

# Utjecaj akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na izražaj proteina enzima uključenih u mehanizme dilatacije krvnih žila te transkripcijskog faktora HIF-1 alfa kod Sprague-Dawley štakora

---

Omičević, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:152:644774>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Ana Omičević**

**UTJECAJ AKUTNE I INTERMITENTNE  
HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA  
IZRAŽAJ PROTEINA ENZIMA  
UKLJUČENIH U MEHANIZME  
DILATACIJE KRVNIH ŽILA TE  
TRANSKRIPCIJSKOG FAKTORA HIF-1  
ALFA KOD SPRAGUE-DAWLEY  
ŠTAKORA**

**Završni rad**

**Osijek, 2022.**

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

**Ana Omičević**

**UTJECAJ AKUTNE I INTERMITENTNE  
HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA  
IZRAŽAJ PROTEINA ENZIMA  
UKLJUČENIH U MEHANIZME  
DILATACIJE KRVNIH ŽILA TE  
TRANSKRIPCIJSKOG FAKTORA HIF-1  
ALFA KOD SPRAGUE-DAWLEY  
ŠTAKORA**

**Završni rad**

**Osijek, 2022.**

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

Mentor rada : doc.dr.sc. Zrinka Mihaljević, prof.

Neposredni voditelj: asistent Petar Šušnjara.

Rad ima 28 listova, 1 tablicu i 14 slika.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Hiperbarična oksigenacija .....	1
1.2. Hipoksijom inducirani faktor-1 alfa ( HIF-1 $\alpha$ ).....	1
1.3. Ciklooksigenaze (COX-1 i COX-2) .....	2
1.4. Dušik oksid-sintaze ( NOS).....	2
1.5. Endotel.....	3
1.6. Western blot metoda.....	3
2. HIPOTEZA .....	5
3. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	6
4. MATERIJALI I METODE .....	7
4.1. Ustroj studije.....	7
4.2. Pokusne životinje.....	7
4.3. Metode .....	8
4.3.1. Uzorkovanje i priprema uzorka.....	8
4.3.2. Western blot metoda .....	8
4.3.3. Prijenos proteina s gela na membranu .....	10
4.3.4. Inkubacija s protutijelima.....	11
4.3.5. Kemiluminiscentna detekcija.....	12
4.4. Statističke metode.....	13
5. REZULTATI.....	14
5.1. Proteinski izražaj COX-1.....	14
5.2. Proteinski izražaj COX-2.....	15
5.3. Proteinski izražaj iNOS .....	16
5.4. Proteinski izražaj eNOS.....	17
5.5. Proteinski izražaj HIF-1 alfa.....	18
6. RASPRAVA.....	19
7. ZAKLJUČAK .....	21
8. SAŽETAK.....	22
9. SUMMARY .....	23
10. LITERATURA.....	24
11. ŽIVOTOPIS .....	28

## **Popis kratica**

**COX** – enzim ciklooksigenaza

**EPO** – eritropoetin

**eNOS** – endotelna dušik-oksida sintaza (prema engl. *Endothelial nitric-oxide synthase*)

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

**GLUT-1** – glukozni transporter-1

**HBO<sub>2</sub>**- hiperbarična oksigenacija

**HIF-1 $\alpha$**  – hipoksijom inducirani faktor transkripcije 1 alfa podjedinica

**HIF-1 $\beta$**  – hipoksijom inducirani faktor transkripcije 1 beta podjedinica

**HRP** – peroksidaza iz hrena (prema engl. *Horseradish peroxidase*)

**iNOS**- inducibilna dušik-oksida sintaza (prema engl. *Inducible nitric-oxide synthase*)

**NO** – dušikov (II)- oksid (prema engl. *Nitric oxide*)

**NOS** – dušik oksida sintaza (prema engl. *Nitric-oxide synthase*)

**nNOS**- neuronska dušik-oksida sintaza (prema engl. *Neuronal nitric-oxide synthase*)

**O<sub>2</sub>** – kisik

**PVDF** – poliviniliden difluorid

**PGI<sub>2</sub>** - prostaciklini

**ROS** – reaktivne kisikove vrste (prema engl. *Reactive oxygen species* )

**SDS-PAGE** – natrijev dodecil sulfat – poliakril amidna gel elektroforeza (prema engl. *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*)

**TXA<sub>2</sub>** – tromboksan A<sub>2</sub>

**TH** – tirozin hidroksilaza

**VEGF** – čimbenik rasta endotela krvnih žila (prema engl. *Vascular endothelial growth factor*)

## 1. UVOD

### 1.1. Hiperbarična oksigenacija

Hiperbarična oksigenacija (HBO<sub>2</sub>) je neinvazivna primarna ili pomoćna terapijska metoda u kojoj se primjenjuje čisti, 100%-tni kisik u tlačnoj komori pri tlaku većem od 1 atmosfere (1, 2). Hiperbarična komora u kojoj se provodi terapija namijenjena za jednu osobu je ispunjena 100%-tnim kisikom. Nasuprot tome, komore dizajnirane za više osoba služe za liječenje pacijenata s akutnim problemima, a pacijenti primaju terapiju preko posebnih maski (3). Niska razina kisika (O<sub>2</sub>) u krvi može nastati kao posljedica poremećaja protoka krvi u pluća, protoka zraka kroz alveole ili ishemijom (4). Jedna od prednosti HBO<sub>2</sub> je što povećava razinu otopljenog kisika u plazmi te povećava O<sub>2</sub> u alveolama, arterijama i tkivu i time smanjuje oštećenja uzrokovana hipoksijom (4). U istraživanju Hu i suradnici uočili su da terapija hiperbaričnom oksigenacijom smanjuje hemoragijsku transformaciju nakon moždanog udara te dolazi do poboljšanja neurološke funkcije u hiperglikemičnih štakora (5). Također, učinkovitost hiperbarične oksigenacije je dokazana kod bolesti kao što su arterijska plinska embolija (6), dijabetički ulkus stopala (7), trovanje ugljičnim monoksidom (8) i teška anemija (6). Osim navedenih bolesti, novije istraživanje pokazuje veliki učinak hiperbarične oksigenacije u liječenju umora uzrokovanog COVID-19 infekcijom (9). Istraživanje provedeno od strane Robbins i suradnika pokazalo je značajni oporavak od umora i niza drugih posljedica infekcije nakon deset dana terapije hiperbaričnom oksigenacijom (9).

### 1.2. Hipoksijom inducirani faktor-1 alfa ( HIF-1 $\alpha$ )

Hipoksija je stanje koje nastaje smanjenom opskrbom stanica kisikom i uzrokuje patološki stres za stanice. Kako bi se tkiva i stanice prilagodile stanju smanjene opskrbe kisikom dolazi do transkripcije niza gena koji sudjeluju u procesima angiogeneze, eritropoeze i transportu glukoze (10). Kao specifični odgovor na hipoksiju aktivira se izražaj hipoksijom induciranog faktora-1 alfa (10).

HIF-1 je heterodimerni transkripcijski faktor koji regulira homeostazu kisika (11). Kompleks HIF-1, osim HIF-1 $\alpha$  podjedinice osjetljive na kisik, sastoji se i od HIF-1 $\beta$  konstitutivno izražene podjedinice u svim stanicama (12). Također, podjedinica HIF-1 $\alpha$

ima još dva izomorfna oblika HIF-2 $\alpha$  i HIF-3 $\alpha$  (11). HIF-1 $\alpha$  ima važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena čija se transkripcija povećava tijekom hipoksije kako bi se smanjili negativni učinci i time omogućili prilagodbu stanica i tkiva na hipoksiju (10, 12). U stanju hipoksije osim HIF-1 $\alpha$  dolazi do pojačanog lučenja čimbenika rasta endotela krvnih žila (VEGF, prema engl. *Vascular endothelial growth factor*), eritropoetina (EPO), tirozin hidroksilaze (TH) i glukoznog transportera-1 (GLUT-1) (13). Tijekom normalne razine kisika u krvi HIF-1 $\alpha$  se kontinuirano sintetizira, ali je nestabilan i brzo se razgrađuje (14). S druge strane, u stanju hipoksije se brzo nakuplja (13).

### 1.3. Ciklooksigenaze (COX-1 i COX-2)

Ciklooksigenaze (COX) su enzimi koji kataliziranjem arahidonske kiseline stvaraju prostaglandin H<sub>2</sub> koji se djelovanjem drugih enzima pretvara u druge prostaglandine i tromboksane (15). Danas poznajemo dva oblika od kojih je COX-1 izražen u većini tkiva, dok je COX-2 izražen kao odgovor na različite protuupalne podražaje (16). Različiti učinci prostaglandina i tromboksana su bitni u održavanju ravnoteže između vazokonstrikcije i vazodilatacije (15). U trombocitima nastaje tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) koji djeluje vazokonstriktorski i uzrokuje agregaciju trombocita. Nasuprot tome, u endotelu prostaciklini (PGI<sub>2</sub>) djeluju vazodilatacijski i sprječavaju agregaciju trombocita (15). Razlika između COX-1 i COX-2 je što COX-1 stvara TXA<sub>2</sub> i prostaglandine koji štite želučani endotel od kiselina. Dok COX-2 sudjeluje u biosintezi upalnih prostaglandina (17). Prostaglandini koji nastaju djelovanjem COX-1 i COX-2 su bitni za normalan rad kardiovaskularnog sustava. Također imaju utjecaje na homeostazu, različite ozljede, ishemiju miokarda i arteriosklerozu (15).

### 1.4. Dušik oksid-sintaze (NOS)

Dušik oksid-sintaze (NOS, prema engl. *Nitric-oxide synthase*) su enzimi koji sintetiziraju dušikov (II)-oksid (NO, prema engl. *Nitric oxide*) tako da pretvaraju aminokiselinu L-arginin i kisik u NO i L-citrulin (18). Osim endotelne dušik-oksid sintaze (eNOS, prema engl. *Endothelial nitric-oxide synthase*) koja je najviše izražena u endotelnim stanicama vezana za membranu, postoje još dvije izoforme (18). U neuronima najviše je izražena neuronska dušik-oksid sintaza (nNOS, prema engl. *Neuronal nitric-oxide synthase*), dok je inducibilna dušik-oksid sintaza (iNOS, prema engl. *Inducible nitric-oxide synthase*) izražena u različitim stanicama (18). Iako NO ima važnu ulogu u različitim biokemijskim putevima u normalnim uvjetima, također je važan kod različitih bolesti kao



što su hipoksija i ishemija u mozgu, retinopatija i u prijevremeno rođene djece (19). Stanje hipoksije i ishemije u mozgu povećava aktivnost dušik-oxid sintaze (19). Rana faza ishemije uzrokuje porast aktivnosti eNOS, a s vremenom njena vrijednost opada. S druge strane, tijekom ishemije mozga aktivnost nNOS se s vremenom povećava (19).

### 1.5. Endotel

Iako se sastoji samo od jednog sloja endotelnih stanica, endotel je važan organ koji oblaže cijeli vaskularni sustav (20). Jedna od važnijih funkcija endotela je kontrola vaskularnog tonusa (20). Endotel regulira vaskularni tonus pomoću endotelnih čimbenika relaksacije (EDRF, prema engl. *Endothelium-derived relaxing factors*) od kojih su najvažniji NO i PGI<sub>2</sub> (21). NO je važan čimbenik jer uzrokuje relaksaciju vaskularnih glatkih mišića, a sintetizira ga eNOS (21). Osim regulacije vaskularnog tonusa, endotel sudjeluje u modulaciji proizvodnje protuupalnih molekula i održavanju fluidnosti krvi (22). Rizični čimbenici kao što su pušenje, dijabetes i starenje mogu dovesti do disfunkcije endotela što dovodi do većeg rizika nastanka arteroskleroze, moždanog udara ili hipertenzije (22).

### 1.6. Western blot metoda

Metoda *Western blot* služi za identifikaciju i razdvajanje određenih proteina uzetih iz stanica ili tkiva. Razvitku metode prethodile su *Southern blotting* koju je razvio Edwin Southern i *Northern blotting* koja je razvijena od strane grupe George Stark Stanford. Za razvoj metode koja se koristila u ovom istraživanju zaslužna su dva poznata znanstvenika, Harry Tobwin i Neal Burnette. U istraživanju objavljenom 1979. godine, Harry Tobwin i suradnici opisali su njihov način prijenosa proteina s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu (23). Protokol počinje s elektroforezom proteina uz prisutnost uree, zatim slijedi prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu (23). Idući korak je bojanje koje služi za vizualizaciju proteina od interesa, a odbojavanje je postignuto pomoću 90 % metanola i 2 % octene kiseline. Zadnji korak je detekcija proteina pomoću obilježenih protutijela specifičnih za tražene proteine (23). Godinu dana kasnije, Neil Burnette provodi istraživanje u kojem je htio dokazati jednostavniji, ali efikasniji prijenos proteina u odnosu na istraživanje provedeno od strane Tobwina (24). Razlika je u tome što je korištena SDS elektroforeza koja omogućuje razdvajanje proteina (24). Također, bitno je istaknuti da elektroforeza u istraživanju Tobwina traje jedan sat, dok je Burnett dokazao da je potrebno više sati jer brzina prijenosa proteina ovisi o njihovoj

molekularnoj masi (24). Danas se metoda koristi kao potvrdni test u slučaju pozitivnog ELISA testa kod HIV pozitivnih osoba kao i za detekciju specifičnih Epstein-Barr virus serumskih protutijela (25,26).

## 2. HIPOTEZA

Akutna i intermitentna hiperbarična oksigenacija utjecati će na izražaj proteina HIF-1  $\alpha$  i proteina enzima uključenih u mehanizme dilatacije krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora.

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj provedenog istraživanja ispitati je utjecaj akutnog i intermitentnog izlaganja hiperbaričnom kisiku na izražaj proteina NOS i COX enzima koji sudjeluju u mehanizmu dilatacije krvnih žila mozga zdravih Sprague-Dawley štakora. Također, cilj je ispitati utjecaj hiperbarične oksigenacije na izražaj transkripcijskog faktora HIF-1  $\alpha$  i svladati princip *Western blot* metode kojom se određuje izražaj proteina.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Ekperimentalna studija na izoliranim organima pokusnih životinja (Sprague-Dawley štakori). Ekperimentalni postupci korišteni u navedenom istraživanju su odobreni od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (Klasa: 602-04/22-08/02; Ur.broj: 2158-61-46-22-77).

### 4.2. Pokusne životinje

Kao materijal istraživanja za utvrđivanje izražaja proteina upotrebljavale su se pohranjene krvne žile mozga pokusnih Sprague-Dawley štakora. Jedan uzorak činile su krvne žile mozga dvaju štakora. Krvne žile su uzorkovane iz zdravih muških Sprague-Dawley štakora starosti od 8 do 10 tjedana. Pokusni štakori su bili podijeljeni u tri skupine nasumično:

- 1) Kontrolna skupina (KONTROLA) koju čine zdravi, pokusni štakori koji nisu bili pod utjecajem hiperbarične oksigenacije
- 2) A-HBO<sub>2</sub> skupinu čine štakori pod utjecajem akutnog djelovanja hiperbarične oksigenacije i koji su žrtvovani odmah nakon spomenutog utjecaja
- 3) 4D-HBO<sub>2</sub> je skupina štakora izložena intermitentnom djelovanju hiperbarične oksigenacije svakodnevno kroz četiri dana i žrtvovana peti dan

Navedeni štakori su iz vlastitog uzgoja Vivarija Medicinskog fakulteta Osijek. Određivanje izražaja proteina od interesa provedeno je u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek.

### 4.3. Metode

#### 4.3.1. Uzorkovanje i priprema uzorka

Usmrćivanju i uzorkovanju prethodilo je anesteziiranje štakora pomoću kombinacije ketamina 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2 ml, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma). Nakon djelovanja anestetika, uslijedila je dekapitacija i uzorkovanje krvnih žila mozga za određivanje COX-1, COX-2, iNOS, eNOS i transkripcijskog faktora HIF-1 alfa. Uzorci krvnih žila mozga smrznuti su u tekućem dušiku i do izvođenja pokusa su čuvani na -80 °C.

Prvi korak homogenizacije uzoraka je preljevanje uzoraka tekućim dušikom i potom usitnjavanje krvnih žila u tarioniku do praha. Usitnjeni uzorci krvnih žila mozga stavljeni su u Eppendorf tubice. U Eppendorf tubicu u koju je prethodno dodan uzorak krvnih žila mozga dodaje se 1 mL homogenizacijskog pufera koji sadržava 10 mM tris-a (Fischer Scientific, Belgija), 1 mM EDTA, 0,4 % SDS- a (AcrosOrganics, SAD) i 0,062 % Trixon-X na 100 mg tkiva. Također, dodan je i koktel inhibitora proteaze (Sigma Aldrich) koji sprječava razgradnju proteina. Uzorak je pomiješan na Vortex homogenizatoru.

Zadnji korak homogenizacije je centrifugiranje uzorka na 15 000 G tijekom 30 minuta na temperaturi od 4 °C. Odvojeni supernatant stavljen je u novu Eppendorf tubicu i pohranjen na -80 °C do daljnje analize.

#### 4.3.2. Western blot metoda

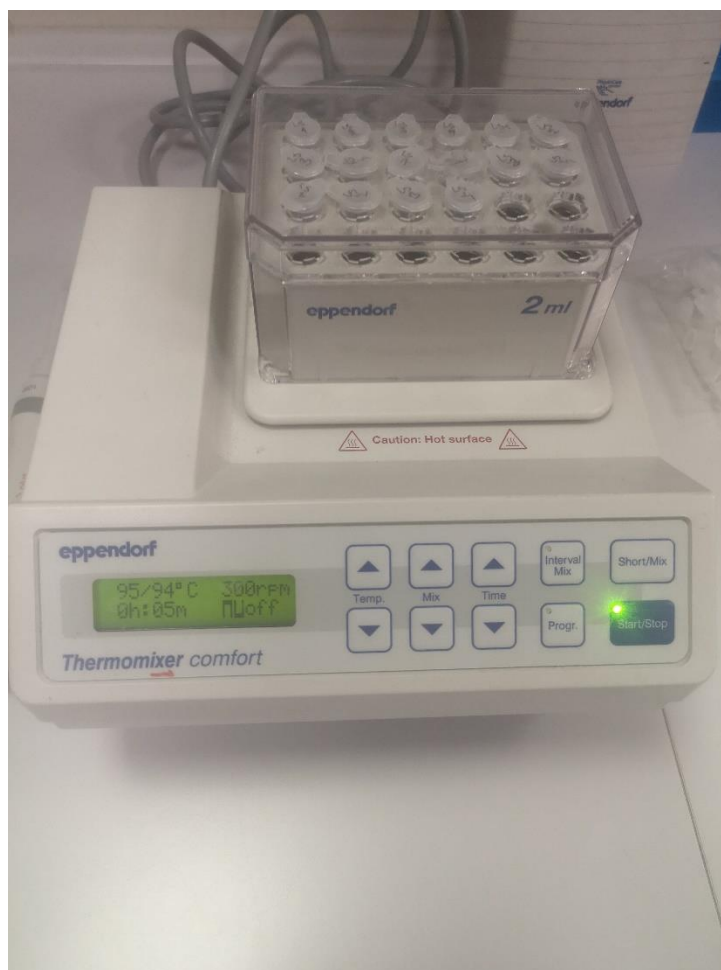
Za određivanje izražaja proteina u uzorcima krvnih žila mozga korištena je *Western blot* metoda kojom određujemo specifične proteine u uzorku. Uzorci su izolirani ukupni proteini iz tkiva krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora. *Western blot* metoda sastoji se od nekoliko koraka:

- 1) SDS-PAGE elektroforeza na poliakrilamidnom gelu
- 2) Prijenos proteina na poliviniliden difluorid (PVDF) membranu
- 3) Inkubacija s protutijelima i kemiluminiscentna detekcija

*Western blot* metoda omogućuje određivanje proteina u uzorku pomoću protutijela specifičnih za traženi protein. Prvi korak *Western blot* metode je SDS-PAGE elektroforeza koja omogućava razdvajanje nabijenih molekula kroz gel na temelju njihove molekularne mase pod

djelovanjem električnog polja. Ovom metodom je moguće razdvojiti molekule proteina, DNA i RNA.

Prije elektroforeze pripremljen je pufer za transfer i pufer za elektroforezu koji su držani u hladnjaku na 4 °C do početka elektroforeze. U epruvete u koje je prethodno dodano 12,5 µL uzorka, dodan je isti volumen pufera za nanošenje uzorka na gel. Nakon toga provedena je homogenizacija smjese i kuhanje na 95 °C 5 minuta.



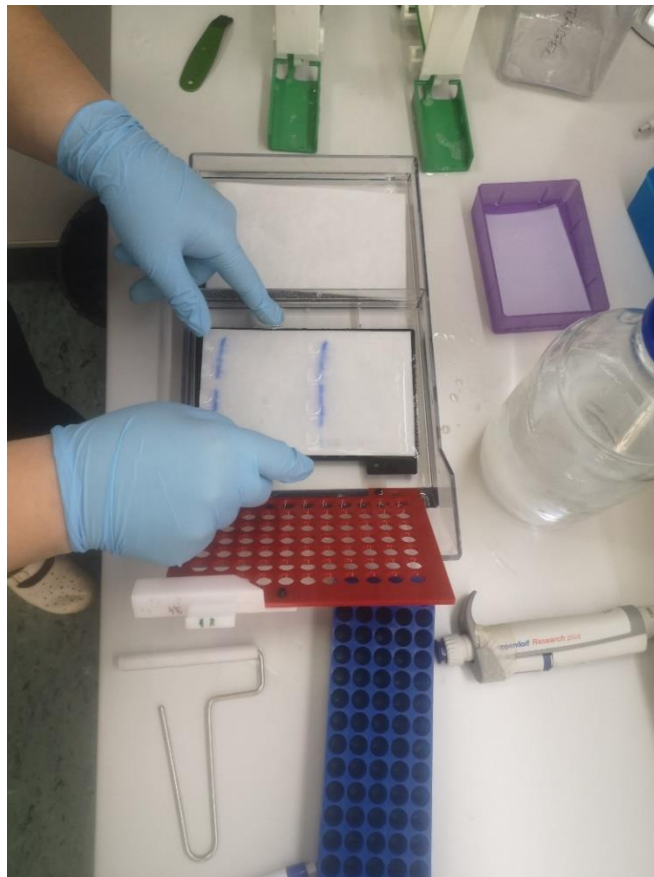
**Slika 1.** Kuhanje uzoraka i pufera za nanošenje na gel (izvor: fotografirala autorica rada)

U kadnicu za elektroforezu stavljena su 4 komercijalno dostupna akrilamidna Mini-PROTEAN TGX Stain-Free gela (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Kadnicu je gotovo do vrha napunjena s puferom za elektroforezu te su zatim skinuti češljici s gela. U prvu jažicu nanešen je standard, a u ostale jažice uzorke koje ispitujeemo. Svaki gel sadržavao je 10 jažica za nanošenje uzoraka.

Slijedila je elektroforeza koja se odvijala u hladnjaku na 4 °C pod naponom od 100 V tijekom 2 sata. Na ovaj način se razdvajaju proteini na temelju mase i time proteini manje mase putuju brže od proteina veće mase koje pronalazimo višlje na gelu.

#### 4.3.3. Prijenos proteina s gela na membranu

Nakon razdvajanja SDS-PAGE elektroforezom slijedio je prijenos proteina na PVDF membranu pomoću kazete za prijenos. Kazete za prijenos složene su tako da je na kazetu stavljena spužvica, filter papir, gel s razdvojenim proteinima, PVDF membrana, drugi filter papir, spužvica i na kraju je zatvorena kazeta stavljena u kadnicu napunjenu puferom za transfer. Kadica s kazetama je stavljena u hladnjak na 4 °C gdje se provodio prijenos proteina na membranu pod djelovanjem 200 mA tijekom dva sata. Nakon prijenosa membrana su uronjene nekoliko sekundi u Amido-BlueBlack boju koja omogućava vizualizaciju proteina. Zatim su membrane prenešene u kadnicu koja sadrži otopinu za odbojavanje (izopropanol, 10 % vodena otopina octene kiseline) i postupak odbojavanja je ponovljen 3 puta po 5 minuta. Nakon toga, slijedilo je blokiranje membrana u 5 %-tnoj otopini bezmasnog mlijeka u prahu. Blokiranje je važan korak jer sprječava nespecifično vezanje protutijela na membranu.



**Slika 2.** Priprema kazete za prijenos proteina (blotting) (izvor: fotografirala autorica rada)



#### 4.3.4. Inkubacija s protutijelima

Inkubacija s protutijelima u otopini za primarna protutijela slijedila je nakon blokiranja membrane. Primarna protutijela korištena u istraživanju su COX-1 zečje poliklonalno protutijelo (Proteintech Europe, UK, 13393-1-AP), COX-2 zečje poliklonalno protutijelo (Proteintech Europe, UK, 12375-1-AP), eNOS zečje poliklonalno protutijelo (Novus Biological, USA, NB300-500), iNOS zečje poliklonalno protutijelo (Novus Biological, USA, NB300-605), HIF-1 $\alpha$  zečje poliklonalno protutijelo (Thermo Scientific, USA, PAI-16601) i peroksidazom iz hrena (HRP, prema engl. *Horseradish peroxidase*) označeno  $\beta$ -aktin-HRP mišje monoklonalno protutijelo (Abcam, UK, ab49900). Navedena primarna protutijela su specifična za proteine od interesa koji se određuju u israživanju. Inkubacija primarnih protutijela odvijala se na Mini Rotatoru u hladnjaku na 4 °C preko noći.



**Slika 3.** Inkubacija primarnih protutijela na Mini Rotatoru u hladnjaku (izvor: fotografirala autorica rada)

Nakon inkubacije s primarnim protutijelom, membrane su inkubirane sa sekundarnim protutijelom koje je označeno s HRP-om (kozje protu-zečje HRP Abcam, UK, ab205718)

protutijelo koje je specifično za primarno protutijelo. HRP razgrađuje luminol i proizvodi luminiscentni signal i tako omogućava kemiluminiscentnu detekciju. Inkubacija sekundarnim protutijelima odvijala se na sobnoj temperaturi 2 sata.

**Tablica 1.** Omjeri razrjeđenja protutijela

<b>Protutijelo</b>	<b>Razrjeđenja</b>
COX-1 zečje poliklonsko protutijelo	1 : 500
COX-2 zečje poliklonalno protutijelo	1 : 500
eNOS zečje poliklonalno protutijelo	1 : 1000
iNOS zečje poliklonalno protutijelo	1 : 500
HIF-1 $\alpha$ zečje poliklonalno protutijelo	1 : 1000
$\beta$ -aktin-HRP mišje monoklonalno protutijelo	1 : 30000

#### 4.3.5. Kemiluminiscentna detekcija

Nakon ispiranja sekundarnih protutijela detekcija je provedena pomoću kemiluminiscentnog reagensa Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, USA) prema uputama proizvođača. Nakon inkubacije koja je trajala jednu minutu, višak reagensa je uklonjen. Membrana je stavljena između dvije folije, a signal snimljen BioRad ChemiDoc digitalnom kamerom. Izražaj  $\beta$ -aktina je određen kao kontrola nanošenja uzorka u *Western blot* metodi.



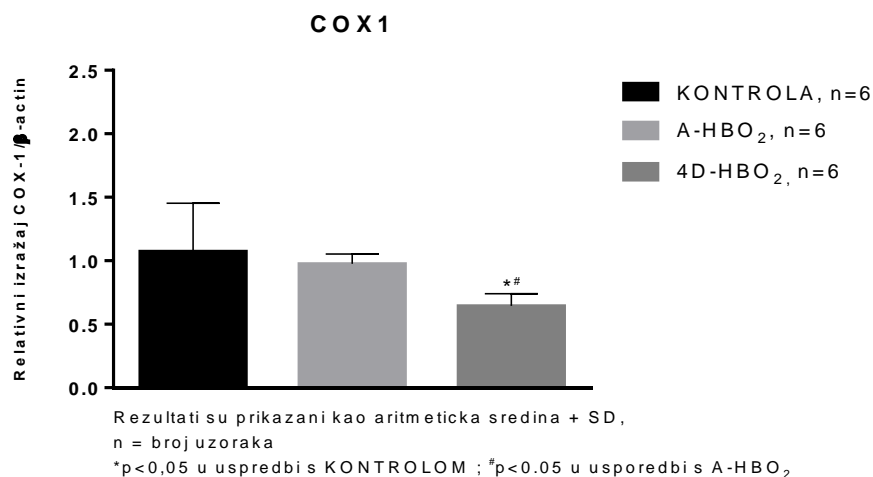
**Slika 4.** BioRad ChemiDoc digitalna kamera (izvor: fotografirala autorica rada)

#### 4.4. Statističke metode

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Za statističku analizu i usporedbu rezultata relativnog izražaja proteina koristio se test za jednosmjernu analizu varijanci za nezavisne uzorke (One-Way ANOVA) ili u slučaju neravnomjerne distribucije dobivenih podataka Holm-Sidak ili Kruskal-Wallis test. Razina statističke značajnosti određena je sa  $p < 0,05$ . Korišten je statistički program SigmaPlot 11.2 (Systat Software, Inc., Chicago, SAD) te GraphPad Prism5 (San Diego, CA, SAD).

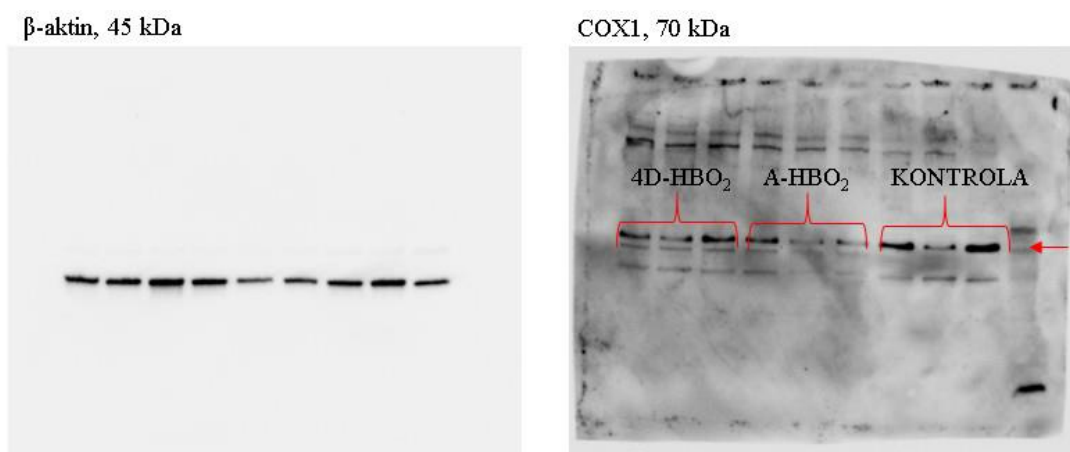
## 5. REZULTATI

### 5.1. Proteinski izražaj COX-1



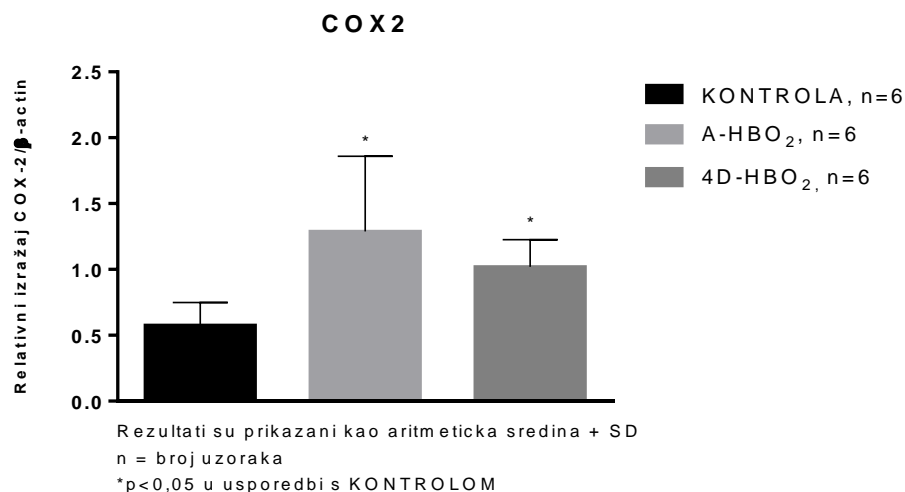
**Slika 5.** Relativni proteinski izražaj COX-1/β-aktin.

Jednosmjernom analizom varijance (One-Way ANOVA) utvrđena je statistički značajna razlika u izražaju COX-1 proteina u uzorku krvnih žila mozga između ispitivanih skupina. Utvrđen je snižen izražaj COX-1 proteina u 4D-HBO<sub>2</sub> skupini u usporedbi s kontrolnom ( $p = 0,0158$ ) i A-HBO<sub>2</sub> ( $p = 0,0360$ ) skupinom.



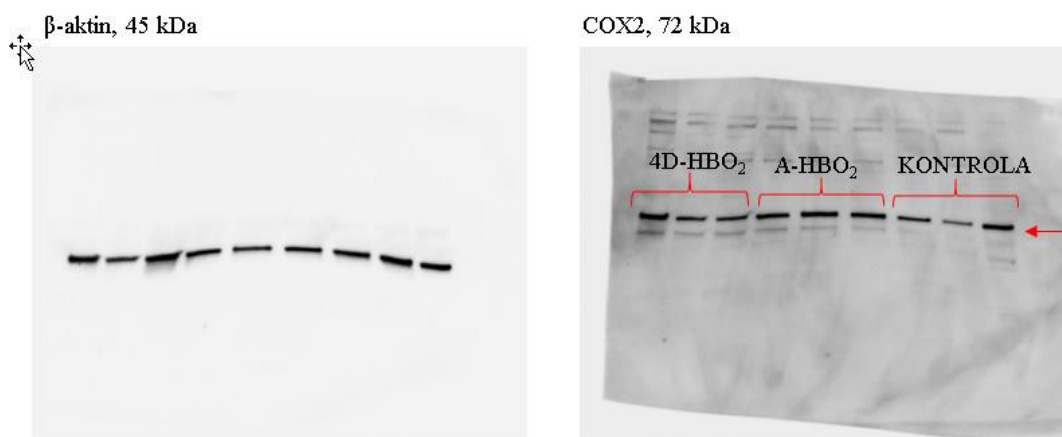
**Slika 6.** Reprezentativne slike β-aktina i COX-1. Slike su snimljene BioRad ChemiDoc digitalnom kamerom na Medicinskom fakultetu u Osijeku.

## 5.2. Proteinski izražaj COX-2



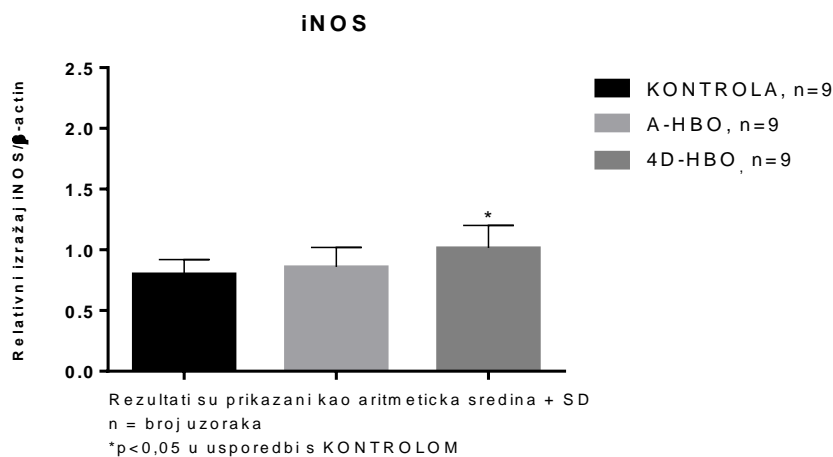
**Slika 7.** Relativni izražaj COX-2/ $\beta$ -aktin.

Statističkom metodom za jednosmjernu analizu varijance (One-Way ANOVA) utvrđena je značajna razlika izražaja COX-2 proteina u uzorku krvnih žila mozga između ispitivanih skupina. Značajno je povišen izražaj COX-2 proteina ( $p = 0,0116$ ) u A-HBO<sub>2</sub> i 4D-HBO<sub>2</sub> ( $p = 0,0432$ ) skupinama u usporedbi s kontrolnom skupinom.



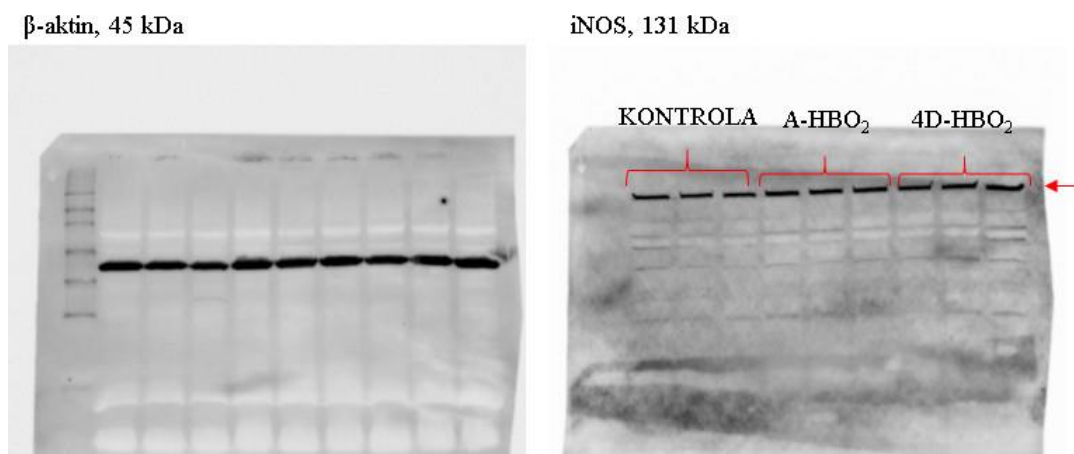
**Slika 8.** Reprezentativne slike  $\beta$ -aktina i COX-2. Slike s snimljene BioRad ChemiDoc digitalnom kamerom na Medicinskom fakultetu u Osijeku.

### 5.3. Proteinski izražaj iNOS



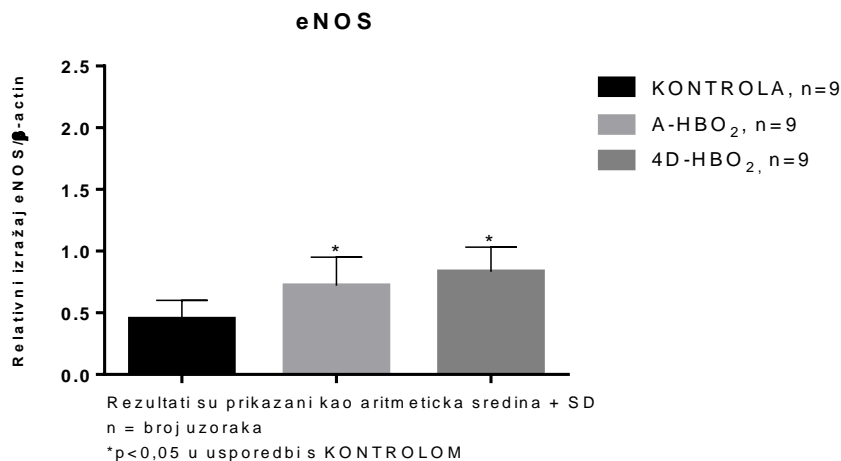
**Slika 9.** Relativni izražaj iNOS/β-aktin.

Statističkom metodom za jednosmjernu analizu varijance (One-Way ANOVA) utvrđena je razlika u izražaju iNOS proteina u uzorku krvnih žila mozga između ispitivanih skupina. Relativni izražaj iNOS proteina je povećan ( $p = 0,0311$ ) u skupini intermitentno izloženoj hiperbaričnoj oksigenaciji u usporedbi s kontrolnom skupinom.



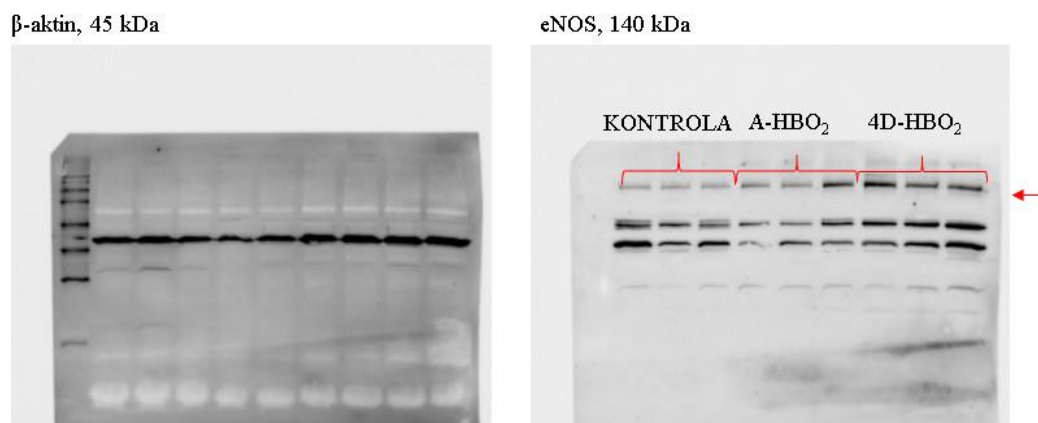
**Slika 10.** Reprezentativne slike β-aktina i iNOS. Slike su snimljene digitalnom kamerom BioRad ChemiDoc na Medicinskom fakultetu u Osijeku.

### 5.4. Proteinski izražaj eNOS



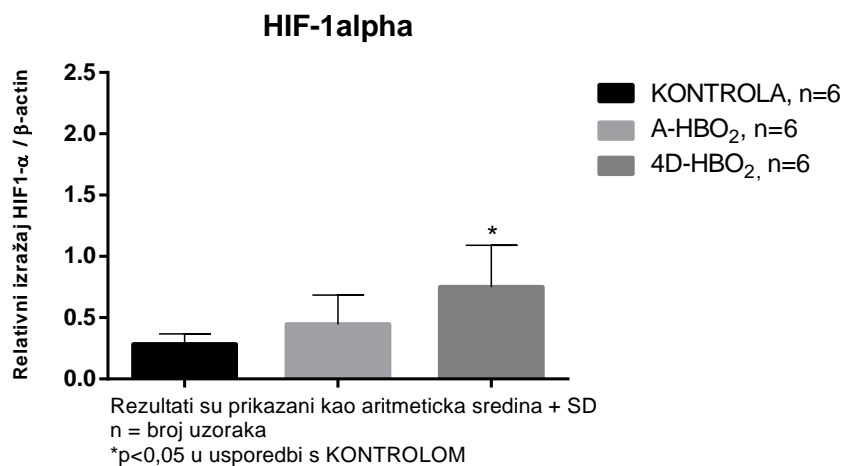
**Slika 11.** Relativni izražaj eNOS/ $\beta$ -aktin.

Statističkom metodom za jednosmjernu analizu varijance (One-Way ANOVA) utvrđena je značajna razlika u izražaju eNOS u uzorku krvnih žila mozga između ispitivanih skupina. Relativni izražaj eNOS proteina značajno je povećan ( $p = 0,0157$ ) u A-HBO<sub>2</sub> i ( $p = 0,0012$ ) 4D-HBO<sub>2</sub> skupinama u usporedbi s kontrolnom skupinom.



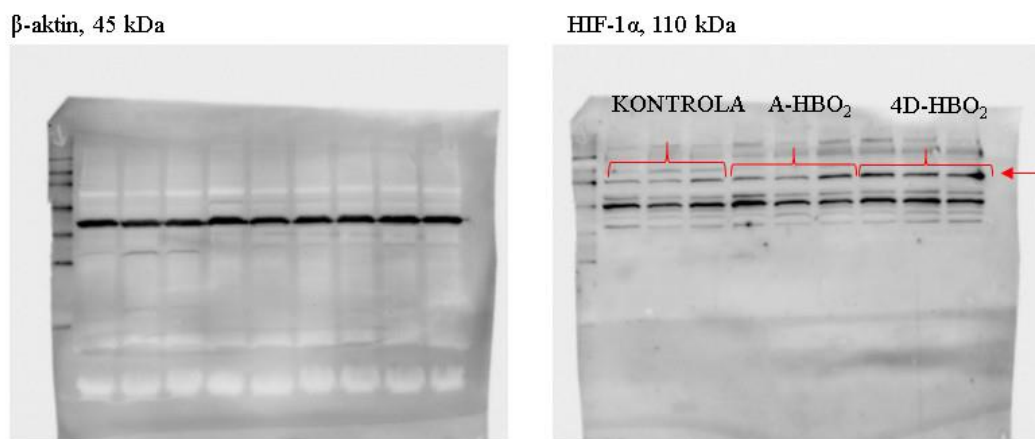
**Slika 12.** Reprezentativne slike  $\beta$ -aktina i eNOS. Slike su snimljene BioRad ChemiDoc digitalnom kamerom na Medicinskom fakultetu u Osijeku.

### 5.5. Proteinski izražaj HIF-1 alfa



**Slika 13.** Relativni izražaj HIF-1- $\alpha$ / $\beta$ -aktin.

Statističkom metodom za jednosmjernu analizu varijance (One-Way ANOVA) utvrđena je značajna razlika između ispitivanih skupina. Relativni izražaj HIF-1- $\alpha$  značajno je povećan ( $p = 0,0151$ ) u 4D-HBO<sub>2</sub> skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom.



**Slika 14.** Reprezentativne slike  $\beta$ -aktina i HIF-1  $\alpha$ . Slike su snimljene BioRad ChemiDoc digitalnom kamerom na Medicinskom fakultetu u Osijeku.



## 6. RASPRAVA

Svrha provedenog istraživanja bila je istražiti kako akutno odnosno intermitentno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji utječe na izražaj proteina COX-1, COX-2, iNOS, eNOS enzima te transkripcijskog faktora HIF-1 alfa koji su uključeni u mehanizme dilatacije krvnih žila. Istraživanje se provodilo na izoliranim krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora. Pomoću *Western blot* metode određen je izražaj proteina, dok je za statističku analizu i usporedbu rezultata korišten test One-Way ANOVA.

Prethodna istraživanja temeljena na hiperbaričnoj oksigenaciji provedena na Katedri za fiziologiju i imunologiju, pokazala su kako terapija kisikom mijenja oksidativni status i reaktivnost aortnih prstenova u odgovoru na acetilkolin i hipoksiju kod zdravih životinja te kako može utjecati na izražaj gena i proteina antioksidativnih enzima te enzima uključenih u mehanizme dilatacije (27 - 32). Poznato je da HBO<sub>2</sub> ima pozitivne učinke u liječenju nuspojava uzrokovanih dijabetesom kao što su dijabetički ulkusi. U istraživanju provedenom na dijabetičkim štakorima, Kibel i suradnici su dokazali da terapija HBO<sub>2</sub> dovodi do značajnog povećanja vaskularnih odgovora na angiotenzin (1-7) (28). Daljnja istraživanja i projekti usmjereni su u istraživanje reaktivnosti i mehanizama dilatacije cerebralne cirkulacije te je ovo istraživanje dio institucijskih projekata pri Katedri za fiziologiju i imunologiju čiji je cilj istraživanja upravo hiperbarična oksigenacija i kisik sam po sebi.

Istraživanja provedena na životinjskim modelima pokazala su da postoji interakcija između reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i enzima koji proizvode vazoaktivne metabolite (NOS, COX-1, -2, CYP450). ROS mogu biti nusproizvodi oštećene aktivacije tih enzima zajedno s aktivacijom NAD(P)H oksidaze, ROS također može djelovati na COX enzime tako da mijenjaju svoj smjer prema proizvodnji vazokonstriktora i / ili smanjenjem biodostupnosti NO (27). Nadalje, u istraživanju Drenjančević i suradnici predlažu hipotezu da se vrijeme između dvaju izlaganja može promatrati kao pseudohipoksija, te se zbog toga učinak hiperbaričnog kisika može promatrati na drugi način, a ne samo kroz prizmu povećanog oksidativnog stresa i njegovog učinka (27, 33).

Zbog toga što učinkovitost terapije HBO<sub>2</sub> općenito ovisi o ponovljenim izlaganjima kroz nekoliko dana (34), važno je definirati molekularne interakcije kada se primjenjuje ponovo. Rezultati prikupljeni u dosadašnjim istraživanjima upućuju na to da ponavljana izloženost HBO<sub>2</sub> dovodi do učinkovitijeg uklanjanja ROS-a, promijene vaskularne reaktivnosti i povećane proizvodnje NO-a.

Jedna od glavnih zaključaka u istraživanju provedenom od strane Mihaljević i suradnika pokazuje da se prilikom jednokratnog akutnog izlaganja HBO<sub>2</sub> smanjuje vazorelaksacija, dok se usporedno s time povećava proizvodnja superoksida (31). Zhang i suradnici pokazali su da je HIF-1 $\alpha$  povezan s regulacijom vaskularne reaktivnosti utječući na izražaj COX-2, iNOS, eNOS, HO-1, te produkciju CO, NO i prostaglandina (35).

Ovim istraživanjem, određivanjem relativnog izražaja COX-1 i COX-2 prikazani su suprotni rezultati. Izražaj proteina COX-1 je značajno snižen u skupini 4D-HBO<sub>2</sub> u usporedbi s kontrolnom skupinom, dok je relativni izražaj COX-2 povišen u A-HBO<sub>2</sub> i 4D-HBO<sub>2</sub> skupinama u usporedbi s kontrolnom skupinom. Proteinski izražaj COX-2 je povećan što je u skladu s prethodnim rezultatima Kaidi-a i suradnika koji su dokazali da je up-regulacija COX-2 transkripcijska i povezana je s induciranjem pomoću HIF-1 $\alpha$  (36). Također, mjerili smo i relativni izražaj dvije izoforme dušik-oxid sintaze. iNOS pronalazimo u različitim stanicama i djelovanjem HBO<sub>2</sub> dolazi do porasta relativnog izražaja kod 4D-HBO<sub>2</sub> skupine u usporedbi s kontrolnom skupinom. Dok se relativni izražaj eNOS također povećava kod 4D-HBO<sub>2</sub> skupine, ali i kod A-HBO<sub>2</sub> skupine u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nasuprot tome, Ding i suradnici su u istraživanju provedenom na Sprague-Dawley štakorima Western blot metodom utvrdili da nakon izlaganja štakora HBO<sub>2</sub> izražaj iNOS i nNOS se smanjuje u usporedbi sa grupom štakora koja nije izložena HBO<sub>2</sub> (37). Wang i sur. su svojim istraživanjem dokazali da djelovanjem HBO<sub>2</sub> dolazi do poboljšanja neurološke funkcije i smanjenja edema na mozgu, ali se time smanjuje izražaj proteina HIF-1 alfa (38). Ovim istraživanjem dokazano je da se relativni proteinski izražaj HIF-1 alfa nakon četiri dana uzastopne terapije hiperbaričnom oksigenacijom povećava u usporedbi s kontrolnom skupinom što je u skladu s prethodnim istraživanjem na aortama Sprague-Dawley štakora (32).

Na temelju dobivenih rezultata, potvrđen je utjecaj hiperbarične oksigenacije na izražaj proteina enzima uključenih u mehanizme vaskularne reaktivnosti u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora. Za konačne zaključke o utjecaju hiperbarične oksigenacije na cerebralnu vaskularnu reaktivnost potrebno je provesti mjerenja izražaja gena ciljanih enzima te funkcionalna mjerenja vaskularne reaktivnosti na izoliranim žilama.

## 7. ZAKLJUČAK

Na temelju prikupljenih rezultata može se zaključiti :

Hiperbarična oksigenacija ima značajan utjecaj na izražaj proteina enzima uključenih u mehanizme dilatacije ovisno o duljini izlaganja.

- 1) Intermitentno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji značajno smanjuje izražaj proteina COX-1 u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora u usporedbi s kontrolnom skupinom i A-HBO<sub>2</sub>.
- 2) Akutno i intermitentno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji dovodi do značajnog povećanja proteinskog izražaja COX-2 i eNOS.
- 3) Intermitentno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji značajno povećava izražaj proteina iNOS i HIF-1  $\alpha$  u uzorku krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Ispitati utjecaj akutnog i intermitentnog izlaganja hiperbaričnom kisiku na izražaj proteina NOS i COX enzima koji sudjeluju u mehanizmu dilatacije krvnih žila mozga zdravih Sprague-Dawley štakora. Također, cilj je ispitati utjecaj HBO<sub>2</sub> na izražaj transkripcijskog faktora HIF-1  $\alpha$  i svladati princip *Western blot* metode kojom se određuje izražaj proteina.

**Nacrt studije:** Eksperimentalna studija na izoliranim organima pokusnih životinja.

**Materijali i metode:** Zdravi, muški Sprague-Dawley štakori, starosti 8- 10 tjedana nasumično su podijeljeni u 3 skupine. Kontrolnu skupinu čine zdravi štakori koji nisu izloženi hiperbaričnoj oksigenaciji. Akutnom djelovanju hiperbarične oksigenacije izložena je skupina A-HBO<sub>2</sub> i žrtvovani su odmah nakon izlaganja. Skupina Sprague-Dawley štakora 4D-HBO<sub>2</sub> je izložena intermitentnom djelovanju hiperbarične oksigenacije svakodnevno kroz četiri dana i žrtvovana peti dan. U uzorku krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora pomoću *Western blot* metode određen je izražaj proteina enzima uključenih u mehanizme dilatacije krvnih žila (COX-1, COX-2, iNOS i eNOS) i transkripcijskog faktora HIF-1 alfa.

**Rezultati:** Utvrđen je značajno smanjen izražaj COX-1 proteina u 4D-HBO<sub>2</sub> skupini Sprague-Dawley štakora koji su izloženi intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji u odnosu na ostale ispitivane skupine, dok intermitentno izlaganje hiperbaričnoj oksigenaciji značajno povećava izražaj proteina iNOS i HIF-1 alfa u uzorku krvnih žila mozga u usporedbi s kontrolnom skupinom i A-HBO<sub>2</sub>. Proteinski izražaj COX-2 i eNOS značajno je povećan u A-HBO<sub>2</sub> i 4D-HBO<sub>2</sub> skupini u odnosu na kontrolnu skupinu.

**Zaključak:** Hiperbarična oksigenacija značajno utječe na izražaj proteina enzima uključenih u mehanizme dilatacije ovisno o duljini izlaganja.

**Ključne riječi:** hiperbarična oksigenacija, Western blot, krvne žile mozga, HIF-1 alfa, proteinski izražaj

## 9. SUMMARY

### **Influence of acute and intermittent hyperbaric oxygenation on the protein expression of enzymes involved in vascular dilatation mechanisms and HIF-1 alpha transcription factor in Sprague-Dawley rats**

**Objectives:** Investigate the effect of acute and intermittent exposure to hyperbaric oxygen on the protein expression of NOS and COX enzymes involved in the dilatation mechanism of brain blood vessels of healthy Sprague-Dawley rats. Also, the aim is to examine the influence of hyperbaric oxygenation on the expression of the transcription factor HIF-1  $\alpha$  and to master the principle of the Western blot method which determines the expression of proteins.

**Study design:** Experimental study on isolated organs of experimental animals.

**Material and methods:** Healthy, male Sprague-Dawley rats, 8-10 weeks old, were divided into 3 groups. The control group consists of healthy rats that are not exposed to hyperbaric oxygenation. The group A-HBO<sub>2</sub> was exposed to acute effects of hyperbaric oxygenation and they were sacrificed immediately after exposure. The Sprague-Dawley group of 4D-HBO<sub>2</sub> was exposed to intermittent hyperbaric oxygenation daily for four days and sacrificed on the fifth day. The expression of protein enzymes involved in the dilatation mechanisms of blood vessels (COX-1, COX-2, iNOS, eNOS) and transcription factor HIF-1 alpha was determined in a sample of Sprague-Dawley rat brain blood vessels using the Western blot method.

**Results:** Significantly reduced COX-1 protein expression was found in the 4D-HBO<sub>2</sub> group of rats exposed to intermittent hyperbaric oxygenation compared to other study groups, while intermittent exposure to hyperbaric oxygenation significantly increased iNOS and HIF-1 alpha protein expression in a sample of brain blood vessels compared to the control group and A-HBO<sub>2</sub>. Protein expression of COX-2 and eNOS was significantly increased in the A-HBO<sub>2</sub> and 4D-HBO<sub>2</sub> groups compared to the control group.

**Conclusion:** Hyperbaric oxygenation significantly affects the protein expressions of enzymes involved in dilation mechanisms depending on the length of exposure.

**Key words:** hyperbaric oxygenation, Western blot, brain blood vessels, HIF-1 alpha, protein expression

**10. LITERATURA**

1. Hajhosseini B, Kuehlmann BA, Bonham CA, Kamperman KJ, Gurtner GC. Hyperbaric Oxygen Therapy: Descriptive Review of the Technology and Current Application in Chronic Wounds. *PRS Glob Open*. 2020;8(9):e3136.
2. Gill AL, Bell CNA. Hyperbaric Oxygen : its uses , mechanisms of action and outcomes. *QJM*. 2004;97:385-395.
3. Sahni T, Singh P, John MJ. Hyperbaric Oxygen Therapy : Current Trends and Applications. *J Assoc Physicians Indija*. 2003;51:280-4.
4. Ortega MA, Fraile-Martinez O, Garcia-Montero C, Callejon-Pelaez E, Saez MA, Alvarez-Mon MA, i sur. A General Overview on the Hyperbaric Oxygen Therapy: Applications, Mechanisms and Translational Opportunities. *Medicina*. 2021;57(9):864.
5. Hu Q, Manaenko A, Bian H, Guo Z, Huang JL, Guo ZN, i sur. Hyperbaric Oxygen Reduces Infarction Volume and Hemorrhagic Transformation Through ATP/NAD<sup>+</sup>/Sirt1 Pathway in Hyperglycemic Middle Cerebral Artery Occlusion Rats. *Stroke*. 2017; 48(6):1655-1664.
6. Leach RM, Rees PJ, Wilmschurst P. Hyperbaric oxygen therapy. *BMJ*. 1998; 317(7166):1140-3.
7. Sharma R, Sharma SK, Mudgal SK, Jelly P, Thakur K. Efficacy of hyperbaric oxygen therapy for diabetic foot ulcer, a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Sci Rep*. 2021;11(1):2189.
8. Weaver LK, Hopkins RO, Chan KJ, Churchill S, Elliott CG, Clemmer TP i sur. Hyperbaric oxygen for acute carbon monoxide poisoning. *N Engl J Med*. 2002; 3;347(14):1057-67.
9. Robbins T, Gonevski M, Clark C, Baitule S, Sharma K, Magar A i sur. Hyperbaric oxygen therapy for the treatment of long COVID: early evaluation of a highly promising intervention. *Clin Med (Lond)*. 2021;21(6):e629-e632
10. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and HIF-2 $\alpha$  in Hypoxic Gene Regulation. *Mol Cell Biol*. 2003;23(24):9361–9374.
11. Hirota K, Semenza GL. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;9;338(1):610-6.
12. Gaspar JM, Velloso LA. Hypoxia Inducible Factor as a Central Regulator of Metabolism – Implications for the Development of Obesity. *Front Neurosci*. 2018;12:813.

13. Shih SC, Claffey KP. Hypoxia-mediated regulation of gene expression in mammalian cells. *Int J Exp Pathol*. 1998;79(6):347-57.
14. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*. 2004;29;36(1):1-12.
15. Sellers RS, Radi ZA, Khan NK. Pathophysiology of Cyclooxygenases in Cardiovascular Homeostasis. *Vet Pathol*. 2010;47(4):601-13.
16. Florez A, de Haro J, Martinez E, Varela C, Bleda S, Acin F. Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition Reduces Endothelial Dysfunction and Improves Inflammatory Status in Patients With Intermittent Claudication. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(8):851-7.
17. Brooks P, Emery P, Evans JF, Fenner H, Hawkey CJ, Patrono C, i sur. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Rheumatology*. 1999;38(8):779-88.
18. Angelis D, Savani R, Chalak L. Nitric oxide and the brain. Part 1: Mechanisms of regulation, transport and effects on the developing brain. *Pediatr Res*. 2020;89(4):738-745.
19. Angelis D, Savani R, Chalak L. Nitric oxide and the brain. Part 2: Effects following neonatal brain injury-friend or foe?. *Pediatr Res*. 2020;89(4):746-752.
20. Chia PY, Teo A, Yeo TW. Overview of the Assessment of Endothelial Function in Humans. *Front.Med*. 2020; doi: 10.3389.
21. Čavka A i sur. Endotelna funkcija – funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. *Med Vjesn*. 2012;44(1-4):135-146.
22. Jia G, Aroor AR, Jia C, Sowers JR. Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1;1865(7):1802-1809.
23. Tobwin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAC*. 1979;76:4350-4354.
24. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*. 1981; 112:195-203.
25. Kone B, Sarro YS, Baya B, Dabita D, Coulibaly N, Wague M, i sur. Diagnostic Performances of Three Rapid Diagnostic Tests for Detecting HIV Infections in Mali. *Infect Dis Diagn Treat*. 2019;3(1):134.

26. AbuSalah MAH, Gan SH, Al-Hatamleh MAI, Irekeola AA, Shueb RH, Yean Yean C. Recent Advances in Diagnostic Approaches for Epstein-Barr Virus. *Pathogens*. 2020; 9(3):226.
27. 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 (4):319-328.
28. 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 epoxyeicosatrienoic acids. *Diab Vasc Dis Res*. 2015;12(1):33-45.
29. Unfirer S, Mihalj M, Novak S, Kibel A, Cavka A, Mihaljevic Z, i sur. Hyperbaric oxygenation affects the mechanisms of acetylcholine-induced relaxation in diabetic rats. *UHM* 2016, Vol. 43, No. 6.
30. Kibel A, Cavka A, Cosic A, Falck JR, Drenjancevic I: Effects of hyperbaric oxygenation on vascular reactivity to angiotensin II and angiotensin-[1-7] in rats. *Undersea Hyperb Med*. 2012;39(6):1053-1066.
31. Mihaljević Z, Matić A, Stupin A, Rašić 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; 2018:7406027.
32. Mihaljević Z, Matić A, Stupin A, et al. Arachidonic Acid Metabolites of CYP450 Enzymes and HIF-1 $\alpha$  Modulate Endothelium-Dependent Vasorelaxation in Sprague-Dawley Rats under Acute and Intermittent Hyperbaric Oxygenation. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(17):6353.
33. Drenjancevic I, Kibel A: Restoring vascular function with hyperbaric oxygen treatment: recovery mechanisms. *J Vasc Res*. 2014;51(1):1-13.
34. Gesell LB, Ed.: *Hyperbaric Oxygen Therapy Indications*. The Hyperbaric Oxygen Therapy Committee Report, Undersea and Hyperbaric Medical Society, Durham, NC, USA, 12th edition, 2008.
35. Zhang Y, Ming J, Li T, Yang G, Xu J, Chen W, Lin L. Regulatory effects of hypoxia-inducible factor 1 alpha on vascular reactivity and its mechanisms following hemorrhagic shock in rats. *Shock* 2008;30 (5):557-62.
36. Kaidi A, Qualtrough D, Williams AC, Paraskeva C. Direct Transcriptional Up-regulation of Cyclooxygenase-2 by Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Promotes Colorectal Tumor



- Cell Survival and Enhances HIF-1 Transcriptional Activity during Hypoxia. *Cancer Res.* 2006;66 (13):6683-6691.
37. Ding Y, Yao P, Hong T, Li H, Zhu Y, Han Z, i sur. The analgesic effect of early hyperbaric oxygen treatment in chronic constriction injury rats and its influence on nNOS and iNOS expression and inflammatory factor production. *Mol pain.* 2018; 14.
38. Wang C, Niu F, Ren N, Wang X, Zhong H, Zhu J, i sur. Hyperbaric Oxygen Improves Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rats Probably via Inhibition of Autophagy Triggered by the Downregulation of Hypoxia-Inducing Factor-1 Alpha. *BioMed Res Int.* 2021; 6615685.

## 11. ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci :

Ime i prezime: Ana Omičević

Datum rođenja: 06.10.1999

Mjesto rođenja: Osijek

Adresa: Hanibala Lucića 12, 31207 Tenja

E-pošta: [ana.omicevic@gmail.com](mailto:ana.omicevic@gmail.com)

### Obrazovanje:

2006.- 2014. Osnovna škola Tenja, Tenja

2014.- 2018. Tehnička škola i prirodoslovna gimnazija Ruđera Boškovića, Osijek

2019.-2022. Preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku