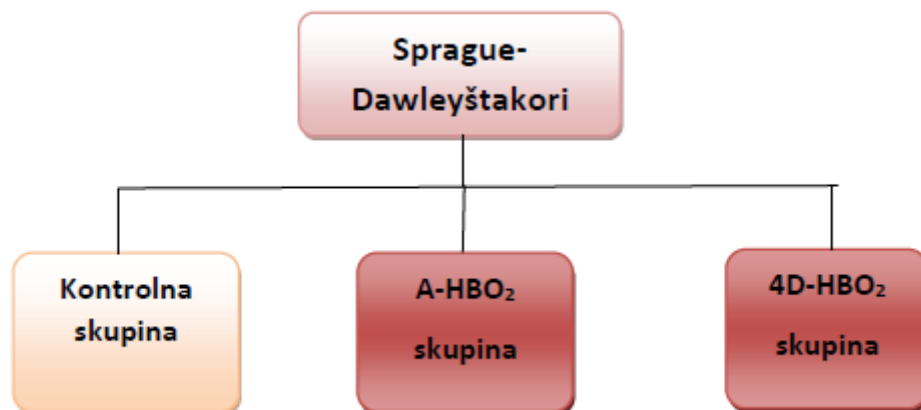
4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

Istraživanje se provodilo na zdravim Sprague-Dawley štakorima muškog spola u starosti 9 – 11 tjedana. U toj dobi životinje su podijeljene u tri skupine (n = šest štakora po skupini):

- 1) KONTROLNA – zdravi netretirani štakori;
- 2) AKUTNA HIPERBARIČNA (A - HBO₂) – štakori tretirani jednom HBO₂ u barokomori (rekompresijska komora za eksperimente 11L, Đuro Đaković, Aparati d. d.) te žrtvovani odmah nakon terapije;
- 3) INTERMITENTNA HIPERBARIČNA (4D – HBO₂) – štakori izloženi hiperbaričnoj oksigenaciji četiri dana uzastopno te žrtvovani peti dan.

Svi su štakori iz vlastitog uzgoja Vivarija pri Medicinskom fakultetu u Osijeku.



Slika 1. Prikaz eksperimentalnih skupina

Sve je eksperimentalne postupke odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek (br. 2158/61-02-139/2-06) te Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske i dio su VIF projekta Medicinskog fakulteta Osijek VIF-2018-MEFOS-07 voditeljice doc. dr. sc. Anite Matić.

4.2. Metode

4.2.1. Protokoli za izlaganje hiperbaričnom kisiku

Nakon smještanja životinja u barokomoru slijedi 15 minuta kompresije na 2,0 atm otvaranjem kompresijskog ventila i puštanjem kisika u komoru. Kada se postigne tlak od 2,0 atm, zatvori se kompresijski ventil te su štakori izloženi djelovanju 100 %-tnog kisika u trajanju dva sata, nakon čega slijedi 15 minuta dekompresije otpuštanjem dekompresijskog ventila.



Slika 2. Hiperbarična komora (izvor: original autorice rada)

4.2.2. Metode

Proteinska ekspresija antioksidativnih enzima određena je korištenjem Western blot metode u uzorcima krvnih žila mozga. Metoda se temelji na specifičnom vezanju protutijela na izolirane proteine. Izolirane krvne žile mozga smrznute su u tekućem dušiku te pohranjene do izolacije na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Homogenizirani uzorci tretirani su koktelom inhibitora proteaza, centrifugirani i određena im je koncentracija ukupnih proteina pomoću Bradford assay (Sigma Aldrich) prema uputama proizvođača. U sljedećem koraku napravljena je SDS-PAGE elektroforeza i prijenos na PVDF membrane te inkubacija primarnim te sekundarnim protutijelima. Detekcija se provela

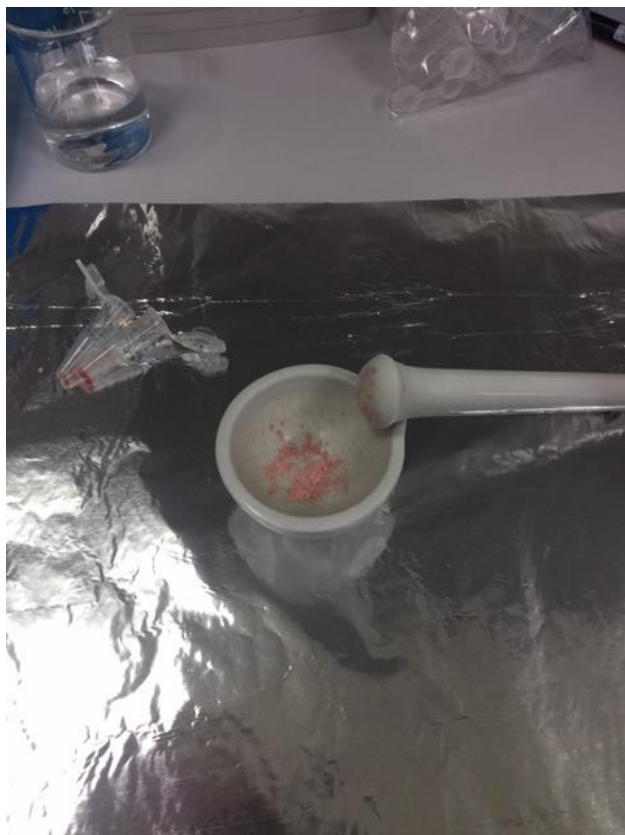
kemiluminiscencijskom metodom pomoću Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific), a signal se snimio na Bio-Rad ChemiDoc uređaju. Detektirani proteini analizirani su pomoću ImageJ programa (National Institute of Health). Za kontrolu ekspresije koristilo se mišje protuštakorsko monoklonalno Anti- β -Actin protutijelo (Sigma Aldrich).

4.2.3. Izolacija uzoraka

U istraživanju su se koristili zdravi Sprague-Dawley štakori muškoga spola starosti 9 do 11 tjedana. Prije usmrćivanja životinje su anestetizirane ketaminom (75 mg/kg) i midazolamom (2,5 mg/kg) te žrtvovane dekapitacijom. Sve je eksperimentalne postupke odobrilo Etičko povjerenstvo (br. 2158/61-02-139/2-06) i usklađeni su s Direktivom EU-a 86/609. Uzorci moždanih žila nakon izolacije smrznuti su u tekućem dušiku i pohranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do izvođenja pokusa. Uzorci su prikupljeni u Vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku i Laboratoriju za mikrocirkulaciju. Pokusi promjene proteinskog izražaja antioksidativnih enzima provedeni su u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju u sklopu Medicinskog fakulteta u Osijeku.

4.2.4. Izolacija proteina

Uz pomoć pincete i škara dobili smo uzorke krvnih žila koje smo pohranili u Eppendorf-tubice. Krvne žile mozga dviju životinja činile su jedan uzorak za Western blot metodu. Upotrebom tekućeg dušika proveli smo homogenizaciju tkiva tako da smo uzorke krvnih žila mozga u tarioniku uz pomoć tučka usitnili do praškastog oblika.



Slika 3. Homogenizacija uzoraka (izvor: original autorice rada)

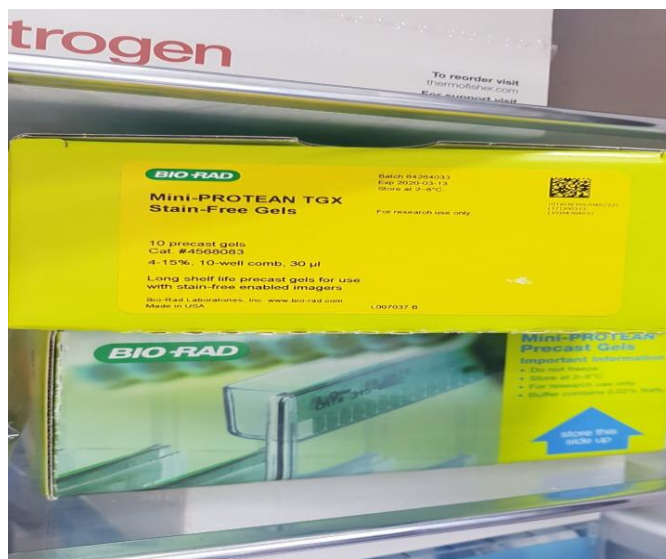
Nakon toga 100 mg uzorka (usitnjeno tkivo krvnih žila mozga) pomiješano je s 1 ml homogenizacijskog pufera. Homogenizacijski pufer sadržavao je 10 ml tris—a (Fischer Scientific, Belgija), 1 mM EDTA, 0,4 % SDS-a (AcrosOrganics, SAD) i koktel inhibitora proteazu u koktelu 0,4 μ l/100 μ l (Sigma Aldrich). Da uzorak ne interferira s Bradfordom (reagens za određivanje koncentracije proteina), dodaje se Triton-X u volumnom udjelu od 0,062 %. Maseni udio SDS-a smanjen je na 0,1 % da određivanje po Bradfordu bude pravilnije. Zbog mogućnosti razgradnje proteina, uzorcima je dodan koktel inhibitora proteaze (1 tableta u 1,5 ml dHO). Nakon toga izmiješani su na miješalici (Vortexu) i dodatno homogenizirani mehaničkim homogenizatorima (IKA Thurax) na 4 °C. Nakon toga uzorci su centrifugirani na 17 000 g kroz 30 minuta na 4 °C. Alikvotirani supernatanti čuvaju se do analize na – 80 °C.

4.2.5. Kvantifikacija proteina

Koncentracija ukupnih proteina u supernatantu homogeniziranih uzoraka određena je pomoću Bradford metode koja se temelji na reakciji proteina s bojom Coomassie Brilliant Blue, G-(250) (CBB). CBB pokazuje svojstvo reagiranja s pobočnim grupama ARG, ali i s pobočnim grupama HIS, LYS, TYR, TRP i Phe. Dolazi do promjene boje iz smeđe u plavu, a dolazi i do pomicanja apsorpcijskog maksimuma s 460 nm na 595 nm. Intenzitet bojenja proporcionalan je koncentraciji proteina u uzorku. Da bismo odredili nepoznatu koncentraciju proteina, napravili smo kalibracijsku krivulju i iz nje očitali nepoznatu koncentraciju. Albumin goveđeg seruma – BSA – koristio se kao standardna otopina.

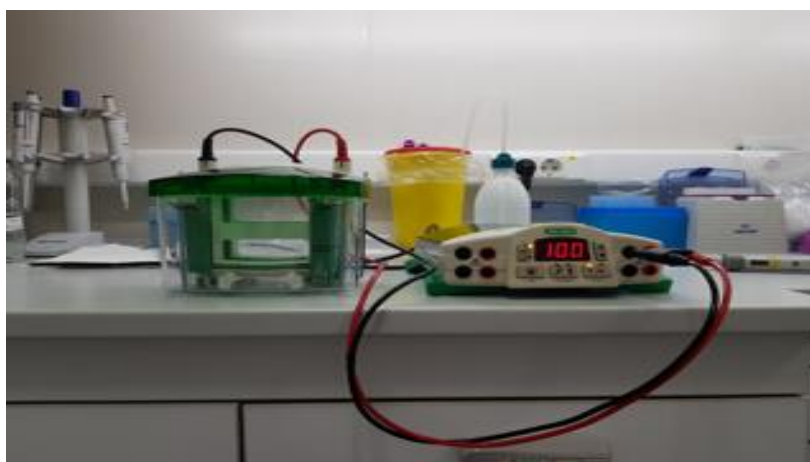
4.2.6. Western blot metoda

Za provedbu pokusa koristili smo Western blot metodu koja se sastoji od nekoliko koraka. Prvi je korak SDS denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE elektroforeza), drugi je prijenos proteina na membranu, treći je korak inkubacija protutijelima, a četvrti kemiluminiscenijska detekcija. Elektroforeza je usmjereno gibanje električno nabijenih molekula kroz potporni medij (gel) pod utjecajem električnog polja. Taj način omogućuje razdjeljivanje molekula DNA, RNA ili proteina. Putovanje molekula kroz gel ovisi o gustoći gela, struji, temperaturi, veličini i konformaciji molekula. U ovom pokusu upotrijebljeni su komercijalno dostupni gelovi Mini-Protein TGX Stain- Free Gels (Bio-Rad).



Slika 4. Gelovi Mini-Protein TGX Stain- Free Gels (izvor: originalni rad autorice)

Sastavili smo sustav za elektroforezu koji je postavljen u kadu koja je napunjena puferom za elektroforezu (tris-baza, glicin, SDS 10x stock, pH = 8,3). Puferom smo prekrili jažice. Elektroforeza je trajala tri sata na 100 V pri temperaturi od 4 °C.



Slika 5. Sustav za elektroforezu (izvor: originalni rad autorice)

4.2.7. Prijenos proteina na membranu

Nakon razdvajanja proteina elektroforezom prebačeni su na PVDF (poliviniliden difluorid) membranu uz pomoć kazete za prijenos. Prijenos proteina provodi se jedan i pol sat na 200 mA na temperaturi 4 °C. Nakon prijenosa membrane su obojene uranjanjem u boju Amid-BlueBlack zbog vizualizacije proteina. Odmah nakon toga stavili smo ih u kadnicu za odbojavanje koja sadrži propanol, octenu kiselinu i destiliranu vodu. Cijeli postupak napravljen je tri puta po pet minuta.

4.2.8. Inkubacija s protutijelima

Nakon odbojavanja membrana je dvaput isprana od otopine za odbojavanje u TBST puferu (50 mM Tris-baza, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween – 20). Zatim je membrana blokirana u 5-postotnoj otopini bezmasnog mlijeka u prahu u TBST-u. Blokiranje je trajalo jedan sat na sobnoj temperaturi na tresilici kako bi se reduciralo nespecifično vezanje protutijela na proteine ili membranu. Nakon završenog blokiranja membrana je inkubirana u otopini za primarna protutijela (10 x razrijeđeno 5 %-tno bezmasno mlijeko u TBST) u količini 4 ml po membrani. Inkubacija se odvijala preko noći na Rotary Shakeru (na 4 °C), a nakon završetka isprana je u TBST-u 4 puta po 15 minuta. Nakon što je isprano primarno protutijelo membranu smo inkubirali sekundarnim protutijelom u otopini za sekundarna protutijela. Inkubacija se odvijala dva sata na sobnoj temperaturi. Sekundarna su protutijela konjugirana s peroksidazom iz hrena (HRP) koja omogućuje kemiluminiscencijsku detekciju. Poslije inkubacije membrana je ponovno isprana u TBST-u 4 puta po 15 minuta.

4.2.9. Kemiluminiscencijska detekcija

Nakon što su isprana sekundarna protutijela na membranu je stavljen kemiluminiscencijski reagens (Pierce ECL Western blotting Substrate, ThermoScientific, USA). Inkubacija je trajala jednu minutu na sobnoj temperaturi, a nakon završetka višak je reagensa uklonjen. Membrana je stavljena između dviju folija (zbog sprječavanja sušenja), a zatim je snimljena BioRad ChemiDoc digitalnom kamerom. Nakon snimanja membranu smo isprali dva puta TBST-

puferom pet minuta i pohranili na 4 °C u PBS-u ako bi ju bilo potrebno opet upotrijebiti. Kao kontrola nanošenja uzorka u Western blotu korišteno je određivanje koncentracije β -aktina.

4.2.10. Statistička analiza

Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između ispitivanih skupina (tri eksperimentalne skupine) nezavisnih skupina testirane su analizom varijacije (ANOVA), a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Kruskal-Wallisovim testom. Razlike između skupina dodatno su testirane Tukey post hoc testom. Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Razina statističke značajnosti određena je s $p < 0,05$. Za statističku analizu upotrijebljen je Sigma Plot v.12 (Systat Software, Inc, Chicago, USA). Veličina uzorka određena je pomoću Sigma Plot v11.0 programa. Za snagu testa od 0,8, p vrijednost manju od 0,05 i uz minimalnu očekivanu razliku od 0,25 minimalni broj životinja uključen u protokol iznosi četiri uzorka (životinja po skupini).

5. REZULTATI

5.1. Tjelesna masa životinja

Osamnaest zdravih, muških Sprague-Dawley štakora slučajnim je odabirom podijeljeno u tri skupine (šest po skupini). Za svaku je životinju izmjerena tjelesna masa pri završetku protokola. Nije utvrđena statistički značajna razlika u tjelesnoj masi između ispitivanih skupina ($p = 0,411$; analiza varijance (ANOVA)) (Tablica 2.)

Tablica 2. Aritmetička sredina izmjerenih vrijednosti tjelesne mase

Pokusna skupina	Broj životinja po skupini	Aritmetička sredina (standardna devijacija)	
		Tjelesna masa (g)	p
KONTROLNA	6	340 (10)	0,411
A-HBO ₂	6	336 (12)	
4D-HBO ₂	6	331 (12)	

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i aritmetička sredina.

$p < 0,05$ analiza varijance (ANOVA)

A-HBO₂ – akutna hiperbarična oksigenacija

4D-HBO₂ – intermitentna hiperbarična oksigenacija

5.2. Relativan proteinski izražaj antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga

5.2.1. Proteinski izražaj SOD izoformi

Tablica 3. prikazuje relativan proteinski izražaj Cu/Zn SOD izoforme u krvnim žilama mozga za sve ispitivane skupine [KONTROLNA 1,29 (1); A-HBO₂ 0,39 (0,1); 4D-HBO₂ 0,42 (0,2)]. Statističkom metodom analize varijance utvrđena je statistički značajna razlika između ispitivanih skupina, $p = 0,02$. Dodatno, Tukey post hoc testom uočen je značajno snižen izražaj Cu/Zn SOD izoforme u A-HBO₂ skupini ($p = 0,038$) te 4D-HBO₂ ($p = 0,031$) u odnosu na KONTROLNU skupinu.

Tablica 3. Relativan proteinski izražaj Cu/Zn SOD antioksidativnog enzima

Pokusna skupina	Broj životinja po skupini	Aritmetička sredina (standardna devijacija)		p	p*	p**
		Relativan proteinski izražaj Cu/Zn SOD/ β aktin				
KONTROLNA	6	1,29 (1)				
A-HBO ₂	6	0,39 (0,1)		0,02	0,038	
4D-HBO ₂	6	0,42 (0,2)				0,031

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija.

$p < 0,05$ analiza varijance (ANOVA)

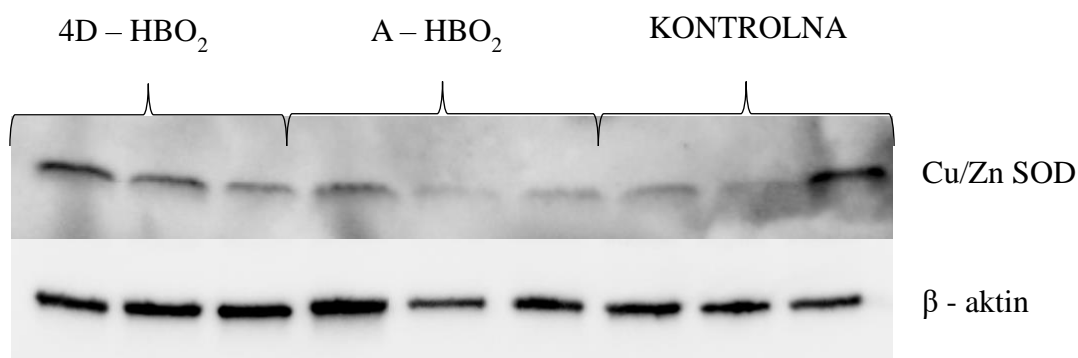
p* - $p < 0,05$ KONTROLNA vs. A-HBO₂ (Turkay post hoc test)

p** - $p < 0,05$ KONTROLNA vs. 4D-HBO₂ (Turkay post hoc test)

A-HBO₂ – akutna hiperbarična

oksigenacija

4D-HBO₂ – intermitentna hiperbarična oksigenacija



Slika 6. Western blot detekcija Cu/Zn SOD i β -aktinskog izražaja u krvnim žilama mozga

Tablica 4. prikazuje relativan proteinski izražaj MnSOD izoforme u krvnim žilama mozga [KONTROLNA 0,74 (0,1); A-HBO₂ 0,62 (0,1); 4D-HBO₂ 1,11 (0,3)]. Statističkom metodom analize varijance utvrđena je statistički značajna razlika između ispitivanih skupina, $p = 0,001$. Proteinski izražaj u 4D-HBO₂ skupini značajno je povećan u odnosu na A-HBO₂ skupinu ($p = 0,002$; Tukey post hoc test) te u odnosu na KONTROLNU skupinu ($p = 0,08$; Tukey post hoc test).

Tablica 4. Relativan proteinski izražaj izoforme MnSOD antioksidativnog enzima

Pokusna skupina	Broj životinja po skupini	Aritmetička sredina (standardna devijacija)		p	p*	p**
		Relativan proteinski izražaj	MnSOD/ β aktin			
KONTROLNA	6	0,74	(0,1)	0,001	0,002	0,08
A-HBO ₂	6	0,62	(0,1)			
4D-HBO ₂	6	1,11	(0,3)			

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija.

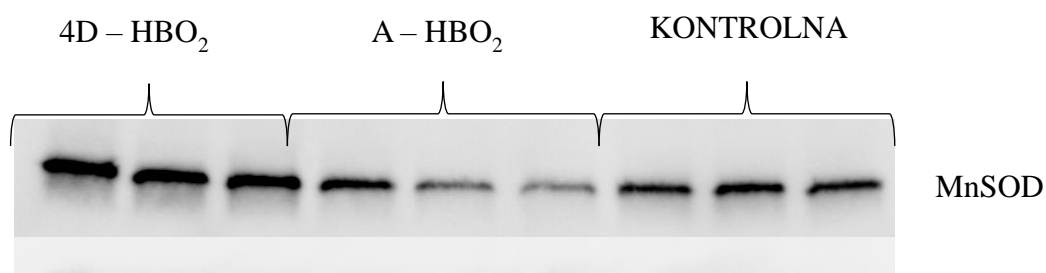
$p < 0,05$ analiza varijance (ANOVA)

p^* - $p < 0,05$ A-HBO₂ vs. 4D-HBO₂ (Tukey post hoc test)

p^{**} - $p < 0,05$ KONTROLA vs. 4D-HBO₂ (Tukey post hoc test)

A-HBO₂ – akutna hiperbarična oksigenacija

4D-HBO₂ – intermitentna hiperbarična oksigenacija



Slika 7. Western blot detekcija MnSOD i β -aktinskog izražaja u krvnim žilama mozga

Tablica 5. prikazuje relativan proteinski izražaj EC-SOD izoforme u krvnim žilama mozga [KONTROLNA 0,93 (0,3); A-HBO₂ 0,73 (0,04); 4D-HBO₂ 0,92 (0,1)]. Nije utvrđena statistički značajna razlika između ispitivanih skupina ($p = 0,017$, analiza varijance (ANOVA)).

Tablica 5. Relativan proteinski izražaj EC-SOD antioksidativnog enzima u krvnim žilama mozga

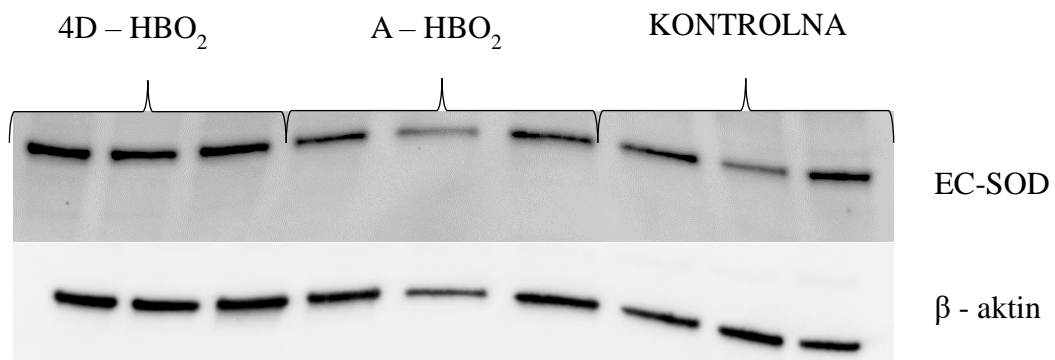
Pokusna skupina	Broj životinja po skupini	Aritmetička sredina (standardna devijacija)		p
		Relativan proteinski izražaj EC-SOD/ β aktin		
KONTROLNA	6	0,93 (0,3)		0,117
A-HBO ₂	6	0,73 (0,04)		
4D-HBO ₂	6	0,92 (0,1)		

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija.

$p < 0,05$ analiza varijance (ANOVA)

A-HBO₂ – akutna hiperbarična oksigenacija

4D-HBO₂ – intermitentna hiperbarična oksigenacija



Slika 8. Western blot detekcija EC-SOD i β-aktinskog izražaja u krvnim žilama mozga

5.2.2. Proteinski izražaj GPx4

Tablica 6. prikazuje relativan proteinski izražaj glutation peroksidaze 4 (GPx4) u krvnim žilama mozga [KONTROLNA 1,06 (0,6); A-HBO₂ 1,62 (0,3); 4D-HBO₂ 0,48 (0,1)]. Statističkom metodom analize varijance utvrđena je statistički značajna razlika između ispitivanih skupina, $p < 0,001$. Proteinski izražaj u A-HBO₂ skupini značajno je povećan u odnosu na 4D-HBO₂ skupinu ($p < 0,001$; Tukey post hoc test) te u odnosu na KONTROLNU skupinu ($p = 0,028$; Tukey post hoc test). Također, proteinski izražaj GPx4 značajno je povećan u KONTROLNOJ skupini u usporedbi sa skupinom 4D-HBO₂ ($p = 0,04$; Tukey post hoc test).

Tablica 6. Relativan proteinski izražaj GPx4 antioksidativnog enzima

Pokusna skupina	Broj životinja po skupini	Aritmetička sredina (standardna devijacija)		p	p*	p**	p***
		Relativan proteinski izražaj GPx4/β aktin					
KONTROLNA	6	1,06 (0,6)		<0,001	0,028	0,04	<0,001
A-HBO ₂	6	1,62 (0,3)					
4D-HBO ₂	6	0,48 (0,1)					

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija.

$p < 0,05$ analiza varijance (ANOVA)

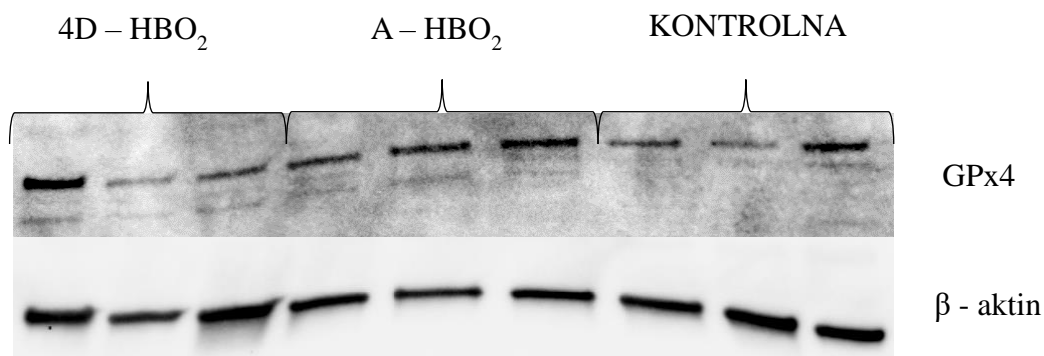
p* - $p < 0,05$ KONTROLA vs. A-HBO₂ (Tukey post hoc test)

p** - $p < 0,05$ KONTROLA vs. 4D-HBO₂ (Tukey post hoc test)

p*** - $p < 0,05$ A-HBO₂ vs. 4D-HBO₂ (Tukey post hoc test)

A-HBO₂ – akutna hiperbarična oksigenacija

4D-HBO₂ – intermitentna hiperbarična oksigenacija



Slika 9. Western blot detekcija GPx4 i β -aktinskog izražaja u krvnim žilama mozga

5.2.3. Proteinski izražaj katalaze

Tablica 7. prikazuje relativan proteinski izražaj katalaze u krvnim žilama mozga [KONTROLNA 0,58 (0,3); A-HBO₂ 1,15 (0,3); 4D-HBO₂ 0,94 (0,3)]. Statističkom metodom analize varijance utvrđena je statistički značajna razlika između ispitivanih skupina, $p = 0,014$. Također, proteinski izražaj u A-HBO₂ skupini značajno je povećan u odnosu na KONTROLNU skupinu ($p = 0,013$; Tukey post hoc test).

Tablica 7. Relativan proteinski izražaj katalaze antioksidativnog enzima

Pokusna skupina	Broj životinja po skupini	Aritmetička sredina (standardna devijacija)	p	p*
		Relativan proteinski izražaj katalaze/ β aktin		
KONTROLNA	6	0,58 (0,3)	0,014	0,013
A-HBO ₂	6	1,15 (0,3)		
4D-HBO ₂	6	0,94 (0,3)		

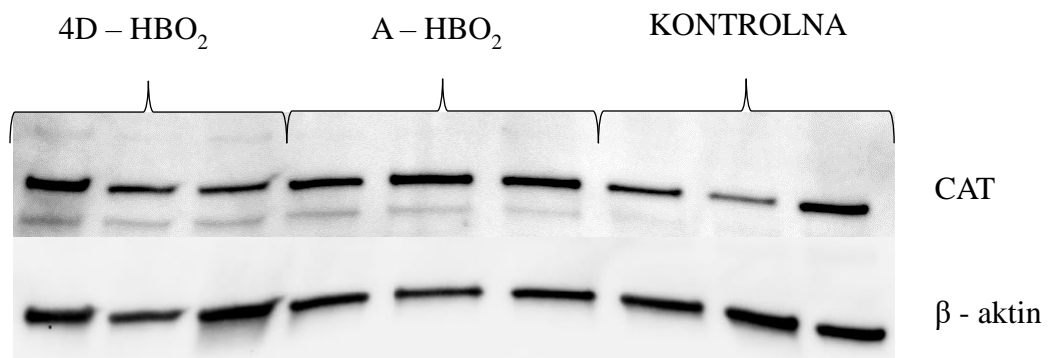
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija

$p < 0,05$ analiza varijance (ANOVA)

p* - $p < 0,05$ KONTROLA vs. A-HBO₂ (Tukey post hoc test)

A-HBO₂ – akutna hiperbarična oksigenacija

4D-HBO₂ – intermitentna hiperbarična oksigenacija



Slika 10. Western blot detekcija CAT i β-aktinskog izražaja u krvnim žilama mozga

6. RASPRAVA

Dosadašnje studije provedene na Katedri za fiziologiju i imunologiju, temeljene na utjecaju hiperbrične oksigenacije na zdravim životinjama, ali i modelima bolesti (npr. dijabetes), pokazale su kako terapija kisikom neupitno mijenja razinu oksidacijskog stresa (21, 22, 23).

Za utvrđivanje promjena nastale razine oksidacijskog stresa primijenile su se metode FRAP (razina antioksidativne statusa), TBARS (razina oksidacijskog stresa), genski i proteinski izražaj antioksidativnih enzima te aktivnost antioksidativnih enzima (SOD izoforme, GPx i katalaza).

Na modelu dijabetesa utvrđeno je kako dijabetes sam po sebi povećava razinu oksidacijskog stresa te da hiperbrična oksigenacija regulira nastalu promjenu (24). Osim pogodne primjene kod dijabetesa, hiperbrična je oksigenacija pokazala pozitivan utjecaj i na druga oboljenja kao što su moždani udar, infarkt miokarda, akutna periferna ishemija ekstremiteta u ljudi (25, 26).

No danas se hiperbrična oksigenacija primjenjuje sve više i u zdravim stanjima, bez prisutnosti patoloških promjena vaskularnog sustava. Zanimljive rezultate pokazala je studija Drenjančević i suradnika (27) koja je utvrdila kako akutno izlaganje hiperbričnoj oksigenaciji (jedan tretman hiperbrične oksigenacije) značajno povećava razinu lipidne peroksidacije u serumu zdravih štakora (TBARS metoda), ali ne mijenja razinu antioksidativnog kapaciteta (FRAP metoda). To nastaje zbog određene toksičnosti kisika. Posljedice se takve toksičnosti različito očituju na staničnoj, tkivnoj ili organskoj razini i mogu pogoditi svako tkivo. Osnova je toksičnosti kisika nastanak reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) (28). To su radikali, ioni ili molekule koje nastaju uslijed metabolizma kisika i vrlo su reaktivne jer sadrže nesporen elektron. U stanju su reagirati s različitim molekulama u stanici, koje često uključuju i molekule koje grade stanicu (npr. stanična membrana), što dovodi do oštećenja. Ako se u stanici naruši ravnoteža između proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta i kapaciteta stanice da različitim mehanizmima te vrste ukloni, dolazi do pojave oksidacijskog stresa koji može imati teške posljedice po stanicu.

Nadalje, utvrđeno je kako produljeno vrijeme hiperbrične oksigenacije, četiri dana uzastopne terapije, ponovno snižava razinu oksidacijskog stresa, ali ponovno bez značajne promjene antioksidativnog kapaciteta (21). Uzrok takvim rezultatima leži u činjenici da je u

istom istraživanju serumska aktivnost enzima katalaze i glutation peroksidaze značajno povećana nakon četiri dana terapije te da je na genskoj razini izražaj Cu/Zn SOD i EC-SOD značajno povećan. Dokazano je čak i da se 24 sata nakon izlaganja terapiji hiperbaričnim kisikom povećava vazorelaksacija krvnih žila u odnosu na akutno izlaganje. Mjerenjem razine superoksida izravno na endotelu aorti utvrđeno je njegovo povećanje kod akutnog izlaganja. Svi ti rezultati govore u prilog činjenici da kratkotrajno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji povećava oksidativni stres, no da dugotrajna hiperbarična oksigenacija vraća oksidativni status u normalu.

Tako povećan oksidativni stres izravno djeluje na endotel krvne žile te uzrokuje promjene u razini vazodilatacije krvnih žila. Konkretno, u prethodno navedenoj skupini istraživača radilo se o aortama i moždanim žilama. Utvrđeno je kako je vazorelaksacija krvnih žila smanjena u skupinama akutnog izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji te da se primjenom TEMPOL-a (koji predstavlja „hvatača“ superoksidnih radikala) razina vazorelaksacije ponovno povećala. To je dodatan dokaz povećanog oksidacijskog stresa (21).

U sklopu projekta, unutar kojega je odrađeno i naše istraživanje, usmjerili smo se više na krvne žile mozga. Genski izražaj važnih antioksidativnih enzima pokazao je kako akutna hiperbarična terapija značajno smanjuje genski izražaj antioksidativnih enzima GPx1, MnSOD i katalaze što dovodi do povećanja oksidacijskog stresa u krvnim žilama mozga tretiranih jednom terapijom hiperbaričnim kisikom. Također je utvrđeno da intermitentna hiperbarična oksigenacija dovodi do ponovnog povećanja genskog izražaja EC-SOD i GPx1 gena u krvnim žilama mozga štakora što govori u prilog tomu da je regulacija antioksidativnog kapaciteta ovisna upravo o tim enzimima (29).

Također, zbog činjenice kako je jedino izražaj GPx1 promjenjiv kod svakog tipa terapije, pretpostavka je kako je razina oksidacijskog stresa ponajviše ovisna o njegovoj razini.

Manje su značajne promjene utvrđene u našem mjerenju proteinskog izražaja. Iako je utvrđeno kako postoji značajna promjena u genskom izražaju Cu/Zn SOD, MnSOD, GPx4 i katalaze između ispitivanih skupina, jedino je utvrđeno kako intermitentna hiperbarična oksigenacija značajno povećava proteinski izražaj MnSOD u odnosu na akutno izlaganje hiperbaričnoj. Iz dobivenih rezultata može se pretpostaviti kako na proteinskoj razini promjena oksidacijskog statusa ovisi najviše o MnSOD-u što na genskoj razini nije bio slučaj.

Prema prikazanim rezultatima, gdje je vidljivo čak i povećanje antioksidativnih enzima u akutnoj skupini, što nije očekivano, može se zaključiti kako je potrebno možda duže razdoblje kako bi se na proteinskoj razini uočile bitne promjene te su očito genske promjene izraženije i brže uočljive.

U sklopu istog projekta dodatno su mjerene razine oksidiranih lipoproteina niske gustoće (oxLDL) i naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda (AOPP) te je utvrđeno kako akutna oksigenacija dovodi do značajnog povećanja serumske koncentracije AOPP-a, ali bez promjene koncentracije oxLDL-a. AOPP se pokazao kao mnogo bolji i osjetljiviji marker za dokazivanje povećanog oksidacijskog stresa (30).

Objedinjeno promatrano, uočeno je kako akutna hiperbarična oksigenacija dovodi do povećanja oksidacijskog stresa koji posredno ima negativan utjecaj na vaskularnu reaktivnost ne samo kod bolesti, nego i u zdravim stanjima. Također, dugotrajna terapija hiperbaričnom oksigenacijom ponovno popravlja oksidativni status i dovodi ga u ravnotežu.

7. ZAKLJUČAK

Iz prikupljenih rezultata može se zaključiti:

- 1) Hiperbarična oksigenacija nema utjecaja na promjenu tjelesne mase životinja.
- 2) Terapija hiperbaričnim kisikom (neovisno o protokolu terapije te u usporedbi s kontrolnom skupinom) dovodi do značajne promjene proteinskog izražaja Cu/Zn SOD-a, MnSOD-a, GPx4 i katalaze.
- 3) Na temelju rezultata proteinskog izražaja antioksidativnih enzima (usporedbom među skupinama) može se zaključiti kako je razina oksidacijskog stresa ovisna najviše o razini MnSOD izoforme.
- 4) Usporedbom dobivenih rezultata s onima na genskoj razini može se pretpostaviti kako je potrebno dulje razdoblje terapije kako bi nastale očekivane promjene na razini proteina.

8. SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA: Cilj je istraživanja bio procijeniti učinke akutne i povremene hiperbarične oksigenacije na proteinski izražaj antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga.

NACRT STUDIJE: Eksperimentalna studija na pokusnim laboratorijskim životinjama.

ISPITANICI I METODE: Zdravi muški Sprague-Dawley štakori starosti 9 – 11 tjedana nasumce su razvrstani u skupine (n = šest štakora/skupina) – kontrolnu (intaktne životinje) i dvije hiperbarične skupine koje su izložene jednom tretmanu hiperbarične oksigenacije (akutna; A-HBO₂) ili intermitentnu skupinu (četiri uzastopna HBO₂ tretmana, 4D- HBO₂). Svaka je životinja izvagana te su prikupljene krvne žile mozga u svrhu određivanja proteinskog izražaja antioksidativnih enzima (Cu/Zn SOD, MnSOD, EC-SOD, GPx4 i katalaze) Western blot metodom.

REZULTATI: Nije utvrđena statistički značajna razlika u tjelesnoj masi između ispitivanih skupina (p = 0,411). Hiperbarična oksigenacija (neovisno o protokolu terapije) dovodi do značajne razlike u proteinskom izražaju Cu/Zn SOD, MnSOD, GPx4 i katalaze u odnosu na kontrolnu. Proteinski izražaj katalaze i GPx4 značajno je povećan u akutnoj ispitivanoj skupini u odnosu na ostale ispitivane skupine. Cu/Zn SOD izražaj pokazao se najveći u kontrolnoj skupini, a jedino je proteinski izražaj MnSOD značajno povećan kod intermitentne oksigenacije u odnosu na druge skupine.

ZAKLJUČAK: Snižena razina oksidacijskog stresa kod intermitentne hiperbarične oksigenacije posljedica je, promatranjem proteinske razine, povećanja izražaja MnSOD antioksidativnog enzima.

KLJUČNE RIJEČI: antioksidativni enzimi, hiperbarična oksigenacija, krvne žile mozga, proteinski izražaj

9. SUMMARY

CHANGES IN PROTEIN EXPRESSION LEVEL OF ANTIOXIDATIVE ENZYMES IN BRAIN BLOOD VESSELS OF SPRAGUE-DAWLEY RATS UNDER THE INFLUENCE OF HYPERBARIC OXYGENATION TREATMENT

RESEARCH OBJECTIVES: The aim of the study is to assess the effect of acute and intermittent hyperbaric oxygenation on the protein expression of antioxidative enzymes in brain blood vessels.

STUDY DESIGN: Experimental study on laboratory animals (Sprague-Dawley rats)

METHODS: 9-11 weeks old healthy male Sprague-Dawley rats were randomly assigned to groups (n = 6 rats/groups): control group (intact animals) and 2 hyperbaric groups that underwent single (acute; A-HBO₂) hyperbaric oxygenation treatment or intermittent group (4 consecutive HBO₂ treatments, 4d HBO₂). Every animal was weighed and brain blood vessels were collected for the purpose of determining the protein expression of the antioxidative enzymes (Cu/Zn SOD, MnSOD, EC-SOD, GPx4 and catalase) with Western Blot method.

RESULTS: Statistically significant difference in body mass was not determined between the groups (p = 0,411). Hyperbaric oxygenation (regardless of therapy protocol) leads to a significant difference in protein expression of Cu/Zn SOD, MnSOD, GPx4, and catalase compared to the control group. The catalase protein expression, as well as the GPx4, were significantly increased in the A-HBO₂ group compared to the other tested groups. Cu/Zn SOD expression was the largest in the control group, whereas the protein expression MnSOD was only increased significantly by intermittent oxygenation compared to the other tested groups.

CONCLUSION: Having observed the protein levels, we can conclude that the lowered level of oxidative stress by intermittent hyperbaric oxygenation is the result of antioxidative enzyme MnSOD's increased expression.

KEYWORDS: antioxidative enzymes, blood vessels, hyperbaric oxygenation, protein expression

10. LITERATURA

1. Bakker DJ. Hyperbaric oxygen therapy and the diabetic foot. *Diabetes Metab Res Rev.* 2000 Sep-Oct;16(S1 Suppl 1):S55–8.
2. Sukoff MH, Hollin SA, Espinosa OE, Jacobson JH 2nd. The protective effect of hyperbaric oxygenation in experimental cerebral edema. *J Neurosurg.* 1968 Sep;29(3):236–41.
3. Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions, Volume 2012, Article ID 217037, *Journal of Botany.* doi:10.1155/2012/217037
4. Anderson D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res.* 1996 Feb;350(1):103–8.
5. Čavka A, Tadžić R, Grizelj I, Unfirer S, Mihaljević Z, Mihalj M, et al. Endotelna funkcija - funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. *Med Vjesn (Osijek).* 2012;44(1-4):135–46.
6. Di Giulio C, Data PG, Lahiri S. Chronic cobalt causes hypertrophy of glomus cells in the rat carotid body. *Am J Physiol.* 1991 Jul;261(1 Pt 1):C102-5.
7. Kehrer JP. Cause-effect of oxidative stress and apoptosis. *Teratology.* 2000 Oct;62(4):235–6.
8. Matés JM, Pérez-Gómez C, Blanca M. Chemical and biological activity of free radical ‘scavengers’ in allergic diseases. *Clin Chim Acta.* 2000 Jun;296(1-2):1–15.
9. Jurković S, Osredkar J, Marc J. Molekularni utjecaj glutation-peroksidaza u antioksidativnim procesima. *Biochem Med (Zagreb).* 2008;18(2):162–74.
10. Čepelak D, Čvorišćec. Molekularna dijagnostika; Štrausova medicinska biokemija. Medicinska naklada Zagreb 2009.
11. Hatfield DL, Gladyshev VN. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 3565-76.

12. Güney M. Selenium-vitamin E combination modulates endometrial lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat. *Biol Trace Elem Res.* 2012 Nov;149(2):234-40.
13. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):315-424.
14. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 2001 Mar;54(3):176-86.
15. Vankayala SL, Hargis JC, Woodcock HL. How does catalase release nitric oxide? A computational structure-activity relationship study. *J Chem Inf Model.* 2013 Nov;53(11):2951-61.
16. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005; 12: 1161-208.
17. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function [Review]. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):47-95.
18. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease [Review]. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004;44(4):275-95.
19. Topić E. Medicinsko biokemijska dijagnostika u kliničkoj praksi, Medicinska naklada Zagreb, 2004.
20. Cooper GM, Hausman RE. Stanica: Molekularni pristup. Medicinska naklada, Zagreb 2010.
21. Mihaljević Z, Matić A, Stupin A, Barić L, Jukić I, Drenjančević I. Acute hyperbaric oxygenation, contrary to intermittent hyperbaric oxygenation, adversely affects vasorelaxation in healthy Sprague-Dawley rats due to increased oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Apr 29;2018:7406027.
22. Kibel A, Novak S, Čosić A, Mihaljević Z, Falck JR, Drenjančević I. Hyperbaric oxygenation modulates vascular reactivity to angiotensin-(1-7) in diabetic rats - potential role of epoxyeicosatrienoic acids. *Diab Vasc Dis Res.* 2015 Jan;12(1):33-45

23. Unfirer S, Mihalj M, Novak S, Kibel A, Čavka A, Mihaljević Z, Gros M, Brizić I, Budimir D, Ćosić A, Boban M, Drenjančević I. Hyperbaric oxygenation affects the mechanisms of acetylcholine-induced relaxation in diabetic rats. *Undersea Hyperb Med.* 2016 Nov-Dec;43(7):787-803.
24. Manojlović D, Stupin A, Mihaljević Z, Matic A, Lenasi H, Drenjančević I. Hyperbaric oxygenation affects acetylcholine-induced relaxation in female diabetic rats. *Undersea & hyperbaric medicine* (2019; prihvaćen za objavu).
25. 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;926:165–171.
26. Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in wound healing-more than a nutrient. *World J Surg.* 2004;28(3):294-300.
27. Drenjančević I, Kibel A, Kibel D, Šerić V, Ćosić A. Blood pressure, acid-base and blood gas status and indicators of oxidative stress in healthy male rats exposed to acute hyperbaric oxygenation. *Undersea Hyperb Med.* 2013 Jul-Aug;40(4):319-28.
28. Devasagayam TPA, Tilak JC, Bloor KK, Sane Ketaki S, Ghaskadbi Saroj S, Lele RD. 2004. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *Journal of Association of Physicians of India (JAPI)*52:796.
30. Šušnjara, Petar. Utjecaj hiperbarične oksigenacije na genski izražaj antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora / završni rad - diplomski/integralni studij. Osijek: Medicinski fakultet Osijek
31. Domazet Ivana. Oksigenacije na promjenu serumske koncentracije oksidiranih lipoproteina niske gustoće i naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda kod Sprague-Dawley štakora. završni rad - diplomski/integralni studij. Osijek : Medicinski fakultet Osijek

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Jasminka Zucić (rođ. Lukić)

Datum i mjesto rođenja: 30. rujna 1969., Osijek

Adresa: Eugena Kumičića 2, 31 221 Josipovac, Republika Hrvatska

Obrazovanje:

- rujna 1984. – lipanj 1988.: Srednja škola „Ruđer Bošković“, Osijek
- rujna 2014. – rujna 2017.: sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- listopad 2017. – danas: sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku