

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Vedran Đambić

ULOGA ADENOZINSKIH A1 I A2A RECEPTORA U PROMJENAMA VASKULARNE
REAKTIVNOSTI NAKON HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE

Doktorski rad

Osijek, 2025.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Vedran Đambić

ULOGA ADENOZINSKIH A1 I A2A RECEPTORA U PROMJENAMA VASKULARNE
REAKTIVNOSTI NAKON HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE

Doktorski rad

Osijek, 2025.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Aleksandar Kibel, dr.med.

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

Rad ima 71 stranicu.

Zahvale

Izrada ove doktorske disertacije rezultat je višegodišnjeg znanstveno-istraživačkog rada usmjerenog na razumijevanje složenih mehanizama vaskularne regulacije pod utjecajem hiperbarične oksigenacije, s posebnim naglaskom na ulogu purinergičkog sustava i adenozičkih receptora. Interes za ovu temu proizašao je iz sve većeg kliničkog i znanstvenog značaja hiperbarične oksigenacijske terapije i nedovoljno istraženog utjecaja na adenozičke receptore u vaskularnoj reaktivnosti.

Ova disertacija ne bi bila moguća bez nesebične pomoći, stručnog vodstva i podrške brojnih osoba kojima dugujem veliku zahvalnost. Prije svega, zahvaljujem svojem mentoru izv. prof. dr. sc. Aleksandru Kibelu i komentorici doc. dr. sc. Zrinki Mihaljević na kontinuiranoj podršci, stručnoj pomoći i poticanju znanstvene radoznalosti. Posebnu zahvalnost upućujem članovima istraživačkog tima i laboratorijskog osoblja čija su stručnost i posvećenost bili neprocjenjivi tijekom provedbe eksperimentalnog dijela istraživanja. Zahvaljujem Katedri za fiziologiju i imunologiju, Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije i Vivariju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku na osiguranim uvjetima i sredstvima za rad u okvirima projekata IP8-MEFOS-2020 (Uloga adenozičkih A1 i A2A receptora u promjenama vaskularne reaktivnosti nakon hiperbarične oksigenacije, voditelj projekta doc. dr. sc. Aleksandar Kibel), IP5-MEFOS-2021 (Uloga adenozičkih A1 i A2A receptora u mehanizmima vaskularne reaktivnosti nakon hiperbarične oksigenacije – molekularni pristup, voditeljica projekta doc. dr. sc. Zrinka Mihaljević), IP25-MEFOS-2024 (Uloga utišavanja NRF2 transkripcijskog čimbenika pomoću siRNA *in vivo* ili *in vitro* na endotelnu funkciju nakon hiperbarične oksigenacije kod ljudi, u animalnim modelima i staničnim kulturama, voditeljica projekta doc. dr. sc. Zrinka Mihaljević), IP7-MEFOS-2025 (Uloga NRF2 transkripcijskog faktora u vaskularnoj reaktivnosti prije i nakon hiperbarične oksigenacije te utjecaj hiperbarične oksigenacije na indikatore upale posredovane oksidativnim stresom u Sprague-Dawley štakora i ljudi, voditeljica projekta doc. dr. sc. Zrinka Mihaljević). Najiskrenije hvala i mojoj obitelji i prijateljima na razumijevanju, strpljenju i stalnoj podršci tijekom svih faza stvaranja doktorske disertacije.

Ova disertacija posvećena je svima koji vjeruju u znanost kao važno sredstvo napretka i boljeg razumijevanja svijeta.

Vedran Đambić

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1 Anatomija, histologija i funkcionalne posebnosti srednje moždane arterije u ljudi i štakora	1
1.2. Vazoreaktivnost i fiziološki podražaji vazoreaktivnosti	4
1.4. Uloga adenzinskih receptora u arterijskim krvnim žilama i mikrocirkulaciji	13
1.5. Utjecaj hiperbarične oksigenacije na krvožilni sustav	15
1.6. Utjecaj hiperbarične oksigenacije i hipoksije na adenzinske receptore i vaskularnu reaktivnost	18
2. HIPOTEZE	21
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	22
4. MATERIJALI I METODE	23
4.1. Nacrt studije	23
4.2. Materijali	23
4.3.1. Priprema pokusnih grupa i protokol izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji	25
4.3.3. <i>In vitro</i> izolirane perfundirane srednje moždane arterije	26
4.3.4. Eksperimentalni protokoli za utvrđivanje krivulje stupnjevitog odnosa doza i učinka agonista adenzinskih A1 i A2A receptora na izoliranoj srednjoj moždanoj arteriji	28
4.3.5. Eksperimentalni protokoli za utvrđivanje mehanizama vaskularne reaktivnosti na izoliranoj srednjoj moždanoj arteriji	28
4.3.6. Mjerenja dilatacije inducirane acetilkolinom, dilatacije neovisne o endotelu i maksimalnog promjera srednje moždane arterije.....	29
4.3.7. Eksperimentalni protokol za utvrđivanje genskog izražaja adenzinskih A1 i A2A receptora	29
4.3.8. Eksperimentalni protokol za utvrđivanje proteinskog izražaja adenzinskih A1 i A2A receptora	32
4.4. Statističke metode	34

5. REZULTATI	36
5.1. Tjelesna masa štakora, bazalni promjer, maksimalni promjer i aktivni tonus srednjih moždanih arterija korištenih u eksperimentima	36
5.2. Rezultati na izoliranim srednjim moždanim arterijama	37
5.2.1. Rezultati krivulja stupnjevitog odnosa doza i učinka agonista adenozijskih A1 i A2A receptora na izoliranoj srednjoj moždanoj arteriji	37
5.2.2. Rezultati utvrđivanja vaskularne reaktivnosti u odgovoru srednje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju, acetilkolin, natrijev nitroprusid te primjenu agonista i antagonista adenozijskih A1 i A2A receptora	38
5.2.3. Rezultati utvrđivanja vaskularne reaktivnosti u odgovoru srednje moždane arterije na hipoksijom potaknutu dilataciju te primjenu agonista i antagonista adenozijskih A1 i A2A receptora	46
5.3.1. Rezultati genskog izražaja adenozijskih A1 i A2A receptora	50
5.3.2. Rezultati proteinskog izražaja adenozijskih A1 i A2A receptora.....	51
6. RASPRAVA	54
8. SAŽETAK	70
9. SUMMARY	71
10. LITERATURA	72
11. ŽIVOTOPIS	95

Popis kratica korištenih u tekstu:

- 5'-AMP – 5'-adenozin monofosfat (prema engl. *5'-Adenosine monophosphate*)
- A1R – adenzinski A1 receptor (prema engl. *Adenosine A1 receptor*)
- A2AR – adenzinski A2A receptor (prema engl. *Adenosine A2A receptor*)
- ACh – acetilkolin (prema engl. *Acetylcholine*)
- Ac-HBO₂ – akutna hiperbarična oksigenacija / akutna skupina (prema engl. *Acute hyperbaric oxygenation / acute group*)
- ADA – adenzin deaminaza (prema engl. *Adenosine deaminase*)
- AK – adenzin kinaza (prema engl. *Adenosine kinase*)
- AMP – adenzin monofosfat (prema engl. *Adenosine monophosphate*)
- ANG-(1-7) – angiotenzin-(1-7) (prema engl. *Angiotensin-(1-7)*)
- ANG-II – angiotenzin II (prema engl. *Angiotensin II*)
- AP2 – adaptorski proteinski kompleks 2 (prema engl. *Adaptor protein complex 2*)
- AR – adenzinski receptor (prema engl. *Adenosine receptor*)
- BK kanali – visokoprovodni kalijeve kanali aktivirani kalcijem (prema engl. *Large conductance calcium-activated potassium channels*)
- CCPA – agonist adenzinskog A1 receptora (prema engl. *A1 adenosine receptor agonist*)
- CD26 – dipeptidil peptidaza 4 (prema engl. *Dipeptidyl peptidase 4*)
- CD39 – ekto-apiraza / ektonukleozid trifosfat difosfohidrolaza (prema engl. *Ecto-apyrase / ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase*)
- CD73 – ekto-5'-nukleotidaza / endo-5'-nukleotidaza (prema engl. *Ecto-5'-nucleotidase / endo-5'-nucleotidase*)
- cAMP – ciklički adenzin-monofosfat (prema engl. *Cyclic adenosine monophosphate*)
- cAMP/PKA put – put cikličkog adenzin-monofosfata i protein kinaze A (prema engl. *cAMP/protein kinase A pathway*)
- cGMP – ciklički gvanozin monofosfat (prema engl. *Cyclic guanosine monophosphate*)
- CGS 21680 – agonist adenzinskog A2a receptora (prema engl. *A2a adenosine receptor agonist*)
- COX – ciklooksigenaza (prema engl. *Cyclooxygenase*)
- CNT – koncentrativni nukleozidni transporter (prema engl. *Concentrative nucleoside transporter*)
- CREB – protein koji veže element odgovora na cAMP (prema engl. *cAMP response element-binding protein*)

CTRL – kontrolna skupina (prema engl. *Control group*)

DAG – diacilglicerol (prema engl. *Diacylglycerol*)

DiHETE – dihidroksieikozatetraenska kiselina (prema engl. *Dihydroxyeicosatrienoic acid*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (prema engl. *Deoxyribonucleic acid*)

DPCPX – antagonist adenozienskog A1 receptora (prema engl. *A1 adenosine receptor antagonist*)

EDHF – endotelom izveden hiperpolarizacijski faktor (prema engl. *Endothelium-derived hyperpolarizing factor*)

EDRF – endotelno derivirani vazodilatacijski faktori (prema engl. *Endothelium-derived relaxing factor*)

EET – epoksieikozatrienska kiselina (prema engl. *Epoxyeicosatrienoic acid*)

ENT – ravnotežni nukleozidni transporter (prema engl. *Equilibrative nucleoside transporter*)

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

EPSIN – epsin protein (prema engl. *Epsin protein*)

ERK1/2 – ekstracelularno signalom regulirane kinaze 1 i 2 (prema engl. *Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*)

ERK/MAPK – ekstracelularno signalom regulirane / mitogenom aktivirane protein kinaze (prema engl. *Extracellular signal-regulated / mitogen-activated protein kinases*)

ET-1 – endotelin 1 (prema engl. *Endothelin 1*)

ETA – endotelin A receptor (prema engl. *Endothelin A receptor*)

ETB1 – endotelin B1 receptor (prema engl. *Endothelin B1 receptor*)

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

GIRK – G-proteinom regulirani kalijeve kanali s unutarnjom rektifikacijom (prema engl. *G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels*)

Gs-cAMP-PKA – signalni put stimulirajućeg G-proteina preko cAMP i PKA (prema engl. *Gs-cAMP-protein kinase A pathway*)

HBO₂ – hiperbarična oksigenacija (prema engl. *Hyperbaric oxygenation*)

HETE – 20-hidroksieikozatetraenska kiselina (prema engl. *20-Hydroxyeicosatetraenoic acid*)

HHP – hiperoksično-hipoksični paradoks (prema engl. *Hyperoxic-hypoxic paradox*)

HID – hipoksijom potaknuta dilatacija (prema engl. *Hypoxia-induced dilation*)

HIF-1 α – faktor induciran hipoksijom 1 alfa (prema engl. *Hypoxia-inducible factor 1 alpha*)

HO-1 – hem-oksigenaza-1 (prema engl. *Heme oxygenase-1*)

HRE – hipoksijski odgovor element (prema engl. *Hypoxia response element*)

ICAM-1 – međustanična adhezijska molekula 1 (prema engl. *Intercellular adhesion molecule*)

1)

IK kanali – kalcijem aktivirani kalijeve kanali srednje vodljivosti (prema engl. *Intermediate-conductance calcium-activated potassium channels*)

IL – interleukin (prema engl. *Interleukin*)

In-HBO₂ – intermitentna hiperbarična oksigenacija / intermitentna skupina (prema engl. *Intermittent hyperbaric oxygenation / intermittent group*)

IP3/DAG – inozitol-1,4,5-trisfosfat / diacilglicerol (prema engl. *Inositol-1,4,5-trisphosphate / diacylglycerol*)

iNOS – inducibilna sintaza dušikovog oksida (prema engl. *Inducible nitric oxide synthase*)

JNK – c-Jun N-terminalna kinaza (prema engl. *c-Jun N-terminal kinase*)

K_{ATP} kanali – ATP-osjetljivi kalijeve kanali (prema engl. *ATP-sensitive potassium channels*)

K_{Ca} kanali – kalcijem aktivirani kalijeve kanali (prema engl. *Calcium-activated potassium channels*)

K_{ir} – rektifier kalijeve kanali / kanali s unutarnjom rektifikacijom (prema engl. *Inward rectifier potassium channels*)

K_{Ca} (BK) – vidi BK kanali

K_{Ca} (IK) – vidi IK kanali

K_{Ca} (SK) – vidi SK kanali

LTCC – L-tip naponski ovisni kalcijeve kanali (prema engl. *L-type voltage-gated calcium channels*)

LOX – lipooksigenaza (prema engl. *Lipoxygenase*)

MAPK – put kinaza aktiviranih mitogenima (prema engl. *Mitogen-activated protein kinase pathway*)

MCA – srednja moždana arterija (prema engl. *Middle cerebral artery*)

MLCK – miozin kinaza lakog lanca (prema engl. *Myosin light chain kinase*)

MLCP – miozin fosfataza lakog lanca (prema engl. *Myosin light chain phosphatase*)

mRNA – glasnička RNA (prema engl. *Messenger RNA*)

mTOR – cilj sisavaca rapamicina (prema engl. *Mammalian target of rapamycin*)

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (prema engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NF-κB – nuklearni faktor kappa B (prema engl. *Nuclear factor kappa B*)

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

Nrf2 – nuklearni faktor eritroidnog 2-povezan 2 (prema engl. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

ONOO- – peroksinitrit (prema engl. *Peroxynitrite*)
PGI₂ – prostaciklin I₂ (prema engl. *Prostacyclin I2*)
PDH – prolil hidrosilaza (prema engl. *Prolyl hydroxylase*)
PI3K- γ – fosfatidilinozitol-3-kinaza gama (prema engl. *Phosphatidylinositol-3-kinase gamma*)
PI3K/Akt – put fosfatidilinozitol-3-kinaze i protein kinaze B (prema engl. *PI3K/protein kinase B pathway*)
PKA – protein kinaza A (prema engl. *Protein kinase A*)
PKC – protein kinaza C (prema engl. *Protein kinase C*)
PKC- α – protein kinaza C alfa (prema engl. *Protein kinase C alpha*)
PNP – purinska nukleozidna fosforilaza (prema engl. *Purine nucleoside phosphorylase*)
PPAR- γ – peroksizom-proliferatorom aktivirani receptor gama (prema engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*)
PSS – fiziološka otopina soli (prema engl. *Physiological saline solution*)
RNA – ribonukleinska kiselina (prema engl. *Ribonucleic acid*)
ROS – slobodni kisikovi radikali (prema engl. *Reactive oxygen species*)
RNS – reaktivne dušikove vrste (prema engl. *Reactive nitrogen species*)
rtPCR – lančana reakcija polimeraze s reverznom transkripcijom (prema engl. *Reverse transcription polymerase chain reaction*)
SAH – S-adenozilhomocistein (prema engl. *S-adenosylhomocysteine*)
SAK – istezanjem aktivirani kationski kanali (prema engl. *Stretch-activated potassium channels*)
SCH-58261 – antagonist adenzinskog A_{2a} receptora (prema engl. *A2a adenosine receptor antagonist*)
SD – Sprague-Dawley (prema engl. *Sprague-Dawley*)
SDF-1 / CXCL12 – stromalni čimbenik 1 (prema engl. *Stromal cell-derived factor 1 / CXCL12*)
sEH – topljiva epoksid-hidrolaza (prema engl. *Soluble epoxide hydrolase*)
SK kanali – kalcijem aktivirani kalijevi kanali male vodljivosti (prema engl. *Small conductance calcium-activated potassium channels*)
SNP – natrijev nitroprusid (prema engl. *Sodium nitroprusside*)
SOD – superoksid dismutaza (prema engl. *Superoxide dismutase*)
TNF- α – tumorski nekrozni faktor alfa (prema engl. *Tumor necrosis factor alpha*)
TP – tromboksan-prostanoidni receptor (prema engl. *Thromboxane-prostanoid receptor*)

TXA2 – tromboksan A2 (prema engl. *Thromboxane A2*)

VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta (prema engl. *Vascular endothelial growth factor*)

VEGFR-1 – receptor za vaskularni endotelni čimbenik rasta 1 (prema engl. *Vascular endothelial growth factor receptor 1*)

VSMCs – glatke mišićne stanice (prema engl. *Vascular smooth muscle cells*)

Popis slika

Slika 4.2.1. Sprague-Dawley eksperimentalni štakori smješteni u samoventilirajućim kavezima	24
Slika 4.2.2. Hiperbarična eksperimentalna komora za laboratorijske životinje	24
Slika 4.2.3. Tlačni miograf povezan s računalom.....	25
Slika 4.3.3.1. Monitorski prikaz izolirane srednje moždane arterije spojene na sustav tlačnog miografa s prikazom mjerenja unutrašnjeg promjera arterije	27
Slika 4.3.7.1. Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR sustav korišten u ovom istraživanju za kvantitativno određivanje izražaja ciljnih gena metodom qPCR.....	30
Slika 4.3.7.2. UV kabinet za pripremu PCR reakcija, korišten za održavanje kontroliranih i sterilnih uvjeta tijekom manipulacije uzorcima i reagensijama	31
Slika 4.3.8.1. Sustav za Western blot analizu	32
Slika 4.3.8.2. Sustav za digitalnu detekciju Western blot signala (Bio-Rad).....	34
Slika 5.2.1.1. Odgovor srednjih moždanih arterija na selektivni agonist A1 adenzinskog receptora (CCPA)	37
Slika 5.2.1.2. Odgovor srednjih moždanih arterija na selektivni agonist A1 adenzinskog receptora (CGS-2168).....	38
Slika 5.2.2.1. Odgovor srednje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju bez primjene agonista i antagonista adenzinskih A1 i A2A receptora.....	39
Slika 5.2.2.2. Odgovor srednje moždane arterije na acetilkolin u koncentraciji od 10^{-6} M u uvjetima bez protoka.....	40
Slika 5.2.2.3. Odgovor srednje moždane arterije na natrij-nitroprusid (SNP) u koncentraciji od 10^{-6} M u uvjetima bez protoka.....	41
Slika 5.2.2.4. Odgovor srednje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju uz primjenu agonista adenzinskog A1 receptora (CCPA).....	41
Slika 5.2.2.5. Odgovor srednje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju uz primjenu antagonista adenzinskog A1 receptora (DPCPX)	42
Slika 5.2.2.6. Odgovor srednje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju uz primjenu agonista adenzinskog A1 receptora (CCPA).....	43

Slika 5.2.2.7. Odgovor srednje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju uz primjenu antagonista adenozienskog A1 receptora (DPCPX)	44
Slika 5.2.2.8. Odgovor srednje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju uz primjenu agonista adenozienskog A1 receptora (CCPA).....	45
Slika 5.2.2.9. Odgovor srednje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju uz primjenu antagonista adenozienskog A1 receptora (DPCPX)	46
Slika 5.2.3.1. Odgovor srednje moždane arterije na hipoksijom potaknutu dilataciju (HID) bez primjene agonista i antagonista adenozienskih A1 i A2A receptora.....	47
Slika 5.2.3.2. Odgovor srednje moždane arterije na hipoksijom potaknutu dilataciju uz primjenu agonista adenozienskog A1 receptora (CCPA).....	48
Slika 5.2.3.3. Odgovor srednje moždane arterije na hipoksijom potaknutu dilataciju uz primjenu antagonista adenozienskog A1 receptora (DPCPX)	48
Slika 5.2.3.4. Odgovor srednje moždane arterije na hipoksijom potaknutu dilataciju uz primjenu agonista adenozienskog A2A receptora (CGS-21680)	49
Slika 5.2.3.5. Odgovor srednje moždane arterije na hipoksijom potaknutu dilataciju uz primjenu antagonista adenozienskog A2A receptora (SCH-58261)	49
Slika 5.3.1.1. Relativni genski izražaj adenozienskih A1 receptora u perifernim moždanim arterijama	50
Slika 5.3.1.2. Relativni genski izražaj adenozienskih A2AR-a u perifernim moždanim arterijama	51
Slika 5.3.2.1. Relativni izražaj proteina i reprezentativni prikaz (blot) a) adenozienskih A1 i b) A2A receptora u perifernim moždanim arterijama određen metodom Western blot	52
Slika 5.3.2.2. Slikoviti sažetak značajnih rezultata istraživanja	53

Popis tablica

Tablica 4.3.7.1. Prikaz sekvenci primera korištenih za kvantifikaciju izražaja gena	31
Tablica 5.1.1. Prikaz tjelesne mase štakora, bazalnog promjera, maksimalnog promjera i aktivnog tonusa srednjih moždanih arterija korištenih u eksperimentima.....	36

1. UVOD

Vaskularna reaktivnost (vazoreaktivnost) odnosno sposobnost odgovora krvnih žila na različite kemijske i mehaničke podražaje vazodilatacijom ili vazokonstrikcijom ključna je za održavanje perfuzijskog tlaka i adekvatne oksigenacije tkiva (1). Regulirana je kompleksnom interakcijom prvenstveno endotelnih i glatkomišićnih stanica unutar kojih se odvijaju brojni signalni putevi među kojima purinergična signalizacija, uključujući adenzin trifosfat (ATP)/adenozin i adenzinske receptore, predstavlja ključni modulacijski put u kontroli vaskularnog odgovora, angiogeneze i vaskularnog remodeliranja (2). Adenzinski A1 receptori (A1R) i adenzinski A2a receptori (A2aR) pokazuju različite, često suprotne učinke na vaskularnu funkciju, ovisno o tipu tkiva, lokalnoj koncentraciji adenzina i fiziološkom kontekstu (3). Njihova uloga u regulaciji vaskularne homeostaze osobito je važna u uvjetima oksidativnog i metaboličkog stresa (4). S obzirom na to da hiperbarična oksigenacija (HBO₂) može promijeniti izražaj gena i proteina, modulirati signalne puteve te utjecati na strukturu i funkciju krvnih žila (4-7), posebno je zanimljivo istražiti utjecaj na adenzinergički sustav jer mehanizmi kojima HBO₂ utječe na adenzinske receptore (AR) i posljedične promjene vaskularne reaktivnosti još uvijek nisu u potpunosti istraženi.

1.1 Anatomija, histologija i funkcionalne posebnosti srednje moždane arterije u ljudi i štakora

Stijenka srednje moždane arterije (engl. *middle cerebral artery* – MCA, lat. *arteria cerebri media*) građena je od tri sloja:

- a) endotelni sloj, lat. *tunica intima*, unutarnji sloj arterije koji se sastoji se od jednoslojnog sloja endotelnih stanica koje prekrivaju lumen krvne žile iza kojeg se nalazi bazalna membrana koja zajedno sa subendotelnim slojem vezivnog tkiva, lat. *lamina elastica interna* s brojnim fenestracijama, lat. *fenestrirane membrane*, čini barijeru između krvi i dubljih slojeva stijenke
- b) mišićni sloj, lat. *tunica media*, srednji i najdeblji sloj arterijske stijenke, građen pretežno od glatkih mišićnih stanica, engl. *vascular smooth muscle cells* – VSMCs, između kojih se nalazi izvanstanični matriks bogat elastinom poredanim u lamele sa spiralno poredanim kolagenim vlaknima i
- c) adventicija, lat. *tunica adventitia*, vanjski sloj arterijske stijenke, sastavljen uglavnom od vezivnog tkiva bogatog kolagenim vlaknima poredanog uzdužno duž stijenke) (8-12).

Vaskularni endotel obložen glikokaliksom tvori biološku barijeru između intravaskularnog i ekstravaskularnog prostora kako bi regulirao transport i izmjenu molekula te je ključan za održavanje zdravlja krvnih žila i homeostaze regulirajući stres smicanja, vaskularni tonus, adheziju monocita ili leukocita, agregaciju trombocita te lučenje i ravnotežu vazodilatacijskih, vazokonstriktorskih, protuupalnih, proupalnih, oksidativnih i antioksidativnih čimbenika (13-15). Endotelni glikokaliks je negativno nabijen gelatinozni sloj, debljine do 0,5–1 μm u mikrocirkulaciji, koji prekriva luminalnu (unutarnju) površinu endotela krvnih žila i predstavlja prvu liniju barijere između protoka krvi i endotela, a sastoji se od proteoglikana, glikozaminoglikana, glikoproteina i adsorbiranih plazmatskih proteina (16, 17). Proteoglikani (npr. sindekani i glikoproteini) sidre se u membranu endotela i predstavljaju glavnu okosnicu sloja (18), glikozaminoglikani (dugi polisaharidni lanci poput heparan sulfata, hondroitin sulfata i hijaluronske kiseline) daju sloju viskoznost i negativan naboj, glikoproteini (npr. selektin, integrin, međustanična adhezijska molekula 1 (engl. *Intercellular Adhesion Molecule-1*, ICAM-1) sudjeluju u interakciji s leukocitima i trombocitima, dok se plazmatski proteini (albumin, antitrombin III, lipoproteini) vežu na glikozaminoglikane i stvaraju dodatni zaštitni sloj (19). Glikokaliks predstavlja mehaničku barijeru smanjujući propusnost žilne stijenke i sprječavajući nekontrolirani prolazak proteina i tekućine u intersticij (20), utječe na regulaciju vaskularnog tonusa kada mehanička sila protoka preko glikokaliksa prenosi signal na endotelne stanice čime se aktivira endotelna sintaza dušikovog oksida (eNOS) (14), sprječava adheziju leukocita i trombocita prekrivajući površinu endotela bogatu adhezijskim molekulama, čime smanjuje upalu i trombozu (21), pohranjuje enzime, faktore rasta i signalne molekule (npr. antitrombin III, superoksid-dismutaza (SOD), lipoproteinska lipaza) čime ostvaruje regulatornu ulogu u antioksidativnoj obrani i angiogenezi (22). Najzastupljeniji tip stanica MCA su VSMCs koje imaju veliku ulogu u miogenom odgovor (širenje ili suženje žile kao posljedica promjene perfuzijskog (intraluminalnog) tlaka) koji je neovisan o endotelu u ljudskim i štakorskim cerebralnim arterijama (23-25). Broj VSMCs se s godinama kod štakora može smanjivati, dok u patološkim uvjetima ove stanice mogu migrirati i proliferirati (26). Elastin u vaskularnoj stijenci stabilizira arterijsku strukturu i daje žilama elastičnost, a funkcija elastina (bez promjene u količini) u moždanim arterijama smanjuje se starenjem (27). Također, sama veličina i broj fenestracija smanjuju se starenjem (12). Kolagen predstavlja ključni ojačavajući strukturni element i glavnu nerastezljivu komponentu arterijske stijenke (11). U mišićnom sloju, u sinergiji s elastinom, ima važnu ulogu u očuvanju strukturnog integriteta krvnih žila te u modulaciji njihove elastičnosti i krutosti, dok u adventiciji kolagen pridonosi mehaničkoj otpornosti i regulaciji vaskularne krutosti (11,28).

Ljudska MCA najveća je grana zajedničke unutrašnje karotidne arterije podijeljena u četiri segmenta (M1 – M4), promjera ~2,5–3,5 mm, tipične građe mišićnog tipa arterija, ali s izraženom unutarnjom elastičnom laminom (12, 29). MCA u štakora predstavlja glavnu granu zajedničke unutrašnje karotidne arterije bez jasne segmentacije, promjera ~200–350 µm kod Sprague-Dawley (SD) štakora, histološki tipična mišićna arterija ranije opisana (12). Glavne razlike su, osim u promjeru i grananju, u histološkoj građi pri čemu štakorska MCA ima tanji endotelni sloj sa znatnim brojem fenestracija, znatno tanji mišićni sloj zbog manje slojeva mišićnih stanica i tanju adventiciju zbog manje elastičnih vlakana (12, 30, 31). U usporedbi sa sistemskim arterijama, MCA u ljudi i štakora nema vanjske elastične lamine, osim ponekad kod ljudskog M1 segmenta gdje postoji fragmentirana vanjska elastična lamina (29). Funkcionalno gledano ljudske MCA imaju slabiju miogensku kontrakciju i veću otpornost na akutne promjene protoka zbog višeg udjela elastičnih komponenti, dok štakorske MCA imaju izrazit miogeni tonus i osjetljivost na promjene perfuzijskog (intraluminalnog) tlaka, što ih čini pogodnima za *in vitro* ispitivanja (32). Miogena reaktivnost predstavlja intrinzični mehanizam glatkih mišićnih stanica da se aktivno kontrahiraju ili relaksiraju kao odgovor na promjene intraluminalnog (perfuzijskog) tlaka, neovisno o živčanoj ili hormonskoj regulaciji kako bi se održao protok kroz tkivo konstantnim, unatoč promjenama sistemskog krvnog tlaka, dakle spriječila hipoperfuzija ili hiperperfuzija i oštećenje endotela (33). Kada se poveća transmuralni tlak aktiviraju se mehanički osjetljivi ionski kanali što rezultira depolarizacijom membrane i vazokonstrikcijom, dok u slučaju pada transmuralnog tlaka dolazi do hiperpolarizacije i oslobađanja vazodilatacijskih molekula s ciljem vazorelaksacije (33, 34).

Kod SD štakora postoje spolne strukturne razlike u MCA: MCA ženki štakora ima manji unutarnji promjer, tanju stijenku, manje vaskularnih glatkih mišićnih stanica, manje kontraktilne sposobnosti i više kolagena u mišićnom sloju, ali ne i u adventiciji, te deblju unutarnju elastičnu laminu s manje fenestra (35). Funkcionalno gledano ženke MCA imaju viši bazalni miogeni tonus, nižu inkrementalnu rastezljivost i veće naprezanje stijenke te smanjene miogene odgovore na povišenje perfuzijskog tlaka (35). S obzirom na to da estrogen povećava sintezu dušikovog oksida (NO) i drugih vazodilatatora te da ženka MCA ima veći odgovor na NO, a slabiji na angiotenzin II (ANG-II) i endotelin 1 (ET-1), a nema odgovor na tromboksan A₂ (TXA₂), razlog pojačanog miogenog tonusa kod ženki su estrogenski uvjetovana veća gustoća struje, ali smanjene osjetljivosti visokoprovodnih kalijevih kanala aktiviranih kalcijem (engl. *Big conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels*, *BK channels*, hrv. BK kanali), dok razlog smanjenog miogenog odgovora je manji broj i manja kontraktilna sposobnost VSMCs (35).

1.2. Vazoreaktivnost i fiziološki podražaji vazoreaktivnosti

Vazoreaktivnost je sposobnost krvnih žila da se stežu (vazokonstrikcija) ili šire (vazodilatacija) pod utjecajem vazomotornih signala s ciljem prilagodbe lokalne perfuzije kako bi se zadovoljile vremenski promjenjive metaboličke potrebe tkiva (1). U osnovi vazoreaktivnosti je dinamička ravnoteža između vazodilatacijskih i vazokonstriksijskih signala, a endotel i vaskularne glatke mišićne stanice igraju dominantnu ulogu u vaskularnoj reaktivnosti (36). Vazoreaktivnost je rezultat koordiniranog djelovanja više čimbenika, uključujući endotelne, neurohumoralne, metaboličke i mehaničke mehanizme (37). Endotelne stanice luče brojne endotelno derivirane vazodilatacijske faktore (engl. *Endothelium-Derived Relaxing Factors*, EDRF) odnosno bioaktivne molekule poput ciklooksigenazom posredovanog metabolita arahidonske kiseline prostaciklina I₂ (PGI₂), lipooksigenazom posredovanih metabolita arahidonske kiseline lipoksina A₄ i B₄, NO-a, adrenomedulina, endotelom izvedenih hiperpolarizacijskih faktora (engl. *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*, EDHF) i vazokonstriksijske bioaktivne molekule (engl. *Endothelium-Derived Contracting Factors*, EDCF) poput ET-1, ciklooksigenazom posredovanih metabolita arahidonske kiseline poput TXA₂ i prostanglandina F_{2α}, lipooksigenazom posredovanih metabolita arahidonske kiseline leukotriena B₄, C₄, D₄ i E₄ te reaktivni kisikovi derivati (37). NO sintetiziran od strane eNOS predstavlja ključni medijator koji uzrokuje relaksaciju glatkih mišićnih stanica aktivacijom gvanilat ciklaze i povećanjem cikličnog gvanozin monofosfata (engl. *cyclic guanosine monophosphate*, cGMP) te smanjenjem koncentracije i povećanjem koncentracije intracelularnog kalcija (Ca²⁺) redukcijom unosa kroz L-tip naponski-ovisnih Ca²⁺ kanala (engl. *L-type voltage-dependent calcium channels*, LTCC), dok PGI₂ posreduje relaksaciju putem aktivacije adenilat ciklaze u VSMCs (37, 38). Adrenomedulin je peptidni vazoaktivni protein/hormon koji se inducira hipoksijom, oksidativnim stresom i upalnim citokinima (tumorski nekrozni faktor alfa (TNF-α), interleukin 1β (IL-1β)), a proizvodi se najviše u endotelu i VSMCs s ciljem vazodilatacije posredovane putem aktivacije puta cikličkog adenozin-monofosfata i protein kinaze A (cAMP/PKA put), ali i smanjuje ekspresiju upalnih citokina i adhezijskih molekula, štiti endotel i potiče produkciju NO, stimulira proliferaciju endotela i vaskularnu remodelaciju te kroz aktivaciju puta fosfatidilinozitol-3-kinaze i protein kinaze B (PI3K/Akt put) ima antiapoptotski učinak (38, 39). EDHF predstavlja skupinu različitih aktivnih biomolekula i aktivacijskih mehanizama u različitim vrstama arterija i arteriola kojima endotel uzrokuje hiperpolarizaciju glatkih mišićnih stanica (negativizacija membranskog potencijala) što uzrokuje zatvaranje Ca²⁺ kanala i posljedični pad intracelularne

koncentracije kalcija što za posljedicu ima vazorelaksaciju (40). U moždanim arterijama, posebice u MCA, EDHF i NO djeluju sinergistički, dok u stanjima narušene sinteze NO (upotreba inhibitora eNOS ili u patološkim stanjima poput oksidativnog stresa, hipoksija, ishemija-reperfuzija), EDHF postaje glavni medijator vaskularne relaksacije odnosno rezervni ili kompenzacijski faktor vaskularne relaksacije (41, 42). Najvažniji endotelom izvedeni hiperpolarizacijski faktori su kalij (K^+), mioendotelne spojnice, vodikov peroksid, endokanabinoidi te epoksieikozatrienska kiselina (EET) (40). Nakon stimulacije (npr. acetikolinom, bradikininom) endotelne stanice podižu svoju unutarnju koncentraciju Ca^{2+} , aktiviraju endotelne Ca^{2+} -ovisne K^+ kanale / kalcijem aktivirane kalijeve kanale (K_{Ca} kanali) i to kalcijem aktivirani kalijevi kanali male vodljivosti, SK kanali (engl. *Small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels*) te kalcijem aktivirani kalijevi kanali srednje vodljivosti, IK kanali (engl. *Intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels*)), što dovodi do otvaranja tih kanala i oslobađanja K^+ iz endotela čiji gubitak pozitivnog naboja uzrokuje hiperpolarizaciju endotela, a ona se dalje prenosi na VSMCs putem mioendotelnih spojnica (engl. *gap junctions*) poput konneksina Cx37, Cx40, Cx43, omogućavajući električni prijenos koji smanjuje membranski potencijal VSMCs i zatvaranje naponski-ovisnih Ca^{2+} kanala (43, 44). Oslobađanje kalija iz endotela u intersticijski prostor, kada K_{Ca} kanali rade, uzrokuje aktivaciju Na^+/K^+ ATP-aze i unutarnjih rektifier kalijevih kanala (engl. *inward-rectifier potassium channel*, Kir) u VSMCs dodatno hiperpolarizirajući mišićne stanice (45). Vodikov peroksid se može ponašati kao EDHF posebice u koronarnim i cerebralnim arterijama ako se generira u endotelu (npr. dismutacijom superoksida) te tako može izazvati pojačanu mobilizaciju Ca^{2+} iz endotelnih intracelularnih skladišta (endoplazmatskog retikula), što aktivira K_{Ca} kanale u endotelnim stanicama, a zatim se hiperpolarizacija može prenijeti na VSMCs kroz gap junctions ili putem izlučenja K^+ u intersticijski prostor, što zatim aktivira Kir ili Na^+/K^+ ATPazu u glatkom mišiću kako je prethodno opisano (46, 47). Endokanabinoidi, poput anandamida i 2-arahidonoilglicerola, su lipofilne molekule izvedene iz membranskih fosfolipida (arahidonske kiseline) koje mogu djelovati kao vazorelaksanti aktivirajući endotelne kanabinoidne CB_1 receptore stimulirajući tako povećanje intracelularnog Ca^{2+} u endotelnim stanicama, što otvara SK_{Ca} i IK_{Ca} kanale, dovodeći do hiperpolarizacije membrane endotela koja se dalje prenosi već opisanim mehanizmom na glatke mišićne stanice (48).

Metaboliti arahidronske kiseline predstavljaju kompleksan sustav različitih bioaktivnih molekula koje imaju različite učinke na vaskularnu strijenku (49). Esterificirana arahidonksa kiselina na unutarnjoj površini stanične membrane hidrolizira se u svoj slobodni oblik pomoću

fosfolipaze A2 te se može metabolizirati putem tri glavna enzimatska puta posredovana ciklooksigenazom (COX) (sinteza prostanglandina, prostaciklina PGI₂ i TXA₂), CYP450 epoksigenazom (sinteza epoksieikosatrienske kiseline (EET) i CYP450 ω-hidroksilazom (20-hidroksieikozatetraensku kiselinu (20HETE)) i lipooksigenazom (LOX) (sinteza leukotriena LTB₄, LTC₄, LTD₄, lipoksina LXA₄, LXB₄ i 5,12,15-hidroksieikosatetraenoične kiseline (5HETE, 12HETE, 15HETE)) (49). Tromboksan A₂, prostanglandin PGF₂α, leukotrieni B₄, C₄ i D₄ i 20-HETE mogu djelovati vazokonstriktorno jer inhibiraju K⁺ kanale i povećavaju Ca²⁺ u glatkim mišićnim stanicama (55-52), dok drugi poput PGI₂, PGD₂, EET, 12-HETE, 15-HETE i metaboliti 15-LOX (15-hidroksi-11,12-epoksieikozatrienoinska kiselina (15-H-11,12-EETA) i 11,12,15-trihidroksieikozatrienoinska kiselina (11,12,15-THETA)) mogu pokazivati EDHF-sličnu aktivnost poticanjem endotelne hiperpolarizacije i relaksacije vaskularne stijenke (53, 54). 5-HETE i PGD₂ mogu pokazivati dvosmjerne učinke na cerebralni vaskularni tonus jer u fiziološkim uvjetima PGD₂ putem prostanoidnog DP₁ receptora (Gs-cAMP-PKA) i 5-HETE preko endotelne aktivacije peroksizom-proliferatorom aktiviranih receptora gama (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, PPAR-γ) i stimulacijom puteva koji povećavaju NO signalizaciju, uzrokuju vazodilataciju (54). Međutim, u prooksidativnim i upalnim stanjima ili pri višim koncentracijama, oba spoja mogu djelovati vazokonstriktorno, preko tromboksan-prostanoidnog receptora (TP), DP₂ receptora ili direktne inhibicije K⁺ kanala i povećanja intracelularnog Ca²⁺ u glatkim mišićnim stanicama (55-59). EET-e predstavlja jedan od najvažnijih endotelom izvedenih hiperpolarizacijskih faktora i nastaje djelovanjem epokigenaza iz obitelji CYP2C i CYP2J djelujući vazodilatacijski na glatke mišiće, dok ω-hidroksilaze poput CYP4a i CYP4f proizvode 20HETE koji kontrahira glatke mišićne stanice krvnih žila (25). Sinteza EET-e je izazvana protokom krvi (engl. *shear stress*), acetilholinom, bradikininom ili metabolizmom glutamata u moždanim astroglialnim stanicama te se potom oslobađaju i difundiraju do glatkih mišićnih stanica gdje aktiviraju K_{Ca} kanale te TRPV4-kanale, uzrokujući hiperpolarizaciju i relaksaciju krvnih žila, dok se razgradnja EETs provodi putem enzimatske razgradnje topljivom epoksid-hidrolazom (engl. *soluble epoxide hydrolase*, sEH) u DHETs, što ograničava njihov vazodilatacijski učinak (60, 61). Pokazano je da djelovanje EET, posredovano aktivacijom metabotropnih glutamatnih receptora tipa I u astrocitima, ima ključnu ulogu u povećanju moždanog krvnog protoka tijekom hipoksije, djelujući kao važan endotelno-glijalni vazodilatacijski medijator (62). S druge strane, 20HETE je vazokonstriktor koji depolarizira stanice glatkih mišića krvnih žila blokiranjem BK kanala, aktivacijom protein kinaze C (PKC), tirozin kinaze Src-tipa, rho kinaze i mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) te pojačava odgovor na ANG II, ET-1, ATP i druge Gq ovisne

vazoaktivne molekule (25, 63). Također potiče vaskularnu hipertrofiju (remodeliranje), endotelnu disfunkciju, vaskularnu restenozu, angiogenezu, upalu i apoptozu (64), ali inhibira agregaciju trombocita (65). Osim endotelnih bioaktivnih molekula važan doprinos vazoreaktivnosti daju i neurohumoralni čimbenici: simpatički i parasimpatički neurotransmiteri te hormoni (npr. adrenalin, vazopresin, atrijski natriuretski peptid), kao i lokalni metabolički produkti (parcijalni tlak ugljikovog dioksida ($p\text{CO}_2$), parcijalni tlak kisika ($p\text{O}_2$), pH, adenzin i laktat) (66,67). Mehanički podražaji poput promjene transmuralnog tlaka ili trenja protokom krvi po endotelu (engl. *shear stress*) dodatno doprinose ovom složenom mehanizmu regulacije vaskularne reaktivnosti (68, 69). Dokazano je da porast transmuralnog tlaka u moždanim arterijama dovodi do aktivacije fosfolipaze A u VSMCs i katalize arahidonske kiseline iz membranskim fosfolipida čime se potiče sineza 20HETE (70). Osim vazokonstriktornih metabolita arahidonske kiseline, endotelne i glatke mišićne stanice proizvode jedan od najpotentnijih endogenih vazokonstriktora ET-1 koji djeluje preko endotelin A receptora (ETA) koji se nalaze u VSMCs uzrokujući vazokonstrikciju i proliferaciju glatkih mišićnih stanica te preko endotelin B1 receptora (ETB_1) gdje u endotelu uzrokuje vazodilataciju putem NO, PGI_2 i EDHF mehanizama, dok preko ETB_2 receptora u VSMCs vazokonstrikciju (71). Poveć izražaj ET-1 koji potiče produkciju slobodnih kisikovih radikala (ROS) i inhibira NO signalizaciju te promijenjeni omjer ETA/ ETB signalizacije tijekom hipoksije, hiperbarične oksigenacije i oksidativnog stresa doprinose promjenama vaskularne reaktivnosti (72, 73). ROS i reaktivne dušikove vrste (RNS) su kratkotrajne, ali visoko reaktivne molekule koje u povišenim koncentracijama uzrokuju oksidativni stres u vaskularnom sustavu (74).

Glavne vrste ROS uključuju superoksidni anion (O_2^-), vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksilni radikal ($\bullet\text{OH}$), dok su ključne RNS vrste dušikov (mon)oksid (NO) i peroksinitrit (ONOO^-) (75). U vaskularnom endotelu i glatkim mišićima, ROS se proizvode preko nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaze (NADPH oksidaza), nesparene eNOS-a i mitohondrija, dok upalne stanice dodatno doprinose stvaranjem superoksida i peroksinitrita (76). ROS inducira vazokonstrikciju prvenstveno smanjenjem dostupnosti NO jer superoksid reagira s NO stvarajući peroksinitrit, čime se gubi endotelno-posredovana relaksacija (77). Nadalje, ROS može direktno aktivirati glatke mišićne, stimulirajući L-tip Ca^{2+} kanale i PKC signalizaciju te inhibirajući K^+ kanale, što dovodi do depolarizacije i povećanog ulaska Ca^{2+} u stanice (78). ROS također modulira ekspresiju EDCF-a, uključujući ET-1 i vazokonstriktorne prostaglandine poput TXA_2 i 20HETE, što dodatno pojačava kontraktilni odgovor vaskularne stijenke (75). Danas je sve više novih istraživanja koja proširuju dosadašnji poznati model

vaskularne reaktivnosti i ukazuju na to da endotelne stanice komuniciraju s VSMCs i imunološkim stanicama putem egzovezikula i mikroRNA, a mehanotransdukacija je jedan od glavnih mehanizama aktivacije ovog sustava (80). Egzovezikuli, mali membranski vezikuli veličine 30–150 nm, sadrže različite molekule uključujući lipide, proteine, glasničke RNA (mRNA) i mikroRNA te omogućuju intercelularnu komunikaciju (79). Poznato je da mikroRNA-126, koja je specifična za endotel, sudjeluje u održavanju vaskularne integriteta i angiogenezi (80). S druge strane, mikroRNA-92a, također prisutna u endotelnim stanicama, može utjecati na funkciju glatkih mišićnih stanica i doprinositi patogenezi ateroskleroze (81).

U ovom radu korištena su dva fiziološka podražaja u ispitivanju izravnih promjena vazoreaktivnosti: protokom potaknuta dilatacija i hipoksijom potaknuta dilatacija. Protokom potaknuta dilatacija (engl. *Flow-Induced Dilation*, FID) označava mehanički podražaj (engl. *shear stress*) vazodilatacije krvnih žila koja nastaje kao odgovor na povećani luminalni protok krvi promjenom gradijenta tlaka na endotelne stanice čime se aktiviraju mehanotransdukcijski mehanizmi (uključujući glikokaliks i cito-skelet) s posljedičnom aktivacijom eNOS i porastom sinteze NO, PGI₂ te EDHF (82, 83). FID predstavlja ključni mehanizam autoregulacije protoka krvi, osobito u mikrovaskulaturi i malim arterijama (84). U zdravim i većim arterijama NO igra dominantnu ulogu u vaskularnoj relaksaciji, dok EDHF i PGI₂ igraju ulogu u malim arterijama i patološkim stanjima (76). Vazodilataciji također doprinosi H₂O₂ kao važan medijator FID-a jer sami mehanički podražaj aktivira mitohondrijsku i NADPH oksidazu čime nastaju ROS, a djelovanjem superoksid dismutaze iz superoksida nastaje H₂O₂ (78). On aktivira K⁺ kanale u VSMCs inducirajući hiperpolarizaciju glatke mišićne stanice te modulira kinazu aktiviranu proteinom i putevima kinaza aktiviranih mitogenima (engl. mitogen-activated protein kinase pathway, MAPK put) čime doprinosi vazodilataciji (85, 86), dok u zdravim arterijama doprinosi FID-u, posebice u mikrovaskulaturi kada NO signalizacija nije dominantna, dok u stanjima oksidativnog stresa i endotelne difunkcije može djelovati vazokonstriksijski (87). U patološkim stanjima poput hipertenzije, dijabetesa, ateroskleroze, metaboličkog sindroma, starenja i upale, protokom potaknuta dilatacija je često smanjena zbog smanjene NO-bioaktivnosti, povećanog oksidativnog stresa i upalnih procesa, dok EDHF i H₂O₂ djeluju kompenzatorno kako bi održali dilatacijski kapacitet malih arterija što u konačnici ipak rezultira povećanim vaskularnim otporom, smanjenom perfuzijom tkiva te predstavlja rani marker endotelne disfunkcije i neželjenih kardiovaskularnih događaja (84, 85, 88-90).

Hipoksijom potaknuta dilatacija (engl. *Hypoxia-induced dilation*; HID) označava metabolički podražaj vazodilatacije na smanjenu razinu kisika u tkivu (91), pri čemu se osim

aktivacije eNOS i sinteze NO, oslobađaju i drugi vazodilatatori poput prostaciklina, EDHF te lokalni metabolički produkti poput adenzina (92), kalija (93) i promjena pH (94), koji zajedno djeluju na relaksaciju glatkih mišićnih stanica vaskularnog zida aktivacijom ATP osjetljivih K⁺ kanala (engl. *ATP-sensitive potassium channels*, KATP), što je osobito značajno u moždanim arterijama i potvrđeno u istraživanjima koje su proveli Wilderman i Armstead (95).

Najvažniji medijatori vazoreaktivnosti kao odgovora na fiziološke podražaje poput FID-a, hiperoksije i HID-a su spomenuti metaboliti arahidonske kiseline (npr. prostaglandini, EET-i, 20HETE) i NO (96).

1.3. Adenzin, klasifikacija i distribucija adenzinskih receptora

Adenzin su prvi put kao biološki aktivnu tvar u srcu i krvnim žilama opisali Albert Newton Drury i Albert Szent-Györgyi 1929., dok su specifični membranski receptori za adenzin identificirani i farmakološki klasificirani tijekom 1970-ih i 1980-ih godina (97). Adenzin je endogeni nukleozid koji se može sintetizirati izvanstanično najčešće u patološkim uvjetima najprije defosforilacijom ATP-a oslobođenog iz endotelnih stanica pomoću ektonukleozid trifosfat difosfohidrolaze (CD39) u adenzin monofosfat (AMP) te dalje pomoću izvanstanične ekto-5'-nukleotidaze (CD73) u adenzin ili najčešće u fiziološkim uvjetima unutarstanično hidrolizom AMP-a pomoću citosolne endo-5'-nukleotidaze (CD73) ili iz S- adenzilhomocisteina (SAH) putem SAH hidrolaze u adenzin (97). Razgradnja adenzina u inozin odvija se prvenstveno u patološkim uvjetima pomoću adenzin deaminaza (ADA) ili se najčešće u fiziološkim uvjetima fosforilira u AMP pomoću adenzin kinaza (AK), što adenzinu daje fiziološki poluživot <1 s. (7). Inozin se dalje pretvara u hipoksantin pomoću purinske nukleozidne fosforilaze (engl. *purine nucleoside phosphorylase*, PNP) (98). Osim svoje enzimske aktivnosti, ADA se može vezati na adenzinske receptore (ekto-ADA) i pojačavati afinitet receptora i njihovu signalizaciju (99). Smjer unosa ili oslobađanja adenzina iz stanica određen je razlikom koncentracija preko membrane i budući da adenzin nije lipofilan odvija se pomoću dvije glavne skupine prijenosnika: ravnotežni nukleozidni transporeter 1 (ENT-1) i koncentrativni nukleozidni transporter (CNT) (97). ENT-ovi prenose adenzin u izvanstanični prostor putem olakšane difuzije (ENT1 i ENT2) ili transporta ovisnog o kationima (ENT3 i ENT4) (100). ENT-1 jedan je od najzastupljenijih membranski proteina endotelnih stanica koji omogućuje pasivni transport adenzina u smjeru koncentracijskog gradijenta bez potošnje energije najčešće s ciljem uklanjanja adenzina iz ekstracelularnog prostora i

podvrgavanja njegovoj unutarstaničnoj deaktivaciji, osim u situacijama hipoksije kada se smjer može mijenjati (101, 102). Postoje tri podtipa CNT transportera koji imaju značajno manju ulogu i mogu samo aktivno unositi adenzin koristeći energiju natrijevih iona (97). Koncentracija adenzina ovisi o energetsom statusu i razinama kisika u tkivu, a regulirana je upravo njegovom sintezom i razgradnjom (7).

Adenzin ostvaruje svoje biološke učinke u različitim tkivima putem aktivacije četiri G-protein-vezana membranska receptora (engl. *G protein-coupled receptor*, GPCR): A1, A2a, A2b i A3, koji se razlikuju prema farmakološkim svojstvima (97). Općenito u organizmu receptori A1 i A2a pokazuju visoki afinitet prema adenzinu, A3 srednji afinitet, dok se A2b smatra receptorom niskog afiniteta (103), osim u stanjima stresa (104). Svi podtipovi adenzinskih receptora imaju središnju domenu koja sedam puta prolazi kroz staničnu membranu, s karakterističnim izvanstaničnim glikozilacijskim i unutarstaničnim fosforilacijskim mjestima važnima za desenzibilizaciju i internalizaciju, pri čemu se razlikuju u broju aminokiselina (105). Ligandno mjesto leži u transmembranskom snopu s važnim ekstracelularnim petljama koje oblikuju ulaz za adenzin ili sintetske ligande, a vezanjem liganda dolazi do konformacijskih promjena u transmembranskom dijelu pri čemu se formira aktivna i stabilna konformacija receptora TM6 koja omogućuje vezivanje s heterotrimernim G proteinima (106). Receptor katalizira GDP u GTP na $G\alpha$ podjedinici koja se disclocira od $G\beta\gamma$ podjedinice što omogućava paralelno djelovanje obje jedinice (107). Aktivacija adenzinskih A1 i A3 receptora vezanih za G_i i G_o obitelj G proteina dovodi do inhibicije adenilat ciklaze (Gai/o), čime se smanjuje intracelularna koncentracija cAMP-a i PKA aktivnost, pri čemu Gai podjedinica također može dodatno aktivirati i određene MAPK puteve, dok suprotno tomu stimulacija adenzinskih A2A i/ili A2B receptora vezanih uz G_s obitelj G proteina (Gas) aktivira adenilat ciklazu i povećava proizvodnju cAMP-a u ciljnim stanicama što rezultira aktivacijom PKA i posljedične fosforilacije niza ciljanih proteina, ionskih kanala i transkripcijskih faktora (108). Adenzinski A2b receptor može se vezati i na G_q obitelj u određenim stanicama što rezultira aktivacijom fosfolipaze C, inozitol 1,4,5-trisfosfat/diacilglicerol (IP3/DAG) te promjenama u unutarstaničnim razinama kalcija (98). Također $G\beta\gamma$ podjedinica oba kod aktivacije svih tipova receptora paralelno može pokrenuti otvaranje ili zatvaranje ionskih kanala, npr. G-proteinom regulirani kalijevi kanali s unutarnjom rektifikacijom (engl. *G-protein-gated inwardly rectifying potassium channel*, GIRK), modulirati presinaptičke Ca^{2+} kanale, aktivirati fosfatidilinozitol-3-kinazu gama (engl. *Phosphoinositide 3-kinase gamma*, PI3K- γ) i modulirati razne enzimske aktivnosti najčešće u

brzom presinaptičkom učinku A1 receptora (107). Osim navedenih signalnih puteva aktivacija adenozijskih receptora pokreće niz regulatornih mehanizama koji kontroliraju intenzitet i trajanje signalizacije među koje pripada fosforilacija receptora, regrutacija β -arrestina, internalizacija i recikliranje receptora koji zajedno čine temelj smanjenja stanične osjetljivosti na produženu stimulaciju (tzv. desenzitizacija) (109). Nakon interakcije s G proteinom i pokretanja signalnog odgovora, aktivirani adenozijski receptor postaje supstrat za fosforilaciju koje provode G protein vezane kinaze (GRK) koje prepoznaju aktivnu konformaciju receptora i fosforiliraju serinske i treoninske ostatke u njegovom intracelularnom C-terminalnom segmentu i trećoj intracelularnoj petlji s ciljem smanjenja sposobnosti receptora da dalje aktivira G protein te stvaranja visoko afinitetnog veznog mjesta za β -arrestine 1 ili 2 (110). Fosforilirani adenozijski receptor veže β -arrestin, pri čemu mu onemogućava novi ciklus G protein signalizacije (homologna desenzitizacija), i poput adaptera/nosača (engl. *scaffolds*) povezuje receptor s drugim staničnim proteinima te aktivira alternativne MAPK/ERK signalne puteve koji pojačavaju desenzitizaciju receptora fosforilacijom samih receptora, proteina uključenih u endocitozu i sami transkripcijskih faktora odgovorih za promjenu genskog izražaja (111-113). β -arrestin formira kompleks s proteinskim komponentama endocitoznog aparata AP-2 (engl. *adaptor protein 2*) i klatrin usmjeravajući receptor-arrestin kompleks prema klatrinom obloženim vezikulama (invaginacijama plazma membrane) pri čemu se formiraju endosomi unutar kojih receptor ostaje unutarstanično lokaliziran (internalizacija receptora) (111, 114). Sudbina internaliziranih odnosno endocitoziranih receptora može završiti recikliranjem nazad na plazma membranu postupkom defosforilacije i odvajanja od β -arrestina (resenzitizacija receptora) ili u uvjetima dugotrajne stimulacije degradiranjem (engl. *down-regulation*) biti usmjeren u lizosome, čime se smanjuje ukupan broj funkcionalnih receptora u stanici (110). Kinetika i dinamika signalizacije adenozijskih receptora definiraju intenzitet i trajanje staničnog odgovora, a ovise o brzini aktivacije i deaktivacije G proteina, razini stvaranja i razgradnje sekundarnih glasnika te vremenskom slijedu uključivanja β -arrestin-ovisnih kaskada (fosforilacija, desenzitizacija i internalizacija), pri čemu brze promjene (sekunde) u koncentraciji sekundarnih glasnika (npr. cAMP, Ca^{2+}) i ionskih struja prethode kasnijim fazama (minute i sati) koje uključuju aktivaciju MAPK puta, fosforilacije efektorskih proteina te promjene u genskom izražaju (115). Znanstvena istraživanja pokazuju da su adenozijski receptori podtipova A2A i A2B podložni relativno brzom desenzitizaciji i down-regulaciji (manje od jedan sat), dok se A1 receptori nepotpuno fosforiliraju i internaliziraju znatno sporije (približno 8 sati), a A3 podtip najbrže reagira, često u trajanju od nekoliko minuta (110, 116, 117).

Osim signalizacije posredovane G proteinima, aktivacija adenzinskih receptora također utječe na niz alternativnih signalnih puteva posebice kada se stanice susreću s oksidativnim stresom, promjenama perfuzije tkiva i upalnim procesima (63). Jedna od važnih alternativnih signalnih puteva jest opisan, a posredovan je aktivacijom β -arrestina koji regrutira kinaze MAPK/ERK te druge kinaze povezane sa stresom (ROS, hipoksija) poput p38 kinaza aktivirana mitogenima (engl. *p38 mitogen-activated protein kinase*, p38 MAPK) c-Jun N-terminalna kinaza (engl. *c-Jun N-terminal kinase*, JNK), ali i aktivira protein kinazu B (Akt ili PKB) što za posljedice ima, osim opisane desenzitizacije receptora, stabilizaciju faktora inducirano hipoksijom 1 alfa (engl. *Hypoxia-inducible factor 1 alpha*, HIF-1 α), regulaciju izražaja antioksidativnih gena i modulaciju endotelne barijere (111, 118, 119). Aktivacija A2A i A2B receptora preko G $\beta\gamma$ podjedinice ili β -arrestin uzrokuje regrutaciju fosfoinozimid 3-kinaze (engl. *Phosphoinositide 3-kinase*, PI3K) koja pretvorbom PIP2 u PIP3 aktivira PKB koja se spaja sa svojim aktivirajućim kinazama i postaje aktivna te u daljnjoj kaskadi fosforilira i aktivira eNOS s ciljem vazodilatacije i zaštite endotela, stabilizira transkripcijskih faktor HIF-1 α koji aktivira vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) s ciljem angiogeneze i vaskularne adaptacije te fosforilira pro-apoptotski protein Bad čime ga inaktivira i više nema sposobnost blokirati anti-apoptotski protein B-limfom 2 (Bcl-2) koji blokira apoptotski put sprečavajući otpuštanje citokroma C iz mitochondrija s ciljem preživljavanja stanica (97, 113, 120). Aktivacija A2A receptora aktivira Src kinaze preko β -arrestina pri čemu ona fosforilira VEGF receptor i integrine te na taj način modulira angiogenezu i reorganizaciju citoskeleta (121). cAMP neovisno o PKA aktivira i regulira signal Epac (engl. *Exchange Protein directly Activated by cAMP*) koji prenosi signal na Rap1/B-Raf/MEK/ERK kaskadni put utječući na adheziju i endotelnu barijeru (122). Aktivacija A2A i A2B receptora inducira Nrf2 faktor (engl. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, Nrf2) koji povećava genski izražaj hem oksigenaze 1 (HO-1), SOD i katalaze s ciljem smanjenja ROS-a i oksidativnog stresa (123). Široka rasprostranjenost ovih receptora u živčanom, kardiovaskularnom, respiratornom, gastrointestinalnom, urogenitalnom i imunološkom sustavu te u kostima, zglobovima, očima i koži naglašava njihovu važnu ulogu u fiziopatologiji (97). Raznolikost funkcija koje posreduju adenzinski receptori upućuje na ključnu ulogu adenzinske signalizacije u održavanju homeostaze i u adaptacijskim odgovorima na stres poput hipoksije ili hiperoksije.

1.4. Uloga adenozijskih receptora u arterijskim krvnim žilama i mikrocirkulaciji

Adenozijski receptori (A1, A2A, A2B i A3) izražavaju se ne samo na endotelnim stanicama, već i na glatkim mišićnim stanicama krvnih žila te u perivaskularnim živcima gdje moduliraju vaskularni tonus putem endotelno-posredovane i endotelno-neovisne relaksacije ili putem kontrakcije, kao i regulacijom neurogenog prijenosa (124). Izraženost i funkcionalna uloga pojedinih podtipova u vaskularnoj stijenci mogu varirati ovisno o vrsti krvne žile, fiziološkom stanju organizma ili patološkim okolnostima poput hipoksije, hipertenzije ili oksidacijskog stresa (125). A2AR i A2BR su dominantno izraženi na endotelnim stanicama, gdje potiču vazodilataciju, dok su A1 i u manjoj mjeri A3 prisutni i u endotelu, ali češće u glatkim mišićnim stanicama, gdje mogu izazvati kontrakciju ili relaksaciju ovisno o vrsti krvne žile i patofiziološkim okolnostima (125). Adenozijski A1 receptori u krvnim žilama imaju visok afinitet što znači da se aktiviraju već pri bazalnim tj. fiziološkim koncentracijama adenzina ($EC_{50} \approx 0.1-0.3 \mu M$), a u moždanoj i bubrežnoj mikrocirkulaciji A1R pridonose miogenoj reaktivnosti i autoregulaciji protoka (125). A2AR imaju visok afinitet za adenzin ($EC_{50} \approx 0.3-0.7 \mu M$) i djeluju u fiziološkim i patološkim uvjetima, dok A2bR imaju niži afinitet ($EC_{50} \approx 10-20 \mu M$) i aktiviraju se tek pri povišenim koncentracijama adenzina primjerice tijekom hipoksije ili reperfuzije (126). A3R u krvnim žilama imaju niži afinitet za adenzin ($EC_{50} \approx 1-5 \mu M$) i aktiviraju se tek pri višim koncentracijama adenzina tijekom hipoksije, ishemije ili upale, ali funkcionalno imaju dvostruku ulogu, pri čemu u fiziološkim uvjetima mogu doprinijeti blagoj vazokonstrukciji, dok u hipoksiji ili hiperoksiji imaju citoprotektivnu i vazodilatacijsku ulogu (127). U perivaskularnim živcima A1 receptori presinaptički inhibiraju oslobađanje noradrenalina, dok A2A mogu facilitirati neurotransmisiju, čime adenzin modulira i miogeni i neurogeni tonus krvnih žila (125). Adenozijski receptori imaju važnu ulogu u krvnim žilama i smatraju se ključnim posrednicima između metaboličkog statusa tkiva i vaskularnog odgovora, posebno u kontekstu hipoksije, reperfuzije i hiperbarične oksigenacije, a osim u samoj ulozi regulacije vaskularne kontraktilnosti i endotelne funkcije, imaju brojne uloge u regulaciji staničnog metabolizma, energetske homeostaze i mitohondrijske funkcije, kontroli staničnog preživljavanja i apoptoze, angiogenzi, proliferaciji, diferencijaciji i migraciji stanica, kontroli upale i imunomodulaciji, antioksidativnoj obrani stanice i neuroprotekciji (124, 128).

Aktivacija A1R u VSMCs rezultira najčešće vazokonstrukcijom putem signala posredovanog G proteinima i poznatom aktivacijom diacilglicerola (DAG) i oslobađanjem arahidonske kiseline iz fosfolipidne membrane s posljedičnom aktivacijom CYP4a što rezultira

proizvodnjom 20-HETE koja funkcionira kao sekundarni drugi glasnik i aktivira protein kinazu C alfa (PKC- α) te dolazi do posljedičnog nizvodnog aktiviranja ekstracelularno signalom regulirane kinaze 1 i 2 (ERK1/2) puta koji integrira signalizaciju za kontrakciju i prenosi je na miozin kinazu lakog lanca (MLCK), miozin fosfatazu lakog lanca (MLCP) i regulatorne proteine tankih filamenata VSMCs (63). Također, poznato je da ANG II pojačava A1 receptorima posredovanu kontrakciju te istovremeno inhibira A2B-ovisnu vazodilataciju (129). Osim regulacije vaskularne kontraktilnosti, adenoinski A1R imaju važnu ulogu u autoregulaciji protoka krvi kroz mozak i bubrege, gdje njihova aktivacija smanjuje oslobađanje noradrenalina i inhibira presinaptičku transmisiju, čime se smanjuje metaboličko opterećenje i štiti tkivo od ishemijskog oštećenja (130, 131). Nadalje, adenzin putem A1R smanjuje potrošnju ATP-a inhibicijom Na⁺/K⁺-ATPaze i kalcijevih kanala s ciljem održavanja energetske homeostaze (132).

Aktivacija A2AR u vaskulaturi putem signalnog puta stimulirajućeg G_s proteina preko cikličkog adenzin monofosfata i protein kinaze A (G_s-cAMP-PKA) inducira aktivaciju CYP-epoksigenaza (npr. CYP2C23, CYP2J2) te posljedičnu sintezu EET-e, koje posreduju vazodilataciju neovisnu o NO, a kada je ta signalizacija narušena (npr. u odsutnosti A2AR ili pri povišenom unosu soli), dolazi do sinteze enzima sEH koji razgrađuju EET na dihidroksieikozatretraensku kiselinu (DiHETE) i ulogu preuzima vazokonstriksijski metabolizam poput 20-HETE (133, 134). Aktivacija A2A i A2B receptora u endotelnim stanicama potiče sintezu dušikovog oksida (NO) putem fosforilacije i aktivacije endotelne NO sintaze (eNOS), što doprinosi povećanoj perfuziji tkiva i zaštiti od hipoksičnog oštećenja (137). A2AR osim smanjenja rane upalne reakcije nakon vaskularne ozljede, smanjenim oslobađanjem TNF- α , IL-1 β , IL-6, a povećanim IL-10 (131, 135, 136), dodatno mogu povećati endotelnu proliferaciju/migraciju i kapacitet angiogeneze, povećati sintezu proangiogenih faktora poput vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) ili smanjiti izražaj antiangiogenih faktora poput solubilnog VEGF receptor-1 (engl. *soluble Fms-like tyrosine kinase-1*; sFLT-1, poznat i kao engl. *soluble VEGFR-1*) (137). Nadalje, dokazano je da A2AR imaju i proaterosklerotske i antiaterosklerotske učinke, no jasan učinak zapravo nije do kraja razjašnjen (131). Aktivacija adenzinskih receptora također utječe na otpuštanje NO, prostaciklina te modulaciju reaktivnih kisikovih vrsta i citokina, čime adenzin postaje ključan lokalni modulator vaskularne reaktivnosti i upalnog odgovor (109). Aktivacija adenzinskih A2AR smanjuje oksidativni stres i povećava antioksidativni odgovor, dok A1 može pojačavati ROS u patološkim uvjetima (84, 88). Adenzinskim A2A receptorima

moгу se inhibirati kontraktilni efekti EDCF-a, dok A1 receptori pojačavaju kontrakciju u nekim arterijama (76). A2BR može stimulirati sintezu prostaciklina (PGI₂) i vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF), čime posreduje angiogenezu i vaskularnu remodelaciju (138, 139). Adenozinski receptori sudjeluju u održavanju stanične homeostaze putem PI3K/Akt i MAPK/ERK signalnih puteva koji reguliraju proliferaciju, preživljavanje i diferencijaciju vaskularnih stanica (119, 140). Aktivacija tih puteva povezana je s povećanom ekspresijom HIF-1 α i VEGF-a, što pridonosi angiogenezi i prilagodbi tkiva na hipoksične uvjete (141).

U uvjetima smanjene oksigenacije, povećana razina izvanstaničnog adenozina potiče ekspresiju A2B receptora putem HIF-1 α , što predstavlja adaptivni mehanizam za poboljšanje mikrovaskularne perfuzije i smanjenje upale (142). A2B receptor potiče proliferaciju fibroblasta i glatkih mišićnih stanica putem ERK1/2 i mTOR puta (142). A3R u stanicama krvnih žila signalizira uglavnom preko Gi/o proteina (smanjenje cAMP), ali i kroz $\beta\gamma$ -ovisnu aktivaciju PLC te može inducirati i MAPK (ERK1/2) i PI3K/Akt puteve, što omogućuje modulaciju vaskularnog tonusa, proliferacije i vaskularne reaktivnosti (143, 144), ali može i modulirati imunosne odgovore, uključujući aktivaciju neutrofila i mastocita (145). Aktivacija A3R može uzrokovati vazodilataciju otvaranjem K⁺ kanala i/ili kroz NO ovisne mehanizme, dok u patološkim stanjima odgovor može doprinijeti vazokonstrukciji ili modulirati učinke drugih AR-a (146).

1.5. Utjecaj hiperbarične oksigenacije na krvožilni sustav

Hiperbarična oksigenacija (HBO₂) je neinvazivna terapijska i eksperimentalna metoda u kojoj se koristi 100 % kisik pri tlaku većem od atmosferskog, obično u rasponu od 2,0 do 2,5 apsolutne atmosfere (ATA) tijekom 90–120 minuta kroz jedan (akutni HBO₂, Ac-HBO₂) ili uzastopce više ponovljenih tretmana (intermitentna HBO₂, In-HBO₂) (5). Terapijska osnova temelji se na trima faktorima: disanje 100 %-tnog kisika pogoduje difuziji u hipoksično tkivo, koncentracija kisika u krvi raste s porastom parcijalnog tlaka kisika (pO₂) te se povećava postotak kisika otopljenog u plazmi što dovodi do hiperoksemije i hiperoksije koje ne utječu na razinu hemoglobina i nezavisan je o razini hemoglobina (147). Na molekularnoj i staničnoj razini HBO₂ direktno podiže tkivni pO₂ i smanjuje tkivnu hipoksiju, modulira oksidativni stres i antioksidativni odgovor inducirajući adaptivne antioksidativne odgovore i smanjenje kroničnih upalnih markera (148), smanjuje oksidativno oštećenje DNA i povećava signalizaciju koja podržava popravak i preživljavanje stanica (npr. Akt, NrF2) (149), pokreće signalne

putove koji nalikuju odgovorima na hipoksiju (npr. induciranje HIF-1 α signalnih puteva) čime se pokreću regenerativne kaskade bez stvarne dugotrajne hipoksije (tzv. hiperoksično-hipoksični paradoks ili pseudohipoksija) (150), modulira imunološki upalni odgovor i smanjuje leukocitnu infiltraciju u oštećenja tkiva reducirajući sintezu proinflammatoryh citokina (npr. TNF- α i IL-6) te povećavajući sintezu antiinflammatoryh citokina (npr. IL-10) (151), potiče angiogenezu i remodelaciju tkiva poticanjem genskog izražaja pro-angiogenih faktora (engl. *endothelial growth factor* (VEGF), engl. *placental growth factor* (PGF), engl. *angiopoietin* (Ang) 1 and 2) čime se poboljšava vaskularizacija tkiva (152), potiče neuroplastičnost i inducira neuroprotekciju (153). Sve ovo objašnjava njezinu učinkovitost u brojnim kliničkim stanjima (npr. kronične dijabetičke rane, refraktorni osteomijelitis, trovanje ugljičnim monoksidom, dekompresijska bolest, radijacijska oštećenja, nekrotizirajuće infekcije...), ali i sve više pronalazi primjenu za nove indikacije (post COVID19 sindrom, tuberkuloza pluća, karcinom, akutni moždani udar), no potrebna su daljnja istraživanja i standardizirani protokoli prije široke terapijske implementacije (154).

Hiperbarični kisik predstavlja signalnu molekulu koja utječe na izražaj gena i proteina, dokazano modulira signalne putove na molekularnoj, staničnoj i tkivnoj razini utječući na vaskularnu strukturu i funkciju što je od velike važnosti u fiziopatološkim procesima (5). Utjecaj hiperbaričnog kisika na mijenjanje funkcioniranja koordiniranog sustava krvnih žila i mikrocirkulacije nije u potpunosti razjašnjen (5). Učinci HBO₂ ovise o primijenjenim protokolima, trajanju i učestalosti izlaganja HBO₂ jer dugotrajna izloženost visokim koncentracijama kisika i neuspjeh u suzbijanju oksidativnog stresa mogu dovesti do toksičnosti kisika i sistemskih promjena (147). Ac-HBO₂ dovodi do povećane periferne vazokonstrikcije posredovane samom hiperoksijom (155) i prolazno narušava vazorelaksaciju te smanjuje odgovor krvne žile na hipoksiju, zbog povećane proizvodnje superoksida i ukupnog porasta oksidativnog stresa, koja se obnavlja 24 sata nakon tretmana (156). Ravnoteža između razine slobodnih radikala i razine i aktivnosti antioksidansa određuju opseg oksidativnog stresa (157). S druge strane, In-HBO₂ poboljšava vaskularnu reaktivnost na podražaje kao što su angiotenzin-(1-7) [ANG-(1-7)] i ANG II zbog aktivacije mehanizama povezanih s aktivacijom enzima CYP450 i sintezom EET-e te induciranjem antioksidativnih obrambenih mehanizama (158, 159). Stoga se pretpostavlja da akutna izloženost HBO₂ smanjuje osjetljivost i funkcijsku aktivnost adenozičkih A1 i A2A receptora te time narušava vazoreaktivnost, dok dugotrajnija izloženost HBO₂ dovodi do različitih prilagodbi u izražaju A1R i A2AR i promjena u enzimatskoj aktivnosti koja regulira pretvorbu adenozina i EET-a, što bi moglo poboljšati

vazoreaktivnost. Nadalje, ključna korist HBO₂ na vaskularni sustav je aktivacija brojnih signalnih puteva poput ekstracelularno signalom regulirana kinaza/mitogeno regulirana protein kinaza ERK/MAPK i aktivacija c-Jun N-terminalne kinaze (JNK), generiranja eNOS i stabilizacije faktora inducirano hipoksijom 1 alfa (engl. *hypoxia-inducible factor 1 alpha* (HIF-1 α)) koji su poznati regulatori vaskularne funkcije te kojima se potiče angiogeneza i neovaskularizacija putem povećanog izražaja VEGF, stromalnog čimbenika 1 (engl. *Stromal cell-Derived Factor 1* (SDF-1), novija oznaka CXCL12), proliferacije matičnih stanica i razine endotelnih progenitorskih stanica (160-162). HBO₂ učinkovito smanjuje izražaj metaloproteinaza 12 (MMP-12) koje oštećuju endotelni glikokaliks i potiču endotelnu disfunkciju (163). S druge strane, HBO₂ pojačava izražaj antioksidativnih gena u ljudskim endotelnim stanicama, smanjuje proizvodnju ROS-a i štiti od oksidativnog oštećenja (147). Također povećava izražaj glasnike RNA (mRNA) i proteina eNOS-a te time razinu NO što ima protektivni učinak na endotelne stanice (163), dok s druge strane putem ERK1/2, proteinske kinaze B (Akt) i nuklearnog faktora kappa B (NF κ B) signalnih puteva smanjuje izražaj i aktivnost inducibilne sintaze dušičnog oksida (iNOS) (147). Potencijalne koristi HBO₂ potvrđene su u održavanju integriteta endotela i poboljšanju stabilnosti plaka smanjenjem razine reaktivnih kisikovih radikala (ROS) i inhibicijom upalnih citokina (tumorski nekroznog faktora alfa (TNF- α), interleukin 6 (IL-6)) uključenih u destabilizaciju plaka (148). Hiperoksija stimulira VSMCs i endotelne stanice na autofagiju koja doprinosi uklanjanju oštećenih komponenti i održavanju zdravlja krvnih žila (164). Endotelni glikokaliks je izrazito osjetljiv na oksidativni stres, upalne citokine, hipoksiju i reperfuziju, visok krvni tlak i glikemiju (165, 165), a u uvjetima hipoksije dokazano dolazi do enzimske degradacije glikokaliksa (aktivacija heparanaza, metaloproteinaza), što povećava propusnost endotela i doprinosi edemu i disfunkciji mikrocirkulacije (167), dok sama HBO₂ se pokazala korisnom jer stabilizira i štiti glikokaliks, smanjuje oksidativni stres, potiče sintezu antioksidativnih enzima i potiče reparaciju endotela, posebice u slučaju endotelne disfunkcije (147, 168).

S obzirom na to da je poznato da MCA SD štakora ima izraženu miogenu aktivnost, važno je naglasiti kako HBO₂ može modulirati miogenu reaktivnost jer smanjuje lokalnu akumulaciju adeonzina i time smanjujući bazalnu aktivnost A1 receptora, a pojačavajući A2B/A2B signalizaciju s ciljem vazorelaksacije i stabilizacije protoka (33, 169).

In-HBO₂ potiče izražaj ne samo antioksidativnih već i citoprotektivnih gena u endotelnim stanicama (170). Antioksidativni kapacitet može spriječiti oštećenje DNA slobodnim kiskovim radiklima kod duže izloženosti HBO₂ (171).

1.6. Utjecaj hiperbarične oksigenacije i hipoksije na adenozijske receptore i vaskularnu reaktivnost

Hiperbarična oksigenacija i hipoksija imaju utjecaj na regulaciju adenozijskog signalnog puta modulacijom aktivnosti brojnih faktora koji reguliraju sintezu i razgradnju ATP-a i adenozijske, transport adenozijske, nizvodne signalne puteve nakon aktivacije adenozijskih receptora te izražaj adenozijskih receptora (4). Usklađena koordinacija sinteze i razgradnje adenozijske ključna je za koncentraciju izvanstaničnog adenozijske kao odgovor na opskrbu tkiva kisikom (4). Izvanstanično nakupljanje signalne molekule adenozijske jedan je od prvih koraka u protektivnoj auto-parakrinoj kaskadi staničnog oštećenja uzrokovanog hipoksijom, uključujući vazodilataciju posredovanu NO i stimulaciju razgradnje glikogena s ciljem proizvodnje ATP-a anaerobnom glikolizom (172). Hipoksija uzrokuje povećanje koncentracije unutarstaničnog i plazmatskog adenozijske povećanom razgradnju ATP-a u AMP koji je prekursor adenozijske, povećanjem razine ektoenzima ekto apiraze (CD39), CD73 i ADA čija sinteza ovisi o HIF-1 α te sprječavanjem razgradnje adenozijske putem adenozijske kinaze i adenozijske deaminaze (172-174). Tijekom normoksije većina sintetiziranog adenozijske potječe iz S –adenozijskehomocisteina, dok za vrijeme hipoksije sinteza je preusmjerena na 5'-adenozijske monofosfat put (5'-AMP) koji tek tada aktivira adenozijske receptore (175). Povećana koncentracija kisika (hiperoksija) ovisno o dozi smanjuje koncentraciju adenozijske u plazmi, proizvodnju cAMP-a posredovanu adenozijskim A2A receptorom i izražaj dipeptidil peptidaze 4 (CD26), dok povećava izražaj CD73 i ADA (4). Sama hiperbarija nema učinak na razinu adenozijske, ADA, CD73 i CD26 (4). Neočekivani porast CD73 u hiperoksiji je posljedica povratnog mehanizma vraćanja razine adenozijske u krvnoj plazmi (4). Neočekivani porast ADA u hipoksiji najvjerojatnije ima zaštitnu ulogu radi citotoksičnosti adenozijske (4). Također, dugotrajni gubitak aktivnosti CD26 povećava antioksidativnu sposobnost kod duže izloženosti HBO₂, dok kod akutne se smanjuje aktivnost CD26 s ciljem smanjene razgradnje vazoaktivnih i antioksidativnih peptida (176). Obrnuti odnos razine kisika i izražaja CD26 pronađeni su i u studijama kod ljudi što predstavlja adaptivni odgovor na visoke razine kisika nerazgradnjom antioksidativnih i vazokonstriktornih peptida poput snažnog neuropeptida Y putem CD26 što rezultira povećanjem vaskularnog tonusa (4). Ove promjene su od velike važnosti u patofiziološkim mehanizmima hipoksije/ishemije/upale jer smanjenje aktivacije adenozijskog signalnog puta posredovanog A2AR u akutnoj hiperoksiji kod upale pluća inhibira fiziološki mehanizam zaštite tkiva posredovan A2AR i time pogoršava akutnu upalnu ozljedu pluća, pri čemu inhalacija agonista A2AR može imati kliničku važnost (177). Postoji

hipoteza da tijekom hipoksije samo je jedan A2AR ili A2BR funkcionalno dominantan podtip u krvnim žilama, a to su navodno A2AR koji imaju snažan vazodilatatorni i proangiogeni učinak (). Jedan od glavnih medijatora odgovornih za vazodilataciju u štakora tretiranih HBO₂ je 11,12-EET, čija je sinteza povećana aktivacijom A2AR (178). A2BR predstavljaju uz A2AR, glavne adeneozinergične receptore na endotelnim stanicama, dok primjerice u uvjetima hipoksije adenozin aktivira i A3R (). Bruzzese i suradnici su pokazali da hiperoksija smanjuje izražaj gena A2AR u mozgu i samu proizvodnju cAMP posredovani tim receptorima, dok hipoksija povećava izražaj istih (4, 180). Nadalje, i sama hiperbarija mijenja izražaj proteina A2AR putem transkripcijske i translacijske regulacije (4). ROS induciran putem HBO₂ može povećati izražaj A1R-a aktiviranjem regulatornog mjesta NF kappa B na ovom genu i time pojačati citoprotektivnu ulogu adenzina neutralizacijom štetnih učinaka ROS-a (181). Hipoksija i porast razine samog adenzina također reguliraju izražaj gena adenzinskih receptora (182). Feoktsov i suradnici upozoravaju da učinci hipoksije na izražaj adenzinskih receptora A2A mogu biti specifični za stanice i tkiva (183). Zanimljivo je da hipoksija smanjuje izražaj i aktivnosti ENT-1 transportera aktivacijom A2A i A2B receptora putem HIF-1, povećavajući razine ekstracelularnog adenzina i time povećavajući vazodilatacijski učinak (172, 184). Također, aktivacija A2AR i vjerojatno A2BR može potaknuti fosforilaciju protein kinaze A (PKA), što dovodi do brze ubikvitinacije i proteasomske razgradnje ENT-1 transportera (185). S obzirom na to da HBO₂ ima suprotan učinak od hipoksije i dokazano djeluje na brojne signalne puteve (VEGF, HIF-1 α , Nrf2, hem-oksigenaza-1 (HO-1) i ERK/MAPK) koji su poznati ili sumnjivi regulatori ENT-1 aktivnosti (186), može se pretpostaviti da hiperbarična oksigenacija modulira vaskularnu reaktivnost djelomično putem promjena u izražaju ili funkcionalnoj aktivnosti ENT-1, posredno utječući na dostupnost adenzina i time na aktivaciju njegovih receptora. U normoksičnim uvjetima HIF-1 α se konstantno hidroksilira prolil hidroksilazom (PDH) i ubikvitinira putem von Hippel–Lindau proteina, čime se razgrađuje u proteasomu (187), dok u hipoksičnim uvjetima aktivnost enzima prolil hidroksilaze (PHD) opada jer im je potreban kisik kao kofaktor pa se HIF-1 α stabilizira, akumulira u citoplazmi i potom ulazi u jezgru gdje se veže na HIF-1 β i aktivira hipoksijski odgovorni element (engl. *Hypoxia-Responsive Element*, HRE) na DNA (188-200). Glavni signalni putevi povezani s HIF-1 α (engl. *HIF-1 α -related pathways*) su PI3K/Akt/mTOR put kojim se povećava translacija HIF-1 α proteina putem mTOR kompleksa (engl. *Mammalian Target of Rapamycin*) čak i pri normalnom pO₂ (119, 201), MAPK/ERK put kojim se povećava transkripcija HIF-1 α i stabilnost kompleksa HIF-1 α /HIF-1 β u jezgri (202), NF- κ B put kojim se inducira ekspresija gena za HIF-1 α (203), djelovanje ROS osobito onih koje nastaju u

mitohondrijima, stabiliziraju HIF-1 α inhibicijom PHD enzima (204) te NO koji može imati dvosmjernan učinak jer u hipoksiji stabilizira HIF-1 α , dok ga u hiperoksiji može degradirati (205). Adenozin preko A2AR i A2BR aktivira PI3K/Akt i ERK puteve u endotelnim stanicama što dovodi do povećane razine i stabilizacije HIF-1 α proteina, ključnog transkripcijskog faktora koji regulira ekspresiju gena odgovornih za adaptaciju stanica na hipoksiju, uključujući gene za angiogenezu, metabolizam i transport kisika (119).

Adenozin ima važnu ulogu u očuvanju integriteta glikokaliksa putem aktivacije A2AR (AC – cAMP – PKA – eNOS – NO) s posljedičnim porastom sinteze NO koji ima ključnu ulogu u stabilizaciji glikokaliksa jer smanjuje oksidativni stres, inhibira adheziju leukocita i sprječava enzimsko razgrađivanje proteoglikana (19, 14, 165). Studije su pokazale da blokada A2AR ili smanjenje sinteze NO dovodi do ubrzanog razgradnje i odvajanja glikokaliksa, povećane leukocitne adhezije i narušene vaskularne reaktivnosti (165, 197, 206, 207). Nadalje, A2AR i A2BR aktiviraju PI3K/Akt signalni put, koji također stimulira eNOS i potiče sintezu antioksidativnih i citoprotektivnih proteina, uključujući heme-oxygenazu-1 (HO-1) i SOD čime zajednički doprinose stabilnosti glikokaliksa i smanjenju njegove degradacije uzrokovane ROS-om i upalnim citokinima tijekom hipoksije i reperfuzije (119, 120). U uvjetima hipoksije, povećana koncentracija izvanstaničnog adenozina potiče ekspresiju A2BR putem aktivacije HIF-1 α , čime se pojačava endotelna zaštita sprječavanjem gubitaka glikokaliksa, održavanjem mikrovaskularne propusnosti, održavanjem vazodilatacijske i antiinflamatorne funkcije endotela te se potiče angiogena signalizacija s ciljem poboljšanja perfuzije tkiva u hipoksičnim uvjetima (140). S druge strane, povećani parcijalni tlak kisika tijekom HBO₂ potiče adenozinsku signalizaciju koja ima dodatni zaštitni učinak potičući antioksidativne mehanizme koji smanjuju oksidativnu degradaciju endotelnog glikokaliksa (168).

Dakle, postoje naznake da adenozinski A1 i A2A receptori mogu igrati važnu ulogu u mehanizmu djelovanja kisika i ugljičnog dioksida kao reaktivnih signalnih molekula i vazoaktivnih tvari, pri čemu bi njihov izražaj gena i proteina mogao biti moduliran HBO₂ i hipoksijom.

2. HIPOTEZE

Ovo istraživanje temelji se na trima polaznim hipotezama:

1. Adenozinski A1 i/ili A2A receptori igraju važnu funkcionalnu ulogu u mehanizmima modulacije vaskularnih odgovora uzrokovanih hiperbaričnom oksigenacijom.
2. Agonisti i antagonisti adenozinskih A1 i A2A receptora utječu na promjene vaskularne reaktivnosti uzrokovane hiperbaričnom oksigenacijom.
3. Specifični protokoli akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije dovode do promjena genskog i proteinskog izražaja adenozinskih A1 i A2A receptora.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj je doktorske disertacije ispitati vaskularnu reaktivnost odnosno krivulju stupnjevitog odnosa doza i učinka *in vitro* izoliranih srednjih moždanih na agoniste adenozijskih A1 i A2A receptora u štakora koji su tretirani s hiperbaričnom oksigenoterapijom (akutno i intermitentno) u usporedbi s kontrolnim (netretiranim) životinjama.

Drugi cilj je ispitati vaskularnu reaktivnost *in vitro* izoliranih srednjih moždanih arterija na hipoksijom potaknutu dilataciju (HID) i protokom potaknutu dilataciju (FID) sa i bez prisutnosti agonista ili antagonista adenozijskih A1 ili A2A receptora u štakora koji su tretirani hiperbaričnom oksigenoterapijom (akutno i intermitentno) i kontrolnih (netretiranih) životinja.

Treći cilj je ispitati utjecaj hiperbarične oksigenacije na genski i proteinski izražaj adenozijskih A1 i A2A receptora na površinskim moždanim arterijama u štakora koji su tretirani hiperbaričnom oksigenoterapijom (akutno i intermitentno) i kontrolnih (netretiranih) životinja.

4. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno na Zavodu za fiziologiju u Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije i Laboratoriju za kliničku i molekularnu imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

4.1. Nacrt studije

Studija je strukturirana kao randomizirani kontrolirani pokus na animalnom modelu korištenjem sorte Sprague-Dawley (SD) štakora oba spola u starosti od 8 do 10 tjedana. Životinje su nasumično raspoređene u tri eksperimentalne skupine:

- a) skupina jedan (KONTROLNA SKUPINA - CTRL) – zdravi SD štakori koji nisu izloženi protokolu hiperbarične oksigenacije
- b) skupina dva (AKUTNA SKUPINA – Ac-HBO₂) – zdravi SD štakori jednokratno izloženi hiperbaričnoj oksigenaciji u barokomori za pokusne životinje prema protokolu te
- c) skupina tri (INTERMITENTNA SKUPINA – In-HBO₂) – zdravi SD štakori izloženi jednom dnevno hiperbaričnoj terapiji u barokomori za pokusne životinje prema protokolu kroz uzastopna četiri dana.

Svi pokusi provedeni su prema unaprijed definiranim protokolima, a promjene vaskularne reaktivnosti ispitane su na izoliranim srednjim moždanim arterijama SD štakora. Svi eksperimentalni postupci bili su u skladu s Europskim smjernicama za njegu i korištenje laboratorijskih životinja (Direktiva 86/609) i odobreni su od strane lokalnog i nacionalnog Etičkog odbora (#2158-61-07-21-88; EP-348/2021).

4.2. Materijali

Svi korišteni SD štakori oba spola (N = 126) uzgojeni su u Vivariju pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, koji je registriran i certificiran kao korisnik/uzgajivač miševa i štakora u obrazovne i znanstvene svrhe (br. HR-POK-005). Štakori su bili smješteni u kavezima (engl. *Individually Ventilated Cage* (IVC) samoventilirajući kavezi Tecniplast GR900) u standardiziranim uvjetima uzimajući u obzir temperaturu od 21°C do 23°C, prostoriju s kontroliranom vlagom i svjetlom te slobodan pristup vodi iz slavine te su

hranjeni prema želji (lat. *ad libitum*) komercijalno pripremljenom peletiranom hranom (Mucedola, Milano, Italija) i održavani na ciklusu svjetlo-tama od 12:12 sati.



Slika 4.2.1. Sprague-Dawley eksperimentalni štakori smješteni u samoventilirajućim kavezima u standardiziranim uvjetima unutar prostorija Vivarija Medicinskog fakulteta Osijek.

(Izvor: autor rada)

Hiperbarična eksperimentalna komora za laboratorijske životinje zapremnine 110 litara – Đuro Đaković Aparati d.d., nalazi se u Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije u sklopu Vivarija Medicinskog fakulteta u Osijeku (Slika 4.2.2.).



Slika 4.2.2. Hiperbarična eksperimentalna komora za laboratorijske životinje (Izvor: autor rada)

U skladu s odobrenim eksperimentalnim protokolom, žrtvovanje životinja provedeno je nakon primjene duboke anestezije i analgezije, postignute intraperitonealnom injekcijom ketamina 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule od 2 ml, Pfizer) i midazolama 2,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma) nakon čega je uslijedilo usmrćivanje dekapitacijom pomoću giljotine za dekapitaciju laboratorijskih životinja. Za anesteziranje životinja upotrebljene su sterline šprice od 5 ml (BD Discardit II) za administriranje anestetika. Prilikom svakog intraperitonealnog apliciranja upotrebljena je jednokratna igla od 25G (BD Microlance 3, 25G x1“ – Nr. 18, 0,5 mm x 25mm). Za uzorkovanje krvnih žila korišten su disekcijski alati tvrtke FST GMBH (Fine Science Tools GmbH, Njemačka) – ravne škare, pincete (forcepsi), disekcijske igle i mikroklješta.

Za provedbu samih pokusa na izoliranim srednjim moždanim arterijama žilama korišten je svjetlosni mikroskop i tlačni miograf (Pressure Myograph System, model 110P MyoView, verzija 1.2.0, tvrtke DMT-Danish Myo Technology, Danska) povezan s računalom radi jasnog prikaza i mjerenja unutrašnjeg promjera krvnih žila te povezan dvjema plinskim bocama korištenim ovisno o eksperimentanom protokolu (Slika 4.3.). Miografija izoliranih krvnih žila jedan je od fiziološki najrelevantnijih *in vitro* tehnika i pristupa proučavanju funkcionalnih odgovora krvnih žila kojom se proučavaju promjene izometrijskog vaskularnog tonusa (208, 209).



Slika 4.2.3. Tlačni miograf povezan s računalom

(Izvor: autor rada)

4.3. Metode

4.3.1. Priprema pokusnih grupa i protokol izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji

KONTROLNA SKUPINA (CTRL): prva je skupina zdravih netretiranih SD štakora konstantno boravila u nastambi do trenutka žrtvovanja.

AKUTNA SKUPINA (Ac-HBO₂): druga je skupina zdravih SD štakora konstantno boravila u kavezu, osim u trenutku izlaganja jednom tretmanu hiperabarične oksigenaciju u barokomori prema protokolu (udisanje 100 %-tnog kisika pod tlakom od 2 bara tijekom dva sata, s dodatnih 15 minuta za kompresiju i 15 minuta za dekompresiju) te odmah po završetku tretmana životinja je žrtvovana i proveden je pokus prema određenom protokolu.

INTERMITENTNA SKUPINA (In-HBO₂): treća je skupina zdravih SD štakora konstantno boravila u kavezu, osim u trenutku izlaganja u približno isto vrijeme uzastopno četiri dana prema protokolu hiperabarične oksigenacije u barokomori (udisanje 100 %-tnog kisika pod tlakom od 2 bara tijekom dva sata, s dodatnih 15 minuta za kompresiju i 15 minuta za dekompresiju). Peti je dan životinja žrtvovana i proveden je pokus prema određenom protokolu. Za provedbu HBO₂ korištena je eksperimentalna hiperbarična komora za laboratorijske životinje.

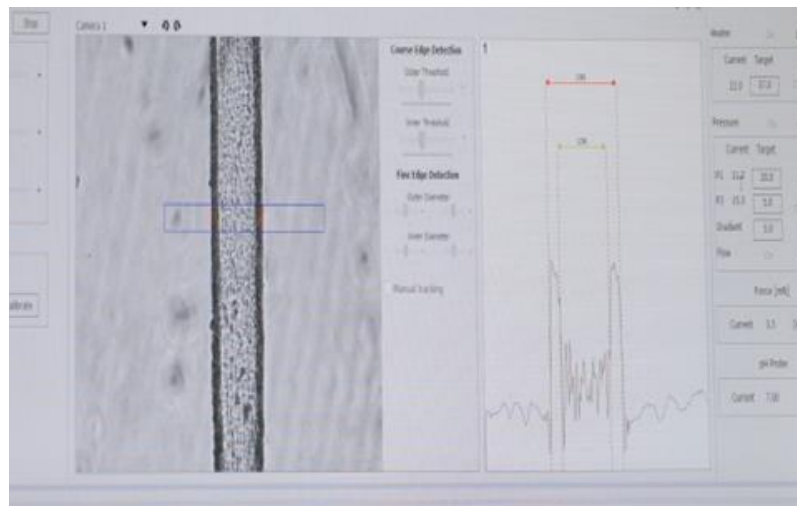
Opisani protokol za izlaganje HBO₂ je standardiziran i više puta je korišten u prethodnim istraživanjima (96, 156, 158, 159, 210, 211).

Štakori su izvagani prije žrtvovanja za pokus. Sve su skupine imale slobodan pristup hrani i vodi te uobičajeno kretanje.

4.3.3. *In vitro* izolirane perfundirane srednje moždane arterije

Eksperimentalni protokol započeo je vaganjem SD štakora i intraperitonealnom anestezijom životinja, nakon čega je učinjena dekapitacija. Odmah nakon dekapitacije, mozak je kirurški izoliran, a srednja cerebralna arterija se odmah pod kontrolom svjetlosnog mikroskopa kirurški izolira i postavi u komoru tlačnog miografa na dvije staklene mikropipete (vanjski promjer ~ 100-200 μm) smještene u komori napunjenom toplom (37 °C) fiziološkom otopinom soli (engl. *Physiological Saline Solution*, PSS), (pH = 7,4 ± 0,05; sastav (u mM/l): 119 NaCl, 4,7 KCl, 1,17 MgSO₄, 1,6 CaCl₂, 1,18 NaH₂PO₄, 24 Na-HCO₃, 0,026 EDTA i 5,5 glukoza) koja imitira ionski sastav izvanstanične tekućine. Sustav je kontinuirano oksigeniran smjesom plinova od 21 % O₂, 5 % CO₂ i ostatka N₂ (oksigenacija, ispitivanja protokom potaknute dilatacije) ili smjesom plinova od 0 % O₂, 5 % CO₂ i ostatka N₂ (hipoksija, ispitivanje hipoksijom potaknute dilatacije) ovisno o istraživačkom protokolu.

Nakon postavljanja u komoru, srednja moždana arterija je inkubirana 60 minuta s intravaskularnim tlakom održavanim na 80 mmHg kako bi se procijenio osnovni (bazalni) promjer. Žila je cijelo vrijeme snimana infracrvenom kamerom s jasnom slikom na monitoru kako bi se precizno izmjerile promjene promjera žile između unutarnjih rubova endotela (Slika 4.3.3.1.).



Slika 4.3.3.1. Monitorski prikaz izolirane srednje moždane arterije spojene na sustav tlačnog miografa s prikazom mjerenja unutrašnjeg promjera arterije.

(Izvor: autor rada)

U oba eksperimentalna protokola za utvrđivanje vaskularne reaktivnosti štakori su nasumično žrtvovani iz različitih skupina, a agonisti i antagonisti adenozijskih A1 i A2A receptora također su upotrebljavani nasumično (N=7 po skupini). U pokusu su korišteni sljedeći agonisti i antagonisti adenozijskih A1 i A2A receptora u koncentraciji 10^{-6} M: agonist adenozijskog A1 receptora (2-kloro-N6-ciklopentiladenozin, CCPA, Abcam), antagonist adenozijskog A1 receptora (8-ciklopentil-1,3-dipropilksantin, DPCPX, Abcam), agonist adenozijskog A2A receptora (3-[4-[2-[[6-amino-9-[(2R, 3R, 4S,5S)-5-(etilkarbamoil)-3,4-dihidroksioksolan-2-il]purin-2-il]amino]etil]fenil]propanoična kiselina, CGS 21680, Abcam) i antagonist adenozijskog A2A receptora (5-amino-7-(2-feniletil)-2-(2-furil)-pirazolo(4,3-e)-1,2,4-triazolo(1,5-c)pirimidin, SCH-58261, Abcam). Spojevi CCPA, CGS-21680, DPCPX i SCH-58261 odabrani su za ovu studiju zbog svoje visoke selektivnosti receptora, posebno u kontekstu endotelne funkcije, dobro okarakteriziranih farmakodinamičkih profila i široko

rasprostranjene standardne upotrebe kao referentnih liganada za adenozijske A1 i A2A receptore, što osigurava pouzdane i usporedive rezultate (212-215).

Preostale površinske krvne žile su izolirane, prikupljene i zamrznute u tekućem dušiku te pohranjene na -80°C za provedbu molekularnih metoda istraživanja – određivanje proteinskog i genskog izražaja adenozijskih A1 i A2A receptora.

4.3.4. Eksperimentalni protokoli za utvrđivanje krivulje stupnjevitog odnosa doza i učinka agonista adenozijskih A1 i A2A receptora na izoliranoj srednjoj moždanoj arteriji

Nakon postavljanja u komoru srednje moždane arterije i 60-minutne inkubacije, najmanja doza agonista adenozijskoga A1 receptora (CCPA, 10^{-10} M) ili agonista adenozijskoga A2A receptora (CGS 21680, 10^{-10} M) dodana je u donji dio komore uz intravaskularni tlak održavan na 80 mmHg, a nakon 15 minuta inkubacije agonista izmjerena je promjer krvne žile. Postupak je ponavljan do najviše određene koncentracije lijeka (10^{-5} M). Prije dodavanja sljedeće doze agonista, PSS u komori zamijenjen je svježim PSS-om. Detaljan shematski prikaz protokola prikazan je u Prilogu 1. Doza-odgovor svakog agonista određena je u sve tri skupine: CTRL, Ac-HBO₂ i In-HBO₂.

4.3.5. Eksperimentalni protokoli za utvrđivanje mehanizama vaskularne reaktivnosti na izoliranoj srednjoj moždanoj arteriji

Nakon postavljanja u komoru srednje moždane arterije i 60-minutne inkubacije s oksigenacijom (smjesom plinova od 21 % O₂, 5 % CO₂ i ostatka N₂), krvna žila je izložena protoku, što je generirano istovremenim promjenama ulaznog i izlaznog tlaka (gradijenti tlaka $\Delta 0$, $\Delta 10$, $\Delta 20$, $\Delta 40$, $\Delta 60$, $\Delta 80$, $\Delta 100$ mmHg). Svaki gradijent tlaka rezultirao je promjenom protoka otopine PSS-a kroz postavljenu krvnu žilu (protokom potaknuta dilatacija – FID), a promjer žile vidljiv na monitoru izmjerena je između unutrašnjih rubova endotela i zabilježen pri svakom od navedenih gradijenata. Za testiranje hipoksijom potaknute dilatacije (HID), nakon stabilizacije žile kroz 30 minuta pri gradijentu tlaka od $\Delta 80$, žila je izložena hipoksiji (smjesa plinova promijenjena je s 21 % O₂ na 0 % O₂) tijekom 20 minuta pri gradijentu tlaka od $\Delta 80$, a promjer žile je mjerena pri gradijentu tlaka od $\Delta 0$ (tlak ulaska i izlaska 80 mmHg) tri minute nakon promjene gradijenta tlaka. Neposredno nakon HID-a uslijedila je reoksigenacija srednje moždane arterije pri gradijentu tlaka od $\Delta 80$ kroz 30 minuta, zatim je izmjerena promjer krvne žile nakon 3 minute izlaganja žile gradijentu tlaka od $\Delta 0$. Prije svakog testiranja agonista

i antagonista adenozijskih receptora najprije je testiran FID i HID (za procjenu početnih vrijednosti). S ciljem randomizacije pokusa pojedini protokoli započeti su testiranjem FID-a pa zatim HID-a, a pojedini protokoli testiranjem HID-a zatim FID-a.

Po završetku mjerenja promjera žile kod FID-a i HID-a uslijedila je najprije 30 minutna stabilizacija žile pri gradijentu tlaka od $\Delta 80$, nakon čega je dodan određeni agonist ili antagonist u dozi od 10^{-6} M u komoru tlačnog miografa te nakon 30 minuta inkubacije pri tlaku 80/0 mmHg, tj. gradijentu tlaka od $\Delta 80$ izmjeren je i zabilježen promjer između unutrašnjih rubova endotela srednje moždane arterije. Detaljan shematski prikaz protokola prikazan je u Prilogu 2.

4.3.6. Mjerenja dilatacije inducirane acetilkolinom, dilatacije neovisne o endotelu i maksimalnog promjera srednje moždane arterije

Dilatacija inducirana acetilkolinom (ACh, 10^{-6} mol/l, Fluka) testirana je na početku svakog eksperimenta da bi se provjerio integritet i funkcionalnost endotela. Izravni donor NO, natrijev nitroprusid (SNP, 10^{-6} mol/l, Sigma Aldrich), korišten je za određivanje dilatacije neovisne o endotelu na kraju eksperimenata kako bi se utvrdila funkcionalnost vaskularne glatke muskulature. Po završetku SNP protokola, otopina PSS-a u sustavu zamijenjena je otopinom PSS-a bez Ca^{2+} (pH = $7,4 \pm 0,05$; sastav (u mM/l): 119 NaCl, 4,7 KCl, 1,17 MgSO_4 , 1,18 NaH_2PO_4 , 24 NaHCO_3 , 0,026 EDTA i 5,5 glukoze) za mjerenje maksimalnog promjera krvne žile. Žile koje nisu pokazale značajne razine aktivnog tonusa (50 %) elimirane su iz pokusa. Aktivni tonus izračunat je u postocima prema formuli: $[(D_{\text{max}} - D_{\text{bas}})/D_{\text{max}}] \times 100$, gdje su D_{max} i D_{bas} maksimalni i osnovni promjer ($\Delta 0$ mmHg, bez protoka) krvne žile.

4.3.7. Eksperimentalni protokol za utvrđivanje genskog izražaja adenozijskih A1 i A2A receptora

Izražaj gena adenozijskih receptora određen je metodom lančane reakcije polimeraze s reverznom transkripcijom (*RT-PCR*) korištenjem sustava Bio-Rad CFX96 (Slika 4.3.7.1.). Analiza je provedena na uzorcima površinskih krvnih žila mozga, uključujući tkivo srednje moždane arterije. Uređaj omogućuje istodobnu amplifikaciju do 96 uzoraka te detekciju fluorescentnih signala u stvarnom vremenu putem integriranog višekanalnog optičkog sustava.

Visoka reproduktivnost i osjetljivost mjerenja osigurane su uniformnom kontrolom temperature i optimiziranim ciklusima denaturacije, sparivanja početnica i ekstenzije. Ova

metoda korištena je za analizu promjena u genskom izražaju nakon izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji.



Slika 4.3.7.1. Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR sustav korišten u ovom istraživanju za kvantitativno određivanje izražaja ciljnih gena metodom qPCR.

(Izvor: autor rada)

Ukupna ribonukleinska kiselina (RNA) ekstrahirana je pomoću TRI reagensa (Molecular Re-search Center, INC), prema uputama proizvođača. Koncentracija i čistoća RNA provjerene su pomoću NanoDropa (Implen, Thermo Scientific). Ukupna RNA dodatno je pročišćena iz deoksiribonukleinske kiseline (DNA) pomoću Deoxyribonuclease kita (Sigma) prema uputama proizvođača kitova. Reverzna transkripcija provedena je pomoću High Capacity cDNA Reverse Transcription kita (Applied Biosystems), prema uputama proizvođača na C1000 Touch termalnom cikleru (BioRad) (Slika 4.3.7.2.).



Slika 4.3.7.2. UV kabinet za pripremu PCR reakcija, korišten za održavanje kontroliranih i sterilnih uvjeta tijekom manipulacije uzorcima i reagensijama. Kabinet je opremljen UV-C lampom koja omogućuje učinkovitu dekontaminaciju radne površine i degradaciju mogućih ostataka nukleinskih kiselina između pojedinih ciklusa rada. U ovom istraživanju korišten je za pripremu qPCR reakcijskih smjesa da bi se minimizirala mogućnost kontaminacije i osigurala visoka pouzdanost amplifikacijskih rezultata.

(Izvor: autor rada)

Izražaj se određuje korištenjem jedinstveno dizajniranih početnica na Primer Express sustavu (Applied Biosystems, Tablica 4.3.7.1.) korištenjem ABSolute QPCR SYBR Green low ROX master mix-a (Thermo scientific). Izražaj gena normaliziran je u odnosu na referentni (engl. *housekeeping*) gen HPRT (tablica 4.3.7.1.).

Tablica 4.3.7.1. Prikaz sekvenci primera korištenih za kvantifikaciju izražaja gena

Gen (ciljani)	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
A1 receptor	TTCCAGGCTGCCTACATTGG	ATGGAGCTCTGGGTGAGGAT
A2A receptor	GCAGCGCTAGTTTTCGAAGTC	CTCGAACAGACAGGTCACCC
HPRT	GAAAGAACGTCTTGATTGTTGAAGA TAT	GAGAGGTCCTTTTCACCAGC AA

4.3.8. Eksperimentalni protokol za utvrđivanje proteinskog izražaja adenozijskih A1 i A2A receptora

Razina proteina adenozijskih A1 i A2A receptora određena je Western blot metodom iz prikupljenih površinskih krvnih žila mozga. Površinske krvne žile mozga su nakon izolacije odmah zamrznute u tekućem dušiku i pohranjene na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do homogenizacije. Uzorci dvaju štakora iz iste skupine tretmana združene su u jedan uzorak. Uzorci površinskih krvnih žila mozga združeni su da bi se osigurao dovoljan prinos proteina za Western blot analizu i da bi se smanjio ukupan broj korištenih životinja, u skladu s 3R principom (zamjena, smanjenje, pročišćavanje). Uzorci su prvo usitnjeni u tekućem dušiku, a homogenati uzoraka tkiva pripremljeni su na ledu pomoću ULTRA-TURARAX homogenizatora korištenjem pufera za homogenizaciju koji sadrži 10 mmol/l Tris baze (Sigma-Aldrich), 1 mmol/L EDTA (Sigma-Aldrich), 0,4 % SDS (Acros Organic) i koktel inhibitora proteinaze ($4\text{ }\mu\text{l}/100\text{ }\mu$, Sigma Aldrich). Prije određivanja koncentracije ukupnih proteina, homogenati su centrifugirani pri 17 000 okretaja u minuti, 30 minuta na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, ukupna koncentracija proteina određena je u supernatantima Bradfordovim testom (AppliChem) prema uputama proizvođača i pohranjena na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnjeg protokola. Izražaj proteina adenozijskih A1 i A2A receptora određena je Western blot metodom, koja se sastoji od elektroforeze (radi odvajanja proteina na gelu prema veličini), prijenosa proteina s gela na polivinilidn fluoridnu membranu (PVDF membrana) i detekcije ciljnih proteina pomoću specifičnih antitijela (Slika 4.3.8.1.).

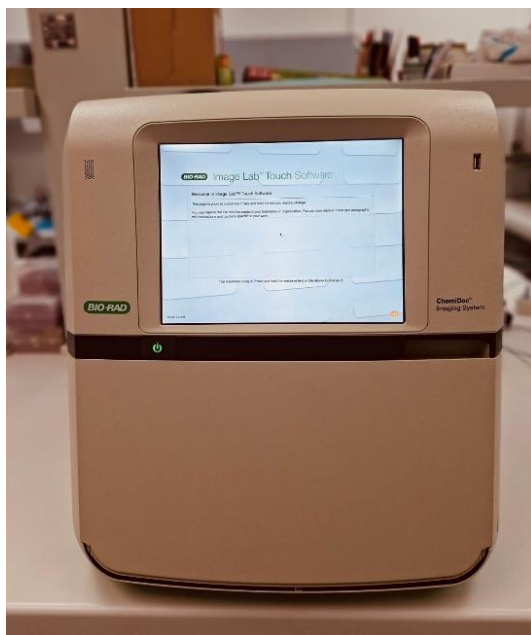


Slika 4.3.8.1. Sustav za Western blot analizu prikazan s lijeva na desno: (1) aparat za izljevanje poliakrilamidnih gelova korišten za pripremu razdvajajućih i koncentrirajućih gelova prema veličini proteina, (2) kadica za SDS–PAGE elektroferazu u kojoj se provodi razdvajanje proteina prema molekularnoj masi pod denaturirajućim uvjetima, (3) izvor napajanja (engl.

power supply) koji osigurava kontrolirani napon i struju tijekom elektroforetskog razdvajanja te (4) transferna kadica korištena za elektrotransfer proteina s poliakrilamidnog gela na PVDF membranu metodom mokrog prijenosa. Ovaj konfiguracijski raspored predstavlja standardni eksperimentalni tijek Western blot analize, od pripreme gela do prijenosa proteina na membranu za daljnju imunodetekciju.

(Izvor: autor rada)

Prije primarne (4 °C preko noći) i sekundarne (dva sata na sobnoj temperaturi) inkubacije antitijela, membrane su blokirane dva sata u 50 ml otopine za blokiranje (5 %-tna otopina obranog mlijeka u prahu u Tris-buferskoj otopini s NaCl i Tween 20 (TBST), sobna temperatura). Razina proteina procijenjena je korištenjem odgovarajućih primarnih antitijela (zečje poliklonsko anti-štakorsko adenzin A1 receptor antitijelo, Abcam, ab82477; zečje poliklonsko anti-štakorsko adenzin A2A receptor antitijelo, Abcam, ab3461; β -aktin-HRP, mišje MonoAb, Abcam, ab49900) i sekundarnih antitijela (kozje anti-zečje HRP, Abcam, ab205718). Detekcija je provedena kemiluminiscencijskom metodom korištenjem Pierce ECL Western Blotting supstrata (Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD) prema uputama proizvođača, a signal je zabilježen korištenjem BioRad ChemiDoc MP Imaging Systema (Slika 4.3.8.2.). Dobivene slike obrađene su i analizirane pomoću softvera ImageJ (verzija 1.52a; National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD) (216) prema uputama programera softvera, a izražaj proteina je određen kao relativni izražaj odnosu na β -aktin, koji je također korišten kao kontrola opterećenja (engl. *loading control*).



Slika 4.3.8.2. Sustav za digitalnu detekciju Western blot signala (Bio-Rad) opremljen integriranom kamerom visoke osjetljivosti i upravljan Image Lab Touch softverom. Sustav omogućuje automatizirano hvatanje kemiluminiscentnih i fluorescentnih signala, optimizaciju ekspozicije u realnom vremenu te kvantifikaciju proteinskih traka. Uređaj osigurava standardizirane uvjete snimanja i minimalnu varijabilnost, čime se postiže visoka reproducibilnost rezultata.

(Izvor: autor rada)

4.4. Statističke metode

Rezultati funkcionalne analize odgovora na FID, ACh i SNP analizirani su dvosmjernom analizom varijance (two-way ANOVA) radi procjene učinka dvaju neovisnih čimbenika i njihove međusobne interakcije. Nakon što je ANOVA pokazala statistički značajne razlike, Tukeyjev post hoc test (engl. *Tukey's Honestly Significant Difference test*) korišten je za višestruke usporedbe srednjih vrijednosti među skupinama, uz korekciju za pogrešku višestrukog testiranja. Za analizu rezultata izražaja gena i proteina korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA), nakon koje je, ovisno o distribuciji podataka, primijenjen Holm-Sidakov test ili Kruskal-Wallisov test za višestruke usporedbe. Za usporedbu između dviju neovisnih skupina korišten je Studentov t-test u slučajevima kad su numerički podaci pokazivali normalnu distribuciju, dok je u slučajevima odstupanja od normalnosti korišten neparametrijski Mann-Whitneyjev U test. Snaga testa (engl. *power*) postavljena je na 0,8, uz razinu značajnosti

$P < 0,05$ i minimalnu očekivanu razliku od 0,25, što je ukazivalo na potrebu za najmanje četiri životinje po skupini. Statistička analiza provedena je pomoću softverskih paketa SigmaPlot v.12 (Systat Software, Inc., Chicago, IL, SAD) i GraphPad Prism v.6.01 za Windows (GraphPad Software, Boston, MA, SAD). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD), a razina statističke značajnosti određena je pri $P < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Tjelesna masa štakora, bazalni promjer, maksimalni promjer i aktivni tonus srednjih moždanih arterija korištenih u eksperimentima

U Tablici 5.1.1. prikazani su tjelesna masa štakora i osnovni morfometrijski i funkcionalni parametri srednjih moždanih arterija izoliranih iz tri eksperimentalne skupine: kontrolne (CTRL), akutno izložene hiperbaričnom kisiku (Ac-HBO₂) te intermitentno izložene hiperbaričnom kisiku (In-HBO₂). Tjelesna masa (izražena u gramima) kontrolnih štakora iznosila je 372±53 (n=42), masa štakora akutno tretiranih u hiperbaričnoj komori iznosila je 350±44 (n=42), a masa štakora intermitentno tretiranih u hiperbaričnoj komori iznosila je 349±44 (n=42). Nije zabilježena statistički značajna razlika u tjelesnoj masi između skupina ($p > 0,05$). Promjer srednjih moždanih arterija izmjeren pri transmuralnom tlaku od 0 mmHg ($\Delta 0$ mmHg) bio je nešto veći u kontrolnoj skupini ($133 \pm 23 \mu\text{m}$) u odnosu na Ac-HBO₂ ($123 \pm 26 \mu\text{m}$) i In-HBO₂ skupine ($125 \pm 23 \mu\text{m}$), no razlike nisu bile statistički značajne. Maksimalni promjer arterija, izmjeren u Ca²⁺-free otopini, također se nije značajno razlikovao među skupinama, s vrijednostima od $207 \pm 19 \mu\text{m}$ (CTRL), $190 \pm 11 \mu\text{m}$ (Ac-HBO₂) i $207 \pm 14 \mu\text{m}$ (In-HBO₂). Aktivni tonus arterija izražen kao postotak maksimalne dilatacije iznosio je $43 \pm 8 \%$ u kontrolnoj skupini, $40 \pm 6 \%$ u Ac-HBO₂, te $42 \pm 10 \%$ u In-HBO₂ skupini, bez značajnih statističkih razlika između skupina ($p > 0,05$).

Tablica 5.1.1. Prikaz tjelesne mase štakora, bazalnog promjera, maksimalnog promjera i aktivnog tonusa srednjih moždanih arterija korištenih u eksperimentima

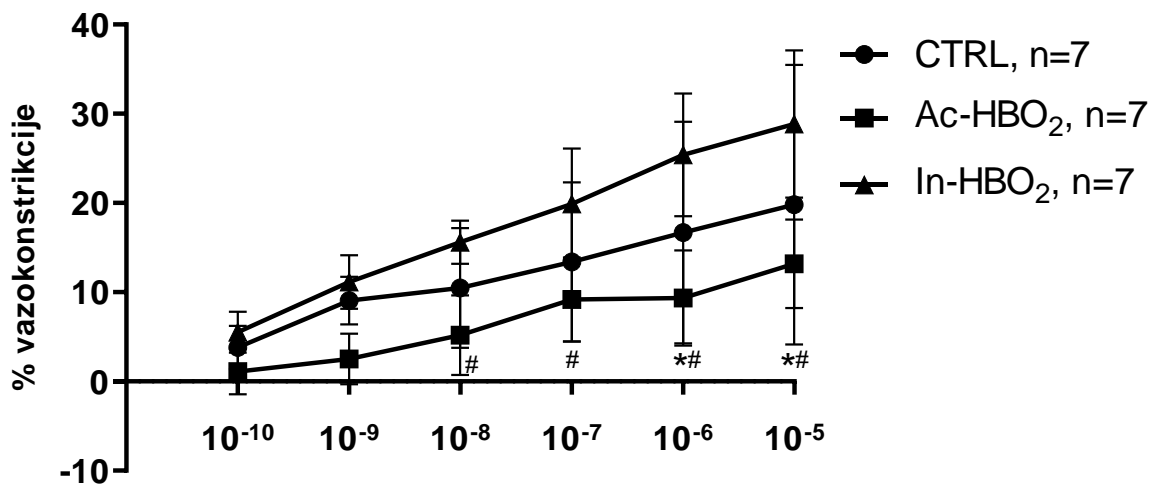
	CTRL*	Ac-HBO ₂	In-HBO ₂
masa štakora [g]	372 ± 53	350 ± 44	349 ± 60
bazalni promjer srednje moždane arterije pri $\Delta 0$ mmHg [μm]	133 ± 23	123 ± 26	125 ± 23
maksimalni promjer srednje moždane arterije (Ca ²⁺ free) [μm]	207 ± 19	190 ± 11	207 ± 14
aktivni tonus srednje moždane arterije (%)	43 ± 8	40 ± 6	42 ± 10

*CTRL – kontrolna skupina, Ac-HBO₂ – akutna skupina, In-HBO₂ – intermitentna skupina

5.2. Rezultati na izoliranim srednjim moždanim arterijama

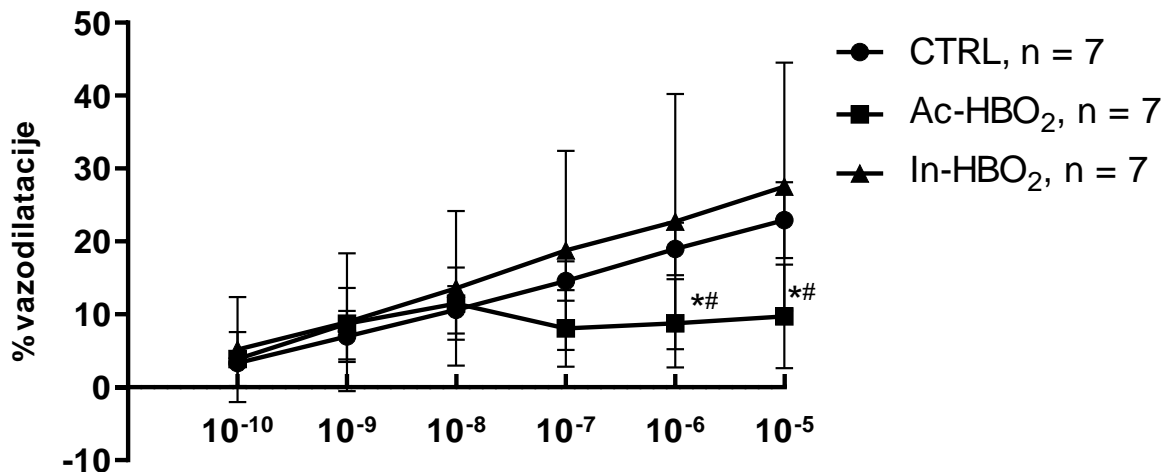
5.2.1. Rezultati krivulja stupnjevitog odnosa doza i učinka agonista adenzinskih A1 i A2A receptora na izoliranoj srednjoj moždanoj arteriji

Na slici 5.2.1.1. prikazan je postotak vazokonstrikcije srednjih moždanih arterija u kontrolnoj skupini (CTRL), kao i u skupinama akutno (Ac-HBO₂) i intermitentno (In-HBO₂) izloženima hiperbaričnoj oksigenaciji, nakon primjene selektivnog agonista adenzinskog A1 receptora (CCPA) u koncentracijama od 10⁻¹⁰ do 10⁻⁵ M. Vazokonstriksijski odgovor na primjenu CCPA bio je sličan u skupinama CTRL i In-HBO₂, dok je odgovor u Ac-HBO₂ skupini bio statistički značajno smanjen u usporedbi s CTRL i In-HBO₂ skupinama pri koncentracijama od 10⁻⁹ do 10⁻⁵ M ($p < 0,05$; označeno simbolima * i #).



Slika 5.2.1.1. Odgovor srednjih moždanih arterija na selektivni agonist A1 adenzinskog receptora (CCPA) primijenjen u postupnim koncentracijama od 10⁻¹⁰ do 10⁻⁵ M. Prikaz promjene dijametra žile kao srednje vrijednosti ± SD. * $p < 0,05$ Ac-HBO₂ u odnosu na CTRL; [#] $p < 0,05$ Ac-HBO₂ u odnosu na In-HBO₂

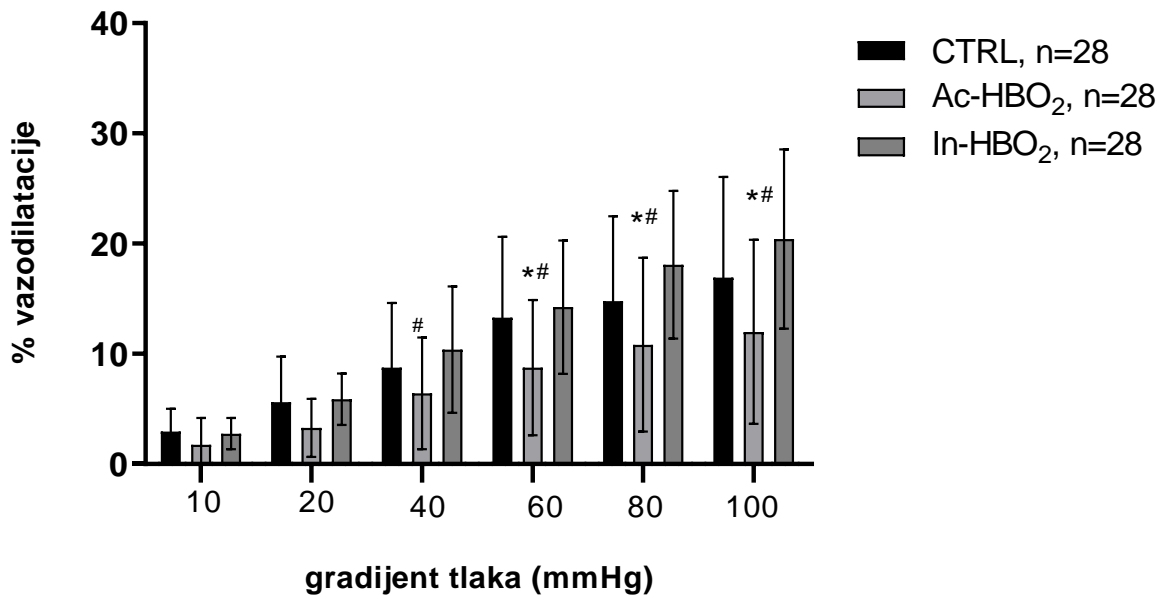
Na slici 5.2.1.2. prikazan je postotak vazodilatacije srednjih moždanih arterija u kontrolnoj skupini (CTRL), kao i u skupinama akutno (Ac-HBO₂) i intermitentno (In-HBO₂) izloženima hiperbaričnoj oksigenaciji, nakon primjene selektivnog agonista adenzinskog A2AR-a (CGS-21680) u koncentracijama od 10⁻¹⁰ do 10⁻⁵ M. Vazodilatacija u odgovoru na CGS-21680 bila je značajno smanjena u štakora izloženih akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (Ac-HBO₂) u usporedbi s kontrolnom (CTRL) i intermitentno izloženom (In-HBO₂) skupinom pri višim koncentracijama lijeka 10⁻⁶ do 10⁻⁵ M ($p < 0,05$; označeno simbolima * i #).



Slika 5.2.1.2. Odgovor srednjih moždanih arterija na selektivni agonist A1 adenozienskog receptora (CGS-2168) primijenjen u postupnim koncentracijama od 10^{-10} do 10^{-5} M. Prikaz promjene dijametara žile kao srednje vrijednosti \pm SD. * $p < 0,05$ Ac-HBO₂ u odnosu na CTRL; # $p < 0,05$ Ac-HBO₂ u odnosu na In-HBO₂

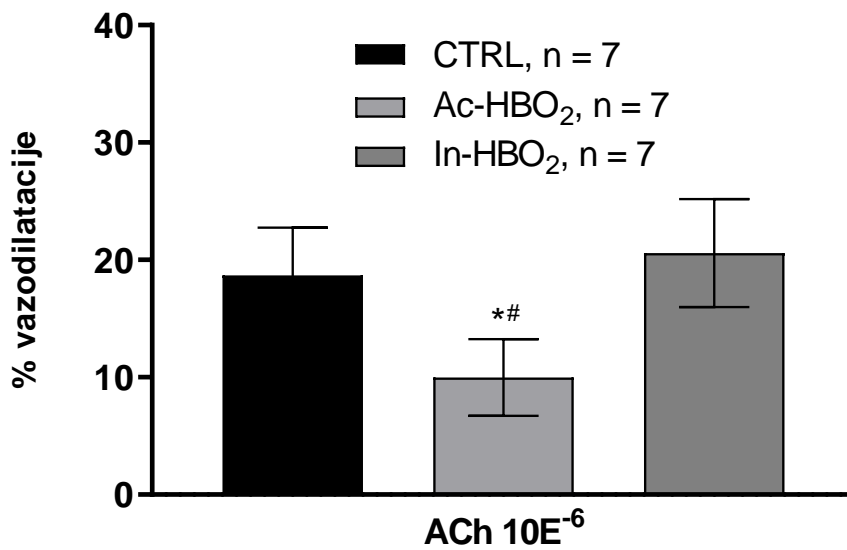
5.2.2. Rezultati utvrđivanja vaskularne reaktivnosti u odgovoru srednje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju, acetilkolin, natrijev nitroprusid te primjenu agonista i antagonista adenozijskih A1 i A2A receptora

Na slici 5.2.2.1. prikazan je odgovor odnosno postotak vazodilatacije srednje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju (FID) pri različitom postupnom porastu gradijenta tlaka ($\Delta 10$ – 100 mmHg) u odnosu na početno stanje bez protoka ($\Delta 0$ mmHg), u kontrolnoj skupini (CTRL) te nakon akutnog (Ac-HBO₂) i intermitentnog (In-HBO₂) izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji. U svim skupinama zabilježen je porast vazodilatacije s porastom gradijenta tlaka te su uočene značajne razlike između skupina. Vaskularni odgovor srednje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju (FID) bio je značajno smanjen u skupini štakora izloženih akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (A-HBO₂), u odnosu na kontrolnu skupinu i u odnosu na skupinu izloženu intermitentnoj HBO₂ (In-HBO₂) ($p < 0,05$; označeno sa * i #). Najizraženija razlika zabilježena je pri većim gradijentima tlaka od $\Delta 80$ i $\Delta 100$ mmHg.



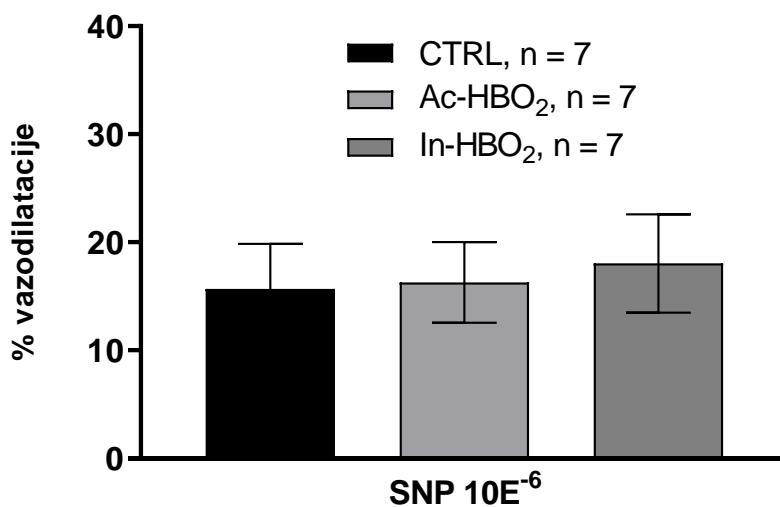
Slika 5.2.2.1. Odgovor srednje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju bez primjene agonista i antagonista adenzinskih A1 i A2A receptora. Prikaz promjene dijametara žile kao srednje vrijednosti \pm SD. * $p < 0,05$ Ac-HBO₂ u odnosu na CTRL; # $p < 0,05$ Ac-HBO₂ u odnosu na In-HBO₂

Na slici 5.2.2.2. prikazan je vazodilatacijski odgovor srednjih moždanih arterija na primjenu acetilkolina (ACh, 10^{-6} M) u uvjetima bez protoka (pri 80 mmHg). U skupini štakora akutno izloženih hiperbaričnoj oksigenaciji (Ac-HBO₂) zabilježen je statistički značajno smanjen postotak dilatacije u usporedbi s kontrolnom skupinom (CTRL) i skupinom s intermitentnom izloženošću (In-HBO₂) ($p < 0,05$, označeno sa * i #). Nasuprot tomu, odgovor na ACh u In-HBO₂ skupini bio je usporediv s onim u kontrolnoj skupini, bez značajnih razlika.



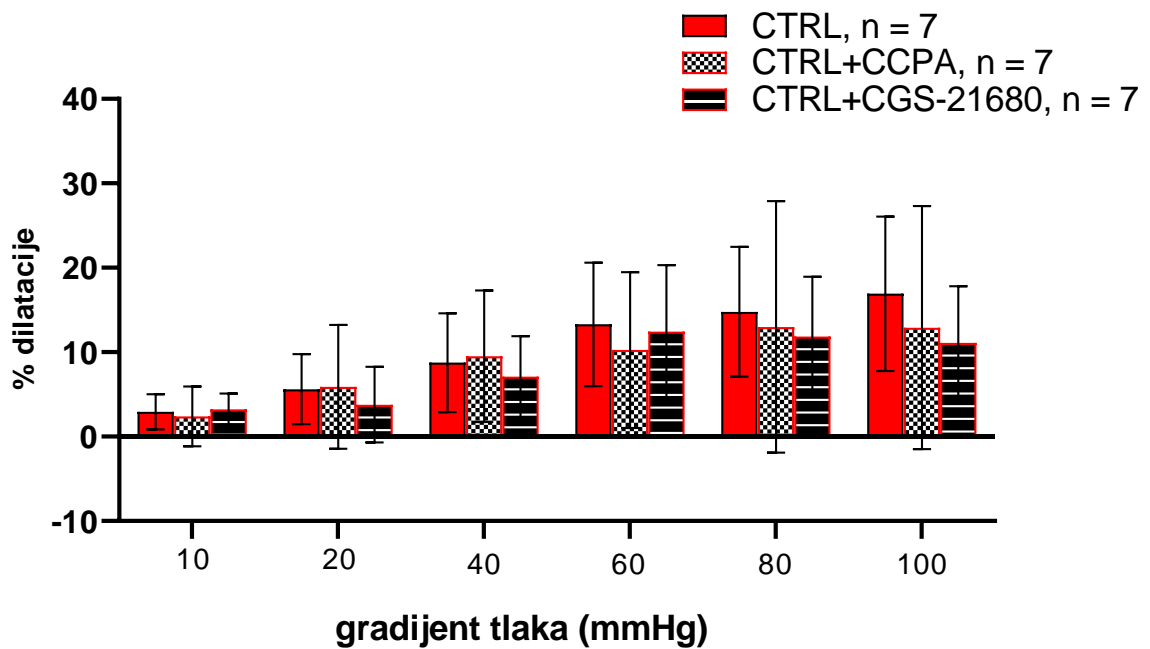
Slika 5.2.2.2. Odgovor srednje moždane arterije na acetilkolin u koncentraciji od 10^{-6} M u uvjetima bez protoka (pri 80 mmHg). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. * $p < 0,05$ Ac-HBO₂ u odnosu na CTRL; # $p < 0,05$ Ac-HBO₂ u odnosu na In-HBO₂

Na slici 5.2.2.3. prikazan je vazodilatacijski odgovor srednje moždane arterije na natrij-nitroprusid (SNP) u koncentraciji 10^{-6} M, izravni donor dušikovog oksida za određivanje dilatacije neovisne o endotelu. Nisu uočene statistički značajne razlike u postotku dilatacije između skupina CTRL, Ac-HBO₂ i In-HBO₂. Sličan odgovor na SNP među svim skupinama ukazuje na očuvanu funkciju glatkih mišićnih stanica vaskularne stijenke tijekom pokusa, neovisno i o protokolu hiperbarične oksigenacije.



Slika 5.2.2.3. Odgovor srednje moždane arterije na natrij-nitroprusid (SNP) u koncentraciji od 10^{-6} M u uvjetima bez protoka (pri 80 mmHg). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD.

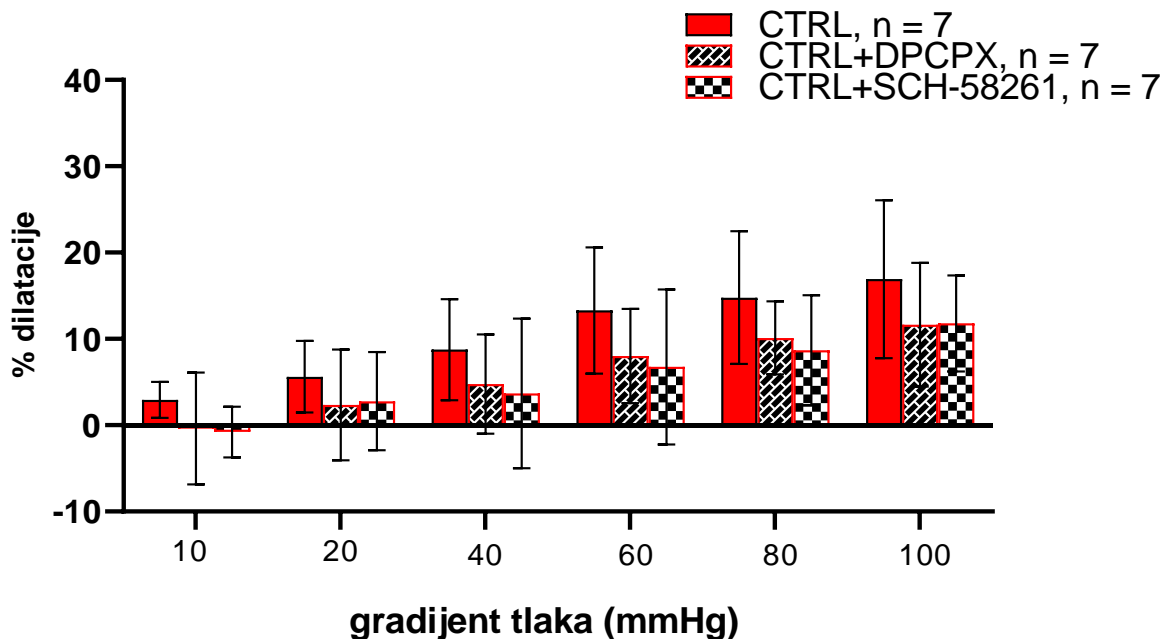
Na slici 5.2.2.4. prikazana je promjena dilatacije srednje moždane arterije (MCA) štakora pri različitim gradijentima tlaka (10–100 mmHg) u kontrolnim uvjetima (CTRL) te nakon inkubacije sa selektivnim agonistima adenozijskih receptora, CCPA (A1 agonist) i CGS-21680 (A2A agonist). U kontrolnoj skupini zabilježeno je blago povećanje dilatacije s porastom gradijenta tlaka, s maksimalnim odgovorom od približno 15–20 % pri 80–100 mmHg. Primjena CCPA nije značajno izmijenila krivulju odgovora u odnosu na kontrolu. Slično tomu, ni inkubacija s CGS-21680 nije dovela do statistički značajnih promjena dilatacijskog odgovora u odnosu na kontrolnu skupinu.



Slika 5.2.2.4. Odgovor srednje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju uz primjenu agonista adenozijskog A1 receptora (CCPA) u koncentraciji 10^{-6} M i agonista adenozijskog A2A receptora (CGS-21680) u koncentraciji 10^{-6} M kod kontrolne skupine štakora. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD.

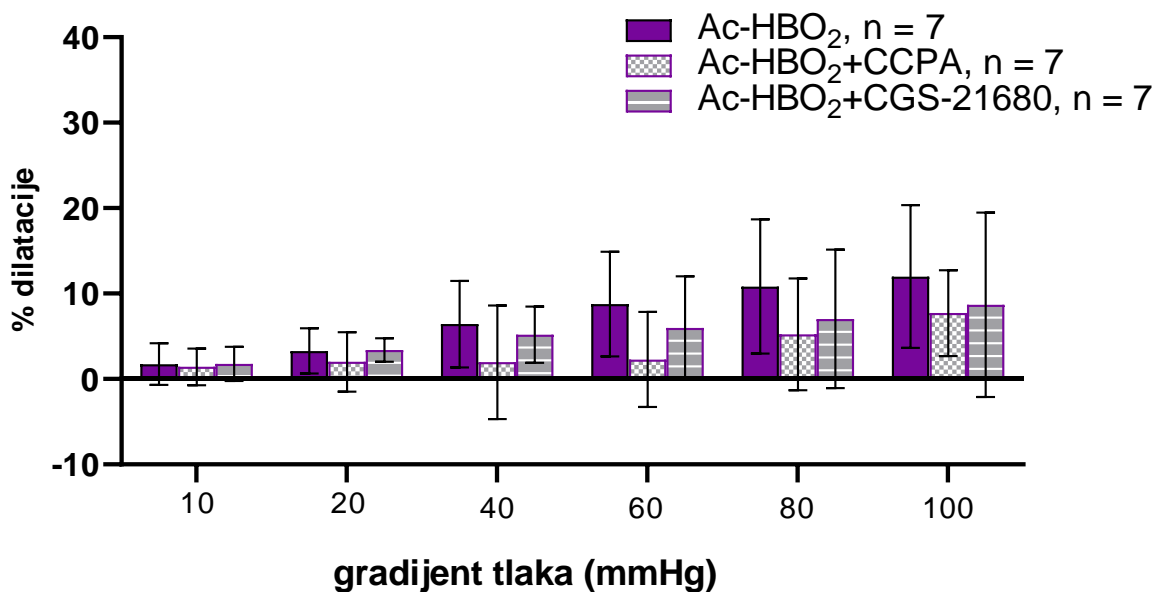
Na slici 5.2.2.5. prikazan je dilatacijski odgovor srednje moždane arterije (MCA) štakora pri različitim gradijentima tlaka (10–100 mmHg) u kontrolnim uvjetima (CTRL) te

nakon inkubacije s antagonistima adenozijskih receptora, DPCPX (A1 antagonist) i SCH-58261 (A2A antagonist). U kontrolnoj skupini dilatacija se postupno povećavala s porastom gradijenta tlaka, pri čemu je maksimalni odgovor iznosio približno 15–20 % pri 80–100 mmHg. Inhibicija A1 receptora DPCPX-om nije značajno izmijenila dilatacijski odgovor u odnosu na kontrolu. Također, blokada A2A receptora SCH-58261-om nije dovela do statistički značajnih promjena u odnosu na kontrolnu skupinu.



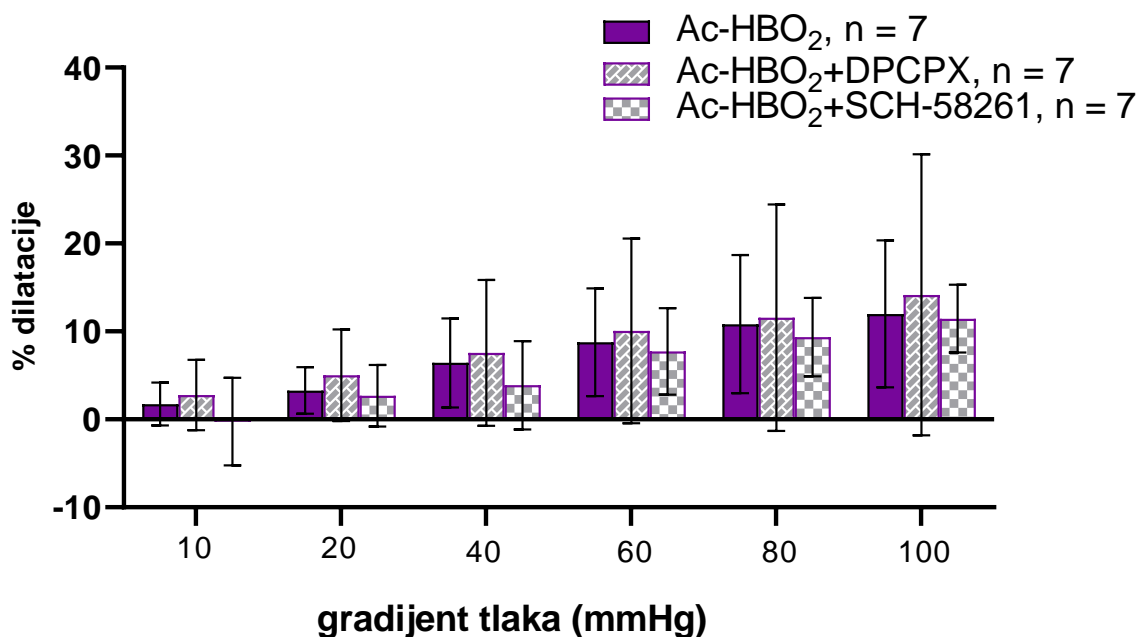
Slika 5.2.2.5. Odgovor srednje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju uz primjenu antagonista adenozijskog A1 receptora (DPCPX) u koncentraciji 10^{-6} M i antagonista adenozijskog A2A receptora (SCH-58261) u koncentraciji 10^{-6} M kod kontrolne skupine štakora. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD.

Na slici 5.2.2.6. prikazan je dilatacijski odgovor srednje moždane arterije (MCA) štakora nakon akutne izloženosti hiperbaričnoj oksigenaciji (Ac-HBO₂) u kontrolnim uvjetima (CTRL) te nakon inkubacije s agonistima adenozijskih receptora, CCPA (A1 agonist) i CGS-21680 (A2A agonist). U skupini Ac-HBO₂ zabilježeno je postupno povećanje dilatacije s porastom gradijenta tlaka, s maksimalnim odgovorom od približno 10–15 % pri 80–100 mmHg. Primjena CCPA nije značajno izmijenila dilatacijski odgovor u odnosu na skupinu Ac-HBO₂. Slično tomu, ni inkubacija s CGS-21680 nije rezultirala statistički značajnim promjenama u odnosu na Ac-HBO₂.



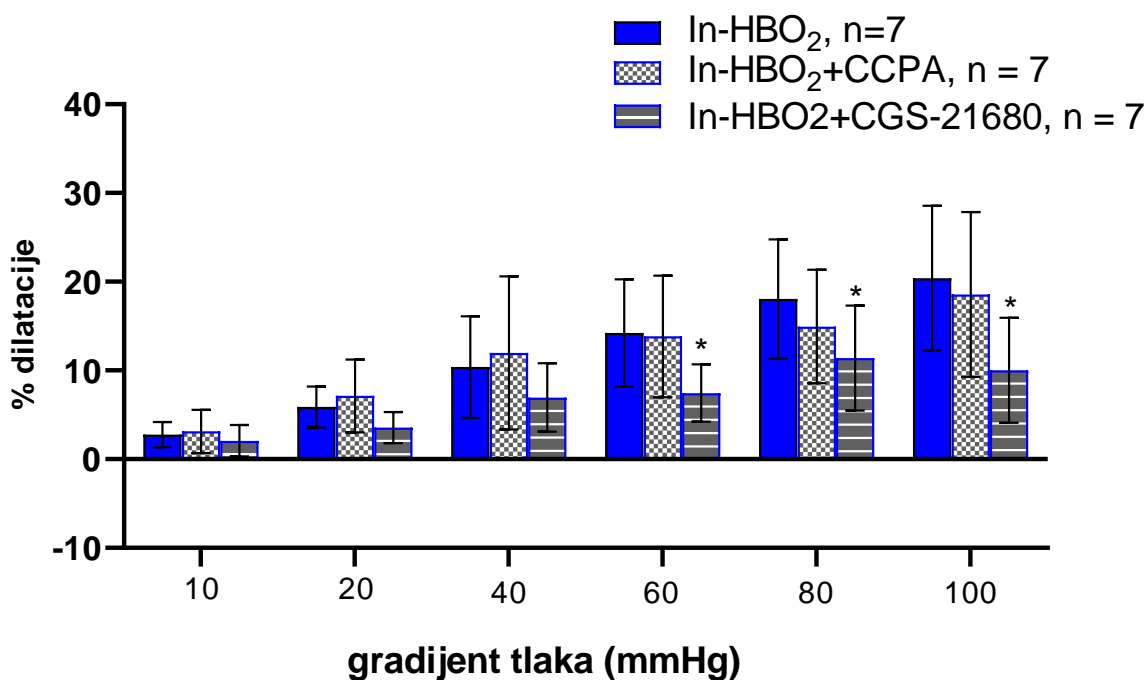
Slika 5.2.2.6. Odgovor srednje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju uz primjenu agonista adenozienskog A1 receptora (CCPA) u koncentraciji 10^{-6} M i agonista adenozienskog A2A receptora (CGS-21680) u koncentraciji 10^{-6} M kod akutne skupine štakora. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD.

Na slici 5.2.2.7. prikazan je dilatacijski odgovor srednje moždane arterije (MCA) štakora nakon akutne izloženosti hiperbaričnoj oksigenaciji (Ac-HBO₂) u kontrolnim uvjetima (CTRL) te nakon inkubacije s antagonistima adenozienskih receptora, DPCPX (A1 antagonist) i SCH-58261 (A2A antagonist). U skupini Ac-HBO₂ zabilježeno je postupno povećanje dilatacije s porastom gradijenta tlaka, s maksimalnim odgovorom od približno 10–15 % pri 80–100 mmHg. Primjena DPCPX nije značajno izmijenila dilatacijski odgovor u odnosu na skupinu Ac-HBO₂. Slično tomu, ni inkubacija s SCH-58261 nije rezultirala statistički značajnim promjenama u odnosu na Ac-HBO₂.



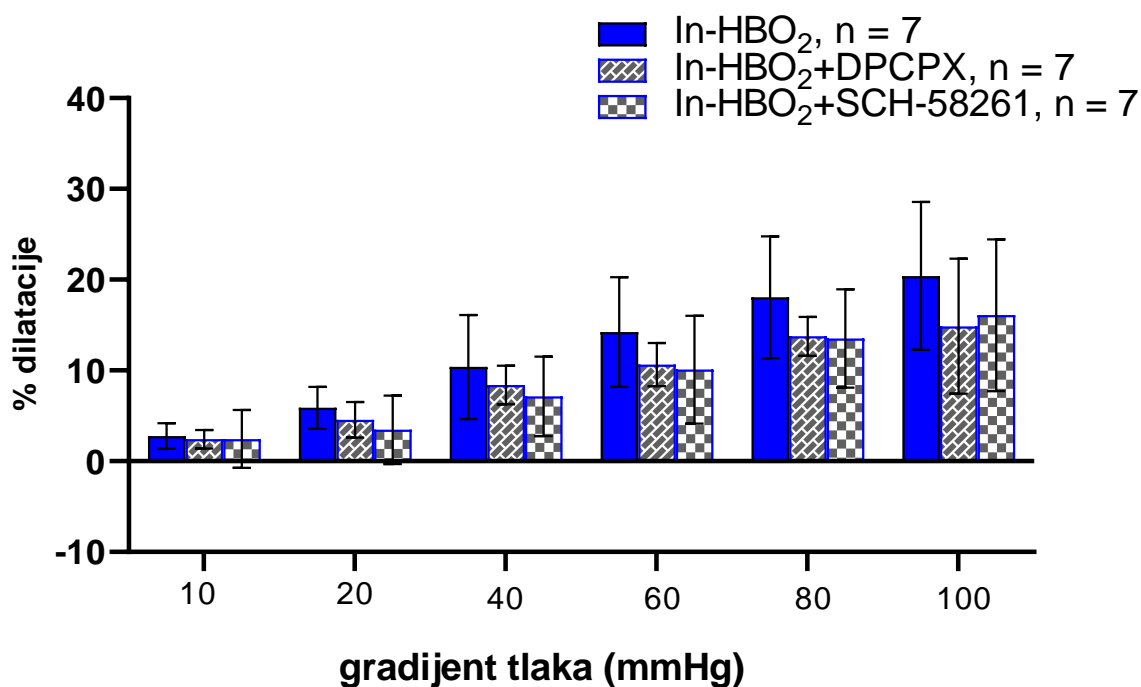
Slika 5.2.2.7. Odgovor srednje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju uz primjenu antagonista adenozienskog A1 receptora (DPCPX) u koncentraciji 10^{-6} M i antagonista adenozienskog A2A receptora (SCH-58261) u koncentraciji 10^{-6} M kod akutne skupine štakora. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD.

Na slici 5.2.2.8. prikazan je dilatacijski odgovor srednje moždane arterije (MCA) štakora nakon intermitentne izloženosti hiperbaričnoj oksigenaciji (In-HBO₂) u kontrolnim uvjetima (CTRL) te nakon inkubacije s agonistima adenozijskih receptora, CCPA (A1 agonist) i CGS-21680 (A2A agonist). U skupini In-HBO₂ zabilježeno je postupno povećanje dilatacije s porastom gradijenta tlaka, s maksimalnim odgovorom od približno 20-25 % pri 80–100 mmHg. Primjena CCPA nije značajno izmijenila dilatacijski odgovor u odnosu na skupinu CTRL. Primjena SCH-58261 rezultirala je statistički značajnim smanjenjem vazodilatacije pri gradijentovima tlaka od 60 do 100 mmHg u odnosu na CTRL.



Slika 5.2.2.8. Odgovor srednje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju uz primjenu agonista adenozienskog A1 receptora (CCPA) u koncentraciji 10^{-6} M i agonista adenozienskog A2A receptora (CGS-21680) u koncentraciji 10^{-6} M kod intermitentne skupine štakora. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. * $p < 0,05$ In-HBO₂ + CGS-21680 u odnosu na CTRL

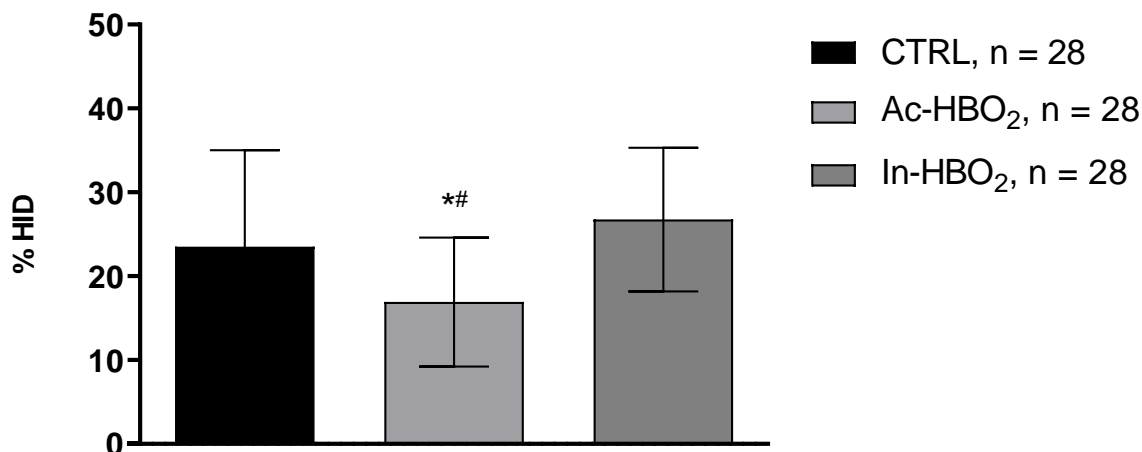
Na slici 5.2.2.9. prikazan je dilatacijski odgovor srednje moždane arterije (MCA) štakora nakon intermitentne izloženosti hiperbaričnoj oksigenaciji (In-HBO₂) u kontrolnim uvjetima (CTRL) te nakon inkubacije s antagonistima adenozienskih receptora, DPCPX (A1 antagonist) i SCH-58261 (A2A antagonist). U skupini In-HBO₂ zabilježeno je postupno povećanje dilatacije s porastom gradijenta tlaka, s maksimalnim odgovorom od približno 20-25 % pri 80–100 mmHg. Primjena DPCPX nije značajno izmijenila dilatacijski odgovor u odnosu na CTRL i Ac-HBO₂ skupinu. Slično tomu, niti inkubacija s SCH-58261 nije rezultirala statistički značajnim promjenama u odnosu na CTRL i Ac-HBO₂.



Slika 5.2.2.9. Odgovor srednje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju uz primjenu antagonista adenozienskog A1 receptora (DPCPX) u koncentraciji 10^{-6} M i antagonista adenozienskog A2A receptora (SCH-58261) u koncentraciji 10^{-6} M kod intermitentne skupine štakora. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD.

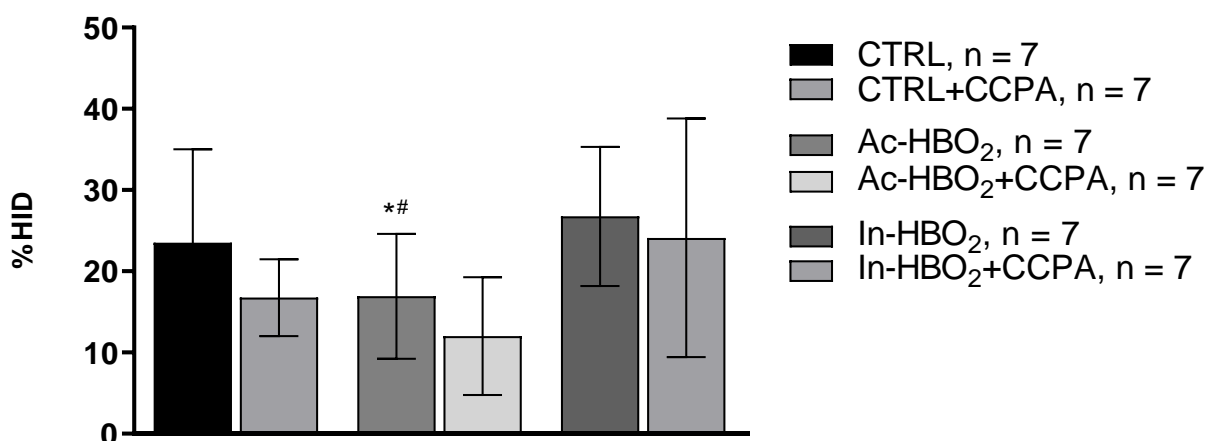
5.2.3. Rezultati utvrđivanja vaskularne reaktivnosti u odgovoru srednje moždane arterije na hipoksijom potaknutu dilataciju te primjenu agonista i antagonista adenozijskih A1 i A2A receptora

Slika 5.2.3.1. prikazuje vaskularni odgovor srednje moždane arterije na hipoksijom induciranu vazodilataciju u kontrolnoj skupini (CTRL) te nakon akutnog (Ac-HBO₂) i intermitentnog (In-HBO₂) izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji. Izloženost hipoksiji izazvala je dilataciju srednje moždane arterije u sve tri ispitivane skupine. Značajno smanjenje vaskularne reaktivnosti (vazodilatacije) srednje moždane arterije uočeno je kod SD štakora izloženih akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (HBO₂) u usporedbi s kontrolnom (CTRL) i intermitentnom (In-HBO₂) skupinom ($p < 0,05$, označeno sa * i #) tijekom hipoksičnih uvjeta, u odsutnosti modulatora adenozijskih A1 i A2A receptora, što ukazuje na oslabljeni hipoksični vazodilatacijski odgovor nakon akutnog HBO₂ tretmana. Suprotno tomu, kod životinja koje su bile podvrgnute intermitentnoj (četverodnevnoj) hiperbaričnoj oksigenaciji (In-HBO₂), odgovor na hipoksiju nije se značajno razlikovao od kontrolnih vrijednosti.



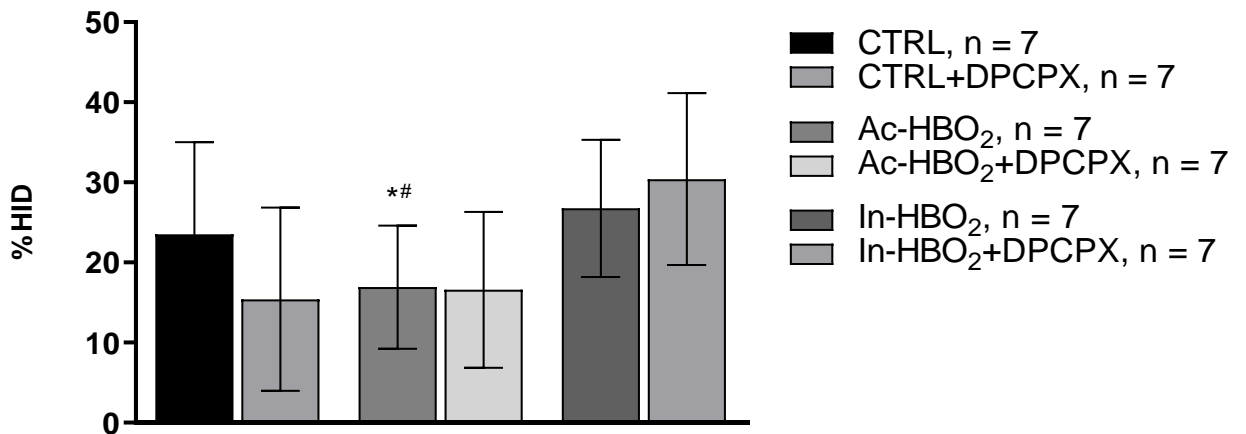
Slika 5.2.3.1. Odgovor srednje moždane arterije na hipoksijom potaknutu dilataciju (HID) bez primjene agonista i antagonista adenzinskih A1 i A2A receptora. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. * $p < 0,05$ Ac-HBO₂ u odnosu na CTRL; # $p < 0,05$ Ac-HBO₂ u odnosu na In-HBO₂

Slika 5.2.3.2. prikazuje odgovor srednje moždane arterije na hipoksijom potaknutu dilataciju uz primjenu agonista adenzinskog A1 receptora (CCPA) u koncentraciji 10^{-6} M u kontrolnoj skupini (CTRL) te nakon akutnog (Ac-HBO₂) i intermitentnog (In-HBO₂) izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji. Nisu utvrđene značajne razlike u vazoreaktivnosti induciranoj hipoksijom nakon primjene agonista adenzinskog A1 receptora u štakora izloženih akutnoj ili intermitentnoj HBO₂, u usporedbi s neizloženim kontrolnim životinjama.



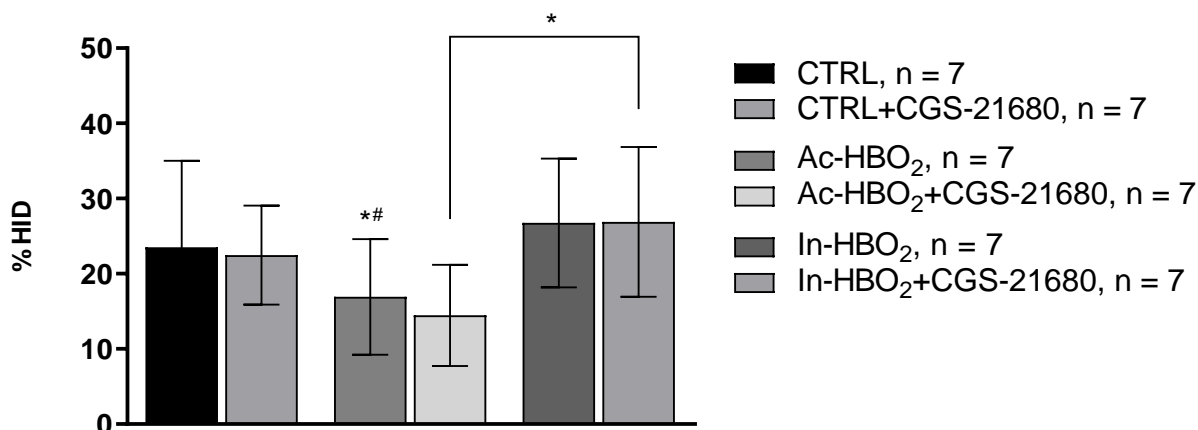
Slika 5.2.3.2. Odgovor srednje moždane arterije na hipoksijom potaknutu dilataciju uz primjenu agonista adenozienskog A1 receptora (CCPA) u koncentraciji 10^{-6} M. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD.

Slika 5.2.3.3. prikazuje odgovor srednje moždane arterije na hipoksijom potaknutu dilataciju uz primjenu antagonista adenozienskog A1 receptora (DPCPX) u koncentraciji 10^{-6} M u kontrolnoj skupini (CTRL) te nakon akutnog (Ac-HBO₂) i intermitentnog (In-HBO₂) izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji. Nisu utvrđene značajne razlike u vazoreaktivnosti induciranoj hipoksijom nakon primjene antagonista adenozienskog A1 receptora u štakora izloženih akutnoj ili intermitentnoj HBO₂, u usporedbi s neizloženim kontrolnim životinjama.



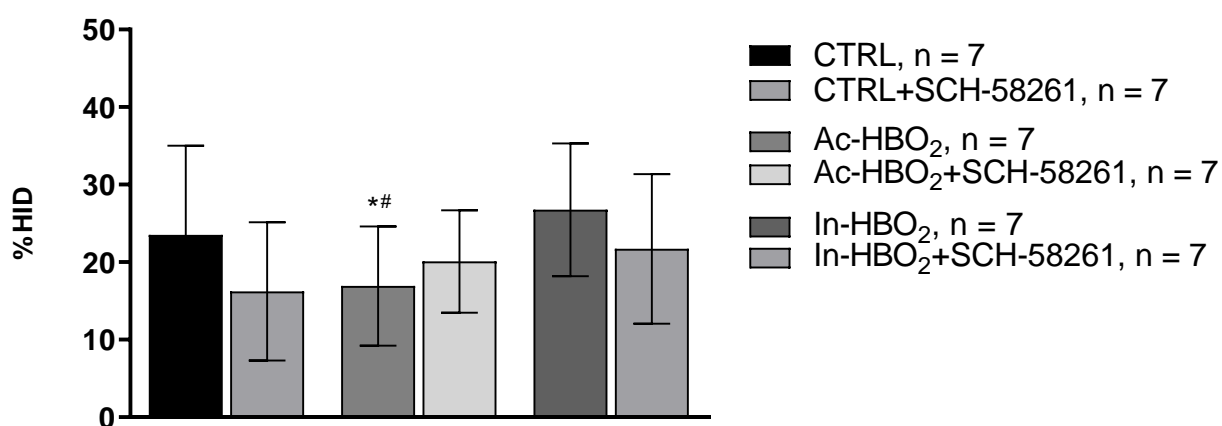
Slika 5.2.3.3. Odgovor srednje moždane arterije na hipoksijom potaknutu dilataciju uz primjenu antagonista adenozienskog A1 receptora (DPCPX) u koncentraciji 10^{-6} M. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD.

Slika 5.2.3.4. prikazuje odgovor srednje moždane arterije na hipoksijom potaknutu dilataciju uz primjenu agonista adenozienskog A2AR-a (CGS-21680) u koncentraciji 10^{-6} M u kontrolnoj skupini (CTRL) te nakon akutnog (Ac-HBO₂) i intermitentnog (In-HBO₂) izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji. Nisu zabilježene značajne promjene u odgovoru na hipoksiju tijekom primjene agonista adenozienskog A2AR-a u skupini izloženoj akutnoj HBO₂ u odnosu na kontrolu. Međutim, u prisutnosti agonista A2AR-a, vazodilatacijski odgovor na hipoksiju bio je značajno izraženiji kod životinja izloženih intermitentnoj HBO₂ u usporedbi s onima izloženima akutnoj HBO₂.



Slika 5.2.3.4. Odgovor srednje moždane arterije na hipoksijom potaknutu dilataciju uz primjenu agonista adenozienskog A2A receptora (CGS-21680) u koncentraciji 10^{-6} M. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. * $p < 0,05$ In-HBO₂ + CGS-21680 u odnosu na Ac-HBO₂ + CGS-21680.

Slika 5.2.3.5. prikazuje odgovor srednje moždane arterije na hipoksijom potaknutu dilataciju uz primjenu antagonista adenozienskog A2AR-a (SCH-58261) u koncentraciji 10^{-6} M u kontrolnoj skupini (CTRL) te nakon akutnog (Ac-HBO₂) i intermitentnog (In-HBO₂) izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji. Nisu utvrđene značajne razlike u vazoreaktivnosti induciranoj hipoksijom nakon primjene antagonista adenozienskog A2AR-a u štakora izloženih akutnoj ili intermitentnoj HBO₂, u usporedbi s neizloženim kontrolnim životinjama.

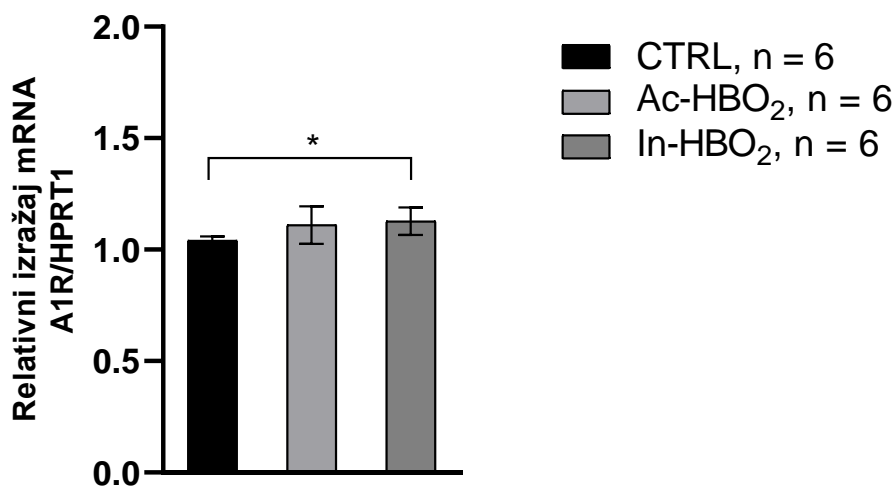


Slika 5.2.3.5. Odgovor srednje moždane arterije na hipoksijom potaknutu dilataciju uz primjenu antagonista adenozienskog A2A receptora (SCH-58261) u koncentraciji 10^{-6} M. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD.

5.3. Rezultati molekularnih metoda istraživanja

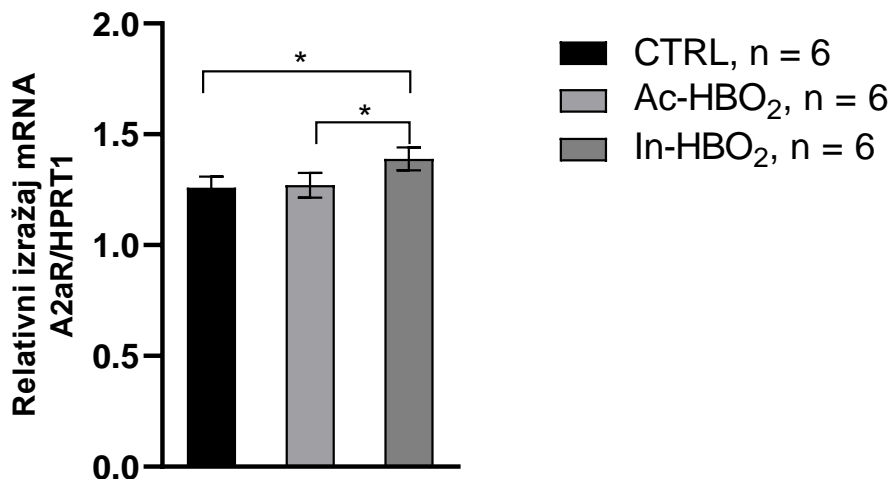
5.3.1. Rezultati genskog izražaja adenzinskih A1 i A2A receptora

Rezultati analize relativnog izražaja gena adenzinskih A1 receptora prikazana je na slici 5.3.1.1. Uočeno je statistički značajno povećanje izražaja gena adenzinskih A1 receptora u skupini štakora izloženih intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (In-HBO₂) u usporedbi s kontrolnom skupinom (CTRL) ($p < 0,05$). S druge strane, nije zabilježena značajna razlika u izražaju gena adenzinskih A1 receptora između skupina Ac-HBO₂ i In-HBO₂.



Slika 5.3.1.1. Relativni genski izražaj adenzinskih A1 receptora u perfirnim moždanim arterijama. Rezultati su prikazani kao srednji relativni izražaj mRNA normalizirane na izražaj referentnog (housekeeping) gena HPRT1. Statistički značajne razlike utvrđene su za vrijednosti $p < 0,05$. * $p < 0,05$ In-HBO₂ u odnosu na CTRL.

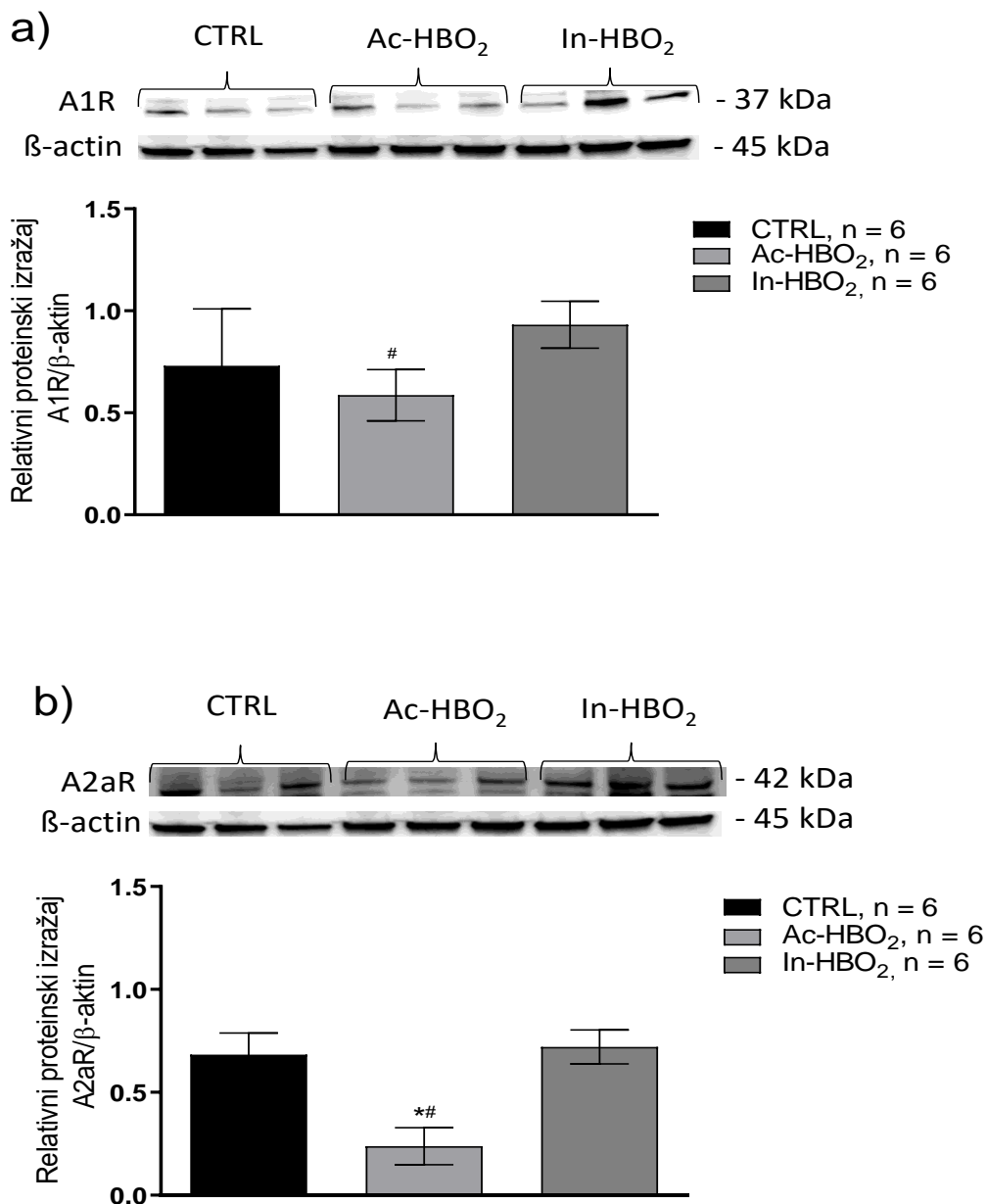
Relativni genski izražaj adenzinskih A2AR-a prikazana je na slici 5.3.1.2. Skupina In-HBO₂ pokazala je značajno povećanje izražaja gena adenzinskih A2AR-a u usporedbi s obje druge skupine – kontrolnom (CTRL) i Ac-HBO₂ ($p < 0,05$). Nije uočena statistički značajna razlika u izražaju A2AR gena između skupina CTRL i Ac-HBO₂.



Slika 5.3.1.2. Relativni genski izražaj adenozičkih A2AR-a u perfirnim moždanim arterijama. Rezultati su prikazani kao srednji relativni izražaj mRNA normalizirane na izražaj referentnog (housekeeping) gena HPRT1. Statistički značajne razlike utvrđene su za vrijednosti $p < 0,05$. * $p < 0,05$ In-HBO₂ u odnosu na CTRL i Ac-HBO₂.

5.3.2. Rezultati proteinskog izražaja adenozičkih A1 i A2A receptora

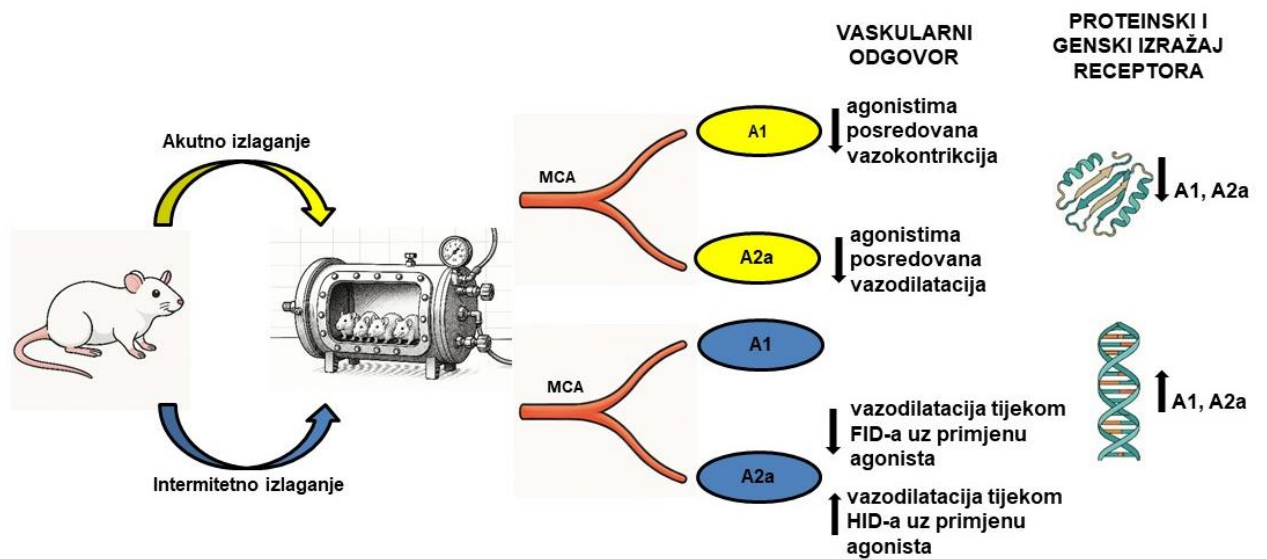
Proteinski izražaj adeozinskih A1 receptora bio je značajno smanjen u skupini životinja akutno izloženih hiperbaričnoj oksigenaciji (Ac-HBO₂) u odnosu na skupinu s intermitentnom izloženošću (In-HBO₂). S druge strane, u skupini In-HBO₂ razine proteina adeonozičkih A1 receptora bile su usporedive s onima u kontrolnoj skupini, bez statistički značajnih razlika. Rezultati su prikazani na slici 5.3.2.1.a. Proteinski izražaj adeozinskih A2AR-a bila je značajno smanjena u skupini životinja akutno izloženih hiperbaričnoj oksigenaciji (Ac-HBO₂) u odnosu na kontrolnu skupinu (CTRL). U intermitentnoj skupini (In-HBO₂) razine proteina adeonozičkih A2AR-a bile su usporedive s onima u kontrolnoj skupini, bez statistički značajnih razlika. Rezultati su prikazani na slici 5.3.2.1.b.



Slika 5.3.2.1. Relativni izražaj proteina i reprezentativni prikaz (blot) a) adenozijskih A1 i b) A2A receptora u perifernim moždanim arterijama određen metodom Western blot. Slika je snimljena pomoću Bio-Rad ChemiDoc sustava i analizirana u programu ImageJ. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti relativnog izražaj proteina, normalizirane na izražaj β-aktina. Statistički značajne razlike utvrđene su za vrijednosti $p < 0,05$. Slika a) $^{\#}p < 0,05$ Ac-HBO₂ u odnosu na In-HBO₂; Slika b) $^{*}p < 0,05$ Ac-HBO₂ u odnosu na CTRL i In-HBO₂.

Ukratko, dobiveni rezultati ukazuju da štakori koji su bili izloženi akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji imaju narušene vaskularne odgovore na agoniste adenozijskog A1 receptora

(A1R) i adenozienskog A2A receptora (A2AR). U obje skupine, Ac-HBO₂ i In-HBO₂, modulacija A1R nije značajno utjecala na protokom potaknutu dilataciju (FID) niti na hipoksijom potaknutu dilataciju (HID). Stimulacija A2AR smanjila je FID u In-HBO₂ skupini, dok antagonizam A2AR nije značajno utjecao na HID. Međutim, prisutnost A2AR agonista pojačala je HID kod štakora izloženih In-HBO₂. Izražaj proteina A1R-a i A2AR-a bio je smanjena nakon Ac-HBO₂, dok je genski izražaj bio povećan nakon In-HBO₂. Ovi nalazi upućuju na to da AR imaju ulogu u HBO₂-induciranoj vazoreaktivnosti, koja se vjerojatno mijenja u srednjim moždanim arterijama (MCA), potencijalno putem modulacije genskog i proteinskog izražaja AR. Rezultati su sažeto slikovno prikazani na slici 5.3.2.2.



Slika 5.3.2.2. Slikoviti sažetak značajnih rezultata istraživanja.

(Izvor: autor rada)

6. RASPRAVA

Kada se govori o razlikama između akutne (Ac-HBO₂) i intermitentne (In-HBO₂) izloženosti zdravih životinja visokim koncentracijama kisika, hiperbarična oksigenoterapija (HBO₂) ima učinke na strukturu i funkciju krvnih žila koji do sada nisu dovoljno eksperimentalno istraženi, posebice na molekularnoj razini (217). S obzirom na to da adenzinski A1R i adenzinski A2AR imaju važnu ulogu u modulaciji vaskularnog tonusa i prilagodbi moždane cirkulacije na promjene oksigenacijskog statusa, zanimljivo je istražiti kako dva ekstremna stanja promjene parcijalnog tlaka kisika, a to su hiperoksija i hipoksija, utječu na adenzinergičku signalizaciju. Cilj istraživanja bio je rasvijetliti utjecaj različitih protokola HBO₂ na vaskularnu reaktivnost MCA u odgovoru na FID i HID sa i bez aktivacije A1R i A2AR. Dobiveni rezultati pokazuju da različita izloženost HBO₂ modificira vazokonstriktorne i vazodilatacijske odgovore posredovane adenzinskim receptorima, uz promjene u njihovom genskom i proteinskom izražaju. Uočeno je smanjenje A1R-posredovane vazokonstrikcije i A2A-posredovane vazodilatacije bez fiziološkog podražaja FID-a i HID-a te smanjenje odgovora na FID i HID bez prisutnosti adenzinskih agonista i antagonista nakon akutne izloženosti HBO₂, dok intermitentna HBO₂ pokazuje različite obrasce reaktivnosti, uključujući smanjenje vaskularnog odgovora na A2A stimulaciju tijekom FID-a, ali povećanje vaskularnog odgovora tijekom HID-a. Ove promjene prate i diferencijalne prilagodbe na razini izražaja gena i proteina samih receptora, pri čemu je Ac-HBO₂ smanjila proteinski izražaj oba receptora, dok je In-HBO₂ povećala njihov genski izražaj, što ukazuje na kompleksnu regulaciju adenzinergičkog sustava pod uvjetima hiperoksije. Razumijevanje ovih mehanizama ključno je za optimizaciju terapijske primjene HBO₂, osobito u neurološkim i cerebrovaskularnim poremećajima gdje je regulacija moždane perfuzije presudna. U nastavku će se detaljno analizirati dobiveni rezultati istraživanja u kontekstu prethodnih istraživanja, s naglaskom na potencijalne molekularne i funkcionalne mehanizme koji stoje u osnovi ovih promjena.

Vaskularna reaktivnost srednje moždane arterije nakon izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji u odgovoru na FID i HID bez prisutnosti agonista i antagonista adenzinskih A1 i A2A receptora

Dilatacija inducirana protokom i dilatacija inducirana hipoksijom važni su regulatori protoka krvi i perfuzije tkiva, a vaskularni oksidativni stres može značajno promijeniti

vaskularni odgovor srednje moždane arterije na ove podražaje (90, 218). Rezultati ovog istraživanja u skladu su s prethodnim opažanjima da akutna izloženost HBO₂ oštećuje vaskularni odgovor na FID i HID (156). S obzirom na to da FID u velikoj mjeri ovisi o NO, dok HID u manjoj mjeri, narušen vaskularni odgovor posljedica je induciranja sinteze reaktivnih kisikovih spojeva, posebice formiranja peroksinitrita (ONOO⁻) koji inaktiviraju NO i smanjuju njegovu biorasploživost, što posljednično narušava vazodilataciju posredovanu dušikovim oksidom (156, 217, 219). Epicentar povećane proizvodnje ROS-a su mitohondriji, a rizik od oksidativnog stresa može negativno utjecati na dobrobiti HBO₂ (220). Kratkotrajna primjena HBO₂ ima štetne učinke i na aktivnost mitohondrija i na proizvodnju ROS, a tek veći broj uzastopnih tretmana poboljšava aktivnost mitohondrija i dovodi do smanjenja razine ROS-a pojačavajući antioksidativne obrambene mehanizme kao dio zaštitnog odgovora stanice kako bi smanjile proizvodnju ROS-a (157). ROS mogu aktivirati RhoA/ROCK, PKC i druge kinaze u VSMCs što rezultira narušenom vazodilatacijom ili pojačanom vazokonstrikcijom te mogu pokrenuti upalne reakcije induciranjem NF- κ B i sintezom citokina (IL-6, TNF- α) što dovodi do povećanog izražaja endotelnih adhezijskih molekula i pro-kontraktivnih prostanoida što utječe na modulaciju vaskularnog odgovora (74). Nadalje, Ac-HBO₂ može dovesti do oksidativne modifikacije BK kanala u VSMCs i smanjenja njihove osjetljivosti na Ca²⁺ i metaboličke signale što narušava hiperpolarizaciju i dilataciju (221) te povećati sintezu potentnog vazokonstriktora ET-1 (222). Jedan od važnih razloga je promjena metabolizma arahidonske kiseline i povećanje prvenstveno 20-HETE i TXA₂ te smanjenje EET-e i PGI₂, što narušava ravnotežu dilatacijskih i konstriktivnih signala (223, 224). S druge strane, intermitentna izloženost može biti korisna za vaskularnu relaksaciju (156, 210, 225-227). Unatoč očekivanjima da bi In-HBO₂ mogla poboljšati endotelnu funkciju, intermitentno izlaganje HBO₂ tijekom četiri dana nije dovelo do povećanja FID i HID odgovora MCA u odnosu na kontrolnu skupinu. Razlozi bi se mogli objasniti adaptacijskim i homeostatskim mehanizmima vaskularnog sustava. Zdrave krvne žile SD štakora već su imale urednu endotelnu funkciju, a FID je dominantno posredovan putem NO čija je koncentracija blizu fiziološkog maksimuma tzv. stropni efekt (engl. *ceiling effect*) pa kratkotrajni protokol ne uzrokuje značajno dodatno poboljšanje sinteze NO i dodatnu značajnu dilataciju, osim kod disfunkcionalnog endotela (228, 229). Nadalje, molekularne adaptacije koje uključuju povećanje izražaja eNOS-a, povećane osjetljivosti ATP-osjetljivih kalijevih kanala (K-ATP kanali), antioksidativnih enzima i proangiogenih faktora obično zahtijevaju dulji period izlaganja (228-230). Ujedno, In-HBO₂ može modulirati konstriktivne (npr. 20-HETE, ET-1) i dilatacijske (npr. EET, prostanoidi) signale putem promjena u izražaju enzima i proteina, što utječe na vaskularnu

funkciju (231, 232). Mihaljević i sur. pokazali su da su štakori izloženi HBO₂ tijekom 4 dana (4D-HBO₂) u aorti potpuno obnovili endotelnu funkciju u odnosu na oštećenu endotelnu funkciju kod akutne HBO₂, koja je smanjila vaskularni odgovor. Ovakva restauracija funkcije povezana je s povećanjem izražaja antioksidativnih enzima (SOD1, superoksid dismutaza 3 (SOD3), katalaza, glutation peroksidaza (GPx)) i modulacijom nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaze (NADPH-oksidaža) (156). Ovo istraživanje pokazuje obnavljanje vaskularne funkcije kod četverodnevnog izlaganja HBO₂ privremeno narušeno akutnom HBO₂, ali ne trajno poboljšanje vaskularne funkcije u odnosu na kontrolnu skupinu. Mnogi klinički i eksperimentalni radovi koji prijavljuju trajne koristi na vaskularnu funkciju koriste više od 10 tretmana HBO₂ (228, 233, 234). Dakle, kraći protokoli mogu dati neutralan ishod na markere funkcije endotela, jer oksidativne adaptacije i reprogramiranja endotelnih signalnih puteva mogu dovesti do fiziološke normalizacije nalik kontrolnoj skupini, što i jest potvrđeno ovim istraživanjem. Kad je riječ o HID-u koji se temelji prvenstveno na aktivaciji A2aR receptora i K-ATP kanala te u manjoj mjeri NO i EDHF putevima, osim već navedenog mogućeg neodgovarajućeg vremenskog okvira za adaptaciju na oksidativni stres i oštećenja signalnog puta posredovanog NO, postoji mogućnost da funkcionalna razina A2AR-a još uvijek nije dovoljna da poboljša vaskularni odgovor na HID, što je i potvrđeno ovim istraživanjem kad govorimo o proteinskom i genskom izražaju adenozijskih receptora. Nadalje, poznato je da oksidativna modifikacija K-Ca kanala i PKC u glatkom mišiću može trajati dulje čak i nakon smanjenja razine ROS-a, što za posljedicu ima smanjenu osjetljivost signalnog puta posredovanog A2A receptorima (74). Protokol In-HBO₂ u ovom radu koristi ograničen broj sesija, no i s tim brojem ponovljenih izlaganja uočene su promjene u vaskularnoj reaktivnosti što ukazuje da hiperbarična oksigenacija poboljšava endotelnu funkciju te uzrokuje promjene u izražaju proteina i gena adenozijskih receptora koji reguliraju vaskularnu kontraktilnost.

Adenozijski A1 receptori u vaskularnoj reaktivnosti srednje moždane arterije nakon izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji

Rezultati ispitivanjem krivulje stupnjevitog odnosa doza i učinka agonista A1R ukazuju da HBO₂ doprinosi modifikaciji vaskularnog odgovora na direktnu promjenu A1 agonista. Ac-HBO₂ značajno narušava vazokonstriktorni odgovor na direktnu primjenu čak i male doze (10⁻¹⁰ M) A1 agonista, dok nije bilo značajne razlike u vaskularnom odgovoru između CTRL i In-HBO₂. Poznato je da ROS mogu oksidirati tiolne skupine na samom A1R ili njegovom G_i

proteinu čime se narušava konformacijska aktivacija receptora i prijenos signala na adenilat ciklazu čime se narušava fiziološki kontraktilni odgovor posredovan A1R (235). Unutar nekoliko sati izlaganja akutnoj HBO₂ može nastupiti i sama desenzitizacija A1R jer akutni oksidativni stres aktivira PKC i GRK2 receptore koji fosforiliraju A1R (109). Nadalje, ovo istraživanje provedeno za potrebe doktorskog rada je prva studija koja potvrđuje vazokonstrikciju aktivacijom A1R u MCA SD štakora jer se uloga A1R u regulaciji tonusa krvnih žila razlikuje među krvnim žilama (236). Na primjer, Bryan i suradnici pokazali su da A1R i A2AR djeluju sinergistički i podjednako doprinose adenozinom induciranoj vazodilataciji u skeletnim mišićima SD štakora (237). Nadalje, bilo je od interesa ispitati kako dodatna stimulacija A1R modificira vaskularnu reaktivnost u odgovoru na FID i HID koja se mijenja izloženošću različitim HBO₂ protokolima. Primjena agonista i antagonista A1R u FID-u i HID-u nije rezultirala značajnom razlikom u vaskularnoj reaktivnosti u Ac-HBO₂ i In-HBO₂ skupinama u usporedbi s kontrolnom skupinom (CTRL). S obzirom na to da oksidativni stres nastao izlaganjem HBO₂ može oštetiti G_i signalizaciju, adenilat ciklazu ili ciljne receptorske kanale, postoji mogućnost postreptorskog smanjenog očekivanog efekta agonista ili antagonista A1R. Također, dokazano je da uloga A1R na moždanim arterijama ima dvojaku ulogu, a to je izravna vazokonstrikcija preko aktivacije A1R u VSMCs, dok preko endotela djelomično aktivira eNOS što rezultira paradoksalnim smanjenjem kontrakcije s ciljem fine modulacije tonusa (109). Oksidativna inaktivacija endotelnog puta i postreptorsko oštećenje signalnog puta mogu objasniti minimalne razlike kod akutnih, ali i kod intermitentnih skupina u odnosu na CTRL jer receptorski signal A1 receptora može biti i nakon nekoliko dana izlaganja HBO₂ neadekvatan. Također, ravnoteža između različitih endotelnih vazokonstriktora ili vazodilatatora mogla bi narušiti ili maskirati učinak posredovan A1R tijekom različitih protokola HBO₂. ROS povećavaju sintezu snažnih vazokonstriktora ET-1, 20-HETE i TXA₂ koji značajno povećavaju kontraktilni tonus VSMCs i dodatna aktivacija ili inhibicija A1R u VSMCs može imati minimalan učinak jer je maksimalan fiziološki efekt postignut što se naziva efekt stropa ili učinak zasićenja (engl. *ceiling/floor effect*) (239-241). Ngai i sur. pokazali su da inhibicija A1R nije utjecala na dilataciju induciranu adenozinom (242), dok studija na bubrežnim arkuatnim arterijama nije uočila vazokonstriktorni odgovor aktivacijom A1R (243), što ukazuje na potrebu daljnjih istraživanja o ulozi A1R u regulaciji vaskularne funkcije u različitim vrstama krvnih žila, budući da različite žile mogu različito reagirati na agonizam ili antagonizam ovih receptora. Također, adenzin oslobođen tijekom hipoksije uzrokuje cerebralnu vazodilataciju djelujući na A2AR-e, dok A1R-i imaju minimalnu funkcionalnu ulogu u hipoksičnim uvjetima (244) što potencijalno može objasniti izostanak očekivanog

odgovora kod HID-a. U glatkim mišićima aorte miša, stimulacija A1R povezana je s proizvodnjom 20-HETE i aktivacijom PKC, što inhibira aktivnost BK kanala, što rezultira vazokonstrikcijom (245). S obzirom na to da ROS također nastaju aktivacijom adenozijskih receptora (246) i da ROS igraju ulogu u modulaciji aktivnosti BK kanala (247, 248), možemo nagađati da Ac-HBO₂ pa čak i četverodnevna In-HBO₂ moduliraju vaskularni odgovor putem BK kanala na stimulaciju A1R, ali potrebna su daljnja istraživanja kako bi se testirala ova hipoteza. Dakle, ovi rezultati mogu upućivati da uloga A1R u vaskularnoj reaktivnosti može biti neutralizirana ili zamaskirana istovremenim promjenama u tzv. nizvodnoj (*engl. downstream*) signalizaciji, oksidativnom okruženju, eikozanoidnoj ravnoteži ili mogućim eksperimentalnim limitacijama (npr. problemi s penetracijom lijeka u tkivo, slaba ili odsutna direktna stimulacija A1R na glatkom mišiću). Posebnu pozornost potrebno je usmjeriti na ekspresiju, membransku lokalizaciju i funkcionalnu aktivnost A1R, kao i na učinkovitost Gi-proteinski posredovanih signalnih puteva koji sudjeluju u prijenosu signala od receptora do efektorskih sustava glatkih mišića. Nadalje, važno je procijeniti ulogu oksidativnog stresa u modulaciji adenozijske signalizacije, uključujući određivanje razine reaktivnih kisikovih vrsta, markera oksidativne modifikacije proteina i antioksidativne obrane. U tom kontekstu potrebno je dodatno istražiti i funkcionalni status endotela, osobito biodostupnost dušikovog oksida, aktivnost enzima sGC te potencijalne promjene u ravnoteži između vazodilatatornih i vazokonstriktornih eikozanoida (TXA₂, PGI₂, 20-HETE, EETs). Takav integrirani pristup omogućio bi preciznije određivanje razine na kojoj dolazi do poremećaja A1R-posredovanog odgovora te bolju interpretaciju vremenske dinamike i mehanizama oporavka vaskularne funkcije nakon različitih protokola hiperbarične oksigenacije.

Adenozijski A2A receptori u vaskularnoj reaktivnosti srednje moždane arterije nakon izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji

Poznato je da je vazodilatacijski odgovor moždanih arterija sigurno posredovan A2AR-om, dok pri višim koncentracijama adenzina (>1 μM) A2BR također može doprinijeti (242). Aktivacija A2A receptora potiče sintezu NO i PGI₂ putem G_s protein vezanog mehanizma koji uključuje porast intracelularnog cAMP-a i aktivaciju PKA, čime se ostvaruje vazodilatacijski učinak (249, 250). Povećana produkcija NO i PGI₂ dodatno može inhibirati sintezu vazokonstriktora poput ET-1, 20-HETE i tromboksana A₂, čime se vaskularni tonus pomiče prema dilataciji (251, 252). U uvjetima oksidativnog stresa ili hiperoksije, ovaj balans može

biti narušen smanjenjem biodostupnosti NO-a i promjenom aktivnosti enzima uključenih u sintezu eikozanoida, što može rezultirati slabljenjem A2A posredovanog vazodilacijskog odgovora (235, 253, 254). Također, dokazano je da smanjenje bioraspoloživosti NO je izravno povezano s povećanjem učinaka 20HETE (255) što objašnjava kako gubitak NO može osnažiti vazokonstrikciju posredovanu ovim vazokonstriktornim eikozanoidom. Stimulacija A2AR-a agonistom u ovoj studiji rezultirala je značajnim smanjenjem vazodilatacije pri ispitivanju krivulje stupnjevitog odnosa doza i učinka pri višim dozama (10^{-6} i 10^{-5} M) u Ac-HBO₂. S obzirom na to da stimulacija A2AR rezultira glatko-mišićnom i endotelno-ovisnom vazodilatacijom, povećano stvaranje ROS-a tijekom Ac-HBO₂, aktivacija prooksidativnih enzima, oksidativna disfunkcija endotela i smanjena biodostupnost NO te oksidativna disfunkcija receptora i receptorskih signalnih puteva mogli bi biti kombinirani potencijalni razlozi narušene vazoreaktivnosti. Poznato je da ROS oksidiraju tiolne skupine A2AR i α -podjedinicu Gs-proteina, čime se smanjuje njihova sposobnost aktivacije adenilat-ciklaze te se smanjuje cAMP i PKA aktivnost što rezultira oslabljenom dilatacijom (235, 256). Premda postoje dokazi da oksidativni stres mijenja funkciju i signalizaciju A2A receptora (257), dosad nije dokumentiran eksperimentalan dokaz da ROS uzrokuje njihovu internalizaciju. Uzimajući u obzir smanjenu funkcionalnu dostupnost A2AR nakon akutne HBO₂, potrebno je provesti dodatne eksperimente koji bi direktno ispitali receptornu internalizaciju (npr. markiranje receptora, kolokalizacija s endosomskim markerima, inhibitor endocitoze) u uvjetima povišenog ROS. S obzirom na to da ROS reagiraju s NO i stvaraju NOO⁻ koji direktno inaktivira sGC u glatkim mišićima, oksidira koenzim tetrahidrobiopterin (BH₄) pri čemu eNOS ne može pravilno prenositi elektrone i sintetizirati NO, već dolazi do povećane sinteze ROS-a što rezultira smanjenom proizvodnjom NO (257), a on važan u posredovanju vazodilacijskog odgovora aktivacijom A2AR, može se potencijalno pretpostaviti dodatni razlog narušenog vazodilacijskog odgovora MCA nakon akutnog izlaganja HBO₂. Nadalje, iako su studije pokazale da hiperoksija može potaknuti sintezu vazokonstriktornog 20-HETE (npr. inhibitor sinteze 20-HETE smanjuje hiperoksijsku konstrikciju) (259, 260) i da hiperoksija povećava ekspresiju COX-2 u određenim modelima (261, 262), još uvijek nedostaje potpuni eksperimentalni dokaz za simultani pomak ravnoteže eikozanoida (npr. porast TXA₂ i PGI₂ te smanjenje EETs) u cerebralnim arterijama nakon akutne HBO₂ te kako taj pomak utječe na odgovor putem A2A receptora, ali postoji pretpostavka da povećan omjer vazokonstriktora u odnosu na vazodilatatore može maskirati ili antagonizirati stimulacijski odgovor posredovan A2AR (260, 263).

Različiti vazoaktivni metaboliti arahidonske kiseline (prostaglandini, EET, 20-HETE), koje stvaraju različiti CYP450 enzimi, značajno moduliraju vaskularnu funkciju te se međusobno preklapaju s adenozienergичkim signalnim putem, osobito onim posredovanim adenzin-epoksigenaznim sustavom (96, 178, 264, 265). Poznato je da je u uvjetima Ac-HBO₂ oštećena endotelno posredovana vazorelaksacija tijekom odgovora na FID i hipoksiju, posredovana povećanom sintezom 20-HETE (96). Ovaj eikozanoid može pridonijeti endotelnoj disfunkciji smanjenjem oslobađanja NO i povećanjem proizvodnje superoksida, čime dodatno narušava sintezu između vazodilatacijskih i vazokonstriktornih medijatora (133). Uz to, 20-HETE, NO, K_{Ca} kanali, istezanjem aktivirani kationski kanali (engl. *Stretch-activated channels* (SAK)) i ROS igraju važnu ulogu u modulaciji vazomotornog tonusa kao odgovor na promjene tlaka i protoka, pri čemu je 20-HETE glavni medijator konstrikcije inducirane protokom u MCA (266). ROS, posebno oni koji nastaju aktivacijom enzima CYP450 4A, dodatno smanjuju biodostupnost NO-a, što rezultira pojačanom sintezom 20-HETE i daljnjom vazokonstrikcijom tijekom FID-a u MCA štakora (266). S obzirom na to da je prethodno pokazano da akutni HBO₂ smanjuje adenozienergичki put posredovan A2AR-om (4), rezultati ovog istraživanja nisu pokazali značajne promjene vaskularne reaktivnosti nakon A2A stimulacije tijekom FID-a i hipoksije mogli bi se objasniti takvim poremećajem u oksidativno-eikozanoidnoj ravnoteži.

Intermitentna izloženost HBO₂ smanjuje izražaj endopeptidaze CD26, koja igra ključnu ulogu u razgradnji vazokonstriktornih i antioksidativnih peptida, što predstavlja adaptivni odgovor na visoke razine kisika povećanjem vaskularnog tonusa i povećanjem antioksidativnih enzima (4, 176, 267). U ovom istraživanju zabilježen je smanjeni vazodilatacijski odgovor na stimulaciju agonistom A2AR-a CGS-21680 kao odgovor na FID kada je intravaskularna razlika tlaka povećana na 80 i 100 mmHg. Poznato je da povećanje intraluminalnog tlaka i intraluminalnog protoka (Δ protoka) dovodi do protokom stimulirane dilatacije, a pri višim tlakovima, protokom stimulirane konstrikcije ljudske i štakorske MCA kao dijela autoregulacije cerebralnog protoka krvi (268, 269). Ovaj dvofazni odgovor MCA također je uočen u ovoj studiji u prisutnosti agonista A2AR i FID-a, što ukazuje da interakcija mehaničkog istezanja stijenke, metaboličkih čimbenika (npr. adenzin) i kemijskih signala (npr. pCO₂, pH i pO₂) može modulirati učinkovitost A2A posredovane vazodilatacije (270, 271). Dodatno, nekoliko studija potvrdilo je da se ne samo velike arterije poput MCA, već i manje bočne grane MCA (promjera oko 50 mikrometara) sužavaju pri povećanju tlaka i protoka (266, 267, 268, 272), što naglašava važnost mikrocirkulacije u autoregulaciji cerebralnog protoka (273). Također, potvrđeno je da porastom luminalnog protoka u ljudskim i štakorskim cerebralnim arterijama

izazvana vazokonstrikcija u sklopu autoregulacije je posredovana 20HETE i TP receptorima (269), što upućuje da protok-inducirani kontrakcijski mehanizmi mogu maskirati ili nadjačati klasične vazodilatacijske puteve, uključujući adenozienergčki A2A receptorski odgovor, osobito u uvjetima oksidativnog stresa i promijenjene eikozanoidne ravnoteže. Nadalje, Bruzzese i suradnici potvrdili su da intermitentna izloženosti HBO₂ može smanjiti funkcionalnu dostupnost A2A receptora što je povezano s nižom cAMP signalizacijom, što znači da agonisti A2A receptora imaju slabiji vazodilatacijski učinak nakon duže izloženosti HBO₂. Isti autori ukazuju da oksidativni stres i promjena u ekspresiji CD26 mogu modulirati adenozienergčki put i odgovore vaskularnih i živčanih stanica (4). Sing i suradnici potvrđuju da dugotrajniji ili ponovljeni stres (intermitentna hiperoksija ili hipoksija) mogu modulirati odgovor A2AR na način da pojačavaju bazalnu aktivnost receptora u sklopu adaptacije, čineći agoniste manje učinkovitim ili čak povećavati staničnu štetu aktivacijom PKC-K_{-ATP} puta koji u uvjetima povećanog oksidativnog stresa ima suprotan efekt jer PKC aktivira ROS proizvodnju, što dovodi do disfunkcionalne hiperpolarizacije čime se smanjuje ukupni vazodilatacijski efekt A2A agonista (274). Stoga, postoje preliminarni podaci koji mogu upućivati da dugotrajnija izloženost HBO₂ može utjecati na A2AR, ali potrebna su dodatna istraživanja kako bi se ti učinci preciznije karakterizirali i kvantificirali.

Rezultati ovoga istraživanja upućuju da In-HBO₂ poboljšava vaskularni odgovor na HID (u usporedbi sa štakorima izloženim Ac-HBO₂) aktivacijom adenozičkih A2AR-ova, suprotno učincima na FID. Tijekom hipoksije i metaboličkog stresa razina ekstracelularnog adenzina značajno raste zbog povećane aktivnosti ektopičnih nukleotidaza (CD39 i CD73), smanjenog unosa adenzina u stanice, povećane degradacije ATP-a iz endotela i smanjene razgradnje adenzina inhibicijom adenzin deaminaze čime izravno pojačava adenozienergčki tonus i funkcionalnost adenozičkih receptora (109, 141, 207, 275), pri čemu A2AR igraju glavnu zaštitnu i vazodilatacijsku ulogu te djeluju kao važni metabolički senzori hipoksije koji posljedično pojačavaju endotelnu proizvodnju NO-a (276, 277), inhibiraju CYP4A i COX-2 aktivnost, povećavaju sintezu EET-e i PGI₂ (250) te smanjuju sintezu 20HETE (255, 278) i TXA₂ (251), inhibiraju upalu i adheziju leukocita i koordiniraju s HIF-1 α signalizacijom jer cAMP/PKA put može stabilizirati HIF-1 α i tako pojačati ekspresiju zaštitnih gena (279, 280), što očigledno A2AR čini važnim modulatorima homeostaze tijekom hipoksijskog stresa. Prethodno je dokazano da je povećani vazodilatacijski odgovor na hipoksiju kod štakora izloženih intermitentnom HBO₂ povezan s aktivacijom COX-a, s posljedičnom sintezom prvenstveno PGI₂ i aktivacijom CYP450 epoksigenaza i stvaranjem EET-a (96). Povećani

omjer vazodilatatora (prvenstveno EET i PGI₂) u usporedbi s vazokonstriktorima (prvenstveno 20HETE) tijekom intermitentnog izlaganja HBO₂, može predstavljati temeljni mehanizam pojačane vazorelaksacije tijekom hipoksije (96). U izoliranim lučnim arterijama SD štakora, dilatacija pri tlaku od 80 mmHg bila je posredovana aktivacijom A2AR i povećanim oslobađanjem EET-a (178, 264). EET-i djeluju kao sekundarni glasnici koji putem aktivacije G_sα proteina rezultiraju otvaranjem Ca²⁺-aktiviranih K⁺ kanala u preglomerularnim mikrožilama (178). Jedan od mehanizama cerebralne vazodilatacije predložen je putem stimulacije adenozijskih receptorskih podtipova A2A i A2B, čija aktivacija adenozinom inducira stvaranje O₂⁻ iz NADPH oksidaze i mitohondrijskih izvora te stvaranje njegovog produkta dismutacije H₂O₂, kao što je pokazano u izoliranim mišićnim stanicama moždanih arterija (281). Generiranje oksidansa može ojačati funkcionalne učinke ovih adenozijskih receptorskih podtipova integrirajući se s drugim oslobođenim faktorima, kao što su NO, PGI₂ i EET-i ili EDHF (43). Pretpostavljamo da tijekom hipoksičnih uvjeta dolazi do povećane proizvodnje spomenutih vazodilatacijskih faktora i značajno boljeg vaskularnog odgovora na HID aktiviranjem A2AR kod SD štakora izloženih In-HBO₂. To je u skladu sa studijama na izoliranim ljudskim i štakorskim perifernim i cerebralnim arterijama koje pokazuju da se cerebralne arterije značajno dilatiraju u hipoksičnim uvjetima unatoč postojanju cerebralne autoregulacije, što implicira da metabolički signali mogu nadjačati autoregucijsko suženje izazvano protokom (282-284). Dakle, hipoksija je jedan od najmoćnijih kemijskih induktora vazodilatacije, izražaja gena, metaboličkih promjena i regenerativnih procesa (285). Nadalje, intermitentna izloženost HBO₂ inducira nekoliko hipoksičnih staničnih mehanizama jer se fluktuacije u koncentraciji slobodnog kisika između serija HBO₂, a ne apsolutne razina kisika, mogu protumačiti na staničnoj razini kao nedostatak kisika, što se naziva hiperoksično-hipoksični paradoks (HHP) (285) ili intermitentna pseudohipoksija (156). Upravo HHP ima najdominantniji učinak na stabilizaciju HIF-1α i aktivaciju hipoksijom induciranih gena (285). Ovaj lažni signal hipoksije tijekom uzastopnih izlaganja HBO₂ inhibira prolil hidroksilazu koja razgrađuje HIF-1α i na taj način dolazi do njegove akumulacije i stabilizacije u stanici, a krivulja doza-odgovor povezana je s primijenjenim tlakom, vremenom i brojem izlaganja HBO₂ (285). HIF-1α utječe na izražaj VEGF-a, antioksidativnih enzima poput HO-1, glikolitičkih enzima, eNOS-a, iNOS-a, SIRT-1, ciklooksigenaze-2 (COX-2) i proizvodnju NO i prostaglandina u uvjetima HHP-a što dovodi do poboljšanja endotelne funkcije odnosno pojačanog vazodilatacijskog odgovora (285, 287). Povećani vazodilatacijski odgovor na hipoksiju posljedica je aktivacije COX-a s posljedičnom sintezom prvenstveno PGI₂ i aktivacijom epoksigenaza CYP450 i EET-a (96) te povećanog izražaja HIF1α koji izravno

povećava ekspresiju adenozijskih A2A i A2B receptora (285). Aktivacija A2AR može neizravno povećati sintezu EET-a aktiviranjem cAMP-a i povećanjem sinteze enzima CYP450 ili njihove stabilnosti inhibiranjem enzima sEH koji razgrađuju EET-e (207, 243, 279, 288), što bi moglo doprinijeti boljem vaskularnom odgovoru, ali možda ne dovoljno da nadjača autoregulacijske mehanizme (koji vjerojatno nisu posredovani A2AR-ima), osim u prisutnosti jakog induktora vazodilatacije poput hipoksije. Pojačano stvaranje adenzina tijekom HHP indirektno povećava staničnu razinu NAD^+ kroz purinski ciklus čime se aktivira SIRT1 (NAD^+ -ovisna deacetilaza) (289) te direktno aktivacijom A2AR i cAMP/PKA puta, koji može povećati ekspresiju SIRT1 putem CREB transkripcijskog faktora (290). SIRT1 doprinosi stabilizaciji HIF-1 α te inhibira NF- κ B i deacetilira FOXO3a i eNOS, čime smanjuje oksidativni stres, upalne procese i povećava sintezu dušikovog oksida (NO) (291, 292). Također, dokazano je da SIRT1 inhibira NF- κ B i upalne gene koji smanjuju ekspresiju A2AR-a (293). Ova dvosmjerna interakcijska suradnja i zajednički signalni mehanizmi aktivacije A2AR i SIRT1 omogućuju sinergističke učinak u očuvanju endotelne funkcije, smanjenju vaskularne upale i stabilizaciji redoks ravnoteže te mogu imati ključnu ulogu u adaptivnom preoblikovanju vaskularne reaktivnosti, pri čemu njihova aktivacija doprinosi rebalansu između vazodilatacijskih (NO, PGL₂, EETs) i vazokonstriktorskih medijatora (20-HETE, endotelin-1), što rezultira poboljšanom endotelno ovisnom vazodilatacijom i smanjenjem oksidativnog oštećenja nakon intermitentne HBO₂ izloženosti (136, 294).

Nedostatak promjene vaskularne reaktivnosti nakon primjene antagonista A2A receptora u Ac-HBO₂ i In-HBO₂ skupinama ukazuje da u tim uvjetima adenozijski tonus posredovan A2A receptorima nije imao značajan funkcionalni doprinos u regulaciji odgovora na FID i HID. Jedno od mogućih objašnjenja je da su povećani oksidativni stres tijekom i nakon HBO₂ i promjene u metabolizmu arahidonske kiseline, osobito povećanje 20-HETE i smanjena sinteza prostaciklina i EET-e, narušili signalni put A2A receptora, smanjujući njegov doprinos NO-ovisnoj vazodilataciji. Osim toga, smanjena biodostupnost NO-a i poremećaj cAMP/PKA signalizacije mogu dodatno umanjiti učinak endogenog adenzina, čime blokada A2A receptora nema mjerljiv fiziološki učinak. Nadalje, dokazano je da supresija adenozijskog signalnog puta posredovanog A2AR-ima u akutnoj hiperoksiji inhibira fiziološki mehanizam zaštite tkiva posredovan A2AR-om (177, 295), što dokazuje da farmakološki antagonizam tijekom FID-a i HID-a ne može dodatno smanjiti vazodilataciju jer sama akutna hiperoksija smanjuje funkcionalnu aktivnosti receptora. U intermitentno izloženih životinja, kompenzacijska aktivacija drugih adenozijskih podtipova receptora (npr. A2B) ili alternativnih

vazodilatacijskih mehanizama (EDHF, prostaciklin) također može pridonijeti očuvanju odgovora na FID i HID neovisno o A2A receptorima. Međutim, ovi mehanizmi zasad se mogu smatrati hipotetskima jer izravni dokazi o utjecaju oksidativnog stresa i eikozanoidne neravnoteže na funkcionalnu aktivnost A2A receptora u kontekstu hiperbarične oksigenacije još uvijek nedostaju. Stoga bi daljnja istraživanja trebala biti usmjerena na ispitivanje povezanosti između oksidativnog statusa, izražaja i funkcionalne signalizacije A2A receptora te promjena u sintezi NO-a i arahidonskih metabolita, da bi se preciznije utvrdilo u kojoj mjeri ti procesi doprinose vaskularnoj reaktivnosti nakon akutne i intermitentne HBO₂ izloženosti.

Proteinski i genski izražaj adenozijskih A1 i A2A receptora

Analizom genskog i proteinskog izražaja adenozijskih A1 i A2A receptora značajno je smanjen proteinski izražaj A1R (u usporedbi s In-HBO₂) i A2AR (u usporedbi s In-HBO₂ i CTRL) kod akutnih izlaganja HBO₂, dok nije bilo značajne razlike u izražaju gena. In-HBO₂ skupina imala je slični izražaj proteina oba adenozijska receptora kao i CTRL skupina. Budući da akutna izloženost HBO₂ dovodi do povećane sinteze ROS-a, a poznato je da ROS sudjeluju u aktivaciji transkripcijskih faktora i modulaciji posttranslacijskih odgovora (296), možemo pretpostaviti da su potencijalne promjene u izražaju proteina A1R i A2AR uzrokovane spomenutim razlogom. Rezultati ovog istraživanja, koji pokazuju smanjen izražaj proteina A2AR nakon akutne izloženosti HBO₂, podudaraju se sa studijom Bruzzese i sur., koja je također pokazala da akutna HBO₂ može značajno smanjiti proteinski izražaj A2AR i oslabiti vaskularnu reakciju na A2AR-agoniste, što upućuje da bi oksigenacijski uvjeti imali potencijal modulirati adenozijsku signalizaciju i utjecati na funkciju krvnih žila (4). Postoje dokazi da ROS mogu inducirati posttranslacijsku modifikaciju GPCR receptora koji nakon aktivacije podliježe fosforilaciji i vezanju za β -arrestin koji pokreće endocitozu (tzv. internalizacija receptora) pomoću klatrinskih vezikula te se nakon razvrstavanja u endosomu podliježe ubikvitinizaciji i lizosomskoj degradaciji (297, 298). Također, ROS može potaknuti i ubikvitin-neovisnu degradaciju adenozijskih receptora putem β -arrestin-posredovane internalizacije i aktivacije ERK1/2 signalnog puta, pri čemu fosforilacija receptora i vezanje adaptorskih proteina (poput engl. *Adaptor Protein Complex 2* - AP2, engl. *Epsin protein* - EPSIN) omogućuju klatrin-ovisni endocitozni unos i lizosomalnu razgradnju bez potrebe za ubikvitinacijom (298-300). Poznatno je da se signalni put ERK1/2 aktivira preko β -arrestina nakon stimulacije A2A receptora, a dodatno se može aktivirati zbog oksidativnog stresa i promjene NO/EET signalizacije te tako smanjiti proteinski izražaj receptora poticanjem

degradacije istih i na taj način neizravno modulirati vaskularni odgovor (301-302). No unatoč postojanju mehanizama desenzitizacije i internalizacije adenozijskih receptora (110, 303), konkretna studija u uvjetima hiperoksije koja bi to potvrdila nije dostupna te je potrebno kroz buduće eksperimente mjeriti ubrzanu internalizaciju/ubikvitinizaciju A2AR nakon Ac-HBO₂ (npr. označavanje receptora na površini stanice, kolokalizacija tj. praćenje prisutnosti receptora u ranim endosomima s biomarkerima Rab5/EEA1, mjerenje ubikvitina spojenog na receptor) kako bi se validirala hipoteza. Iako se ne radi o adenozijskim receptorima, ovo istraživanje potkrepljuje ideju da oksidativni stres može uzrokovati oksidaciju receptorskih tiolnih skupina, promijeniti funkciju receptora i omesti interakciju s β -arrestinom, što može ubrzati ili promijeniti unutarnji promet receptora (npr. internalizaciju) i na taj način dovesti do lizosomske degradacije i smanjenja ukupne dostupnosti receptora na površini (304), što potencijalno može objasniti smanjenje proteinskih izražaja bez promjene genskog izražaja adenozijskih receptora. Dakle, ROS se smatra ranim modulatorima funkcionalne dostupnosti receptora (brzi posttranslacijski učinci) modulirajući β -arrestin–posredovanu signalizaciju, dok su transkripcijski učinci odnosno stabilne promjene genskog izražaja mogući tek nakon dugotrajnijeg izlaganja HBO₂, što može objasniti zašto akutno izlaganje HBO₂ nema utjecaj na genski izražaj adenozijskih receptora (233, 305, 306).

U skladu s time, SD štakori izlagani In-HBO₂ su imali povećan izražaj gena A1R (u usporedbi s CTRL) i A2AR (u usporedbi s CTRL i Ac-HBO₂), ali ne i proteinski izražaj adenozijskih A1 i A2A receptora. Nije bilo razlike u izražaju gena A2AR između kontrolne i akutne skupine. Povećan izražaj gena A1R i A2AR, uzrokovan HBO₂, najvjerojatnije predstavlja adaptivni mehanizam protiv štetnih učinaka ROS-a i poboljšanja cerebralne perfuzije, s obzirom na to da je poznato da oba receptora imaju neuroprotektivne uloge (294). Ponovljena stimulacija In-HBO₂ može povećati stabilnost mRNA i aktivnost transkripcijskih faktora (npr. engl. *cAMP response element binding protein* -CREB, HIF-1 α) te vremenski razmak između sesija omogućuje recikliranje receptora i pojačanu transkripciju, što rezultira ukupnim povećanjem genskog izražaja adenozijskih receptora (299, 301, 307). Dok je kronična hipoksija klasično stanje u kojem dolazi do aktivacije transkripcijskih mehanizama, prvenstveno preko HIF signalizacije, njezin utjecaj na adenozijske receptore jasno je prikazan u studiji Browna i suradnika (308). Autori su demonstrirali da produljena hipoksija dovodi do značajnog povećanja izražaja ADORA2A gena i to putem izravnog vezanja HIF-2 α na promotor A2AR, što rezultira povećanjem i mRNA i proteinskog izražaja A2AR te pojačanom funkcionalnom osjetljivošću stanica na adozin (308). Takav odgovor predstavlja adaptivni

mehanizam čiji je cilj povećati adenozergički tonus i poboljšati preživljenje tkiva u uvjetima niske dostupnosti kisika. Suprotan obrazac vidljiv je u stanjima gdje dominira oksidativni stres, kao što je akutna hiperoksija inducirana HBO₂. U klasičnoj studiji Nie i suradnika pokazano je da ROS mogu inducirati ekspresiju adenozerinskih receptora, posebice A1R, ali putem sasvim drugog mehanizma, tj. preko aktivacije NF-κB, transkripcijskog faktora koji se aktivira u oksidativnim stanjima i pokreće genske reakcije povezane s upalom i staničnim stresom (181). Dakle, za razliku od hipoksije (HIF-posredovani put), oksidativni stres aktivira NF-κB-ovisnu regulaciju, što pokazuje da različiti stresori pokreću genski izražaj različitih podtipova receptora i potpuno različite signalne osi. Zanimljivo je da In-HBO₂, iako ne uključuje kontinuiranu hipoksiju, aktivira slične adaptivne mehanizme kao kronična hipoksija, što se može objasniti tzv. hiperoksično-hipoksičnim paradoksom. Nadalje, akutne oscilacije između hiperoksije tijekom HBO₂ sesija i relativne hipoksije u razdobljima između njih, u kombinaciji s ROS-posredovanom inhibicijom PHD enzima, dovode do stabilizacije HIF-1α i HIF-2α te aktivacije hipoksiji sličnog transkripcijskog programa. S obzirom na to da je poznato da kronična hipoksija putem HIF-2α selektivno povećava ekspresiju A2AR (Brown et al., 2011), moguće je da sličan mehanizam djeluje u intermitentnoj HBO₂, pri čemu se kroz ponavljane cikluse hiperoksije i normoksije inducira transkripcijska aktivacija ADORA1 i ADORA2A gena. Ova poveznica dodatno objašnjava zašto intermitentna, a ne akutna HBO₂, rezultira povećanim genskih ekspresijom adenozerinskih receptora u našem modelu.

Zaključno, u kontekstu akutne HBO₂, porast ROS je izrazito nagao i vremenski kratak, što znači da stanični odgovor nije dominantno transkripcijski (jer za genske učinke treba vrijeme), već posttranslacijski. ROS mogu potaknuti fosforilaciju receptora, regrutaciju β-arrestina, klatrin-ovisnu internalizaciju te ubranu degradaciju u endolizosomalnom sustavu. To objašnjava zašto u akutnoj skupini dolazi do pada proteinskog izražaja A1R-a i A2AR-a bez promjena u genskoj ekspresiji. Nasuprot tomu, intermitentna HBO₂ predstavlja sasvim drugačije biološko stanje gdje između sesija hiperoksije dolazi do faza reperfuzije i normoksije, što omogućuje aktivaciju transkripcijskih faktora poput HIF-1α i CREB-a, koji su poznati regulatori ADORA gena i stabilnosti mRNA (141, 309). Ukupno gledajući, kronična hipoksija i intermitentna HBO₂ imaju sličan krajnji ishod (povećanje adenozergičkog tonusa), ali putem različitih molekularnih mehanizama pri čemu hipoksija aktivira HIF-ovisnu transkripciju, oksidativni stres aktivira NF-κB i brze posttranslacijske promjene, a intermitentna HBO₂ kombinira oba mehanizma (ROS, HIF) te dodatnu pojačanu aktivnost drugih transkripcijskih faktora (npr. CREB) uz sami vremenski prostor za obnovu i recikliranje receptora između

intermitentnih sesija. Dakle, u modelu akutne HBO₂, koji prvenstveno stvara nagli porast ROS, očekivane su brze posttranslacijske promjene receptora (fosforilacija, β-arrestin regrutacija, internalizacija i povećana degradacija) umjesto neposrednog povećanja genskog izražaja, dok dugotrajnije ili intermitentno izlaganje omogućuje aktivaciju transkripcijskih faktora (HIF, CREB) i stabilizaciju mRNA koja vodi do povećanog genskog izražaja.

Ti rezultati pružaju dokaze u prilog hipotezi da dodatna stimulacija ili inhibicija adenozijskih A1R i A2AR modificira vaskularnu reaktivnost koja se mijenja pod različitim protokolima HBO₂ što je potrebno dodatno istražiti na staničnoj i molekularnoj razini. Različite razine oksidativnog stresa tkiva, antioksidativnog obrambenog kapaciteta i antioksidativnog prekonicioniranja u različitim protokolima izloženosti HBO₂ mogle bi imati različite učinke na adozinergički put. Promjene u omjeru vazokonstriktornih i vazodilatacijskih metabolita na staničnoj i molekularnoj razini, uključujući utjecaj interakcije između EET i 20-HETE, koja u konačnici modulira vaskularnu funkciju, tek treba dalje istražiti. Vrlo je jasno da intervencije koje mijenjaju oksidativno stanje (npr. hiperbarična oksigenacija) ili mehanički stres (FID) mogu pomaknuti upravo tu ravnotežu između EDRF i EDCF signala. Uloga adenozijskih receptora u vaskularnoj reaktivnosti ima translacijske implikacije jer bolje razumijevanje interakcije između HBO₂ i adenozijskih receptora stvara osnovu za optimiziranije odluke pri korištenju hiperbarične oksigenacije u terapijskom i kliničkom kontekstu.

Ograničenja studije

Unatoč uvidima koje pruža ova studija, potrebna su daljnja istraživanja da bi se bolje razumjela uloga reaktivnih vrsta kisika u ravnoteži između oksidativnog stresa i mehanizama antioksidativne obrane, posebno u kontekstu hiperbarične oksigenacije. Ova interakcija može značajno utjecati na signalizaciju adenozijskih receptora mijenjajući njihov izražaj, afinitet i funkciju. Još uvijek nema dovoljno podataka o tkivno specifičnim razlikama u odgovoru na HBO₂ i o molekularnim mehanizmima putem kojih adenozijski receptori posreduju u njegovim učincima. Buduća istraživanja trebala bi biti usmjerena na detaljnije razjašnjenje vremenske dinamike oporavka vaskularne funkcije nakon različitih protokola hiperbarične oksigenacije, uz procjenu molekularnih mehanizama koji određuju reaktivnost adenozijskih receptora, osobito odnosa između adenozijske signalizacije, oksidativnog stresa i endotelno-ovisnih puteva (NO, eikozanoidi). Takvi podaci omogućili bi preciznije određivanje razdoblja u kojem dolazi do stabilizacije i potencijalnog poboljšanja vaskularne funkcije nakon ponavljano

HBO₂ izlaganja. Dodatnim istraživanjima preciznije bi se razjasnila uloga pojedinačnih podtipova receptora, posebno u različitim fiziološkim i patološkim uvjetima izloženosti hiperoksičnom stresu, što bi moglo imati važne implikacije za optimizaciju terapijske upotrebe hiperbarične oksigenacije.

7. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- akutna hiperbarična oksigenacija značajno smanjuje vaskularni odgovor srednjih moždanih arterija tijekom ispitivanja krivulje stupnjevitog odnosa doza i učinka agonista adenozijskih A1 i A2A receptora
- akutna hiperbarična oksigenacija značajno je smanjila vaskularne odgovore srednjih moždanih arterija tijekom protokom i hipoksijom potaknute dilatacije bez prisutnosti agonista i antagonista adenozijskih A1 i A2A receptora
- primjena agonista i antagonista adenozijskih A1 receptora nije značajno utjecala na protokom i hipoksijom potaknutu dilataciju srednjih moždanih arterija kod štakora izloženih akutnoj i intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji
- primjena agonista adenozijskih A2A receptora značajno je smanjila vaskularni odgovor srednje moždane arterije na protokom potaknutu dilataciju, ali je pojačala vaskularni odgovor srednje moždane arterije na hipoksijom potaknutu dilataciju kod štakora izloženih intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji
- primjena antagonista adenozijskih A2A receptora nije značajno utjecala na protokom i hipoksijom potaknutu dilataciju srednjih moždanih arterija kod štakora izloženih akutnoj i intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji
- akutna hiperbarična oksigenacija smanjuje proteinski izražaj adenozijskih A1 i A2A receptora
- intermitentna hiperbarična oksigenacija povećava genski izražaj adenozijskih A1 i A2A receptora.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ispitati utjecaj akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije (HBO₂) na genski i proteinski izražaj adenozijskih A1 i A2A receptora te promjene vaskularne reaktivnosti srednje moždane arterije posredovane adenozijskim A1 ili A2A receptorima.

Nacrt studije: Istraživanje je strukturirano kao randomizirani kontrolirani pokus na animalnom modelu.

Materijali i metode: Pomoću tlačnog miografa ispitana je protokom potaknuta dilatacija (FID) i hipoksijom potaknuta dilatacija (HID), u prisutnosti ili odsutnosti agonista (CCPA za A1R i CGS-21680 za A2AR) i antagonista (DPCPX za A1R i SCH-58261 za A2AR) adenozijskih receptora, u izoliranim srednjim moždanim arterijama Sprague-Dawley štakora oba spola u starosti 8-10 tjedana koji su bili izloženi ili akutnoj HBO₂ (Ac-HBO₂) ili intermitentnoj HBO₂ tijekom četiri dana (In-HBO₂) te su uspoređivani s kontrolnom skupinom. Molekularnim metodama istraživanja određen je genski i proteinski izražaj adenozijskih A1 i A2A receptora na izoliranim perifernim moždanim arterijama.

Rezultati: Akutna HBO₂ narušila je vaskularne odgovore tijekom ispitivanja odnosa doza i učinka agonista adenozijskih A1 i A2A receptora. Također, akutna HBO₂ značajno je narušila vazoreaktivnost tijekom FID-a i HID-a bez prisutnosti agonista i antagonista adenozijskih A1 i A2A receptora. U obje skupine (Ac-HBO₂ i In-HBO₂), primjena A1 agonista te A1 i A2A antagonista nije značajno utjecala na FID ni HID. Primjena agonista adenozijskih A2A receptora smanjila je FID, ali je pojačala vaskularni odgovor na HID u skupini In-HBO₂. Proteinski izražaj adenozijskih A1 i A2A receptora bio je smanjen nakon Ac-HBO₂, dok je genski izražaj porastao nakon In-HBO₂.

Zaključak: Adenozijski A1 i A2A receptori imaju važnu ulogu u vaskularnim odgovorima induciranim HBO₂, a promjene u funkciji srednjih moždanih arterija vjerojatno su povezane s modulacijom signalnih puteva i izražaja adenozijskih A1 i A2A receptora na razini gena i proteina.

Ključne riječi: adenozijski receptori, hiperbarična oksigenacija, hipoksijom potaknuta dilatacija, izražaj gena i proteina, moždane krvne žile, protokom potaknuta dilatacija, Sprague-Dawley štakori

9. SUMMARY

The Role of Adenosine A1 and A2A Receptors in Vascular Reactivity Changes after Hyperbaric Oxygenation

Objective: To investigate the effects of acute and intermittent hyperbaric oxygenation (HBO₂) on the gene and protein expression of adenosine A1 and A2A receptors, as well as on the changes in the vascular reactivity of the middle cerebral artery mediated by adenosine A1 or A2A receptors.

Study Design: A randomized controlled experimental study using an animal model.

Materials and Methods: Flow-induced dilation (FID) and hypoxia-induced dilation (HID) were assessed using a pressure myograph, in the presence or absence of adenosine receptor agonists (CCPA for A1R and CGS-21680 for A2AR) and antagonists (DPCPX for A1R and SCH-58261 for A2AR), in isolated middle cerebral arteries of male and female Sprague-Dawley rats aged 8–10 weeks. Animals were exposed to either to acute HBO₂ (Ac-HBO₂) or intermittent HBO₂ for four days (In-HBO₂) and were compared with a control group. Gene and protein expression of adenosine A1Rs and A2ARs in isolated pial arteries were determined using molecular methods.

Results: Acute HBO₂ impaired vascular responses during dose–response testing with adenosine A1 and A2A receptor agonists. It also significantly reduced vasoreactivity during both FID and HID in the absence of adenosine receptor agonists and antagonists. In both Ac-HBO₂ and In-HBO₂ groups, administration of the A1 agonist or A1/A2A antagonists did not significantly affect FID or HID. Administration of the A2A agonist following FID but enhanced HID in the In-HBO₂ group. Protein expression of adenosine A1 and A2A receptors was reduced after Ac-HBO₂, whereas gene expression was increased after In-HBO₂.

Conclusion: Adenosine A1 and A2A receptors play an significant role in vascular responses induced by HBO₂, and and the observed functional changes in middle cerebral arteries are likely associated with modulation of signaling pathways and altered gene and protein expression of these receptors.

Keywords: adenosine receptors, gene and protein expression, hyperbaric oxygenation, hypoxia-induced dilation, cerebral blood vessels, flow-induced dilation, Sprague-Dawley rats

10. LITERATURA

1. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2001;53(4):527–552.
2. Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000;362:364–374.
3. Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:775–787.
4. Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(3):247–264.
5. Shryock JC, Belardinelli L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol.* 1997;79(12A):2–10.
6. Sebastião AM, Ribeiro JA. Adenosine receptors and the central nervous system. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(193):471–534.
7. Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: release, uptake and role in physiological and pathological events. *Brain Res Rev.* 2001;33(1):1–59.
8. Phillis JW. Adenosine and cerebral circulation. *Prog Neurobiol.* 2003;70(4):275–312.
9. Ngai AC, Coyne EF, Meno JR, West GA, Winn HR. Receptor subtypes mediating adenosine-induced dilation of cerebral arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(5):H2329–H2335.
10. Coney AM, Marshall JM. Role of adenosine and its receptors in the vasodilatation induced in the cerebral cortex of the rat by systemic hypoxia. *J Physiol.* 1998;509(Pt 2):507–518.
11. Bryan PT, Marshall JM. Adenosine receptor subtypes and vasodilatation in rat skeletal muscle during systemic hypoxia: a role for A1 receptors. *J Physiol.* 1999;514(Pt 1):151–162.
12. Wang Y, Yang JN, Arner A, Boels PJ, Fredholm BB. Adenosine A1 receptors and vascular reactivity. *Acta Physiol (Oxf).* 2010;199(2):211–220.
13. Carroll MA, Doumad AB, Li J, Cheng MK, Falck JR, McGiff JC. Adenosine A2A receptor vasodilation of rat preglomerular microvessels is mediated by epoxyeicosatrienoic acids that activate the cAMP/PKA pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;291(1):F155–F161.

14. Cheng MK, Doumad AB, Jiang H, Falck JR, McGiff JC, Carroll MA. Epoxyeicosatrienoic acids mediate adenosine-induced vasodilation in rat preglomerular microvessels via A2A receptors. *Br J Pharmacol*. 2004;141(3):441–448.
15. Hein TW, Belardinelli L, Kuo L. Adenosine A2A receptors mediate coronary microvascular dilation to adenosine: role of nitric oxide and ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res*. 1999;85(8):755–762.
16. Li JM, Fenton RA, Wheeler HB, Powell CC, Peyton BD, Cutler BS. Adenosine A2A receptors increase arterial endothelial cell nitric oxide. *J Surg Res*. 1998;80(2):357–364.
17. Olanrewaju HA, Mustafa SJ. Adenosine A2A receptor activation induces vasodilation via cAMP/PKA-dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(6):H2821–H2830.
18. Kobayashi S, Conforti L, Pun RY, Millhorn DE. Adenosine A2A receptor stimulation induces nitric oxide production through cAMP-PKA signaling in vascular endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;294(3):1134–1142.
19. Dubey RK, Gillespie DG, Mi Z, Jackson EK. Adenosine inhibits smooth muscle cell growth and induces nitric oxide and prostacyclin release. *Hypertension*. 1998;31(1):376–382.
20. Chan ES, Cronstein BN. Adenosine A2A receptors modulate endothelin-1 synthesis in human endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(1):H31–H38.
21. Ralevic V, Dunn WR. Purinergic transmission in blood vessels. *Auton Neurosci*. 2015;191:48–66.
22. Burnstock G, Ralevic V. Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacol Rev*. 2014;66(1):102–192.
23. Feoktistov I, Ryzhov S, Zhong H, Goldstein AE, Biaggioni I. Role of A2B adenosine receptors in regulation of inflammation and tissue protection. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011;203(2):251–262.
24. Grant MB, Davis MI, Caballero S, Feoktistov I, Biaggioni I, Belardinelli L. Proliferation and migration of human retinal endothelial cells through activation of A2B adenosine receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(3):563–570.
25. Merighi S, Borea PA, Varani K, Vincenzi F, Gessi S. Adenosine receptors and angiogenesis: up-regulation of A2B receptors in hypoxia. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015;213(1):18–27.
26. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med*. 2011;364(7):656–665.

27. Eltzschig HK, Rivera-Nieves J, Colgan SP. Targeting the A2B adenosine receptor during gastrointestinal ischemia and inflammation. *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13(11):1267–1277.
28. Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, Kojima H, Koshiba M, Caldwell C. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:657–682.
29. Ohta A, Sitkovsky M. Role of adenosine A2A receptor signaling in inflammation and immunosuppression. *Trends Immunol*. 2001;22(1):17–22.
30. Haskó G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(9):759–770.
31. Grenz A, Homann D, Eltzschig HK. Extracellular adenosine: a safety signal that dampens hypoxia-induced inflammation during ischemia. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(8):2221–2234.
32. Thiel M, Chouker A, Ohta A, Jackson E, Caldwell C, Smith P, et al. Oxygenation inhibits the physiological tissue-protecting mechanism and thereby exacerbates acute inflammatory lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(24):9927–9932.
33. Eltzschig HK, Faigle M, Knapp S, Karhausen J, Ibla J, Rosenberger P, et al. Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia. *Blood*. 2006;108:1602–1610.
34. Görlach A. Control of adenosine transport by hypoxia. *Circ Res*. 2005;97(1):1–3.
35. Bruzzese L, Fromonot J, By Y, Durand-Gorde JM, Condo J, Kipson N, et al. NF- κ B enhances hypoxia-driven T-cell immunosuppression via upregulation of adenosine A2A receptors. *Cell Signal*. 2014;26:1060–1067.
36. By Y, Jacquin L, Franceschi F, Durand-Gorde JM, Condo J, Michelet P, et al. Fall in oxygen tension stimulates adenosinergic signalling of a human T cell line. *Purinergic Signal*. 2012;8:661–667.
37. Nie Z, Mei Y, Ford M, Rybak L, Marcuzzi A, Ren H, et al. Oxidative stress increases A1 adenosine receptor expression by activating nuclear factor- κ B. *Mol Pharmacol*. 1998;53(4):663–669.
38. Feoktistov I, Ryzhov S, Zhong H, Goldstein AE, Matafonov A, Zeng D, et al. Hypoxia modulates adenosine receptors in human endothelial and smooth muscle cells toward an A2B angiogenic phenotype. *Hypertension*. 2004;44(5):649–654.
39. Pastor-Anglada M, Pérez-Torras S. Who is who in adenosine transport. *Front Pharmacol*. 2018;9:627.

40. Merighi S, Varani K, Gessi S, Cattabriga E, Borea PA. Adenosine receptors in cancer biology. *Pharmacol Ther.* 2007;115(3):331–355.
41. Gessi S, Merighi S, Varani K, Leung E, MacLennan S, Borea PA. The A3 adenosine receptor: an enigmatic player in cell biology. *Pharmacol Ther.* 2008;117(1):123–140.
42. Ho MF, Low LM, Rose' Meyer RB. Pharmacology of the adenosine A3 receptor in the vasculature and essential hypertension. *PLoS One.* 2016;11(2):e0150021.
43. Gao ZG, Auchampach JA, Jacobson KA. Species dependence of A3 adenosine receptor pharmacology and function. *Purinergic Signal.* 2023;19(3):523–550.
44. Duangrat R, Parichatikanond W, Chanmahasathien W, Mangmool S. Adenosine A3 receptor: from molecular signaling to therapeutic strategies for heart diseases. *Int J Mol Sci.* 2024;25(11):5763.
45. Storme J, White PJ, Stoddart LA. Molecular dissection of the human A3 adenosine receptor internalization mechanism. *Biochem J.* 2018;475(21):3389–3403.
46. Stoddart LA, Vernall AJ, Briddon SJ, Kellam B, Hill SJ. Direct visualisation of internalization of the adenosine A3 receptor using a fluorescent agonist. *Neuropharmacology.* 2015;98:68–77.
47. Klaasse EC, IJzerman AP, de Grip WJ, Beukers MW. Internalization and desensitization of adenosine receptors. *Purinergic Signal.* 2007;3(3):201–219.
48. Mundell SJ, Kelly E. Adenosine receptor desensitization and trafficking. *Br J Pharmacol.* 2011;163(1):38–46.
49. Bastia E, Varani K, Monopoli A, Vincenzi F, Borea PA, Ongini E. Signal transduction pathways involved in A2A receptor-mediated desensitization. *Mol Pharmacol.* 2002;62:1323–1332.
50. Schulte G, Fredholm BB. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal.* 2003;15(9):813–827.
51. Luttrell LM, Gesty-Palmer D. Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacol Rev.* 2010;62(2):305–330.
52. Shenoy SK, Lefkowitz RJ. β -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32(9):521–533.
53. Rajagopal K, Shenoy SK. GPCR desensitization: acute and prolonged phases. *Cell Signal.* 2018;45:63–71.
54. Marchese A, Paing MM, Temple BR, Trejo J. G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:601–629.

55. Skieterska K, Rondou P, Van Craenenbroeck K. Regulation of G protein-coupled receptors by ubiquitination. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5):923.
56. Dores MR, Trejo J. Endo-lysosomal sorting of G protein-coupled receptors by ubiquitin. *Traffic.* 2019;20(2):101–109.
57. Seyedabadi M, Ostad SN, Albert PR, Dehpour AR, Rahimian R, Ghazi-Khansari M. Receptor–arrestin interactions: the GPCR perspective. *Biomolecules.* 2021;11(2):218.
58. Hoare SRJ, Tewson PH, Sachdev S, Connor M, Hughes TE, Quinn AM. Quantifying the kinetics of signaling and arrestin recruitment by nervous system GPCRs. *Front Cell Neurosci.* 2022;15:814547.
59. Company-Marín I, Gunner J, Poyner D, Simms J, Pitt AR, Spickett CM. Effect of oxidative stress on adenosine A2A receptor activity and signalling. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2025;1867(3):184412.
60. Borea PA, Varani K, Vincenzi F, Baraldi PG, Tabrizi MA, Gessi S. Pharmacology of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2018;70:542–577.
61. Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets. *Exp Cell Res.* 2010;316(8):1284–1288.
62. Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:31–55.
63. Paterniti I, Melani A, Cipriani S, Corti F, Mello T, Mazzon E, et al. Selective adenosine A2A receptor agonists reduce ischemic brain damage in experimental stroke. *Neurobiol Dis.* 2011;42(2):226–234.
64. Chen JF, Sonsalla PK, Pedata F, Melani A, Domenici MR, Popoli P, et al. Adenosine A2A receptors and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27(3):459–471.
65. Melani A, Corti F, Stephan H, Müller CE, Donati C, Brambilla R, et al. Selective adenosine A2A receptor antagonism reduces ischemic brain damage in the rat. *Neuropharmacology.* 2003;45(2):181–190.
66. Popoli P, Pepponi R, Martire A, Armida M, Pezzola A, Galluzzo M, et al. Neuroprotective effects of adenosine A2A receptor antagonists. *Pharmacol Ther.* 2008;117(2):124–140.
67. Pedata F, Dettori I, Coppi E, Melani A, Fusco I, Corradetti R. Purinergic signalling in brain ischemia. *Neuropharmacology.* 2016;104:105–130.
68. Latini S, Bordoni F, Corradetti R, Pepeu G, Pedata F. Effect of A2A adenosine receptor stimulation and blockade on glutamate release in rat striatum during ischemia. *J Neurochem.* 1999;72(2):803–810.

69. Phillis JW, O'Regan MH. Adenosine and the control of cerebral blood flow. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 2003;15(2):99–124.
70. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*. 1999;22(9):391–397.
71. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*. 2011;17(7):796–808.
72. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron*. 2010;67(2):181–198.
73. Sharp FR, Bernaudin M. HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(6):437–448.
74. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annu Rev Physiol*. 2014;76:39–56.
75. Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)*. 2009;24:97–106.
76. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE*. 2005;2005(306):re12.
77. Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, Jacobson KA, Enjyoji K, et al. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in hypoxia-induced vascular leak. *Blood*. 2003;101(9):3665–3674.
78. Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, Van De Wiele CJ, Resta R, Morote-Garcia JC, et al. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med*. 2004;200(11):1395–1405.
79. Morote-Garcia JC, Rosenberger P, Nivillac NM, Coe IR, Eltzschig HK. Hypoxia-inducible factor-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter 2 attenuates mucosal inflammation during intestinal hypoxia. *J Immunol*. 2009;182(1):332–339.
80. Eltzschig HK, Eckle T, Mager A, Küper N, Karcher C, Weissmüller T, et al. ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ Res*. 2006;99(10):1100–1108.
81. Eckle T, Faigle M, Grenz A, Laucher S, Thompson LF, Eltzschig HK. A2B adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak. *Blood*. 2008;111(4):2024–2035.
82. Grenz A, Osswald H, Eckle T, Yang D, Zhang H, Tran ZV, et al. The reno-vascular A2B adenosine receptor protects the kidney from ischemia. *PLoS Med*. 2008;5(6):e137.
83. Haskó G, Pacher P. A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *J Leukoc Biol*. 2008;83(3):447–455.

84. Sitkovsky MV, Ohta A. The “danger” sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors. *Trends Immunol.* 2005;26(6):299–304.
85. Ohta A, Sitkovsky MV. Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. *Front Immunol.* 2014;5:304.
86. Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(3):177–192.
87. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med.* 2013;19(6):355–367.
88. Burnstock G. Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Exp Physiol.* 2014;99(1):16–34.
89. Fredholm BB. Adenosine—a physiological or pathophysiological agent? *J Mol Med.* 2014;92(3):201–206.
90. Jacobson KA, Tosh DK, Jain S, Gao ZG. Historical and current adenosine receptor agonists. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:124.
91. Chen JF, Eltzschig HK, Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets—what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(4):265–286.
92. Wei CJ, Singer P, Coelho J, Boison D. Selective adenosine A2A receptor activation suppresses neuroinflammation in experimental stroke. *Brain Behav Immun.* 2013;30:95–104.
93. Yu L, Huang Z, Mariani J, Wang Y, Moskowitz MA, Chen JF. Selective inactivation or reconstitution of adenosine A2A receptors in bone marrow-derived cells affects ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004;24(9):1010–1019.
94. Martin ED, Fernández M, Perea G, Pascual O, Haydon PG, Araque A, et al. Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission. *J Neurosci.* 2007;27(25):6691–6701.
95. Gourine AV, Dale N, Llaudet E, Poputnikov D, Spyer KM, Gourine VN. Release of ATP in the ventral medulla during hypoxia in rats: role in respiratory drive. *J Neurosci.* 2005;25(5):1211–1218.
96. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(12):1471–1483.
97. Khakh BS, North RA. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature.* 2006;442(7102):527–532.

98. Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol.* 1929;68(3):213–237.
99. Berne RM. The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ Res.* 1980;47(6):807–813.
100. Rubio R, Berne RM. Adenosine release from ischemic myocardium. *Circ Res.* 1969;25(4):407–415.
101. Olsson RA, Pearson JD. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev.* 1990;70(3):761–845.
102. Ralevic V. Purines as neurotransmitters and neuromodulators in blood vessels. *J Auton Nerv Syst.* 1997;66(1–2):1–13.
103. Marshall JM. Adenosine and muscle vasodilatation in systemic hypoxia. *Exp Physiol.* 2007;92(4):613–617.
104. Dinunno FA, Joyner MJ. Combined NO and PG inhibition augments α -adrenergic vasoconstriction in contracting human skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(6):H2576–H2584.
105. Hellsten Y, Nyberg M. Cardiovascular adaptations to exercise training. *Compr Physiol.* 2015;6(1):1–32.
106. Mortensen SP, Saltin B. Regulation of the skeletal muscle blood flow in humans. *Exp Physiol.* 2014;99(12):1552–1558.
107. Casey DP, Joyner MJ. Local control of skeletal muscle blood flow during exercise: influence of available oxygen. *J Appl Physiol.* 2012;111(6):1527–1538.
108. Rosenmeier JB, Hansen J, González-Alonso J. Circulating ATP and muscle blood flow in humans following eccentric exercise. *J Physiol.* 2004;557(Pt 2):649–658.
109. González-Alonso J, Mortensen SP, Dawson EA, Secher NH, Damsgaard R. Erythrocytes and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery: role of circulating ATP. *Circ Res.* 2012;111(8):1046–1055.
110. Ellsworth ML. The red blood cell as an oxygen sensor: what is the evidence? *Acta Physiol (Oxf).* 2000;168(4):551–559.
111. Sprague RS, Ellsworth ML. Erythrocyte-derived ATP and perfusion distribution: role of intracellular and intercellular communication. *Microcirculation.* 2012;19(5):430–439.
112. Jagger JE, Bateman RM, Ellsworth ML, Ellis CG. Role of erythrocyte in regulating local O₂ delivery mediated by hemoglobin oxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(6):H2833–H2839.

113. Ellsworth ML, Sprague RS. Regulation of blood flow distribution in skeletal muscle: role of erythrocyte-released ATP. *J Physiol*. 2012;590(20):4985–4991.
114. Poole DC, Copp SW, Ferguson SK, Musch TI. Skeletal muscle capillary function: contemporary observations and novel hypotheses. *Exp Physiol*. 2013;98(12):1645–1658.
115. Musch TI, Poole DC. Blood flow and muscle oxygenation: evidence for regulation at the capillary level. *J Appl Physiol*. 2016;121(1):1–8.
116. Ferreira LF, Reid MB. Muscle-derived ROS and thiol regulation in muscle fatigue. *J Appl Physiol*. 2008;104(3):853–860.
117. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*. 2008;88(4):1243–1276.
118. Reid MB. Free radicals and muscle fatigue: of ROS, canaries, and the IOC. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(2):169–179.
119. Powers SK, Talbert EE, Adhietty PJ. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J Physiol*. 2011;589(Pt 9):2129–2138.
120. Jackson MJ. Redox regulation of muscle adaptations to contractile activity and aging. *J Appl Physiol*. 2011;110(3):749–759.
121. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*. 2011;194(1):7–15.
122. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417(1):1–13.
123. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*. 2012;48(2):158–167.
124. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47–95.
125. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol*. 2008;4(5):278–286.
126. Sies H. Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem*. 2014;289(13):8735–8741.
127. Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(6):411–421.
128. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012;24(5):981–990.
129. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(3):181–189.

130. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87(1):245–313.
131. Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(5):687–706.
132. Guzik TJ, Harrison DG. Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. *Drug Discov Today.* 2006;11(11–12):524–533.
133. Lassegue B, San Martín A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res.* 2012;110(10):1364–1390.
134. Dikalov SI, Nazarewicz RR. Angiotensin II-induced production of mitochondrial reactive oxygen species: potential mechanisms and relevance for cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(10):1085–1094.
135. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnfsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem.* 2003;278(38):36027–36031.
136. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(20):11715–11720.
137. Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased ROS during hypoxia. *Exp Physiol.* 2006;91(5):807–819.
138. Waypa GB, Marks JD, Guzy RD, Mungai PT, Schriewer JM, Dokic D, et al. Hypoxia triggers subcellular compartmental redox signaling in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circ Res.* 2010;106(3):526–535.
139. Waypa GB, Schumacker PT. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. *J Appl Physiol.* 2005;98(1):404–414.
140. Ward JP. Oxygen sensors in context. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1777(1):1–14.
141. Prabhakar NR, Semenza GL. Oxygen sensing and homeostasis. *Physiology (Bethesda).* 2015;30(5):340–348.
142. Weir EK, López-Barneo J, Buckler KJ, Archer SL. Acute oxygen-sensing mechanisms. *N Engl J Med.* 2005;353(19):2042–2055.
143. Bunn HF, Poyton RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev.* 1996;76(3):839–885.
144. Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell.* 2008;30(4):393–402.

145. Semenza GL. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:47–71.
146. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(5):343–354.
147. Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* 2004;279(37):38458–38465.
148. Berra E, Benizri E, Ginouvès A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J.* 2003;22(16):4082–4090.
149. Chandel NS. Evolution of mitochondria as signaling organelles. *Cell Metab.* 2015;22(2):204–206.
150. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun.* 2020;11(1):102.
151. Quinlan CL, Orr AL, Perevoshchikova IV, Treberg JR, Ackrell BA, Brand MD. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both forward and reverse reactions. *J Biol Chem.* 2012;287(32):27255–27264.
152. Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol.* 2010;45(7–8):466–472.
153. Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG, Halliwell B, Chang CJ, Kalyanaraman B, et al. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab.* 2011;13(4):361–366.
154. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(7):363–383.
155. Forman HJ, Ursini F, Maiorino M. An overview of mechanisms of redox signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;73:2–9.
156. D’Autréaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(10):813–824.
157. Finkel T. From sulfenylation to sulfhydration: what a thiolate needs to tolerate. *Sci Signal.* 2012;5(230):pe10.
158. Rhee SG. Cell signaling: H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science.* 2006;312(5782):1882–1883.
159. Winterbourn CC, Hampton MB. Redox biology: signaling via a peroxiredoxin sensor. *Nat Chem Biol.* 2015;11(1):5–6.

160. Veal EA, Day AM, Morgan BA. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell.* 2007;26(1):1–14.
161. Dickinson BC, Chang CJ. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol.* 2011;7(8):504–511.
162. Stone JR, Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(3–4):243–270.
163. Zhang Y, Marsboom G, Toth PT, Rehman J. Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 2013;8(10):e77077.
164. Waypa GB, Marks JD, Mack MM, Boriboun C, Mungai PT, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes. *Circ Res.* 2002;91(8):719–726.
165. Weissmann N, Tadic A, Hänze J, Rose F, Winterhalder S, Nollen M, et al. Hypoxic vasoconstriction in intact lungs: a role for NADPH oxidase-derived ROS? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279(4):L683–L690.
166. Archer SL, Weir EK, Reeve HL, Michelakis E. Molecular identification of O₂ sensors and O₂-sensitive potassium channels in the pulmonary circulation. *Adv Exp Med Biol.* 2000;475:219–240.
167. Cogolludo A, Moreno L, Frazziano G, Moral-Sanz J, Menendez C, Castaneda J, et al. Activation of neutral sphingomyelinase is involved in acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res.* 2009;82(2):296–302.
168. Sommer N, Dietrich A, Schermuly RT, Ghofrani HA, Gudermann T, Schulz R, et al. Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *Eur Respir J.* 2008;32(6):1639–1651.
169. Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JP. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev.* 2012;92(1):367–520.
170. Paddenberg R, König P, Faulhammer P, Goldenberg A, Pfeil U, Kummer W. Hypoxic vasoconstriction of pulmonary arteries depends on mitochondrial complex II. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;284(4):L710–L719.
171. Waypa GB, Marks JD, Guzy RD, Mungai PT, Schriewer JM, Dokic D, et al. Hypoxia triggers redox signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res.* 2010;106(3):526–535.

172. Shimoda LA, Udem C. Interactions between calcium and reactive oxygen species in pulmonary arterial smooth muscle responses to hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010;174(1–2):221–229.
173. Shimoda LA, Polak J. Hypoxia sensing and signal transduction in pulmonary artery smooth muscle cells. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011;174(1–2):32–42.
174. Aaronson PI, Robertson TP, Ward JP. Endothelium-derived mediators in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Respir Physiol Neurobiol.* 2006;151(2–3):117–127.
175. Rowan SC, Keane MP, Gaine S, McLoughlin P. Hypoxic pulmonary hypertension in chronic lung diseases: novel mechanisms and therapeutic targets. *J Clin Med.* 2016;5(6):52.
176. Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling. *Circ Res.* 2006;99(7):675–691.
177. Shimoda LA. Cellular and molecular mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Adv Exp Med Biol.* 2016;903:3–21.
178. Sommer N, Strielkov I, Pak O, Weissmann N. Oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Eur Respir J.* 2016;47(1):288–303.
179. Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JP. Hypoxic pulmonary vasoconstriction revisited. *Physiology (Bethesda).* 2012;27(6):317–327.
180. Pak O, Aldashev A, Welsh D, Peacock A. The effects of hypoxia on the pulmonary circulation. *Br Med Bull.* 2007;84:1–15.
181. Eltzschig HK, Sitkovsky MV, Robson SC. Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med.* 2012;367(24):2322–33.
182. Thiel M, Chouker A, Ohta A, Jackson E, Caldwell C, Smith P, et al. Oxygenation inhibits the physiological tissue-protecting mechanism and thereby exacerbates acute inflammatory lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(24):9927–32.
183. Schubert R, Gaynullina D, Shvetsova A, Tarasova OS. Myography of isolated blood vessels: considerations for experimental design and combination with supplementary techniques. *Front Physiol.* 2023;14:1176748.
184. Hart J. Vascular myography to examine functional responses of isolated blood vessels. *Methods Mol Biol.* 2019;2007:205–17.
185. Unfirer S, Mihalj M, Novak S, Kibel A, Cavka A, Mihaljevic Z, et al. Hyperbaric oxygenation affects the mechanisms of acetylcholine-induced relaxation in diabetic rats. *Undersea Hyperb Med.* 2016;43(7):787–803.

186. Unfirer S, Kibel A, Drenjancevic-Peric I. The effect of hyperbaric oxygen therapy on blood vessel function in diabetes mellitus. *Med Hypotheses*. 2008;71(5):776–80.
187. Monopoli A, Conti A, Dionisotti S, Casati C, Camaioni E, Cristalli G. Pharmacology of the highly selective A1 adenosine receptor agonist 2-chloro-N6-cyclopentyladenosine. *Arzneimittelforschung*. 1994;44(12):1305–12.
188. Monopoli A, Casati C, Lozza G, Forlani A, Ongini E. Cardiovascular pharmacology of the A2A adenosine receptor antagonist SCH 58261 in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;285(1):9–15.
189. Conti A, Monopoli A, Gamba M, et al. Effects of selective A1 and A2 adenosine receptor agonists on cardiovascular tissues. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1993;348:108–12.
190. Impellizzeri D, Di Paola R, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Melani A, et al. CGS21680, an agonist of the adenosine A2A receptor, decreases acute lung inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2011;668(1–2):305–16.
191. Yavuz C, Karahan O, Akkaya O. Vascular effects of continuous hyperbaric oxygen exposure: experimental outlook. *Med Gas Res*. 2023;13(4):198–201.
192. Matic A, Jukic I, Stupin A, Baric L, Mihaljevic Z, Unfirer S, et al. High salt intake shifts the mechanisms of flow-induced dilation in the middle cerebral arteries of Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;315(3):H718–30.
193. Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J Appl Physiol*. 2009;106(3):988–95.
194. Patel V, Chivukula IV, Roy S, Khanna S, He G, Ojha N, et al. Oxygen: from the benefits of inducing VEGF expression to managing the risk of hyperbaric stress. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(9–10):1377–87.
195. Earley S, Brayden JE. Transient receptor potential channels in the vasculature. *Physiol Rev*. 2015;95(2):645–90.
196. Thom SR. Vascular signaling mechanisms in response to hyperbaric oxygen. *Toxicol Lett*. 2011;202(2):121–7.
197. Imig JD. Epoxyeicosatrienoic acids, 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, and renal microvascular function. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2013;104–105:2–7.
198. Zhang Y, Wang X, Liu G, Liang J, Jiang Y, Chen X, et al. Hyperoxia induces cyclooxygenase-2 expression in vascular endothelium via reactive oxygen species and NF- κ B. *Free Radic Biol Med*. 2003;34(12):1541–1551.

199. 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):1053–66.
200. Unfirer S, Drenjancevic I. The mechanisms of vascular reactivity to acetylcholine and serotonin are modulated by hyperbaric oxygen treatment in cerebral resistance arteries of diabetic rats. *J Vasc Res.* 2011;48(Suppl 1):276.
201. Unfirer S, Falck JR, Drenjancevic I. Cytochrome P450 epoxygenase metabolites play a role in vasodilation of middle cerebral arteries in response to reduced pO₂ in healthy and diabetic rats that underwent hyperbaric oxygenation. In: *International Union of Physiological Sciences; 2013; Birmingham, UK. Abstract book.* p. 950.
202. Lunde PK, Pape M, Sjaastad I, Tønnesen E, Bjørtuft Ø, Myhre HO, et al. Hyperoxia and intermittent hyperbaric oxygen: effects on vascular function and oxidative stress. *J Physiol.* 2019;597(7):1831–1846.
203. Liu J, Liu Z, Li Q, Wang H, Zhang Y, Chen Z, et al. Intermittent hyperoxia improves endothelial function via modulation of eNOS and oxidative stress. *Eur J Appl Physiol.* 2017;117(8):1673–1683.
204. Yuan G, Nanduri J, Khan SA, Semenza GL, Prabhakar NR. Induction of HIF-1 α expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, calcium signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *J Cell Physiol.* 2008;217(3):674–85.
205. Alkayed NJ, Narayanan D, Romero MF. Ion channels and endothelial function in cerebral arteries: focus on potassium channels. *Curr Opin Pharmacol.* 2015;21:66–73.
206. Bruegger D, Rehm M, Jacob M, Chappell D, Stoeckelhuber M, Welsch U, et al. Exogenous nitric oxide requires an endothelial glycocalyx to prevent post-ischemic coronary vascular leak in guinea pig hearts. *Crit Care.* 2008;12(3):R73.
207. Thom SR. Hyperbaric oxygen: its mechanisms and efficacy. *Plast Reconstr Surg.* 2011;127(Suppl 1):131S–41S.
208. Schubert R, Gaynullina D, Shvetsova A, Tarasova OS, Koch A, Mayer B, et al. Myography of isolated blood vessels: considerations for experimental design and combination with supplementary techniques. *Front Physiol.* 2023;14:1176748.
209. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circ Res.* 2018;122(6):877–902.
210. Wang Y, Yang JN, Arner A, Boels PJ, Fredholm BB. Adenosine A₁ receptors and vascular reactivity. *Acta Physiol (Oxf).* 2010;199(2):211–20.

211. Bryan PT, Marshall JM. Adenosine receptor subtypes and vasodilatation in rat skeletal muscle during systemic hypoxia: a role for A1 receptors. *J Physiol*. 1999;514(Pt 1):151–62.
212. Phillis JW. Adenosine and cerebral circulation. *Prog Neurobiol*. 2003;70(4):275–312.
213. Zeng Q, Roman RJ, Harder DR, Gebremedhin D, Wang Z, Rincón J, et al. 20-HETE increases NADPH oxidase-derived reactive oxygen species production and smooth muscle contractility. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;298(3):F732–41.
214. Thakkar MM, Winston S, McCarley RW. A1 receptor and adenosinergic homeostatic regulation of sleep-wakefulness. *J Neurosci*. 2003;23(10):4278–87.
215. Silva L, Subiabre M, Araos J, Sáez T, Salsoso R, Pardo F. Insulin–adenosine axis-linked signalling. *Mol Aspects Med*. 2017;55:45–61.
216. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jul;9(7):671-5.
217. Ngai AC, Coyne EF, Meno JR, West GA, Winn HR. Receptor subtypes mediating adenosine-induced dilation of cerebral arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(5):H2329–35.
218. Cheng MK, Doumad AB, Jiang H, Falck JR, McGiff JC, Carroll MA. Epoxyeicosatrienoic acids mediate adenosine-induced vasodilation in rat preglomerular microvessels via A2A receptors. *Br J Pharmacol*. 2004;141(3):441–8.
219. Coney AM, Marshall JM. Role of adenosine and its receptors in the vasodilatation induced in the cerebral cortex of the rat by systemic hypoxia. *J Physiol*. 1998;509(Pt 2):507–18.
220. Kunduri S, Dick G, Nayeem M, Mustafa S. Adenosine A1 receptor signaling inhibits BK channels through a G α -dependent mechanism in mouse aortic smooth muscle. *Physiol Rep*. 2013;1(3):e00037.
221. Sharifi-Sanjani M, Zhou X, Asano S, Tilley S, Ledent C, Teng B, et al. Interactions between A2A adenosine receptors, hydrogen peroxide, and KATP channels in coronary reactive hyperemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;304(10):H1294–301.
222. DiChiara TJ, Reinhart PH. Redox modulation of hslow Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J Neurosci*. 1997;17(13):4942–55.
223. Tang XD, Daggett H, Hanner M, Garcia ML, McManus OB, Brot N, et al. Oxidative regulation of large-conductance calcium-activated potassium channels. *J Gen Physiol*. 2001;117(3):253–74.

224. Kobayashi S, Zhang C, Roman RJ, Harder DR, Gebremedhin D, Wang Z, et al. Adenosine A2A receptor stimulation induces nitric oxide production through cAMP–PKA signaling in vascular endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;294(3):1134–42.
225. Dubey RK, Gillespie DG, Mi Z, Jackson EK, Zacharia LC, Rosselli M, et al. Adenosine inhibits smooth muscle cell growth and induces nitric oxide and prostacyclin release. *Hypertension*. 1998;31(1):376–82.
226. Chan ES, Cronstein BN, Williams DL, Kline JN, Ohlstein EH, Shulman NR, et al. Adenosine A2A receptors modulate endothelin-1 synthesis in human endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(1):H31–8.
227. Liu Y, Renic M, Harder DR, Roman RJ. Role of eicosanoids in cerebral blood flow autoregulation. *Curr Neurovasc Res*. 2004;1(4):395–413.
228. Zhang Y, Roman RJ, Harder DR, Gebremedhin D, Wang Z, Falck JR, et al. Superoxide-induced oxidative stress modulates vascular tone via nitric oxide bioavailability. *Free Radic Biol Med*. 2003;34(12):1541–51.
229. Takeuchi K, Roman RJ, Harder DR. Hemoglobin, nitric oxide, and 20-HETE interactions in mediating vascular responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;290(5):R1260–6.
230. Vezzoli A, Company-Marín I, Gunner J, Poyner D, Simms J, Pitt AR, et al. Oxy-inflammation in humans during underwater activities. *Int J Mol Sci*. 2024;25(5):3060.
231. Li N, Li B, Brun T, Deffert-Delbouille C, Mahiout Z, Daali Y, et al. NADPH oxidase NOX2 defines a new antagonistic role for reactive oxygen species and cAMP/PKA in the regulation of insulin secretion. *Diabetes*. 2012;61(11):2842–50.
232. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87(10):840–4.
233. Liu Y, Renic M, Takeuchi K, Harder DR, Zhang C, Roman RJ, et al. 20-HETE-promoted cerebral blood flow autoregulation is associated with mural cell contractility. *Front Cell Neurosci*. 2021;15:762843.
234. Hirunpattarasilp C, Barkaway A, Davis H, Thompson A, Chen Q, Crowley C, et al. Hyperoxia evokes pericyte-mediated capillary constriction. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2022;42(9):1457–71.
235. Mitchell JA, Godson C, Bishop-Bailey D, Warner TD, Maguire JJ, Rainger GE, et al. Eicosanoids, prostacyclin and cyclooxygenase in the vascular system. *Br J Pharmacol*. 2019;176(11):1650–60.

236. Dunn KM, Holdsworth DW, Reid LM, Rosenblum WI, Zhang Y, Roman RJ, et al. Elevated production of 20-HETE in the cerebral vasculature after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(3):596–605.
237. Stuart MJ, McIntosh D, Seaton A. Effects of hyperoxia and hypoxia on vascular prostacyclin formation in vitro. *Pediatrics.* 1984;74(4):548–53.
238. Carroll MA, Balazy M, Margiotta P, Huang DD, Falck JR, McGiff JC. Cytochrome P-450-dependent HETEs: profile of biological activity and stimulation by vasoactive peptides. *Am J Physiol.* 1996;271(4 Pt 2):R863–9.
239. Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):131–85.
240. Koller A, Toth P. Contribution of flow-dependent vasomotor mechanisms to the autoregulation of cerebral blood flow. *J Vasc Res.* 2012;49(5):375–89.
241. Moro PJ, Quilici J, Giorgi R, Cuisset T, By Y, Boussuges A, et al. Mononuclear cell adenosine deaminase and CD26/dipeptidylpeptidase-IV activities are sensitive markers of reperfusion during percutaneous transluminal angioplasty. *Int J Cardiol.* 2013;166(1):225–9.
242. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2011;63(1):1–34.
243. Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(3):247–64.
244. Sitkovsky MV, Ohta A. The “danger” sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? *Trends Immunol.* 2005;26(6):299–304.
245. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature.* 2001;414(6866):916–20.
246. Haskó G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(9):759–70.
247. Cronstein BN. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol.* 1994;76(1):5–13.
248. Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(12):842–57.
249. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med.* 2011;364(7):656–65.

250. Loffler M, Morote-Garcia JC, Eltzschig SA, Coe IR, Eltzschig HK. Physiological roles of vascular nucleoside transporters. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(5):1004–13.
251. Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, Van De Wiele CJ, Resta R, Morote-Garcia JC, et al. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med.* 2004;200(11):1395–405.
252. Colgan SP, Eltzschig HK. Adenosine and hypoxia-inducible factor signaling in intestinal injury and recovery. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:153–75.
253. Decking UK, Schlieper G, Kroll K, Schrader J. Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase attenuates myocardial ischemia–reperfusion injury. *Circ Res.* 1997;81(5):154–64.
254. Vezzoli A, Camporesi EM, Bosco G, Sbarbati A, Marroni A, Bosco C, et al. Oxy-inflammation in humans during underwater activities. *Int J Mol Sci.* 2024;25(5):3060.
255. Bosco MC, Puppo M, Blengio F, Fraone T, Cappello P, Giovarelli M, et al. Monocytes and dendritic cells in hypoxia: a role for adenosine. *Semin Immunol.* 2008;20(4):271–6.
256. Li N, Li B, Brun T, Deffert-Delbouille C, Mahiout Z, Daali Y, et al. NADPH oxidase NOX2 defines a new antagonistic role for reactive oxygen species and cAMP/PKA in the regulation of insulin secretion. *Diabetes.* 2012;61(11):2842–50.
257. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox Biol.* 2015;6:260–71.
258. Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 2014;49(5):687–706.
259. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33(7):829–37.
260. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;34(6):879–86.
261. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43(2):109–42.
262. Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(8):1367–73.
263. Madamanchi NR, Runge MS. Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic Biol Med.* 2013;61:473–501.

264. Schulz E, Gori T, Münzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens Res.* 2011;34(6):665–73.
265. Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch.* 2010;459(6):923–39.
266. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite. *Am J Physiol.* 1996;271(5 Pt 1):C1424–37.
267. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007;87(1):315–424.
268. Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 1986;320(6061):454–6.
269. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res.* 1999;43(3):562–71.
270. Lauer T, Kleinbongard P, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, et al. Direct biochemical evidence for eNOS uncoupling in humans. *Circulation.* 2002;106(16):2060–6.
271. Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. *Circulation.* 2006;113(13):1708–14.
272. Schulz E, Anter E, Keaney JF. Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function. *Curr Med Chem.* 2004;11(9):1093–104.
273. Drummond GR, Sobey CG. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(9):452–63.
274. Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(5–6):691–728.
275. Grenz A, Homann D, Eltzschig HK. Extracellular adenosine: a safety signal that dampens hypoxia-induced inflammation during ischemia. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(8):2221–34.
276. Eltzschig HK, Weissmüller T, Mager A, Eckle T. Nucleotide metabolism and cell-cell interactions. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:103–30.
277. Borea PA, Varani K, Vincenzi F, Baraldi PG, Tabrizi MA, Merighi S, et al. The A3 adenosine receptor: history and perspectives. *Pharmacol Rev.* 2015;67(1):74–102.

278. Merighi S, Varani K, Gessi S, Cattabriga E, Borea PA. Pharmacology and therapeutic applications of adenosine receptors. *Pharmacol Ther.* 2003;100(1):31–48.
279. Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ.* 2007;14(7):1315–23.
280. Linden J. Regulation of leukocyte function by adenosine receptors. *Adv Pharmacol.* 2011;61:95–114.
281. Csóka B, Haskó G. Adenosine, inflammation pathways and therapeutic challenges. *Joint Bone Spine.* 2011;78(1):4–6.
282. Antonioli L, Colucci R, La Motta C, Tuccori M, Awwad O, Da Settimo F, et al. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and inflammation. *Mediat Inflamm.* 2012;2012:490843.
283. Franco R, Casadó V, Ciruela F, Saura C, Mallol J, Canela EI, et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog Neurobiol.* 1997;52(4):283–94.
284. Klinger M, Freissmuth M. Adenosine receptors: G protein–mediated signalling and beyond. *Cell Signal.* 2009;21(6):820–9.
285. Sebastiao AM, Ribeiro JA. Adenosine receptors and the central nervous system. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(193):471–534.
286. Ribeiro JA, Sebastião AM. Modulation and metamodulation of synapses by adenosine. *Acta Physiol (Oxf).* 2010;199(2):161–9.
287. Daly JW. Adenosine receptors: targets for future drugs. *J Med Chem.* 1982;25(3):197–207.
288. Olsson RA, Pearson JD. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev.* 1990;70(3):761–845.
289. Burnstock G. Purinergic signalling: its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *Bioessays.* 2012;34(3):218–25.
290. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(12):1471–83.
291. Burnstock G. Introduction: purinergic signalling and receptors. *Curr Top Med Chem.* 2004;4(8):793–803.
292. Vassort G, Turan B. Protective role of adenosine in the heart. *Curr Pharm Des.* 2010;16(27):3049–61.
293. Headrick JP, Ashton KJ, Rose’Meyer RB, Peart JN. Cardiovascular adenosine receptors: expression, actions and interactions. *Pharmacol Ther.* 2013;140(1):92–111.

294. Mustafa SJ, Morrison RR, Teng B, Pelleg A. Adenosine receptors and the heart: role in regulation of coronary blood flow and cardiac electrophysiology. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;(193):161–88.
295. Mubagwa K, Flameng W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res*. 2001;52(1):25–39.
296. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*. 1998;50(3):413–92.
297. King BF, Townsend-Nicholson A. Adenosine receptors: structure, distribution and function. In: Abbracchio MP, Williams M, editors. *Purinergic and pyrimidineric signalling*. Berlin: Springer; 2001. p. 27–44.
298. Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:31–55.
299. Sebastiao AM, Ribeiro JA. Adenosine receptors and the nervous system. In: Wilson CN, Mustafa SJ, editors. *Adenosine receptors in health and disease*. Berlin: Springer; 2009. p. 41–65.
300. Cunha RA. Neuroprotection by adenosine in the brain: from A1 receptor activation to A2A receptor blockade. *Purinergic Signal*. 2005;1(2):111–34.
301. Fredholm BB, Chen JF, Masino SA, Vaugeois JM. Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:385–412.
302. Bastia E, Varani K, Monopoli A, Gessi S, Merighi S, Borea PA. Signal transduction pathways involved in A2A receptor-mediated desensitization. *Mol Pharmacol*. 2002;62:1323–32.
303. Burgueño J, Blake DJ, Benson MA, Tinsley CL, Esapa CT, Canela EI, et al. The adenosine A2A receptor interacts with the actin-binding protein alpha-actinin. *J Biol Chem*. 2003;278(39):37545–52.
304. Rambacher KM, Moniri NH. Cysteine redox state regulates human β 2-adrenergic receptor binding and function. *Sci Rep*. 2020;10(1):2934.
305. Hong Y, Boiti A, Vallone D, Foulkes NS. Reactive oxygen species signaling and oxidative stress: transcriptional regulation and evolution. *Antioxidants (Basel)*. 2024;13(3):312.
306. Fan F, Zhang H, Zhao Y, Wang X, Li Q, Chen Y. Reactive oxygen species are required for β 2-adrenergic receptor– β -arrestin signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;423(1):71–5.

307. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pharmacology of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2018;70:542–77.
308. Brown ST, Reyes EP, Nurse CA. Chronic hypoxia upregulates adenosine A2A receptor expression in chromaffin cells via hypoxia-inducible factor-2 α : role in modulating secretion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;412(3):466–72.
309. Sheth S, Brito R, Mukherjea D, Rybak LP, Ramkumar V. Adenosine receptors: expression, function and regulation. *Int J Mol Sci.* 2014;15(2):2024–52.

11. ŽIVOTOPIS

Obrazovanje:

2020. – Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Republika Hrvatska
Tema doktorskog rada: *Uloga adenozijski A1 i A2A receptora u promjenama vaskularne reaktivnosti nakon hiperbarične oksigenacije*
Mentor: izv. prof. dr. sc. Aleksandar Kibel, dr.med.

Komentorica: doc. dr. sc. Zrinka Mihaljević, prof.

2012.-2018. – Integrirani prediplomski i diplomski studij medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Republika Hrvatska

Diplomski rad: *Odnos Syntax Scorea II s nalazima lipidograma i urata i prisustvom šećerne bolesti u pacijenata s višezilnom koronarnom bolesti*

2008.-2012. – Medicinska škola Osijek, smjer medicinska sestra/tehničar

Radno iskustvo:

2023. – Ambulanta za obiteljsku medicinu, Beč, Austrija

2023.-2023. – Klinika za kardiovaskularne bolesti Magdalena, Krapinske Toplice

2022.-2023. – Ambulanta za hiperbaričnu medicinu, Poliklinika Slavonija Osijek, 2020.-2023.
– nastavnik zdravstvene skupine predmeta, Medicinska škola Osijek

2020. – Asistent na katedri za Fiziologiju na njemačkom jeziku, Medicinski fakultet Osijek

2019.-2023. - nastavnik zdravstvene skupine predmeta, Učilište Studium Osijek, Vukovar, Vinkovci

2019.-2022. – Zavod za hitnu medicinu Osječko-baranjske županije, Osijek

2018.-2019. – Pripravnički staž za doktore medicine, Nacionalna i memorijalna bolnica dr. Juraj Njavro Vukovar, Vukovar

Aktivnosti tijekom integriranog prediplomskog i diplomskog studija medicine:

2017. – Stručna praksa u AMEOS Klinikum Bremerhaven na Odjelu za anesteziologiju i postoperativno inenzivno liječenje

2013. – Demonstrator na kolegiju Fizologija i imunologija čovjeka, Medicinski fakultet Osijek

Znanstveno-istraživački rad:

Sudjelovanje u projekima:

2025. – Znanstveno-istraživački projekt, Uloga NRF2 transkripcijskog faktora u vaskularnoj reaktivnosti prije i nakon hiperbarične oksigenacije te utjecaj hiperbarične oksigenacije na indikatore upale posredovane oksidativnim stresom u Sprague -Dawley štakora i ljudi, voditeljica projekta doc. dr. sc. Zrinka Mihaljević, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2024. – Znanstveno-istraživački projekt, Uloga utišavanja NRF2 transkripcijskog čimbenika pomoću siRNA *in vivo* ili *in vitro* na endotelnu funkciju nakon hiperbarične oksigenacije kod ljudi, u animalnim modelima i staničnim kulturama, voditeljica projekta doc. dr. sc. Zrinka Mihaljević, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2021. – Znanstveno-istraživački projekt, Uloga adenozijskih A1 i A2A receptora u mehanizmima vaskularne reaktivnosti nakon hiperbarične oksigenacije - molekularni pristup, voditeljica projekta doc. dr. sc. Zrinka Mihaljević, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2020. – Znanstveno-istraživački projekt, Uloga adenozijskih A1 i A2A receptora u promjenama vaskularne reaktivnosti nakon hiperbarične oksigenacije, voditelj projekta doc. dr. sc. Aleksandar Kibel, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Istraživački interesi: cerebrovaskularna fiziologija, kardiovaskularna fiziologija, purinergijska signalizacija, hiperbarična oksigenacija, vaskularna reaktivnost

Objavljeni znanstveni radovi i knjige:

Znanstveni radovi:

2025. *Uloga adenozijskih A1 i A2A receptora u mehanizmima vaskularne reaktivnosti nakon hiperbarične oksigenacije*, *Molecules*. 2025;30(14):2918–2939. MDPI. DOI:10.3390/molecules30142918.

2025. *Varijabilnost mehanizama vazodilatacije inducirane protokom u cerebralnim arterijama: utjecaj različitih protokola hiperbarične oksigenacije*, *Medical Gas Research*. 2025;15(3):383–390. Wolters Kluwer – Medknow. DOI:10.4103/mgr.MEDGASRES-D-24-00091.

2025. *Odnos SYNTAX score II s nalazima lipidograma i urata te prisustvom šećerne bolesti u bolesnika s višezilnom koronarnom bolesti*, *Acta Clinica Croatica*. 2025;64(1):309–323. Udruga liječnika – Acta Clinica Croatica.

Knjige:

2025. Poglavlje u knjizi, *Tlačna natriureza u regulaciji krvnog tlaka*, Odabrane teme iz fiziologije krvnog tlaka, London: Delhi: IntechOpen 2025. DOI:10.5772/intechopen.1002577

2020. Poglavlje u knjizi, *Značaj renin-angiotenzinskog sustava u kliničkim stanjima*; Odabrana poglavlja o renin-angiotenzinskom sustavu, London: Delhi: IntechOpen 2020. DOI: 10.5772/intechopen.92309.

Sudjelovanje na znanstvenim skupovima s objavljenim sažetcima:

2025. Regionalni sastanak fiziologa 2025.: Napredak u fiziologiji: Povezujući obrazovanje, istraživanje i praksu, poster, *Vazodilatacija posredovana adenozijskim A2A receptorom održava se kod povremene, ali ne i akutne hiperbarične oksigenacije*, Ljubljana, Slovenija

2025. Dvogodišnji sastanak Europskog društva za mikrocirkulaciju (ESM 2025), predavanje, *Intermitentna hiperbarična oksigenacija obnavlja mehanizme vazodilatacije u životinjskom modelu štakora*, Szeged, Mađarska

2023. 16. godišnji sastanak Hrvatskog fiziološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, poster, *Uloga adenozijskih A1 i A2A receptora u mehanizmima vaskularne reaktivnosti nakon hiperbarične oksigenacije*, Osijek, Hrvatska

2023. 4. RECOOP Međunarodna studentska konferencija (ISC) i 17. RECOOP Konferencija Mostovi u biomedicinskim znanostima, poster, *Uloga adenozijskih A1 i A2A receptora u promjenama vaskularne reaktivnosti nakon hiperbarične oksigenacije*, Prag, Češka

2022. 6. kongres hitne medicine s međunarodnim sudjelovanjem, predavanje, *Nove atipične i/ili naizgled benigne promjene u elektrokardiogramu važne su za rano prepoznavanje akutnog koronarnog sindroma*, Vodice, Hrvatska

2022. 3. regionalni kongres fizioloških društava; 5. kongres Hrvatskog fiziološkog društva, poster, *Proteinski izražaj adenozijskih A1 i A2A receptora u cerebralnim krvnim žilama Sprague-Dawley štakora izloženih hiperbaričnoj oksigenaciji*, NP Plitvička jezera, Hrvatska

2022. 20. Lošinjski dani bioetike: Integrativna bioetika i nova epoha, predavanje, *Svrha i dobrobit laboratorijskih životinja u pogledu njihove upotrebe, zakonodavstva i međunarodnih organizacija koje se bave pitanjima dobrobiti životinja*, Mali Lošinj, Hrvatska

2022. 31. Europski sastanak o hipertenziji i zaštiti kardiovaskularnog sustava, poster, *Uloga adenozijskih A1 i A2A receptora u mehanizmima vaskularne reaktivnosti nakon hiperbarične oksigenacije - molekularni pristup*, Atena, Grčka

2021. 24. Kongres Hrvatske udruge djelatnika hitne medicinske pomoći s međunarodnim sudjelovanjem "Znanost i iskustva spašavaju živote", predavanje, *Koristimo li potencijal gadgeta zvanog kapnometar u izvanbolničkoj hitnoj medicinskoj službi?*, Pula, Hrvatska

2021. 4. međunarodna znanstveno-stručna konferencija Digitalizacija, nove tehnologije i informacijsko društvo u razvoju ruralnih krajeva, predavanje, *Povećanje sigurnosti cestovnog prometa kroz edukaciju biciklista*, Gospić, Hrvatska

2021. Svjetski dan hipertenzije, poster, *Hipertenzivna emergencija i urgencija*, Osijek, Hrvatska

2018. 12. Kongres Hrvatskog kardiološkog društva, predavanje, *Odnos SYNTAX score II s nalazima lipidograma i urata te prisustvom šećerne bolesti u bolesnika s višezilnom koronarnom bolesti*, Zagreb, Hrvatska

Sudjelovanjima na projektima i festivalima:

2016.-2018. Sudjelovanje u organizaciji manifestacije Tjedan mozga u sklopu udruge SenzOS-a, Osijek

2017. Sudjelovanje u projektu Znanje i vještine u organizaciji EMSA-e, Osijek

2014. Sudjelovanje na Festivalu znanosti, Osijek

Nagrade i priznanja:

2022. – 2. mjesto za poster, 3. regionalni kongres fizioloških društava; 5. kongres Hrvatskog fiziološkog društva, *Proteinski izražaj adenozijskih A1 i A2A receptora u cerebralnim krvnim žilama Sprague-Dawley štakora izloženih hiperbaričnoj oksigenaciji, NP Plitvička jezera, Hrvatska*

2017. – osvojeno 9. mjesto na natječaju „Najbolja poduzetnička ideja“ Osječko-baranjske županije

Jezici:

Hrvatski (materinji jezik)

Engleski (aktivno govorenje i pisanje)

Njemački (aktivno govorenje i pisanje)

Računalne vještine:

MS Office (Word, Excel, PowerPoint)

Statistički softver (GraphPad Prism, SPSS)

Ostali alati (ImageJ, Python, Canva)

Članstvo:

2022. – Član Hrvatskog fiziološkog društva

2019. – Član Hrvatskog društva za hitnu medicinu

2017. – Članstvo u Gradskom društvu Crvenog križa Osijek