

# Oksidacijski i antioksidacijski status i ekspresija sirtuina nakon ronjenja s komprimiranim zrakom

---

**Perović, Antonija**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:794420>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-14**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

ANTONIJA PEROVIĆ

**OKSIDACIJSKI I ANTIOKSIDACIJSKI STATUS I  
EKSPRESIJA SIRTUINA NAKON RONJENJA S  
KOMPRIMIRANIM ZRAKOM**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

ANTONIJA PEROVIĆ

**EFFECT OF SCUBA DIVING ON THE  
OXIDANT/ANTIOXIDANT STATUS, SIRT1 AND  
SIRT3 EXPRESSION**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018.



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

ANTONIJA PEROVIĆ

**OKSIDACIJSKI I ANTIOKSIDACIJSKI STATUS I  
EKSPRESIJA SIRTUINA NAKON RONJENJA S  
KOMPRIMIRANIM ZRAKOM**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

dr. sc. Jerka Dumić, red. prof.

dr. sc. Sandra Sobočanec, viša znanstv. sur.

Zagreb, 2018.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

ANTONIJA PEROVIĆ

**EFFECT OF SCUBA DIVING ON THE  
OXIDANT/ANTIOXIDANT STATUS AND SIRTUINS  
EXPRESSION**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Professor Jerka Dumić, Ph.D.

Sandra Sobočanec, Ph.D.

Zagreb, 2018.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu i Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku Opće bolnice Dubrovnik u Dubrovniku u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Želim izraziti veliku zahvalnost svojoj mentorici prof. dr. sc. Jerki Dumić na usmjeravanju u znanstveno-istraživačkom radu, poticanju, podršci i svim korisnim savjetima tijekom izrade doktorskog rada.

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Sandri Sobočanec na savjetima, pomoći i povjerenju.

Posebno zahvaljujem prof. dr. sc. Sanji Dabelić na nesebičnoj pomoći i podršci, onda kad je bilo najteže.

Veliko hvala osoblju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković i Odjela za laboratorijsku dijagnostiku Opće bolnice Dubrovnik na pomoći pri izvođenju analiza.

Zahvaljujem članovima Ronilačkog kluba Dubrovnik, Ronilačkog kluba Župa dubrovačka i Ronilačkog centra Abyss na tehničkoj pomoći i sudjelovanju u istraživanju. Liječniku Davoru Romanoviću, specijalistu baromedicine i pomorske medicine, zahvaljujem na stručnoj pomoći pri procjeni zdravstvenog statusa ronilaca.

Mojim kolegicama Marini i Ani hvala na podršci, pomoći i svim trenucima koje su dijelile sa mnom.

Najveće hvala mojim najdražima, mojem izvoru mira, sreće i energije.

Ovaj rad posvećujem svojoj majci.

*„Dès la naissance, l'homme porte le poids de la gravité sur ses épaules. Il est rivié à terre. Mais l'homme n'a qu'à descendre sous la surface et il est alors libre.“*

*„Od rođenja čovjek nosi teret gravitacije na svojim leđima. On je prikovan za zemlju. Ali čovjek samo mora zaroniti ispod površine i tada je slobodan.“*

Jacques Yves Cousteau



## SAŽETAK

Ronjenje s komprimiranim zrakom predstavlja poseban oblik oksidacijskog stresa izazvanog vježbanjem jer je povećano stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) posljedica ne samo zahtjevne fizičke aktivnosti, već i hiperoksije, koja nastaje uslijed disanja kisika pod povišenim tlakom. Smatra se da bi učinkovitost antioksidacijskih enzima mogla ovisiti o aktivnosti sirtuina (SIRT), molekula osjetljivih na povećanu produkciju ROS-a, koje imaju sposobnost povećati ekspresiju i aktivnost antioksidacijskih enzima. Cilj je ovog rada bio ispitati oksidacijski/antioksidacijski status i ekspresiju gena *SIRT1* i *SIRT3* nakon zaronu s komprimiranim zrakom kod rekreacijskih ronilaca koji nisu ronili tijekom zimskog razdoblja.

U istraživanje je bilo uključeno 17 ronilaca, muškog spola, raspona životne dobi od 30 do 52 godine. Uzimanje krvi bilo je provedeno neposredno prije i nakon ronjenja na 30 metara dubine u trajanju od 30 minuta te 3 i 6 sati nakon ronjenja. U uzorcima krvi određeni su parametri kompletne krvne slike, u eritrocitima i plazmi praćeni su biljezi oksidacijskog oštećenja lipida i proteina, mjerenjem koncentracije tiobarbiturnih reaktivnih supstanci (TBARS) i proteinskih karbonila, dok su aktivnosti antioksidacijskih enzima katalaze (CAT), ukupne superoksid dismutaze (SOD) te izoformi SOD1 i SOD2, kao i ekspresija gena *CAT*, *SOD1* i *SOD2* te *SIRT1* i *SIRT3* bili praćeni u mononuklearnim stanicama krvi.

Rezultati ovog rada pokazali su da povećanje broja leukocita te smanjenje broja eritrocita, hemoglobina i hematokrita nakon ronjenja nisu klinički značajne promjene. Zapažen porast aktivnosti CAT, SOD2 i SOD neposredno nakon ronjenja nije bio dovoljan da spriječi porast eritrocitnih TBARS vrijednosti. Budući da promjene TBARS vrijednosti u plazmi, kao ni promjene proteinskih karbonila u plazmi i eritrocitima nisu nađene nakon ronjenja, lipidna peroksidacija u eritrocitima pokazala se najosjetljivijim ispitivanim parametrom oksidacijskog stresa. Povećanje aktivnosti ispitivanih antioksidacijskih enzima nije bilo praćeno porastom njihove genske ekspresije. Smanjenje ekspresije gena *SIRT1* izazvano zaronom, doseglo je bazalnu vrijednost 6 sati nakon ronjenja, kada je uočen porast ekspresije gena *SIRT3*.

Ovo je istraživanje pokazalo da zaron na 30 metara dubine, nakon razdoblja ne ronjenja, uzrokuje oksidacijsko oštećenje dajući dobru osnovu za daljnja usmjerena istraživanja u području rekreacijskog ronjenja koja bi mogla biti korisna u formiranju smjernica za rekreacijske ronioce. Uz to, opažen porast ekspresije gena *SIRT3* pridonosi razumijevanju pretpostavljenog adaptacijskog antioksidacijskog mehanizma i hormeznog odgovora na povećanu produkciju ROS-a.

**Ključne riječi:** ronjenje, hiperoksija, oksidacijski stres, sirtuin 1, sirtuin 3

## SUMMARY

SCUBA diving represents a special form of exercise-induced oxidative stress since the increased production of reactive oxygen species (ROS) is a result not only of a demanding physical activity, but also of hyperoxia, which occurs due to breathing oxygen under increased pressure. It is believed that the effectiveness of antioxidant defense enzymes could be dependent on the activity of sirtuins (SIRT), molecules sensitive to the increased production of ROS, which have the ability to increase the expression and activation of antioxidant enzymes. The aim of this study was to examine the effects of scuba diving on oxidative/antioxidative status, as well as *SIRT1* and *SIRT3* gene expressions in recreational divers after a winter non-dive period.

The study included 17 male recreational divers median age (range) 41 (30-52) years. Blood samples were taken before and immediately after diving at a depth of 30 m for 30 min, 3 h and 6 h after diving. The changes of the following parameters were examined: complete blood counts, oxidative damage markers of lipids and proteins in erythrocytes and plasma, by measuring the formation of thiobarbituric reactive substances (TBARS) and protein carbonyl derivatives (PCD), while the activities of antioxidant enzymes; catalase (CAT), total superoxide dismutase (SOD), and isoforms SOD1 and SOD2, as well as *CAT*, *SOD1*, *SOD2*, *SIRT1* and *SIRT3* gene expression were monitored in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

The increase of leukocyte count and the decrease of erythrocyte count, hemoglobin and hematocrit observed after diving did not show clinical significance. The elevation of CAT, SOD2 and SOD activities observed after diving was not sufficient to prevent the increase in erythrocyte TBARS values. Since we found no difference for plasma TBARS level and also for carbonylated proteins level in either plasma or erythrocytes, peroxidative damage in erythrocytes appears to be the most pronounced response to oxidative stress. Elevation of the antioxidant enzymes activities was not accompanied by the increase of their gene expression. The decrease of *SIRT1* gene expression induced by diving, reached its basal level 6 h after the dive, when the increase of *SIRT3* gene expression was observed.

This study showed that the first dive to 30 m after a non-dive season causes oxidative damage, providing a good basis for further research in the field of recreational diving, which could be useful for forming the diving recommendations. In addition, the observed increase of *SIRT3* gene expression contributes to the understanding of the assumed adaptation antioxidant mechanism and the hormesis response to increased ROS production.

**Keywords:** diving, hyperoxia, oxidative stress, sirtuin 1, sirtuin 3

**SADRŽAJ**

<b>1 UVOD</b> .....	1
1.1 Ronjenje uz uporabu autonomnog ronilačkog uređaja .....	3
1.1.1 (Pato)fiziološke promjene povezane s ronjenjem .....	4
1.1.1.1 Izlaganje visokom tlaku okoline .....	4
1.1.1.2 Učinci imerzije .....	4
1.1.1.3 Disanje pod povišenim tlakom .....	5
1.1.1.4 Štetni učinci dušika .....	5
1.1.1.5 Hiperoksija .....	6
1.1.2 Fizička aktivnost i oksidacijski stres.....	6
1.2 Oksidacijski stres .....	8
1.2.1 Stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva .....	8
1.2.2 Oksidacijsko oštećenje staničnih komponenti .....	12
1.2.2.1 Oksidacijsko oštećenje lipida .....	12
1.2.2.2 Oksidacijsko oštećenje proteina .....	15
1.2.2.3 Oksidacijsko oštećenje nukleinskih kiselina .....	17
1.2.3 Antioksidacijska obrana .....	17
1.3 Ronjenje i oksidacijski/antioksidacijski status .....	20
1.4 Uloga SIRT1 i SIRT3 u oksidacijskom stresu.....	22
1.4.1 Sirtuini.....	22
1.4.2 Sirtuin 1.....	24
1.4.3 Sirtuin 3.....	26
1.5 Svrha i ciljevi rada.....	28
<b>2 MATERIJALI I METODE</b> .....	30
2.1 Materijali .....	31
2.2 Ispitanici .....	33
2.2.1 Eksperimentalni zaron .....	34

---

2.2.2 Uzimanje uzoraka krvi .....	35
2.3 Metode .....	36
2.3.1 Određivanje parametara kompletne krvne slike .....	36
2.3.2 Izdvajanje plazme i priprema hemolizata eritrocita .....	36
2.3.3 Izolacija mononuklearnih stanica periferne krvi .....	36
2.3.4 Određivanje biljega oksidacijskog oštećenja .....	37
2.3.4.1 Određivanje proteinskih karbonila .....	38
2.3.4.2 Određivanje lipidne peroksidacije .....	39
2.3.5 Određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima .....	39
2.3.5.1 Određivanje aktivnosti katalaze .....	40
2.3.5.2 Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze .....	40
2.3.6 Analiza genske ekspresije .....	40
2.3.6.1 Izolacija ukupne RNA .....	41
2.3.6.2 Provjera integriteta i čistoće izolirane RNA .....	41
2.3.6.3 Reverzna transkripcija praćena lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu .....	42
2.4 Statistička analiza .....	44
<b>3 REZULTATI</b> .....	<b>45</b>
3.1 Utjecaj ronjenja na hematološke parametre .....	46
3.2 Biljezi oksidacijskog oštećenja .....	49
3.3 Aktivnost antioksidacijskih enzima .....	52
3.4 Genska ekspresija antioksidacijskih enzima .....	55
3.5 Genska ekspresija sirtuina .....	57
3.6 Korelacije analize .....	59
3.6.1 Korelacijska analiza ispitivanih parametara sa životnom dobi ispitanika .....	59
3.6.2 Korelacijska analiza genskih ekspresija sirtuina i antioksidacijskih enzima .....	62
<b>4 RASPRAVA</b> .....	<b>63</b>

<b>5 ZAKLJUČCI .....</b>	<b>73</b>
<b>6 POPIS LITERATURE.....</b>	<b>76</b>
<b>7 POPIS KRATICA .....</b>	<b>91</b>
<b>8 ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>95</b>

# **1 UVOD**

Posljednjih desetljeća ronjenje uz uporabu autonomnog ronilačkog uređaja (eng. *Self Contained Underwater Breathing Apparatus*, SCUBA) postaje vrlo popularna i široko rasprostranjena sportska i rekreacijska aktivnost. SCUBA ronjenje karakterizira pojačana fizička aktivnost u promijenjenim uvjetima okoline što uključuje izloženost tijela povišenom tlaku i disanje komprimiranog zraka ili drugih plinskih mješavina pri povišenom tlaku, učinak uranjanja i izloženost niskoj temperaturi. Pojačana fizička aktivnost koja je kod ronjenja dodatno prisutna zbog težine ronilačke opreme i povećane otpornosti kretanju pod vodom i hiperoksija koja nastaje zbog disanja kisika pod povišenim tlakom uzrokuju povećano stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) [1]. Visoka produkcija ROS-a može uzrokovati oksidacijsko oštećenje staničnih struktura, kao što su lipidi, proteini i nukleinske kiseline, a nakupljanje takvih oštećenja može rezultirati promjenama u zdravstvenom statusu [2]. S druge strane, ROS su važne signalne molekule i njihovo stvaranje ima važnu ulogu u regulaciji staničnih procesa, uključujući i aktivaciju antioksidacijske obrane za suzbijanje oksidacijskog stresa i štetnog djelovanja ROS-a [2,3].

O mehanizmima aktivacije i ekspresije antioksidacijskih enzima te njihovoj učinkovitosti još uvijek se ne zna dovoljno. Sirtuin 1 (SIRT1) i sirtuin 3 (SIRT3), nikotinamid adenin dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) ovisne deacetilaze, zbog svoje osjetljivosti na promjene redoks statusa i sposobnosti regulacije redoks homeostaze [3] predstavljaju intrigantne molekule koje mogu biti povezane s povećanom učinkovitošću antioksidacijskih enzima. Njihova uloga u antioksidacijskom odgovoru čini ih važnim indikatorima razine oksidacijskog stresa na raskrižju protektivnih i štetnih učinaka povećane produkcije ROS-a [4]. Osim toga, njihove brojne uloge kao NAD<sup>+</sup> ovisnih deacetilaza te povezanost s produljenjem životnog vijeka [5] čine ih zanimljivim molekulama čija aktivnost se može potaknuti ronjenjem ili nekom drugom fizičkom aktivnošću.

Dosadašnje spoznaje o utjecaju ronjenja na biljege oksidacijskog oštećenja i antioksidacijske enzime proizlaze iz istraživanja na profesionalnim ronionicima, a kontroverzni rezultati mogu se objasniti različitim uvjetima u kojima su istraživanja provedena uključujući različite dubine i trajanje zarona, korištene smjese za disanje, vrste uzorka i ispitivanu populaciju. Zapravo, u području rekreacijskog ronjenja nedostaju znanja o štetnim ili korisnim učincima povećane produkcije ROS-a.

## 1.1 Ronjenje uz uporabu autonomnog ronilačkog uređaja

Globalizacija SCUBA ronjenja usko je povezana s razvojem ronilačke opreme, napretkom ronilačkih protokola i razumijevanjem fiziologije ronjenja. Ronjenje uz uporabu ronilačkog uređaja koje je omogućilo neovisno kretanje pod vodom, započinje u 19. stoljeću. Godine 1879. britanski inženjer Henry Fleuss konstruirao je autonomni ronilački uređaj zatvorenog kruga koji se sastojao od spremnika s kisikom te filtera natopljenog kalijevim hidroksidom za apsorpciju izdahnutog ugljikovog dioksida. Kod ronilačkih uređaja zatvorenog kruga proces udisanja i izdisanja odvija se u zatvorenom krugu tako da se izdahnuti zrak reciklira odnosno filtrira od ugljikovog dioksida i obogaćuje kisikom. Unaprijeđeni ronilački uređaji zatvorenog kruga danas imaju svoju primjenu uglavnom u vojsci, a njihova prednost je duže zadržavanje pod vodom. Takva vrsta ronjenja poznata je pod nazivom „*rebreather*“ ronjenje.

Najveću prekretnicu u komercijalizaciji ronjenja pokrenuo je izum 1942. godine kada su Jacques-Yves Cousteau i Emile Gagnan predstavili hidrostatski regulator koji omogućuje doziranje zraka iz visokotlačnih spremnika prilikom povišenog tlaka okoline. Time započinje ronjenje kakvo danas poznajemo, SCUBA ronjenje otvorenog sustava u kojem ronilac otpušta iskorišteni zrak izravno u vodu. Kao oblik rekreacije, SCUBA ronjenje se počelo intenzivno razvijati nakon osnivanja Svjetske konfederacije podvodnih aktivnosti (fra. *Confederation Mondiale des Activites Subaquatiques*, CMAS) u Europi 1959. godine i Nacionalnog udruženja podvodnih instruktora (eng. *National Association of Underwater Instructors*, NAUI) osnovanog iste godine u Sjedinjenim Američkim Državama. Danas postoji niz međunarodno priznatih ronilačkih asocijacija prema čijim se programima u ronilačkim klubovima i centrima vrši obuka ronilaca.

S obzirom na potrebnu obuku, iskustvo i korištenu opremu za ronjenje, amatersko ronjenje se može podijeliti na rekreacijsko ili sportsko ronjenje i tehničko ronjenje. Rekreacijsko ronjenje s komprimiranim zrakom najčešći je oblik amaterskog ronjenja koji uključuje ograničenje dubine do 40 metara, izravan okomit pristup površini vode te postupno izranjanje bez dekompresijskog zaustavljanja [6]. Tehnička ronjenja su kompleksnija od rekreacijskog ronjenja i zahtijevaju veću razinu obuke i iskustva za korištenje opreme koju je ronilačka industrija preuzela od tehnologija namijenjenih vojsci i profesionalcima. Naziv su dobila zbog korištenja tehničkih mješavina kao smjese za disanje pri ronjenju, a svrha im je omogućiti dublje urone i duže zadržavanje pod vodom. Najčešće korištene tehničke mješavine



su nitrox koji u odnosu na zrak sadrži veći postotak kisika i manji postotak dušika i trimix koji sadrži kisik, dušik i helij i ima niži postotak kisika i dušika u odnosu na zrak.

### **1.1.1 (Pato)fiziološke promjene povezane s ronjenjem**

#### 1.1.1.1 Izlaganje visokom tlaku okoline

Dubina, odnosno visok tlak u vodi za čovjeka je neprirodno okruženje. Tijekom ronjenja ronilac je izložen porastu tlaka okoline koji proporcionalno raste s dubinom zarona (sa svakih 10 metara morske dubine tlak okoline se povećava za 101,3 kPa). Zbog velikog udjela tekućine u ljudskom tijelu, ljudsko tijelo relativno dobro podnosi tlak na većim dubinama. Međutim, u određenim situacijama porast tlaka okoline može uzrokovati ozljede šupljih organa i tkiva ispunjenih zrakom zbog kompresije zraka na manji volumen pri zaronu ili porasta volumena zraka pri izronu, što se naziva barotrauma. Najčešća barotrauma je barotrauma srednjeg uha [7], dok je plućna barotrauma pri naglom izronu najozbiljniji oblik koji može dovesti do kolapsa pluća zbog porasta volumena zraka u plućima.

#### 1.1.1.2 Učinci imerzije

Uronjenost tijela u vodu (imerzija) zbog djelovanja hidrostatskog tlaka vode na krvožilni sustav, kojem pridonosi i gubitak utjecaja gravitacije zbog bestežinskog stanja, uzrokuje promjene hemodinamike. Učinak djelovanja imerzije pojačava se u hladnoj vodi zbog periferne vazokonstrikcije koja pojačava preraspodjelu periferne krvi u središnju intratorakalnu cirkulaciju [8]. Centralizacija cirkulacije rezultira povećanjem krvnog tlaka i aktivacijom parasimpatičkog živčanog sustava koji dovodi do promjene kardio-endokrino-bubrežne osi. Posljedica je usporavanje srčanog ritma (bradikardija), povećano otpuštanje atrijskog natriuretskog peptida (ANP), supresija antidiuretskog hormona (ADH) te izazivanje diureze, natriureze i vazodilatacije kojim se povećanje krvnog tlaka nastoji vratiti na niže razine [9]. S druge strane, hladna voda u kombinaciji sa psihološkim stresom dovodi do aktivacije simpatičkog živčanog sustava [9] što uzrokuje ubrzani rad srca (tahikardija) kao i posljedično lučenje kateholamina iz nadbubrežne žlijezde. Centralizacija cirkulacije, aktivacija srčanih receptora, izlaganje hladnoći i psihološkom stresu čimbenici su koji prate imerziju kod SCUBA ronjenja i stimuliraju simpatički i parasimpatički živčani sustav s posljedičnim promjenama u brzini srčanog ritma i otpuštanju hormona [10].

### 1.1.1.3 Disanje pod povišenim tlakom

Pod utjecajem visokog tlaka mijenja se topljivost plinova u tjelesnim tekućinama i tkivima. Najzastupljeniji plinovi u zraku jesu dušik (~78%) i kisik (~21%), a njihova saturacija krvi i tkiva ne ovisi samo o dubini zarona, odnosno tlaku, već i trajanju cjelokupnog izlaganja visokom tlaku. Štetni učinci disanja dušika pod povišenim tlakom povezani su s dušikovom narkozom i pojavom dekompresijske bolesti, dok su štetni učinci kisika povezani s njegovom toksičnošću za neurološki sustav i oksidacijskim stresom. Upravo zbog toga kod dubokih zarona koriste se tehničke mješavine obogaćene helijom, kao što su trimix (sadrži dušik, kisik i helij) i heliox (sadrži samo kisik i helij) koje imaju manji udio kisika i dušika u odnosu na zrak. Helij ima manji narkozni učinak od dušika, a zbog manje gustoće stvara znatno manji otpor u dišnim putevima što je važno na velikim dubinama kada su plinovi toliko gusti da stvaraju izrazit otpor strujanju.

### 1.1.1.4 Štetni učinci dušika

Behnke je 1935. godine primijetio da ronionci izloženi stlačenom zraku pri 506,5 kPa (40 metara dubine) pokazuju simptome slične simptomima alkoholne opijenosti te da je taj fenomen posljedica disanja dušika pod povišenim tlakom. Od tada su mnogi autori istraživali tu pojavu, koju je kasnije Cousteau nazvao „pijanstvom velikih dubina“, a koja je povezana s dušikovom narkozom. Točan mehanizam narkoznog djelovanja dušika nije posve jasan, ali smatra se da je posljedica topljivosti dušika u lipidima i prolaska kroz membrane živčanih stanica te djelovanja na GABA<sub>A</sub> receptore [11].

Osim narkoznog djelovanja, disanje dušika pod povišenim tlakom glavni je uzrok dekompresijske bolesti ronilaca, koja nastaje zbog stvaranja mjehurića dušika kao posljedica prebrzog smanjenja tlaka odnosno izrona u odnosu na mogućnost odstranjivanja dušika otopljenog u tkivima i tjelesnim tekućinama. Klinička slika dekompresijske bolesti ovisi o lokalizaciji, brojnosti i veličini mjehurića, a najčešće se javlja unutar 3 sata nakon izrona, iako pojava simptoma može uslijediti i do 35 sati nakon izrona. Blaži stupanj dekompresijske bolesti manifestira se bolovima u zglobovima i kožnim osipom, dok su teži stupnjevi praćeni neurološkim i kardiopulmonalnim simptomima koji mogu dovesti do konvulzija i smrti.

Kako bi omogućilo odstranjenje otopljenog dušika putem pluća i spriječilo nastajanje dekompresijske bolesti, ronilac izron mora provoditi postupno primjenom dekompresijskih tablica odnosno uputa za dekompresiju u ronilačkom računalu.

#### 1.1.1.5 Hiperoksija

Premda je kisik pri uvjetima normalnog atmosferskog tlaka neškodljiv i neophodan za odvijanje gotovo svih životnih procesa, dugotrajno udisanje pod povišenim tlakom ili u većim koncentracijama nego što se nalazi u zraku može djelovati toksično. Nakon dugotrajnog izlaganja 100%-tnom kisiku pod povišenim tlakom, štetno djelovanje kisika najčešće se manifestira neurološkim poremećajima poznatijim pod nazivom kisikova epilepsija ili Paul Bertov učinak, a rjeđe poremećajem plućne funkcije (poznato kao Lorain-Smithov učinak). Neurološki simptomi akutnog otrovanja kisikom, kao što su mučnina, omaglica, poremećaj vida, razdražljivost i dezorijentacija ili grčevi nalik na epileptične napade, rijetko se javljaju prilikom rekreacijskog ronjenja, ali mogu pratiti dubinske zarone. Upravo zato za zarone preko 40 metara koriste se tehničke mješavine s manjim udjelom kisika.

S druge strane, uporaba 100%-tnog kisika pri povišenom tlaku (hiperoksigenacija u hiperbariji) temelj je liječenja u hiperbaričnoj medicini jer visok tlak i veći postotak kisika u mješavini koja se udiše povećava topljivost kisika u plazmi i omogućuje njegovu dostupnost do najudaljenijih stanica neovisno o prijenosu putem hemoglobina u eritrocitima. Povećanje ukupne količine kisika u ljudskom tijelu ili porast tlaka kisika ( $pO_2$ ) preko fizioloških razina, koji varira od organa do organa i između arterijske i venske krvi, naziva se hiperoksija [12]. Prekomjerna količina i dostupnost kisika pogoduju stvaranju ROS-a [13]. Hiperoksija uzrokovana hiperbaričnom oksigenacijom prepoznata je kao eksperimentalni model proučavanja oksidacijskog stresa.

#### 1.1.2 Fizička aktivnost i oksidacijski stres

Intenzivna fizička aktivnost praćena je povećanom produkcijom ROS-a i akutnim imunskim odgovorom [14,15]. Mnoga su istraživanja pokazala korisnu ulogu ROS-a nastalih tijekom vježbanja, koja dovodi do adaptacijskih odgovora poput povećane otpornosti na oksidacijski stres, angiogeneze, biogeneze mitohondrija i hipertrofije mišića [14].

Tijekom tjeleovježbe ROS uglavnom nastaju zbog povećane kontrakcije kako skeletnih mišića, tako i srčanog mišića, što je povezano s povećanom potrebom za stvaranjem energije, posljedičnim ubrzavanjem metabolizma i procesa staničnog disanja. Premda su identificirani i drugi mehanizmi koji tijekom vježbanja dovode do povećane produkcije ROS-a, još uvijek nije jasno koliko koji od njih pridonosi oksidacijskom stresu. Zapravo, smatra se da različite vrste fizičke aktivnosti aktiviraju različite dodatne puteve stvaranja ROS-a. Primjerice, kod intenzivnog mišićnog rada i posljedičnog ishemijskog-reperfuzijskog sindroma endotelna ksantin oksidaza može imati znatnu ulogu u stvaranju ROS-a. Nadalje, kod fizičkih aktivnosti praćenih povećanim otpuštanjem adrenalina i noradrenalina, što je opaženo i kod ronjenja [16], neenzimska oksidacija kateholamina može pridonijeti stvaranju ROS-a [14]. Imunosni odgovor praćen povećanjem broja neutrofila i njihove aktivnosti kroz respiratorni prasak još jedan je značajan izvor nastajanja ROS-a [17]. Treba spomenuti da dugotrajno zahtjevno vježbanje u fazi oporavka osim porasta neutrofila često prati smanjenje limfocita, kao i poremećaj funkcije imunskih stanica, što može uzrokovati povećanu osjetljivost na infekciju [15].

Intenzitet, trajanje i vrsta fizičke aktivnosti, kao i njena učestalost jesu komponente o kojima ovisi fiziološki odgovor organizma. Budući da je fizička aktivnost tijekom ronjenja praćena hiperoksijom, koja može značajno pridonijeti stvaranju ROS-a, ronjenje treba razmatrati kao poseban oblik oksidacijskog stresa uzrokovanog vježbanjem. Vježbom/ronjenjem uzrokovane promjene imunskog i oksidacijskog/antioksidacijskog sustava vjerojatno prate princip hormeze kojeg karakterizira koristan i protektivan učinak kod blagog i kontinuiranog izlaganja određenom stanju/supstanci, a s druge strane štetan učinak kod akutnog i intenzivnog izlaganja tom istom stanju/supstanci.

## 1.2 Oksidacijski stres

Oksidacijski stres karakterizira poremećaj oksidacijske/antioksidacijske ravnoteže u korist oksidansa koji može dovesti do oštećenja [18]. U stanicama se neprestano stvaraju ROS čija je razina pod nadzorom antioksidacijskih zaštitnih mehanizama. Antioksidacijska zaštita djelovanjem endogenih i egzogenih antioksidansa sprječava nakupljanje i štetno djelovanje ROS-a i time neprestano uspostavlja redoks homeostazu između njihovog nastajanja i uklanjanja. Stanice mogu do određene razine kompenzirati povećano stvaranje ROS-a, povećavanjem aktivnosti i sinteze antioksidansa.

Uzrok oksidacijskog stresa može biti posljedica povećane ROS produkcije ili smanjene antioksidacijske zaštite, a rezultira oksidacijskim oštećenjem staničnih komponenti, najčešće lipida, proteina i nukleinskih kiselina. Zbog oštećenja osnovnih bioloških molekula oksidacijski stres povezuje se s procesom starenja te mnogim patološkim stanjima kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes, neurodegenerativne bolesti, autoimune bolesti i nastanak tumora [19,20]. Međutim, to ne znači da je oksidacijski stres glavni uzrok bolesti. Porast razine ROS-a može biti i sekundaran u procesu razvoja bolesti.

Oksidacijski stres moguće je pratiti izravnim mjerenjem ROS-a ili posrednim mjerenjem produkata oksidacijskog oštećenja. Povećano stvaranje ROS-a, zbog njihovog kratkog vremena poluživota i kompleksnosti metodologije, obično se procjenjuje mjerenjem stabilnijih biljega odnosno produkata oksidacijskog oštećenja lipida, proteina i nukleinskih kiselina.

### 1.2.1 Stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva

Najvažniji oksidansi u organizmu jesu reaktivni kisikovi spojevi. Kao i reaktivni dušikovi spojevi (eng. *Reactive Nitrogen Species*, RNS), ROS uključuju slobodne radikale odnosno ione ili molekule s jednim ili više nesparenih elektrona i reaktivne molekule koje nisu slobodni radikali, ali su visoko kemijski reaktivni i lako stupaju u reakcije međusobno ili s drugim molekulama. Različite vrste ROS-a i RNS-a neprestano se stvaraju tijekom metaboličkih procesa, a većinu karakterizira vrlo kratko poluvrijeme života (Tablici 1). Visoka reaktivnost i kratko poluvrijeme života slobodnih radikala ograničava njihovo djelovanje na supstrate iz najbliže okoline. Međutim, s druge strane, jednom stvoreni slobodni radikal može izazvati niz lančanih reakcija reagirajući s drugim manje reaktivnim

molekulama te tako uzrokovati nastajanje relativno stabilnih, ali visoko reaktivnih spojeva koji mogu potaknuti širenje njihovog štetnog djelovanja čak i izvan stanice.

**Tablica 1.** Popis reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva (ROS/RNS) koji se stvaraju tijekom metaboličkih procesa i njihovo poluvrijeme života. Preuzeto i prilagođeno iz [20].

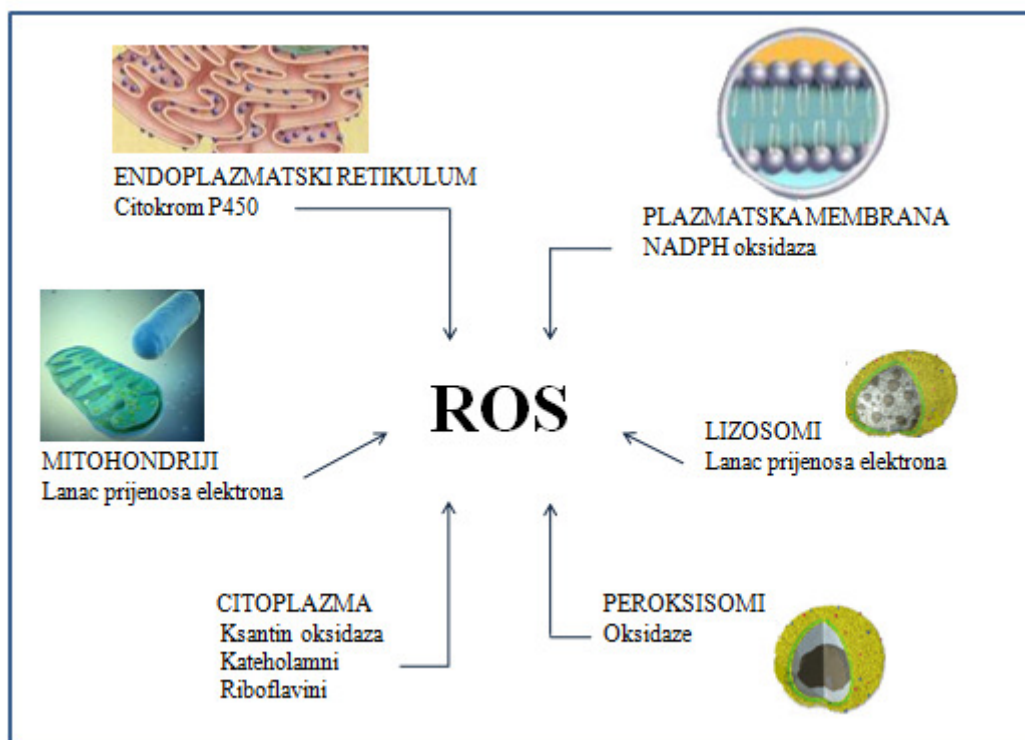
	Radikali	Poluvrijeme života	Neradikali	Poluvrijeme života
ROS	Superoksidni anion ( $O_2^{\bullet -}$ )	$10^{-6}$ s	Peroksid ( $H_2O_2$ )	stabilan
	Hidroksilni radikal ( $\bullet OH$ )	$10^{-10}$ s	Ozon ( $O_3$ )	1 s
	Alkoksilni radikal ( $RO^{\bullet}$ )	$10^{-6}$ s	Singletni kisik ( $^1O_2$ )	$10^{-6}$ s
	Peroksilni radikal ( $ROO^{\bullet}$ )	17 s	Organski peroksid	stabilan
			Hipokloritna kiselina (HOCl)	stabilna
			Hipobromna kiselina (HOBr)	stabilna
RNS	Dušikov oksid ( $NO^{\bullet}$ )	s*	Nitritna kiselina ( $HNO_2$ )	1 s
	Dušikov dioksid ( $NO_2^{\bullet}$ )	1 s	Peroksinitrit ( $ONOO^{\bullet}$ )	$10^{-3}$ s
			Nitrozilni kation ( $NO^+$ )	1 s
			Nitroksilni anion ( $NO^{\bullet}$ )	1 s
			Dinitrogen trioksid ( $N_2O_3$ )	1 s
			Dinitrogen tetraoksid ( $N_2O_4$ )	1 s
			Nitril klorid ( $NO_2Cl$ )	1 s

\* ovisi o okolišnim uvjetima

ROS nastaju djelovanjem enzima u različitim staničnim procesima koji se odvijaju na mitohondrijskim i plazmatskim membranama, citosolu, endoplazmatskom retikulu, lizosomima i peroksisomima (Slika 1). Smatra se da oko 90% staničnog ROS-a u fiziološkim uvjetima nastaje u mitohondrijima [21]. Oksidacijska fosforilacija, koja je katalizirana multienzimskim kompleksima na unutrašnjoj membrani mitohondrija, najvažniji je metabolički put za proizvodnju adenozin trifosfata (ATP). Tijesno je povezana s mitohondrijskim lancem prijenosa elektrona koji predstavlja glavni izvor nastanka ROS-a [22]. Gubitak elektrona na ubikinonskim i semikinonskim mjestima lanca prijenosa elektrona, kao i na citokromu c dovodi do jednovalentne redukcije molekularnog kisika i nastanka superoksidnog aniona ( $O_2^{\bullet -}$ ). Nastali  $O_2^{\bullet -}$  antioksidacijski sustav stanice uklanja redukcijom u

vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), a potom u vodu. Međutim, kod visoke proizvodnje ATP-a, gubitak elektrona se povećava što rezultira povećanom količinom  $\text{O}_2^{\cdot-}$  koju antioksidacijski sustav ne može potpuno ukloniti. Uslijed toga može doći do reakcije između  $\text{O}_2^{\cdot-}$  i njegovog reduciranog oblika  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ili reakcije  $\text{H}_2\text{O}_2$  s ionima prijelaznih metala, a u oba slučaja nastaje izuzetno štetni hidroksilni radikal ( $\cdot\text{OH}$ ) koji može pokrenuti lipidnu peroksidaciju u membrani mitohondrija. Posljedica lipidne peroksidacije može biti promjena konformacije mitohondrijske membrane, inhibicija sinteze ATP-a te aktivacija signalnih puteva za pokretanje apoptoze [23]. Jasno je da takav scenarij odgovara konvencionalnom pogledu na slobodne radikale kao štetne, međutim, oslobađanje ROS-a djeluje kao lokalni signal za aktivaciju mitohondrijskih redoks osjetljivih transkripcijskih faktora. Uz to, mitohondrijski ROS mogu difundirati u citoplazmu i pokrenuti citoplazmatske signalne procese koji pružaju dodatni put pomoću kojih inicijalni ROS-signal može pokrenuti redoks osjetljive stanične odgovore [24].

Osim u mitohondrijima, ROS nastaju i u drugim dijelovima stanica. Jedan od važnih izvora ROS-a u citoplazmi je djelovanje ksantin oksidaze te prisutnost riboflavina, kateholamina i prijelaznih metala (željezo, bakar) koji se mogu uključiti u prijenos elektrona. U plazmatskoj membrani važnu ulogu u stvaranju ROS-a u ima nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaza, dok je glavni izvor ROS-a u endoplazmatskom retikulu sustav P450 enzima [25]. Tijekom metaboličkih procesa, brojne oksidaze u peroksisomima, također pridonose stvaranju ROS-a [26], kao i lizosomski lanac prijenosa elektrona potreban za održavanje optimalnog pH za kisele hidrolaze [27].



**Slika 1.** Najvažniji izvori nastajanja ROS-a u staničnim organelama.

Proces fagocitoze može znatno pridonijeti stvaranju ROS-a. U fagocitnim stanicama djelovanjem membranskog sustava NADPH oksidaze, smještenog na membrani fagosoma, u fagosom se „upumpavaju“ ROS koji zatim iniciraju lančanu reakciju nastajanja novih ROS-a (tzv. respiratorni prasak). Primarna je uloga ovog procesa oksidacijsko oštećenje molekula unutar fagosoma te uz  $O_2^-$  i  $H_2O_2$  djelovanjem enzima mijeloperoksidaze (MPO) u fagocitima nastaje značajna koncentracija hipokloritne kiseline (HOCl) koja uništava patogeni organizam odnosno fagocitiranu molekulu [28].

Zahtjevnu fizičku aktivnost prati povećana produkcija ROS-a i imunوسي odgovor. Tijekom tjelovježbe ROS se dominantno generiraju u skeletnim mišićima, premda u nekim situacijama i druga tkiva kao što su srce i pluća te leukociti mogu značajno pridonijeti ukupnom stvaranju ROS-a. Primjerice, nakon intenzivne fizičke aktivnosti zabilježeno je ne samo povećanje broja neutrofila, već i njihove fagocitne aktivnosti mjerene kemiluminiscencijom [16]. Kontrakcijom skeletnih mišića ROS mogu nastajati na više mjesta unutar stanice [29]. No, smatra se da se ROS uglavnom generiraju u mitohondrijima miocita, a njihova difuzija kroz membranu miocita omogućuje im djelovanje i na ostale organe i tkiva [24].



Dostupnost kisika u krvi i tkivima tijekom hiperoksije također može utjecati na stvaranje ROS-a. Istraživanja na životinjskim modelima pokazala su da hiperoksija uzrokovana disanjem 85%-tnog kisika povećava nastajanje  $O_2^-$  i  $H_2O_2$  u plućima [30], dok je povećano stvaranje  $H_2O_2$  u ljudskim limfocitima opaženo nakon hiperbaričnog izlaganja 100%-tnom kisiku [31]. Primarna je uloga hiperoksije kod terapije hiperbaričnom oksigenacijom (HBO) osigurati dostupnost kisika u tkivima s povećanom potražnjom. Nekada se povećana produkcija ROS-a tijekom terapije HBO smatrala negativnom stranom hiperbarične medicine. Danas se, naprotiv, s povećanim razumijevanjem uloge ROS-a u staničnoj signalizaciji smatra temeljem liječenja u hiperbaričnoj medicini [32].

Povećano endogeno stvaranje ROS-a i/ili njihovo smanjeno uklanjanje prate, također određena (pato)fiziološka stanja, primjerice psihološki stres, ishemiju, infekcije i stvaranje tumora, a povišena količina ROS-a povezuje se i s procesom starenja. S druge strane, egzogeni uzroci nastajanja ROS-a uključuju djelovanje ultraljubičastog i ionizirajućeg zračenja koje može dovesti do pobuđivanja slobodnih elektrona kisika, izbacivanja elektrona iz orbitale te sudara molekula pri čemu nastaju ROS. U egzogene se uzroke ubrajaju, također djelovanja određenih lijekova (poput kemoterapeutika), opijata, alkohola, herbicida, kemijskih onečišćivača (sastojci smoga, duhanski dim), kao i hrane (posebice masna hrana, hrana koja sadrži užeglu mast, sušeno meso) [20].

## 1.2.2 Oksidacijsko oštećenje staničnih komponenti

Najčešće mete prekomjernog stvaranja ROS-a su biološke makromolekule - lipidi, proteini i nukleinske kiseline. Oksidacijsko oštećenje ovih makromolekula može dovesti do gubitaka ili slabljenja njihovih funkcija, kao i pojave mutacija u slučaju oštećenja DNA. Oksidacijska oštećenja lipida, proteina i DNA prepoznata su kao biljezi oksidacijskog stresa i povećane produkcije ROS-a.

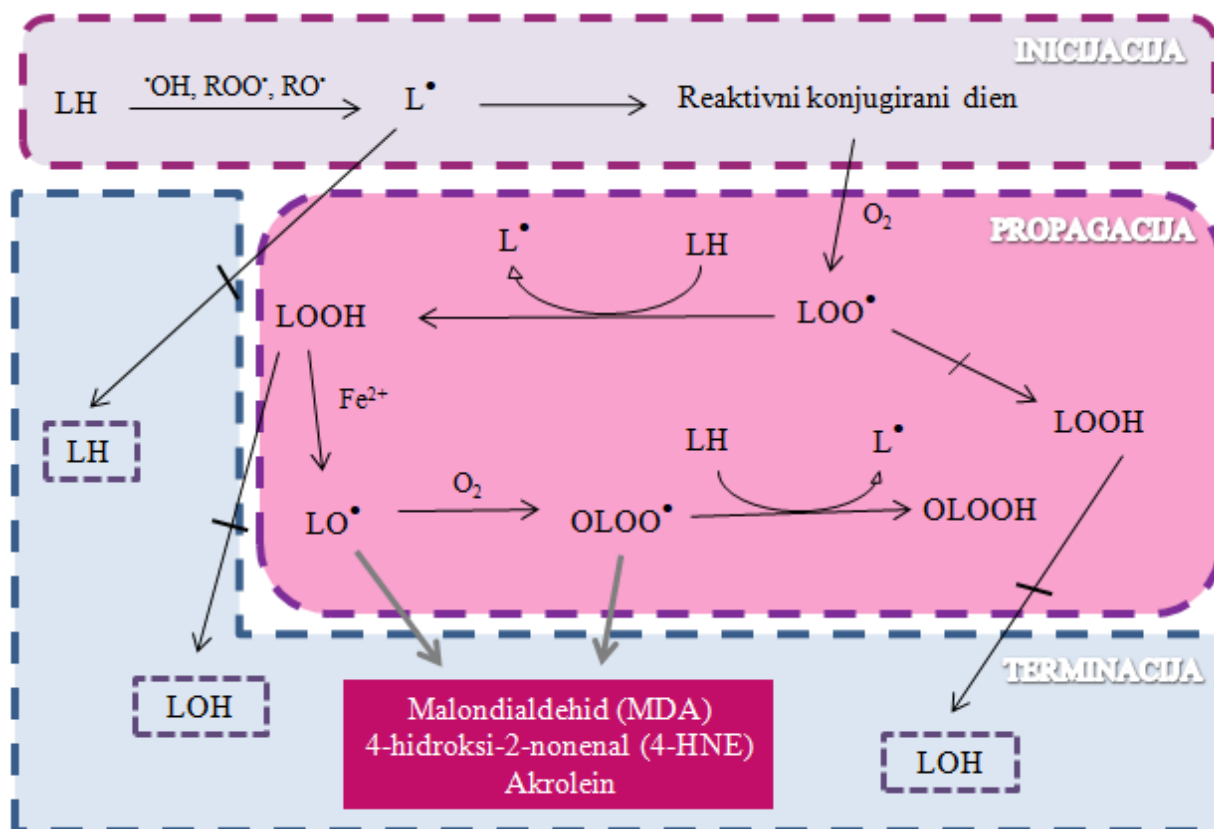
### 1.2.2.1 Oksidacijsko oštećenje lipida

Lipidi su sastavni dio membrana i imaju važnu strukturnu i funkcionalnu ulogu u stanici. Oksidacijsko oštećenje lipida može promijeniti fluidnost i cjelovitost membrana, a time i njihove funkcije. Reakcijom ROS-a s lipidima započinje proces lipidne peroksidacije (LPO) koji se prelazeći iz faze inicijacije u fazu propagacije progresivno grana te završava

fazom terminacije (Slika 2). Reakciju inicijacije u procesu LPO najčešće pokreće hidroksilni radikal ( $\cdot\text{OH}$ ), no može je pokrenuti i peroksilni radikal ( $\text{ROO}\cdot$ ) i alkoksilni radikal ( $\text{RO}\cdot$ ), djelujući na višestruko nezasićene masne kiseline, pri čemu nastaje lipidni radikal ( $\text{L}\cdot$ ). Lipidni radikal dovodi do lančane reakcije (propagacija) u kojoj nastaju novi radikali kao što su lipidni peroksilni radikal ( $\text{LOO}\cdot$ ), lipidni alkoksilni radikal ( $\text{LO}\cdot$ ), epoksi-lipidni peroksilni radikal ( $\text{OLOO}\cdot$ ), koji mogu djelovati na susjedne masne kiseline te tako širiti proces LPO. Završna faza ili faza terminacije može nastati reakcijom radikala s radikalom što rezultira nastajanjem ne-radikalnog spoja ili djelovanjem lipofilnih antioksidansa, poput  $\beta$ -karotena ili  $\alpha$ -tokoferola, pri čemu nastaju stabilni oblici radikala [33].

Procesom LPO stvaraju se relativno stabilni produkti kao što reaktivni  $\alpha$ - i  $\beta$ -nezasićeni aldehidi poput 4-hidroksi-2-nonenala (4-HNE), malondialdehida (MDA), 2-propenala (akrolein) te reaktivni  $\gamma$ -ketoaldehidi (poznati i kao izoketali) koji su produkti pregradnje izoprostana nastalog oksidacijom arahidonske kiseline. Premda su manje reaktivni od slobodnih radikala, reaktivni aldehidi su vrlo štetni uslijed dugog vremena raspada i širenja unutar stanice, pa čak i van stanice. Time nisu samo završni produkti LPO već su i „drugi toksični glasnici“ koji mogu djelovati na udaljenim mjestima od stvaranja ROS-a [34,35]. Oni mogu reagirati s drugim lipidima, proteinima, DNA i šećerima dovodeći do njihove oksidacije, fragmentacije te uzrokovati nastajanje umreženih produkata tzv. uznapredovalih lipooksidacijskih produkata (eng. *Advanced Lipoxidation End-Products*, ALEs) te uznapredovalih glikacijskih produkata (eng. *Advanced Glycation End-Products*, AGEs).

Produkti LPO vrlo se često koriste kao biljezi oksidacijskog stresa/oštećenja i mogu biti mjereni u izoliranim tkivima i stanicama, kao i u krvnim frakcijama ili mokraći. Oni uključuju mjerenje MDA, 4-HNE, izoprostana te mjerenje produkata LPO određivanjem koncentracije tiobarbiturnih reaktivnih supstanci (eng. *Thio Barbituric Acid Reactive Substances*, TBARS).



**Slika 2.** Lipidna peroksidacija.

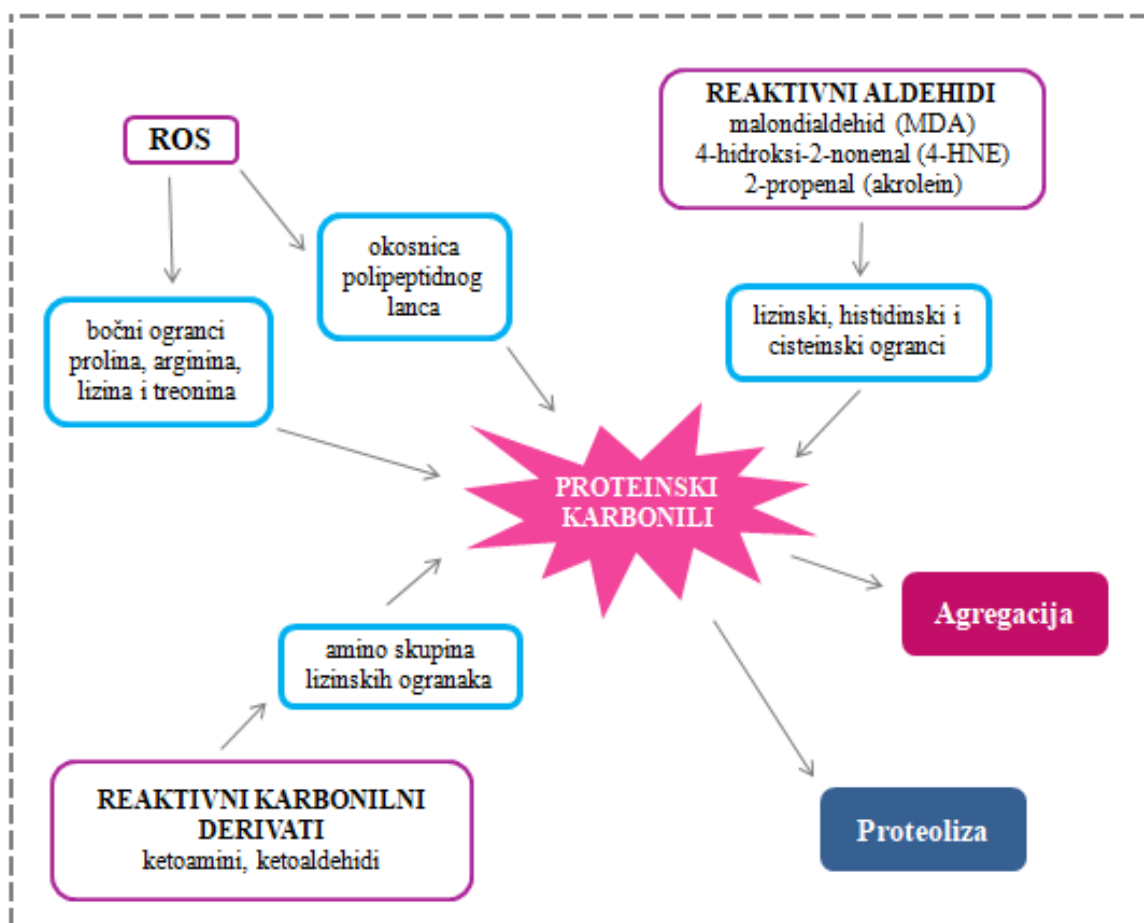
Reakciju inicijacije pokreće hidroksilni radikal ( $\cdot\text{OH}$ ), peroksilni radikal ( $\text{ROO}\cdot$ ) ili alkoksilni radikal ( $\text{RO}\cdot$ ) djelujući na višestruko nezasićene masne kiseline (LH) pri čemu nastaje lipidni radikal ( $\text{L}\cdot$ ). Lipidni radikal uslijed rezonancijskog efekta susjednih dvostrukih veza transformira se u reaktivni konjugirani dien koji brzo reagira s molekularnim kisikom tvoreći tako lipidni peroksilni radikal ( $\text{LOO}\cdot$ ). On može ponovno započeti lipidnu peroksidaciju reakcijom s drugom LH uz vlastitu redukciju u lipidni hidroperoksid (LOOH). Lančana reakcija lipidne peroksidacije dodatno se grana u prisutnosti iona prijelaznih metala (npr.  $\text{Fe}^{2+}$ ) pri čemu nastaje lipidni alkoksilni radikal ( $\text{LO}\cdot$ ) koji u prisutnosti kisika može prijeći u epoksi lipidni peroksilni radikal ( $\text{OLOO}\cdot$ ), a koji pak može oksidirati sljedeću masnu kiselinu.  $\text{LO}\cdot$  i  $\text{OLOO}\cdot$  mogu podleći  $\beta$ -otkidanju pri čemu nastaju toksični aldehidi: 4-hidroksi-2-nonenal, malondialdehyd i akrolein. Antioksidansi mogu reducirati  $\text{L}\cdot$  u LH ili druge lipidne radikale u lipidni alkohol (LOH).

### 1.2.2.2 Oksidacijsko oštećenje proteina

Proteini su najčešći cilj oksidacijskog djelovanja ROS-a zbog njihove ukupne količine u biološkim sustavima te se smatra da je 50-75% djelovanja ROS-a usmjereno na proteine [36]. Oksidacijsko oštećenje proteina može dovesti do promjene i/ili gubitka njihovih bioloških funkcija poput smanjenja ili potpunog gubitka enzimske aktivnosti, povećane propusnosti ili nefunkcionalnosti ionskih kanala i transportera te može uzrokovati smanjenu topljivost proteina, taloženje i nakupljanje istaloženih proteina unutar stanice. Proteini mogu biti modificirani velikim brojem različitih oksidacijskih reakcija koje uključuju oksidaciju aminokiselinskih bočnih ograna ili okosnice polipeptidnog lanca, reoksidaciju disulfidnih veza, fragmentaciju polipeptidnih lanaca i nastanak proteinskih karbonila [37]. Priroda proteinske modifikacije može dati podatak o vrsti oksidansa koji je doveo do oštećenja. Primjerice, klor-tirozil je specifičan biljeg oksidacijskog oštećenja uslijed djelovanja hipokloritne kiseline koji upućuje na aktivaciju neutrofila i monocita u oksidacijskom stresu, dok nitro-tirozil upućuje na prisutnost povećane sinteze peroksinitrita. Ditirozil je najosjetljiviji biljeg oksidacijskog stresa uslijed djelovanja  $\gamma$  zračenja, dok se proteinski karbonili smatraju biljegom ozbiljnog oksidacijskog oštećenja [38].

Proteinski karbonili nastaju uvođenjem karbonilnih skupina u proteine kao posljedica djelovanja ROS-a ili reaktivnih aldehida te reaktivnih karbonilnih derivata [39] (Slika 3). Ukupnoj karbonilaciji proteina pridonosi razina stvaranja ROS-a, razlika u otpornosti pojedinih proteina na oksidacijsko oštećenje te mogućnost rješavanja oštećenih proteina degradacijom [40]. Umjereno karbonilirani proteini razgrađuju se proteolizom, dok se teško karbonilirani proteini povezuju međusobno kovalentnim vezama u netopljive proteinske aggregate otporne na proteoliznu razgradnju.

Mjerenje proteinskih karbonilnih derivata (eng. *Protein Carbonyl Derivatives*, PCD) široko je prihvaćen biljeg oksidacijskog stresa i oksidacijskog oštećenja proteina zbog nastajanja ireverzibilne modifikacije proteina te zbog same veličine nastalih modifikacija koje su znatno veće nego kad se javljaju na specifičnim aminokiselinama [41,42].



**Slika 3.** Nastanak proteinskih karbonila.

Karbonilne skupine nastaju: izravnom oksidacijom izloženih bočnih lanaca hidrofilnih aminokiselina prolina, arginina, lizina i treonina; oksidacijskom fragmentacijom polipeptidnog lanca; djelovanjem reaktivnih aldehida nastalih u procesu lipidne peroksidacije na lizinske, histidinske i cisteinske ogranke što rezultira nastajanjem uznapredovalih lipooksidacijskih produkata (eng. *Advanced Lipoxidation End-Products*, ALEs); glikacijom/glikooksidacijom amino skupine lizinskih ogranaka pri čemu nastaju uznapredovali glikacijski produkti (eng. *Advanced Glycation End-Products*, AGEs).

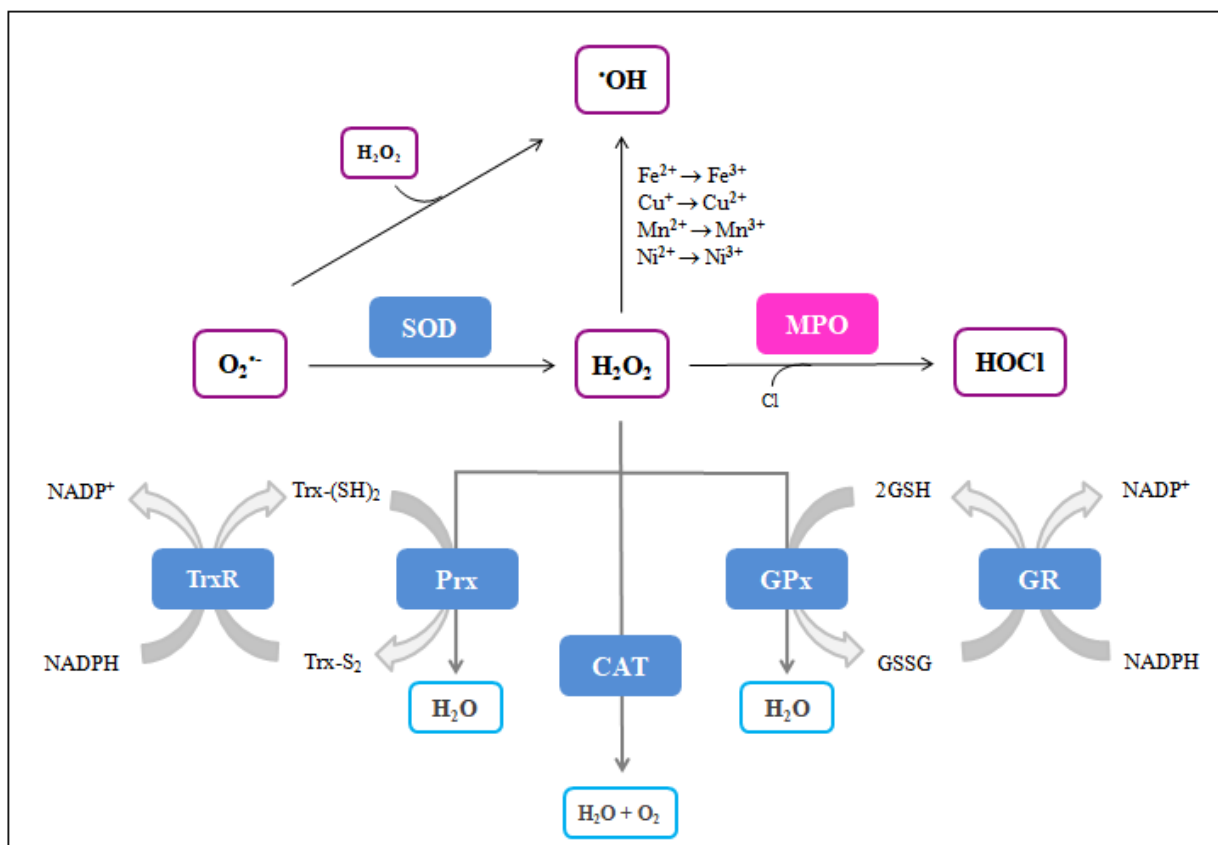
### 1.2.2.3 Oksidacijsko oštećenje nukleinskih kiselina

Oštećenja nukleinskih kiselina uzorkovana djelovanjem ROS-a povezana su s oksidacijom šećernih komponenti te pirimidinskih i purinskih baza koja dovodi do kidanja okosnice nukleotidnog lanca (jednostruki lom ili dvostruki lom), otkidanja baza, nastajanja mutacija te povezivanja DNA i proteina [43]. Oksidacijskim promjenama izrazito je podložna mitohondrijska DNA jer nije zaštićena histonima i nalazi se u okruženju glavnih izvora nastajanja ROS-a [44]. Osim izravnog djelovanja, ROS mogu djelovati na DNA posredno, djelujući na proteine koji sudjeluju u njezinom popravku. Vrlo česta meta djelovanja ROS-a je gvanin, a mjerenje 8-hidroksi-2'-deoksigvanozina (8OHdG) u plazmi ili serumu, mokraći, slini te raznim tkivima predstavlja najčešće korišten biljeg oksidacijskog oštećenja DNA [45,46].

### 1.2.3 Antioksidacijska obrana

Za uklanjanje/neutralizaciju nastalih ROS-a i odražavanje redoks homeostaze odgovorni su antioksidansi. Definiraju se kao tvari koje sprječavaju oksidacijske procese i smanjuju ili onemogućuju oksidaciju supstrata čak i ako su prisutni u značajno nižim koncentracijama od samog supstrata [47]. Većina antioksidansa nastaje u organizmu te se nazivaju endogeni antioksidansi, dok se egzogeni antioksidansi unose u organizam putem hrane ili kao dodaci prehrani. U egzogene antioksidanse ubrajaju se vitamin E,  $\beta$ -karoten (prethodnik vitamina A) važni u inhibiciji LPO [33], vitamin C značajan antioksidans u plazmi, kao i likopen iz rajčice, flavonoidi iz bobičastog voća te polifenoli iz crnog vina i zelenog čaja.

Najznačajniji endogeni antioksidansi su antioksidacijski enzimi koji ROS odstranjuju katalitičkim putem, dok neenzimski antioksidansi poput transferina, haptoglobina, ceruloplazmina, glutaciona, mokraćne i lipoične kiseline umanjuju djelotvornost prooksidansa, primjerice iona metala, ili pomažu antioksidacijsku regeneraciju. Antioksidacijski sustav enzima (Slika 4) vrlo je složen i sastoji se od primarnih antioksidacijskih enzima kao što su superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPx) i katalaza (CAT) te sekundarnih antioksidacijskih enzima kao što su glutation reduktaza (GR), tioredoksin reduktaza (TrxR) i glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PD) koji regeneriraju antioksidanse ili koenzime antioksidacijskih enzima.



**Slika 4.** Sustav antioksidacijskih enzima.

Superoksid dismutaza (SOD) katalizira dismutaciju superoksidnog aniona ( $O_2^{\cdot-}$ ) pri čemu nastaje stabilan vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) koji može reagirati s  $O_2^{\cdot-}$  ili u Fentonovoj reakciji s ionima prijelaznih metala dajući izuzetno štetni hidroksilni radikal ( $\cdot OH$ ) te može djelovanjem mijeloperoksidaze (MPO) prijeći u hipokloritnu kiselinu (HOCl). Katalaza (CAT) odstranjuje  $H_2O_2$  razgradnjom u vodu i kisik, a glutation peroksidaza (GPx) i peroksiredoksin (Prx) razgradnjom u vodu. Glutation reduktaza (GR) i tioredoksin reduktaza (TrxR) reduciraju glutation i tioredoksin potreban za reakcije GPx i Prx.

### Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza predstavlja prvu liniju obrane od visoko reaktivnog superoksidnog radikala pretvarajući ga u manje reaktivan  $H_2O_2$  i kisik. Kod sisavaca postoje tri izoforme SOD koje su produkti različitih gena, ali sve zahtijevaju redoks aktivni prijelazni metal u aktivnom centru kako bi postigle katalitičku razgradnju superoksidnog aniona. SOD1 ili CuZnSOD je dimer koji u aktivnom centru sadrži bakar i cink, primarno smještena u citosolu s malom frakcijom u međumembranskom mitohondrijskom prostoru [48]. SOD2 ili

MnSOD je tetramer s kofaktorom manganom, smještena u matriksu mitohondrija [49]. SOD3 ili ekstracelularna SOD (EcSOD) je izvanstanična CuZnSOD, koja se kod ljudi nalazi u intersticijskim prostorima tkiva, a čini većinu SOD aktivnosti plazme, limfne i sinovijske tekućine [50]. SOD1 i SOD3 su izuzetno osjetljive na inhibiciju cijanidom, a sve tri izoforme podliježu inhibiciji od strane svog produkta  $H_2O_2$ .

#### Glutation peroksidaza i katalaza

Glavnu ulogu u uklanjanju  $H_2O_2$  imaju glutacione peroksidaze i katalaze. Glutacione peroksidaze su tetrameri od četiri podjedinice od kojih svaka sadrži po jedan atom selena u obliku selenocisteina koji tvori aktivni centar enzima. Do sada je poznato 8 izoformi GPx, različito raspoređenih po tkivima, a nastalih od različitih gena. GPx razgrađuje najveći dio  $H_2O_2$  u stanici pri fiziološkim uvjetima, uključujući i lipidni hidroperoksid te ima važnu ulogu pri uklanjanju  $H_2O_2$  pri niskim razinama. Zapravo, smatra se da ovi enzimi imaju ulogu u održavanju odgovarajuće fiziološke razine  $H_2O_2$  koja je važna za održavanje stanične signalizacije i funkcioniranje stanica [51].

S druge strane, aktivnost katalaze ima važnu ulogu pri uklanjanju prekomjernih razina  $H_2O_2$  [52] te se katalaza smatra jednim od najdjelotvornijih enzima u uvjetima oksidacijskog stresa [53]. Katalaza se sastoji od četiri podjedinice od kojih svaka u aktivnom centru sadrži željezo. Poznata su tri izoenzimska oblika (A, B, C) koja nastaju posttranslacijskom modifikacijom ishodišnog proteina. U stanici enzim ima najveću koncentraciju u peroksisomima, prisutan je u citosolnoj frakciji, a u mitohondrijima je prisutan u malim koncentracijama ili ga uopće nema.

Regulacija antioksidacijskih enzima vrlo je složena i prisutna je na translacijskoj i transkripcijskoj razini, kao i na razini same aktivnosti. Uloga sirtuina u regulaciji antioksidacijskih enzima opisan je u poglavlju 1.4.



### 1.3 Ronjenje i oksidacijski/antioksidacijski status

Dosadašnja istraživanja o utjecaju ronjenja na oksidacijski/antioksidacijski (O/A) status jesu malobrojna te su provedena na profesionalnim roniocima. Najveći broj radova potječe od grupe španjolskih istraživača među kojima se ističu imena Ferrer i Sureda, kao glavnih autora. Njihovi su radovi obuhvatili promjene O/A statusa u različitim krvnim frakcijama, premda su istraživanja provedena na svega dva zarona. Rad spomenutih autora, objavljen 2007. godine, ispitivao je promjene O/A statusa u limfocitima kod 7 ronilaca nakon ronjenja s komprimiranim zrakom na 40 metara dubine u trajanju od 25 minuta te promjene nakon hiperbarične oksigenacije (HBO) kod 12 fizički aktivnih muškaraca koji su u komori disali 100%-tni kisik pod tlakom od 2,2 ATA (222,9 kPa) tijekom 60 minuta [31]. Rezultati su pokazali da hiperoksija koja prati HBO i ronjenje dovodi do porasta limfocitne produkcije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i aktivnosti GPx, dok je porast limfocitne razine nitrita i aktivnosti katalaze zabilježen samo nakon ronjenja.

Radom iz 2008. godine, u kojem su praćene promjene O/A statusa u plazmi i eritrocitima, pokazano je da ronjenje na 40 metara dubine ne dovodi do promjena biljega oksidacijskog oštećenja lipida (mjenjenih kolorimetrijskim određivanjem MDA), proteina (mjenjenih određivanjem PCD-a) te MDA-proteinskih adukata (mjenjenih ELISA metodom) ni u plazmi ni u eritrocitima, dok je zabilježeno povećanje razine nitrita u plazmi i eritrocitima, kao i u prethodnom radu kod limfocita, te porast aktivnosti katalaze i SOD, ali samo u plazmi, a ne i u eritrocitima [54].

Ista grupa autora nakon još jednog istraživanja na 9 ronilaca koji su ronili s komprimiranim zrakom na 50 metara dubine u trajanju od 35 minuta pratila je promjene O/A statusa u plazmi [55] i neutrofilnim granulocitima [56]. Promjene O/A statusa u plazmi pokazale su porast biljega oksidacijskog oštećenja lipida (mjenjenih kolorimetrijskim određivanjem MDA) i DNA (mjenjenih određivanjem 8OHdG), razine nitrita, porast aktivnosti katalaze, SOD i MPO aktivnosti te proteinske ekspresije SOD i MPO [55]. S druge strane, rezultati istraživanja u neutrofilnim granulocitima pokazali su da ronjenje na 50 metara dubine ne uzrokuje promjenu MDA u neutrofilima, ali uzrokuje porast razine nitrita i nitrotirozina, biljega oksidacijskog oštećenja proteina [56].

Veliki broj istraživanja o utjecaju ronjenja s različitim plinskim smjesama na kardiovaskularne promjene proveli su Dujčić i suradnici. U jednom od njihovih istraživanja,

provedenom na 7 ronilaca, pokazan je porast razine lipidne peroksidacije (mjerene TBARS metodom) nakon šest uzastopnih trimix ronjenja na 55 do 80 metara dubine [57]. Ista grupa autora pokazala je da antioksidacijska suplementacija smanjuje endotelnu disfunkciju koja se opaža nakon ronjenja, međutim, biljezi O/A statusa nisu mjereni u ovim istraživanjima [58,59].

Morabito i suradnici proveli su istraživanje na 6 ronilaca kod različitih protokola ronjenja u kojima su ispitivali utjecaj disanja 100%-tnog kisika pri različitom tlaku odnosno dubinama (0, 6 i 12 metara), prije zarona s komprimiranim zrakom na 30 metara u trajanju od 25 minuta [60]. Ovo istraživanje nije pokazalo porast limfocitne  $H_2O_2$  produkcije, što je u suprotnosti s navedenim rezultatima Ferrera i suradnika, dok je porast aktivnosti limfocitne katalaze bio zabilježen nakon svih protokola ronjenja.

Prvo veće istraživanje o utjecaju ronjenja na O/A status proveli su Radojević-Popović i suradnici. Istraživanje je obuhvatilo 32 policijska ronioca koji su s komprimiranim zrakom ronili na dubinu od 30 metara u trajanju od 30 minuta, a rezultati su pokazali porast TBARS i nitritne razine u plazmi, dok plazmatski porast  $H_2O_2$  i  $O_2^{\cdot-}$  nije bio zabilježen [61]. Navedeno istraživanje nije pokazalo promjene aktivnosti katalaze i SOD koje su praćene u eritrocitima, što je u skladu s prethodnim rezultatima Surede i suradnika koji su promjene aktivnosti ovih enzima zamijetili samo u plazmi, ali ne i u eritrocitima. Međutim, drugo istraživanje istih autora, provedeno na 10 policijskih ronilaca, na istoj dubini i s istim trajanjem zarona pokazalo je nešto drugačije rezultate, a razlike su autori pripisali redovitom treningu odnosno uvježbanosti ronilaca [62]. Nakon ovog zarona koje je provedeno tijekom redovitih ronilačkih treninga, TBARS vrijednosti u plazmi ostale su nepromijenjene, a uočen je porast plazmatskog  $H_2O_2$  i  $O_2^{\cdot-}$ . Kao i u prethodnom istraživanju, u ovom istraživanju promjene aktivnosti eritrocitne katalaze i SOD nisu opažene.

Ukupno gledajući navedena istraživanja, jasno je da različite vrste uzorka, odabrani biljezi O/A statusa, različite metode te uvježbanost ronilaca utječu na interpretaciju rezultata istraživanja. Premda nove spoznaje u različitim frakcijama krvi donose nova otkrića, smjernice koje bi preporučile vrste uzorka, kao i standardizirane metode mogle bi biti korisne za praćenje promjena O/A statusa.

## 1.4 Uloga SIRT1 i SIRT3 u oksidacijskom stresu

### 1.4.1 Sirtuini

Sirtuini su evolucijski visoko očuvani proteini koji se nalaze u svim oblicima života od prokariota do eukariota. Prvi poznati sirtuin, Sir2 (eng. *Silent Information Regulator Two*) otkriven je u kvascima *Saccharomyces cerevisiae* kao tihi regulator utišavanja gena, popravaka DNA, stabilnosti kromosoma i molekularnih procesa povezanih sa starenjem [63]. Kod sisavaca, do sada je otkriveno sedam proteina homolognih sa Sir2 koji su nazvani sirtuini (eng. *Sirtuins*, SIRTs) (Slika 5).

Sirtuini pripadaju klasi III histon deacetilaza (HDAC) čije je obilježje ovisnost katalitičke aktivnosti o  $\text{NAD}^+$ -u. Katalitička domena, koja je zajednička svim članovima ove obitelji, sastoji se od 275 aminokiselina i može djelovati kao  $\text{NAD}^+$  ovisna deacetilaza (DAC) i/ili ADP-ribozil transferaza (ART). Dok je primarna aktivnost većine sirtuina uloga deacetilaze, glavna aktivnost SIRT4 jest uloga ADP-ribozil transferaze, koju također posjeduje i SIRT6 [64]. Za SIRT5, osim aktivnosti deacetilaze, karakteristično je da može demalonirati i desukcinirati proteine [65]. Istraživanja su pokazala da sirtuini kod sisavaca imaju svoju lokalizaciju unutar stanice. SIRT1, SIRT6 i SIRT7 smatraju se nuklearnim proteinima, SIRT2 se nalazi uglavnom u citoplazmi gdje je njegov glavni supstrat  $\alpha$ -tubulin [66], dok se SIRT3, SIRT4 i SIRT5 nazivaju mitohondrijski sirtuini.

	Glavna aktivnost	Br. aminokiselina	kDa	Primarna lokalizacija
SIRT1	DAC	746	62,0	eukromatin
SIRT2	DAC	388	41,5	citoplazma
SIRT3	DAC	399	43,6	mitohondrij
SIRT4	ART	314	35,2	mitohondrij
SIRT5	DAC	310	33,9	mitohondrij
SIRT6	DAC i ART	355	39,1	heterokromatin
SIRT7	DAC	400	44,8	nukleolus

**Slika 5.** Članovi obitelji sirtuina. DAC - deacetilaza, ART - ADP-ribozil transferaza.

Sirtuini imaju ulogu u mnogim posttranslacijskim modifikacijama koje dovode do promjena katalitičke aktivnosti, stabilnosti i sposobnosti vezanja na druge proteine te u staničnoj signalizaciji i transkripcijskom reguliranju ekspresije gena. Time sudjeluju u različitim staničnim procesima kao što su popravak DNA, stabilnost genoma, apoptoza, upalni odgovor, regulacija staničnog ciklusa i mitohondrijske funkcije te antioksidacijske obrane.

Veliki interes za sirtuine zapravo je potaknut njihovom ulogom u blagotvornim učincima energijske ili kalorijske restrikcije (eng. *Calorie Restriction*, CR) povezanih s produženjem životnog vijeka. Naime, brojna istraživanja pokazala su da CR promiče produljenje životnog vijeka do 50% kod mnogih organizama uključujući kvasce, crve, muhe i miševе [67] te da CR može potaknuti aktivnost gotovo svih sirtuina, osim aktivnosti SIRT4 [68]. Učinak CR na aktivnost sirtuina posredovan je velikim dijelom dostupnošću NAD<sup>+</sup>, čija se razina tijekom CR povećava [69]. Međutim, pokazalo se također, da CR može povećati proteinsku ekspresiju SIRT1, SIRT2, SIRT3 i SIRT5 [70-72]. Molekularni mehanizmi utjecaja CR i sirtuina na produženje životnog vijeka još uvijek nisu jasni, ali se smatra da su povezani sa smanjenom produkcijom ROS-a, jačanjem antioksidacijske obrane kao i smanjenjem težine metaboličkih poremećaja povezanih sa starenjem [72,73]. Identifikacija lijekova ili nutrijenata koji mogu povećati aktivnost sirtuina i imitirati utjecaj CR predstavlja se kao obećavajuća strategija u ublažavanju bolesti povezanih s nakupljanjem ROS-a i starenjem [5]. Predlaže se i praćenje promjene razine aktivnosti sirtuina u krvi kao dijagnostičkog biljega za procjenu slabosti i sklonosti razvoju bolesti [74].

Dok je utjecaj sirtuina na produženje životnog vijeka još uvijek tema mnogih istraživanja i znanstvenih rasprava, korisni učinci sirtuina u pogledu ljudskog zdravlja i kvalitete starenja naširoko su prihvaćeni [64,68,75]. Osim CR, pokazano je da redovita fizička aktivnost može utjecati na aktivnost ukupnih sirtuina te da se njihova aktivnost mijenja sa životnom dobi [76]. Zbog uloge SIRT1 i SIRT3 u antioksidacijskom odgovoru te uloge SIRT3 u regulaciji mitohondrijskog energijskog metabolizma, poseban interes u adaptacijskom odgovoru na fizičku aktivnost usmjeren je na SIRT1 i SIRT3 članove obitelji sirtuina [77].

### 1.4.2 Sirtuin 1

SIRT1 je najviše istraživani član obitelji sirtuina koji zajedno sa SIRT3 ima važnu ulogu u odgovoru na oksidacijski stres. Gen koji kodira SIRT1 protein kod ljudi se nalazi na 10. kromosomu, a SIRT1 protein eksprimira se u širokom rasponu tkiva i organa. Premda je najvećim dijelom smješten u jezgri, kod nekih je stanica pronađen i u citosolu [78]. Posljednjih desetljeća otkrivene su brojne mete SIRT1, kao i značaj njegove deacetilacijske uloge u mnogim fiziološkim i patološkim procesima (Tablica 2).

Uloga SIRT1 u odgovoru na oksidacijski stres povezana je s njegovim djelovanjem na transkripcijske faktore FOXO3a (eng. *Forkhead box O3a*) i p53. Deacetilacijom FOXO3a, SIRT1 inducira prijelaz gena *SOD2* i *CAT*, dok deacetilacijom p53 aktivira prijelaz gena *SOD2* i *GPx1* [3,101]. Još jedna potencijalna redoks meta SIRT1 jest PGC1 $\alpha$  (eng. *Peroxisome proliferation-activated receptor Gamma Coactivator-1 $\alpha$* ) koji je uključen u regulaciju ekspresije gena *SOD2* [102].

Smatra se da blagi uvjeti oksidacijskog stresa induciraju ekspresiju gena *SIRT1*, mijenjaju njegovu aktivnost na proteinskoj razini i time utječu na njegove redoks mete koje su uključene u prijelaz gena koji kodiraju za antioksidacijske enzime [3,101]. S druge strane, pokazalo se da visoke razine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dovode do inaktivacije SIRT1 te njegove razgradnje [103] koja vodi aktiviranju FOXO3a i p53 posredovane apoptoze [104,105]. Ovim mehanizmima SIRT1 je predstavljen kao redoks senzor razine oksidacijskog stresa, koji ovisno o razinama ROS-a može potaknuti protektivne antioksidacijske odgovore ili mehanizme apoptoze.

Istraživanja su pokazala da se razina i aktivnost SIRT1 smanjuju sa starenjem [106,107], da pušenje utječe na degradaciju SIRT1 [108] te da su polifenoli moćni modulatori SIRT1 aktivnosti [109]. Resveratrol (polifenol, naročito zastupljen u crnom vinu), CR i redovita tjelovježba smatraju se prirodnim aktivatorima SIRT1 koji utječu na njegovo protektivno djelovanje [5].

**Tablica 2.** Neke od SIRT1 staničnih meta i značaj SIRT1 deacetilacije.

<b>SIRT1 mete</b>	<b>Značaj SIRT1 deacetilacije</b>
Histon 1	
Histon 3	Preoblikovanje kromatina i regulacija ekspresije gena [79]
Histon 4	
p53	Regulacija apoptoze i antioksidacijskog odgovora [3,80,81]
Ku70	Sprječavanje apoptoze, povećanje aktivnosti popravka DNA [82]
FOXO1	Regulacija homeostaze glukoze i angiogeneze [83,84]
FOXO3a	Regulacija apoptoze i antioksidacijskog odgovora [85]
FOXO4	Povezano s ulogom deacetilacije FOXO3a [86,87]
NFκB	Suzbijanje prekomjerne upale [88]
PGC-1α	Indukcija glukoneogeneze, β-oksidacije masnih kiselina i mitohondrijske biogeneze [89]
PPARγ	Inhibicija lipogeneze, poticanje lipolize [90]
PPARα	Indukcija β-oksidacije masnih kiselina tijekom kalorijske restrikcije [91]
UCP2	Sekrecija inzulina → poboljšanje funkcije gušterače [92]
eNOS	Suzbijanje upale, vazodilatacija [93]
LXRs	Smanjenje triglicerida i LDL kolesterola, povećanje HDL kolesterola [94]
SREBP1	Redukcija sinteze triglicerida i odlaganja masti u jetri [95]
CLOCK	Regulacija cirkadijalnog ritma [96]
Atg5	Čišćenje stanica aktivacijom autofaga koji razgrađuju i recikliraju oštećene i nefunkcionalne makromolekule i stanične komponente - tumor supresor [97,98]
Atg7	
Atg8	
c-Myc	Aktivacija/inhibicija staničnog rasta i transformacije, uloga SIRT1 kao tumor supresora ili promotora ? [99]
HIF-1α	Smanjenje HIF-1α transkripcijske aktivnosti kojom se sprječava povećana isporuka kisika u hipoksičnoj regiji - tumor supresor [100]

FOXO (eng. *Forkhead box class O*), NFκB (eng. *Nuclear Factor-κB*), PGC-1α (eng. *Peroxisome proliferation-activated receptor Gamma Coactivator-1α*), PPAR (eng. *Peroxisome Proliferation-Activated Receptor*), UCP2 (eng. *Uncoupling Protein Gene 2*), eNOS - endotelna sintaza dušikovog oksida (eng. *endothelial Nitric Oxide Synthase*), LXR (eng. *Liver X Receptors*), SREBP1 (eng. *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1*), CLOCK (eng. *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*), Atg (eng. *Autophagy-related proteins*), HIF-1α (eng. *Hypoxia-Inducible Factor 1α*).

### 1.4.3 Sirtuin 3

SIRT3 je jedini sirtuin za kojeg su istraživanja pokazala da su određeni polimorfizmi u njegovom genu povezani s dužim životnim vijekom kod ljudi [110-112]. Ljudski SIRT3 postoji u dvije izoforme; duža izoforma (44 kDa) koja nastaje prijenosom gena na 11. kromosomu i kratka izoforma (29 kDa) koja nastaje nakon unosa u mitohondrij i djelovanja mitohondrijske matriksne peptidaze. Premda se smatralo da samo kraća izoforma u mitohondriju ima aktivnost deacetilaze, istraživanja su pokazala da i duža izoforma koja se može naći u jezgri i citoplazmi također može djelovati kao aktivni enzim odnosno deacetilaza [113,114]. SIRT3 se nalazi u različitim tkivima i organima, a naročito je zastupljen u organima i tkivima s intenzivnim metabolizmom kao što su srce, mišići, mozak, jetra i masno tkivo [115].

SIRT3 je glavna mitohondrijska deacetilaza koja djelujući na svoje brojne mete igra važnu ulogu u regulaciji mitohondrijskog energijskog metabolizma i redoks homeostaze (Tablica 3). Djelujući na metaboličke puteve u mitohondrijima, koji uključuju Krebsov ciklus, respiratorni lanac prijenosa elektrona i oksidaciju masnih kiselina, SIRT3 utječe na proizvodnju ATP-a, a s druge strane njegova uloga u održavanju redoks homeostaze omogućuje neutralizaciju prekomjerne produkcije ROS-a. Uloga SIRT3 u oksidacijskom stresu povezana je izravno s aktivacijom SOD2, koju deacetilira i tako promiče njenu aktivnost [119]. S druge strane, djelujući na izocitrat dehidrogenazu 2 (IDH2) i glutamat dehidrogenazu (GDH) osigurava dostupnost NADPH, potrebnu za regeneraciju glutationa [120]. Osim toga, SIRT3 djelujući na FOXO3a može utjecati na ekspresiju gena *SOD2* i *CAT* [122].

Istraživanja su pokazala da se aktivnost SIRT3 smanjuje sa starenjem [129], u uvjetima prehrane bogatom masnoćama te u stanjima poput dijabetesa [130], dok se povećava kao odgovor na CR i tjelovježbu [131]. Opaženo je također, da izlaganje hladnoći može povećati ekspresiju gena *SIRT3* u smeđem masnom tkivu [132]. Zbog povezanosti pada mitohondrijskog energijskog metabolizma s dobi, kao i povezanosti prekomjernog stvaranja ROS-a s mnogim bolestima te procesom starenja, fiziološka ili farmakološka aktivacija SIRT3 predstavlja obećavajuću strategiju u ublažavanju (pato)fizioloških procesa povezanih sa starenjem.

**Tablica 3.** Neke od SIRT3 staničnih meta i značaj SIRT3 deacetilacije.

<b>SIRT3 mete</b>	<b>Značaj SIRT3 deacetilacije</b>
AceCS2	Povećanje dostupnosti acetil-CoA za ciklus trikarboksilnih kiselina, sintezu masnih kiselina, kolesterola [116]
Kompleks I i III lanca prijenosa elektrona	Povećanje učinkovitosti elektronskog transporta, što umanjuje prekomjernu produkciju ROS-a [117] Regulacija ATP sinteze i mitohondrijskog energijskog metabolizma [118]
SOD2	Povećanje SOD2 aktivnosti [119]
GDH	Produkcijom $\alpha$ -ketoglutarata tijekom niskog unosa glukoze u stanicu (kalorijska restrikcija, dijabetes) utječe na produkciju ATP-a, a regeneracijom NADPH utječe na regeneraciju oksidiranog glutaciona [120]
IDH2	Regeneracijom NADPH utječe na regeneraciju oksidiranog glutaciona [120]
SDH	Regulacija ciklusa trikarboksilnih kiselina [121]
FOXO3a	Regulacija antioksidacijskog odgovora [122]
p53	Zaustavljanje p53 inducirano rasta tumora - tumor supresor [123]
Ku70	Sprječavanje Bax-posredovane apoptoze - otpornost na oksidacijski stres [113]
Cyp D	Usporavanje pada mitohondrijske funkcije povezane sa starošću [124]
HIF-1 $\alpha$	Smanjenje HIF-1 $\alpha$ transkripcijske aktivnosti te time sprječavanje angiogeneze i povećane isporuke kisika u hipoksičnoj regiji - tumor supresor [125]
LCAD	Oksidacija masnih kiselina [126]
LDH A	Promicanje anaerobne glikolize [127]
HMGCS2	Produkcijom ketona tijekom niskih vrijednosti glukoze (kalorijska restrikcija, dijabetes) utječe na produkciju ATP-a [128]

AceCS2 - acetil-CoA sintetaza 2, SOD2 - superoksid dismutaza 2, GDH - glutamat dehidrogenaza, IDH2 - izocitrat dehidrogenaza 2, SDH - sukcinat dehidrogenaza, FOXO3a (eng. *Forkhead box class O3a*), CypD - ciklofilin D, HIF-1 $\alpha$  (eng. *Hypoxia-Inducible Factor 1a*), LCAD - acil-CoA dehidrogenaza dugih lanaca, LDH A - laktat dehidrogenaza A, HMGCS2 - 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA sintaza 2.



## 1.5 Svrha i ciljevi rada

Zahtjevna fizička aktivnost tijekom ronjenja s komprimiranim zrakom, kao i izlaganje hiperoksiji koja nastaje zbog disanja kisika pod povišenim tlakom utječu na povećano stvaranje ROS-a tijekom ronjenja. Povećano stvaranje ROS-a može voditi oksidacijskom stresu i porastu oksidacijskog oštećenja staničnih komponenti kao što su lipidi, proteini i DNA. S druge strane konstantno, blago povećanje ROS-a može dovesti do adaptacijskih odgovora organizma i učinaka hormona koji uključuju ne samo porast antioksidacijske obrane već i aktivaciju mnogih signalnih puteva i metaboličkih procesa.

Svrha je ovog rada pridonijeti razumijevanju utjecaja povećane produkcije ROS-a na mehanizme antioksidacijske obrane, kao i ostale adaptacijske i fiziološke odgovore organizma povezane s ulogom SIRT1 i SIRT3.

Glavni je cilj ovog istraživanja bio ispitati promjene oksidacijskog/antioksidacijskog statusa i ekspresije gena *SIRT1* i *SIRT3* nakon zarona s komprimiranim zrakom, kod rekreacijskih ronilaca koji nisu ronili tijekom zimskog razdoblja. Kako bi se ostvario zadani cilj provedeni su sljedeći postupci:

- organiziran je eksperimentalni zaron na dubinu do 30 metara u kojem su sudjelovali rekreacijski ronilci koji nisu ronili tijekom zimskog razdoblja
- uzorci krvi prikupljeni su u četiri vremenske točke, neposredno prije i nakon eksperimentalnog zarona te 3 i 6 sati nakon ronjenja
- praćene su promjene broja krvnih stanica i ostalih parametara kompletne krvne slike
- iz uzoraka krvi izdvojena je plazma i izolirani su eritrociti i mononuklearne stanice
- praćeni su biljezi oksidacijskog oštećenja proteina i lipida u lizatima eritrocita i u plazmi
- praćene su aktivnosti antioksidacijskih enzima; katalaze, SOD1, SOD2 i ukupne SOD u mononuklearnim stanicama krvi
- praćena je ekspresija gena *CAT*, *SOD1* i *SOD2* te *SIRT1* i *SIRT3* u mononuklearnim stanicama krvi
- ispitana je povezanost promjena genskih ekspresija sirtuina i antioksidacijskih enzima te povezanost rezultata sa životnom dobi ispitanika.

Istraživanja (pato)fizioloških odgovora ljudskog tijela na promjene koje su prisutne tijekom ronjenja mogu imati ključnu ulogu u daljnjem razvoju ronilačkih protokola koji bi trebali pratiti širenje ove sportske i rekreacijske aktivnosti te u razumijevanju štetnih i protektivnih učinaka ROS-a koji nastaju tijekom ronjenja. Budući da mnogi rekreacijski ronionci ne prakticiraju redovito ronjenje, primjerice tijekom zimskog razdoblja, osobit značaj trebalo bi posvetiti primjerenj dubini nakon razdoblja ne ronjenja koja je zapravo ključna u nastanku hiperoksije.

## **2 MATERIJALI I METODE**

## 2.1 Materijali

U radu su korišteni sljedeći materijali.

### Kemikalije

- Agens (smola) za uklanjanje lipida (Sigma)
- Bradfordov reagens (Sigma)
- Bromfenol plavo (Sigma)
- $\beta$ -merkaptotanol (Sigma)
- Etanol, 96%-tni (Kemika)
- Etanol, 99,9%-tni (Sigma)
- Etilen-diamin-tetraoctena kiselina, EDTA (Sigma)
- Fiziološka otopina (Braun)
- Formaldehid (Sigma)
- Formamid (Sigma)
- Fosfatni pufer, PBS, pH 7,4
- GelRed otopina za bojanje nukleinskih kiselina (Olerup SSP)
- Glicerol (Sigma)
- Histopaque-1077 (Sigma)
- Inhibitor proteaza koktel tablete (Roche Diagnostics)
- Kalijev cijanid, KCN (Kemika)
- Kalijev hidrogenfosfat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma)
- Kalijev klorid, KCl (Sigma)
- Kloridna kiselina, HCl, 99-100%-tna (Kemika)
- Mlijeko u prahu (Roth)
- Morfolinpropansulfonska kiselina, MOPS (Sigma)
- N-butanol (Kemika)
- Natrijev acetat (Sigma)
- Natrijev dodecilsulfat, SDS (Sigma)
- Natrijev hidrogenfosfat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma)
- Natrijev hidroksid, NaOH (Kemika)
- Natrijev klorid, NaCl (Sigma)
- Octena kiselina, 99-100%-tna (Kemika)

- Trifluorocetna kiselina, TFA, 99-100%-tna (Sigma)
- Tween®20 (Roth)
- Vodikov peroksid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30%-tni (Sigma)
- 1,1,3,3-tetrametoksipropan, TMP (Sigma)
- 2- tiobarbiturna kiselina, TBA, 98-100%-tna (Sigma)
- 2,4-dinitrofenilhidrazin, DNPH (Sigma)
- 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, TMB (ThermoFisher Scientific)

### **Komercijalni kompleti („kitovi“)**

- RANSOD antioxidant kit (Randox)
- Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare)
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

### **Protutijela**

- Zečje poliklonsko protutijelo razvijeno naspram DNPH (Sigma)
- Kozje poliklonsko protutijelo konjugirano s peroksidazom iz hrena (eng. *Horseradish Peroxidase*, HRP) razvijeno naspram zečjeg IgG (imunoglobulin G) protutijela (Jackson ImmunoResearch)

## 2.2 Ispitanici

U istraživanje je bilo uključeno 17 rekreacijskih ronilaca, muškog spola koji nisu ronili tijekom zimskog razdoblja (najmanje 5 mjeseci). Ispitanici su upoznati sa svrhom i tijekom istraživanja te im je objašnjen plan eksperimentalnog zarona i važnost pridržavanja protokola ronjenja. Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom i svi ispitanici su potpisali informirani pristanak. Istraživanje je odobreno od Etičkog povjerenstva Opće bolnice Dubrovnik (broj odobrenja 01-355/4-3-14 od 13. lipnja 2014.) i Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (broj odobrenja 643-03/14-01/04 od 18. srpnja 2014.)

Kriteriji uključanja u istraživanje obuhvaćali su:

- ne prakticiranje ronjenja tijekom zimskog razdoblja (najmanje 5 mjeseci)
- važeća medicinska potvrda za ronjenje
- indeks tjelesne mase (eng. *Body Mass Index*, BMI) od 20 kg/m<sup>2</sup> do 30 kg/m<sup>2</sup>
- ne uzimanje antioksidacijske suplementacije i dodataka prehrani unutar 2 mjeseca prije ulaska u istraživanje
- ne uzimanje nikakvih lijekova 7 dana prije istraživanja
- suzdržavanje od vježbanja 48 sati prije istraživanja
- ne uzimanje alkohola 48 sati prije istraživanja

Kriteriji isključenja u istraživanje bili su:

- profesionalno bavljenje sportom
- pušenje
- postojanje povijesti kronične bolesti ili bilo koje klinički značajne bolesti unutar 3 mjeseca prije ulaska u istraživanje koja bi mogla utjecati na sigurnost ispitanika ili tumačenje rezultata
- smanjeni unos kalorija i gubitak težine tijekom 30 dana prije ulaska u istraživanje
- bilo kakvi znakovi dekompresijske bolesti (blaži ili teži)
- klinički značajno odstupanje u laboratorijskim pretragama

Zdravstveni status ispitanika bio je ispitan sistematskim pregledom u Poliklinici za baromedicinu i medicinu rada Oxy, u Dubrovniku. Sistematski pregled je uključivao uzimanje detaljne anamneze, antropometrijska mjerenja, mjerenja krvnog tlaka i sljedeće laboratorijske pretrage: kompletna krvna slika (KKS), bilirubin, alkalna fosfataza (AP), gama-

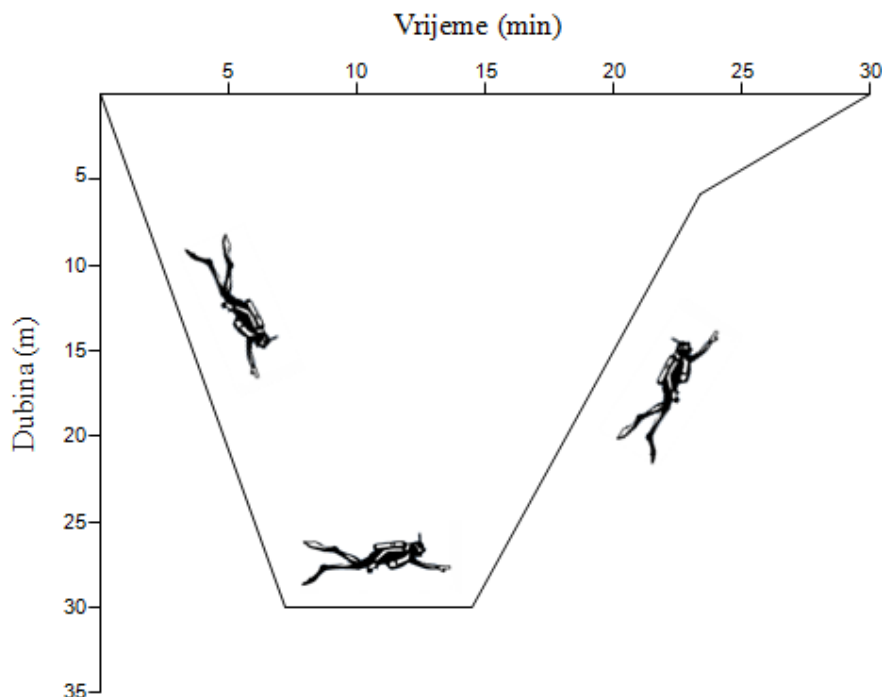
glutamiltransferaza (GGT), aspartat-aminotransferaza (AST), alanin-aminotransferaza (ALT), kreatin-kinaza (CK), laktat-dehidrogenaza (LDH), amilaza, C-reaktivni protein (CRP), ukupni proteini, ureja, kreatinin, urati, glukoza, kolesterol, trigliceridi, kalij, natrij, kloridi. Antropometrijski podaci ispitanika i dob ispitanika prikazani su u Tablici 4.

**Tablica 4.** Antropometrijski podaci i dob ispitanika.

<b>Ispitanici (n=17)</b>		
	<b>Medijan</b>	<b>Raspon</b>
<b>Godine</b>	41	(30-52)
	<b>Medijan</b>	<b>Interkvartilni raspon</b>
<b>Težina (kg)</b>	90	(85-92)
<b>Visina (cm)</b>	180	(178-185)
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	27,5	(24,9-28,4)

### 2.2.1 Eksperimentalni zaron

Eksperimentalni zaron bio je proveden 30. travnja 2016. na morskoj obali u Dubrovniku. Temperatura zraka tijekom provođenja istraživanja kretala se između 16 i 20°C, a temperatura mora bila je 16°C na površini mora i 14°C na 30 metara dubine. Ronioci su bili opremljeni ronilačkom opremom koja se sastojala od mokrih ronilačkih odjela i opreme za disanje otvorenog kruga (SCUBA oprema). Za disanje je korišten komprimirani zrak. Ronioci su ronili u skupini do 30 metara dubine, a vraćanje na površinu je provedeno postupno bez dekompresijskog zaustavljanja. Zaron je trajao 30 minuta i svih 17 ispitanika uspješno je završilo planirani zaron. Nakon izrona ispitanike je pregledao liječnik, specijalist za baromedicinu i pomorsku medicinu i nitko od ronilaca nije imao simptome dekompresijske bolesti. Profil zarona preuzet je s ronilačkih računala u svrhu analize dubine i trajanja zarona, kao i temperature mora (Slika 6).



**Slika 6.** Profil zarona preuzet s ronilačkog računala.

### 2.2.2 Uzimanje uzoraka krvi

Uzimanje uzoraka krvi u četiri vremenske točke bilo je provedeno: neposredno prije izvođenja zarona, između 9:15 i 9:45 ( $t_0$ ); neposredno nakon ronjenja, između 10:45 i 11:15 ( $t_1$ ); 3 sata nakon ronjenja, između 13:45 i 14:15 ( $t_2$ ); te 6 sati nakon ronjenja, između 16:45 i 17:15 ( $t_3$ ). U svim vremenskim točkama uzeto je po 18 mL venske krvi izravno u vakuum epruvete s  $K_2EDTA$  kao antikoagulansom (Vacuette, Greiner Bio-One GmbH). Krv je prikupljena u tri epruvete od 6 mL i jednu epruvetu od 2 mL. Vađenje krvi provedeno je u sjedećem položaju od strane stručnog osoblja i prema nacionalnim preporukama za uzorkovanje venske krvi [133]. Svi uzorci dopremljeni su na obradu u Odjel za laboratorijsku dijagnostiku Opće bolnice Dubrovnik unutar 30 minuta od vađenja krvi.



## 2.3 Metode

### 2.3.1 Određivanje parametara kompletne krvne slike

Parametri kompletne krvne slike (KKS) analizirani su unutar sat vremena od vađenja krvi na hematološkom brojaču Cell Dyn Ruby (Abbott, Illinois, SAD). Određeni su sljedeći hematološki parametri: broj leukocita, neutrofila, limfocita, monocita, bazofila i eozinofila, broj eritrocita, hemoglobin, hematokrit, prosječni volumen eritrocita (eng. *Mean Corpuscular Volume*, MCV), prosječna količina hemoglobina u eritrocitu (eng. *Mean Corpuscular Hemoglobin*, MCH), prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu (eng. *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*, MCHC), raspodjela eritrocita po volumenu (eng. *Red blood cell Distribution Width*, RDW) te broj trombocita i prosječni volumen trombocita (eng. *Mean Platelet Volume*, MPV). Kontrola kvalitete provedena je korištenjem kontrolnog materijala proizvođača hematološkog brojača (Cell-Dyn 26 Plus Control, Abbott, Wiesbaden, Njemačka).

### 2.3.2 Izdvajanje plazme i priprema hemolizata eritrocita

Epruvete od 2 mL centrifugirane su 10 minuta pri 2200 g, neposredno nakon dostave uzoraka. Izdvojena plazma vizualno je pregledana i odmah pohranjena u dva alikvota na  $-80^{\circ}\text{C}$ . U niti jednom uzorku nije zabilježena hemoliza ni lipemija. Preostali talog krvnih stanica ispiran je tri puta dodavanjem fiziološke otopine i centrifugiranjem 10 minuta pri 2200 g. Pročišćeni eritrociti su rekonstituirani i hemolizirani ledenom destiliranom vodom u istom volumenu kao što su se nalazili u plazmi. Mjerenje koncentracije hemoglobina u lizatima eritrocita vršeno je na hematološkom brojaču Cell Dyn 1800 (Abbott, Illinois, SAD), lizat eritrocita podijeljen je u dva alikvota i pohranjen na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3.3 Izolacija mononuklearnih stanica periferne krvi

Postupak izolacije mononuklearnih stanica periferne krvi (eng. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) obavljen je između jedan i dva sata od uzorkovanja krvi separacijskom tehnikom u gradijentu gustoće. Korištene su Leucosep™ epruvete od 50 mL sa separacijskom barijerom (Vacuette, Greiner Bio-One GmbH), a kao separacijski medij Histopaque-1077. Leucosep™ epruvete pripremljene su sukladno uputama proizvođača;

dodavanjem 15 mL Histopaque-1077 i centrifugiranjem 30 sekundi pri 1000 g pri čemu se separacijski medij locirao ispod barijere. Krv iz epruveta s K<sub>2</sub>EDTA (18 mL) razrijeđena je s PBS-om u omjeru 1:1, dodana u Leucosep™ epruvete te centrifugirana 15 minuta pri 1000 g s isključenom kočnicom. Bijeli prsten mononuklearnih stanica prikupljen je u sterilnu epruvetu, a zatim tri puta ispiran dodavanjem PBS-a te centrifugiranjem 10 minuta pri 300 g. Broj mononuklearnih stanica određen je na hematološkom brojaču Cell Dyn Ruby (Abbott, Illinois, SAD). Mononuklearne stanice podijeljene su u dva alikvota: za analizu genske ekspresije (~10<sup>7</sup> izoliranih mononuklearnih stanica) i za analizu aktivnosti antioksidacijskih enzima (preostale mononuklearne stanice).

U ~10<sup>7</sup> izoliranih mononuklearnih stanica dodano je 500 µL RNAspin otopine za lizu stanica, iz komercijalnog paketa za izolaciju RNA (Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit), u koju je dodano 7 µL β-merkaptetanola te je uzorak snažno vorteksiran i pohranjen na -80°C. Talog za određivanje antioksidacijskih enzima otopljen je u 400 µL PBS-a s inhibitorom proteaza (1 tableta na 5 mL PBS-a) te podijeljen u dva alikvota i pohranjen na -80°C.

Uzorci plazme, eritrocita i mononuklearnih stanica za određivanje antioksidacijskih enzima dostavljeni su na suhom ledu u Laboratorij za mitohondrijsku bioenergetiku i dijabetes Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, a uzorci mononuklearnih stanica za izolaciju RNA u Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

#### **2.3.4 Određivanje biljega oksidacijskog oštećenja**

U uzorcima eritrocita i plazme ispitan je utjecaj ronjenja na oksidacijsko oštećenje proteina i lipida. Nakon odmrzavanja, uzorci eritrocita i plazme sonificirani su četiri puta po 15 sekundi korištenjem Potter-Elvehjem homogenizatora (Braun, Biotech, Int., Njemačka) te potom centrifugirani 10 minuta pri 3000 g. U supernatantu uzoraka određeni su proteinski karbonili mjerenjem proteinskih karbonilnih derivata i produkti lipidne peroksidacije mjerenjem koncentracije TBARS-a.

#### 2.3.4.1 Određivanje proteinskih karbonila

Proteinski karbonili u uzorcima plazme i lizatima eritrocita određeni su prema metodi Vidović i suradnika [134] koja se temelji na ELISA testu (eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) - enzimskoj imunodetekciji i kvantifikaciji proteinskih karbonilnih derivata nastalih derivatizacijom karbonilnih skupina proteina s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH). Detaljnije, u uzorke je dodano 0,1 mg/1 mL uzorka silikatne smole za uklanjanje lipida te su uzorci inkubirani 60 minuta na rotirajućoj miješalici pri sobnoj temperaturi. Suspenzija je zatim centrifugirana 20 minuta pri 1000 g te je iz odvojenog supernatanta alikvot od 10  $\mu$ L iskorišten za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu. Potom je na 96-mikrotitracijsku pločicu Maxisorb well (Sigma Aldrich) nanoseno 1  $\mu$ g proteina po jažici te inkubirano preko noći pri 4°C kako bi se omogućila pasivna adsorpcija proteina na površinu jažica.

Sljedeći dan sve jažice su isprane PBS-om te su adsorbirani proteini na dnu jažica derivatizirani dodavanjem 200  $\mu$ L derivatizacijske otopine koja je pripremljena na dan pokusa otapanjem 0,02 g DNPH u 1 mL trifluoroctene kiseline te razrjeđivanjem 6  $\mu$ L pripremljene otopine u 10 mL PBS-a. Reakcija DNPH s karbonilnim skupinama na proteinima (derivatizacija) provedena je uz inkubaciju od 45 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, jažice su isprane puferom za ispiranje II (PBS i 96%-tni etanol u omjeru 1:1) četiri puta i PBS-om tri puta te je dodano 250  $\mu$ L pufera za blokiranje koji sadrži 5%-tno mlijeko u prahu u puferu za ispiranje III (0,1%-tni Tween20 u PBS-u). Nakon inkubacije od 90 minuta uz lagano miješanje na termomikseru, jažice su isprane puferom za ispiranje III tri puta te je dodano 100  $\mu$ L primarnog protutijela protiv DNP koje je razrijeđeno 1:5000 u puferu za ispiranje III. Nakon inkubacije od 120 minuta uz lagano miješanje na termomikseru, jažice su isprane puferom za ispiranje III pet puta i dodano je 100  $\mu$ L sekundarnog protutijela konjugiranog s peroksidazom pripremljenog na isti način kao i primarno antitijelo. Provedena je inkubacija od 60 minuta na termomikseru, jažice su isprane s puferom za ispiranje III pet puta i dodano je po 100  $\mu$ L enzimskog supstrata 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) uz inkubaciju od 30 minuta. Enzimska reakcija je prekinuta dodavanjem 100  $\mu$ L „Stop“ otopine (0,3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) čime se boja iz plave promijenila u žutu. Apsorbancija uzoraka očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica LabSystem Multiskan MS (Artisan Technology group, SAD) pri valnoj duljini 450 nm. Dobiveni rezultati izraženi su u nmol karbonila po mg proteina.

#### 2.3.4.2 Određivanje lipidne peroksidacije

Lipidna peroksidacija određena je spektrofotometrijskom metodom mjereći koncentraciju TBARS-a prema metodi Ohkawe i suradnika [135]. Metoda se temelji na reakciji MDA i drugih aldehida nastalih tijekom LPO s tiobarbiturnom kiselinom (TBA) i nastanku obojenog produkta čija se apsorbanacija mjeri pri valnoj duljini 532 nm.

U 100  $\mu\text{L}$  uzorka plazme ili liziranih eritrocita (lizat eritrocita razrijeđen je četiri puta) dodano je 100  $\mu\text{L}$  2%-tnog SDS-a, vorteksirano i inkubirano 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Potom je dodano 250  $\mu\text{L}$  svježe pripremljene otopine 0,8%-tne tiobarbiturne kiseline (TBA) pomiješane u jednakom omjeru s 20%-tnom octenom kiselinom i podešenog pH na 3,5. Smjesa se kuhala u vodenoj kupelji 60 minuta pri 95°C, a zatim se hladila pri sobnoj temperaturi 15 minuta te centrifugirala 15 minuta pri 3000 g. U odvojeni supernatant dodana je jednaka količina n-butanola, smjesa je vorteksirana 15 sekundi te centrifugirana 15 minuta pri 1000 g. Koncentracija TBARS-a mjerila se u gornjem obojenom sloju pri valnoj duljini 532 nm na spektrofotometru/fluorometru Tecan Infinite M200 (Männedorf, Švicarska). Kao standard koristio se 1,1,3,3-tetrametoksipropan (TMP) pripremljen otapanjem 1,6  $\mu\text{L}$  TMP-a u 98,4  $\mu\text{L}$  99,9%-tnog etanola (100 mM otopina standarda) na dan izvođenja pokusa. Od osnovne otopine standarda korištena su sljedeća razrjeđenja standarda: 10  $\mu\text{M}$ , 7,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ . Koncentracija TBARS-a u uzorcima eritrocita izražena je u nmol/g hemoglobina, a u uzorcima plazme u  $\mu\text{mol/L}$  plazme.

#### 2.3.5 Određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima

Katalitička aktivnost antioksidacijskih enzima određena je u uzorcima mononuklearnih stanica krvi spektrofotometrijskim metodama korištenjem spektrometra Camspec M330 opremljenog s M330 Camspec softverskim paketom (Camspec LTD, Cambridge, UK). Nakon odmrzavanja uzorci mononuklearnih stanica su sonificirani i centrifugirani 15 minuta pri 3000 g. Supernatant je korišten za mjerenje aktivnosti katalaze, ukupne SOD i SOD2, dok je SOD1 dobivena računski oduzimanjem aktivnosti SOD2 od ukupne SOD. Broj stanica je izračunat za svaki uzorak, a enzimska aktivnost je izražena u IU po  $10^6$  stanica.

### 2.3.5.1 Određivanje aktivnosti katalaze

Katalitička aktivnost katalaze određena je metodom po Aebiju [136] koja se temelji na praćenju sniženja apsorbancije reakcijske smjese pri valnoj duljini 240 nm, nastale kao rezultat enzimske razgradnje vodikova peroksida.

Uzorci su razrijeđeni s 50 mM fosfatnim puferom, pH 7,0 na  $\sim 0,5 \times 10^6$  stanica. Slijepa proba napravljena je dodavanjem 250  $\mu\text{L}$  50 mM fosfatnog pufera u 500  $\mu\text{L}$  razrijeđenog uzorka koji je termostatiran pri 25°C u kvarcnoj kiveti. Aktivnost katalaze ispitana je dodavanjem 250  $\mu\text{L}$  30 mM otopine  $\text{H}_2\text{O}_2$  (pripravljene iz 30%-tne  $\text{H}_2\text{O}_2$  u 50 mM fosfatnom puferu) u 500  $\mu\text{L}$  razrijeđenog termostatiranog uzorka. Enzimska aktivnost mjerila se 30 sekundi pri valnoj duljini 240 nm tako da je zabilježena početna apsorbancija nakon dodatka supstrata i apsorbancija nakon 30 sekundi. Pad u apsorbanciji u jedinici vremena mjera je aktivnosti katalaze, pri čemu je jedinica aktivnosti katalaze definirana kao količina enzima koja razgrađuje 1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  u minuti kod pH 7,0 pri 25°C. Aktivnost katalaze izražena je u  $\mu\text{mol}$  razgrađenog  $\text{H}_2\text{O}_2$  po minuti po  $10^6$  stanica ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min } 10^6$  stanica), što odgovara jedinicama katalaze po  $10^6$  stanica (IU/ $10^6$  stanica).

### 2.3.5.2 Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Katalitička aktivnost ukupne SOD određena je korištenjem komercijalnog kompleta RANSOD antioxidant kit, sukladno uputama proizvođača. Metoda koristi sustav ksantin/ksantin oksidaza za nastajanje superoksidnih radikala koji reagiraju s 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium kloridom (INT) dajući crvenu boju. Aktivnost SOD mjeri se prema stupnju inhibicije ove reakcije pri valnoj duljini 505 nm. Jedinica SOD definirana je kao količina enzima potrebnog za 50%-tnu inhibiciju reakcije u baždarnom pravcu s poznatim koncentracijama SOD.

Katalitička aktivnost SOD2 određena je se u istim uvjetima nakon što je uzorak inkubiran najmanje pola sata sa 3mM KCN-om u omjeru 1:1 kako bi se inhibirala aktivnost SOD1 [137]. Katalitička aktivnost SOD1 dobivena je oduzimanjem aktivnosti SOD2 od aktivnosti ukupne SOD.

### 2.3.6 Analiza genske ekspresije

#### 2.3.6.1 Izolacija ukupne RNA

Ukupna RNA izolirana je iz  $\sim 10^7$  PBMCs uporabom kompleta Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit, sukladno uputama proizvođača. Ukratko, za izolaciju RNA korišteni su PBMCs koji su odmah po izolaciji lizirani te pohranjeni na  $-80^\circ\text{C}$  (postupkom opisanim u poglavlju 2.3.3). U lizat je po otapanju dodano još pufera za lizu kako bi konačni volumen i sastav bio 700  $\mu\text{L}$  pufera za lizu/1%-tni  $\beta$ -merkaptotanol. Lizat je filtriran kroz RNAspin Mini Filter kolonu te je u njega potom dodano 700  $\mu\text{L}$  70%-tnog etanola u vodi kako bi se podesili uvjeti vezanja na kolonu te je tako priređena smjesa nanijeta na RNAspin Mini kolonu. Nakon centrifugiranja 30 sekundi pri 8000  $g$  filtrat je odbačen, kroz kolonu je propušten pufer za uklanjanje soli, nakon čega je kolona osušena. Na kolonu je dodana otopina DNaze I te je razgradnja vezane DNA provedena tijekom 15 minuta pri sobnoj temperaturi. Kolona je potom isprana puferom za ispiranje 1 te dva puta puferom za ispiranje 2 (nakon dodatka svakog pojedinog pufera uslijedilo je centrifugiranje 1 minutu pri 11000  $g$  i odbacivanje filtrata). Ukupna RNA s kolone je eluirana RNase-slobodnom vodom (55  $\mu\text{L}$ ) uz centrifugiranje 1 minutu pri 11000  $g$ . Alikvot od 15  $\mu\text{L}$  odvojen je za mjerenje koncentracije, čistoće i integriteta RNA, a ostatak izolata korišten je za reverznu transkripciju. Oba izolata pohranjena su na  $-80^\circ\text{C}$  do uporabe.

#### 2.3.6.2 Provjera integriteta i čistoće izolirane RNA

##### Spektrofotometrijsko određivanje čistoće i integriteta RNA

Koncentracija i čistoća izolirane ukupne RNA određena je mjerenjem apsorbancije 2  $\mu\text{L}$  izolata RNA pri 260 nm, odnosno omjera apsorbancija pri 260 nm i 280 nm i omjera apsorbancija pri 260 i 230 nm na spektrofotometru Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, Wilmington, SAD). Koncentraciju RNA u izolatima uređaj preračunava temeljem Lambert-Beerovog zakona koji opisuje linearnu povezanost apsorbancije i koncentracije te činjenice da RNA koncentracija 44  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ima vrijednost apsorbancije 1. Omjer  $A_{260}/A_{280}$  otopine čiste RNA je između 1,9 i 2,1, što je i bio slučaj kod svih analiziranih uzoraka. Omjer  $A_{260}/A_{230}$  za uzorke koji ne sadrže tragove gvanidin-izotiocijanata ili soli je oko 2, premda odstupanja od navedene vrijednosti ne moraju nužno utjecati na uspješnost reakcija koje se provode na izolatima RNA.

### Elektroforezno određivanje čistoće i integriteta RNA

Za provjeru čistoće i integriteta izolirane ukupne RNA korištena je elektroforeza u agaroznom gelu s formaldehidom. Uzorak za elektroforezu priređen je na sljedeći način: u 8  $\mu\text{L}$  otopljene RNA dodano je 2  $\mu\text{L}$  5 x pufera za nanošenje uzoraka RNA na elektroforezu (0,25%-tno bromfenol plavo, 2,6%-tni formaldehid, 20%-tni glicerol, 20 mM natrijev acetat, 8 mM MOPS, 8 mM EDTA, 3%-tni formamid, 1%-tna otopina boje za bojanje nukleinskih kiselina GelRed), otopina je inkubirana 5 minuta pri 65°C i ohlađena na ledu. Uzorci su nanijeti u jažice 1,2%-tnog agaroznog gela priređenog u puferu konačnog sastava: 20 mM MOPS, 5 mM natrijev-acetat, 1 mM EDTA, pH 7,0 i 6,66%-tni formaldehid. Elektroforeza je provedena u puferu za elektroforezu RNA (konačnog sastava: 20 mM MOPS, 5 mM natrijev acetat, 1 mM EDTA, 0,74%-tni formaldehid, pH 7,0) pri jakosti struje 5V/cm. Nakon što je boja bromfenol plavo dosegla dvije trećine duljine gela, elektroforeza je prekinuta te je gel izložen UV-svjetlosti  $\lambda = 254 \text{ nm}$  na transiluminatoru. Vizualizacija dviju jakih vrpce koje odgovaraju položajima 28 S i 18 S rRNA (omjera intenziteta približno 2:1) dokaz je da je RNA intaktna, dočim nejasne vrpce i dodatne vrpce koje odgovaraju položajima manjih RNA ukazuju da je izolirana RNA djelomično ili u cijelosti degradirana. U svim uzorcima izolirana RNA je bila intaktna.

### 2.3.6.3 Reverzna transkripcija praćena lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu

Reverzna transkripcija provedena je pomoću komercijalno dostupnog kompleta High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, sukladno uputama proizvođača. Konačna reakcijska smjesa volumena 20  $\mu\text{L}$  sadržavala je 1  $\mu\text{g}$  izolata RNA, 1 x nasumičnih heksanukleotidnih početnica, 1 x dNTPs (4 mM deoksinukleozid-trifosfati - dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1 x pufer za reverznu transkripciju, 1 x rekombinantni inhibitor RNaze i 1 x Multiscribe reverznu transkriptazu. Reverzna transkripcija u konačnici je provedena inkubacijom reakcijskih smjesa pri 25°C 10 minuta, pri 37°C 120 minuta, pri 85°C 5 minuta, uz završno hlađenje pri 4°C. Uzorci cDNA pohranjeni su na -20°C do priređivanja reakcijskih smjesa za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu.

Reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (eng. *Quantitative Reverse Transcription - Real-Time Polymerase Chain Reaction*, qRT-PCR) priređene su u ukupnom volumenu 25  $\mu\text{L}$  u pločicama s 96 jažica i u konačnici su sadržavale: 1 x reagens za umnažanje TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), 1 x

TaqMan smjesu početnica i proba za umnažanje gena od interesa ili referentnog gena te 5  $\mu$ L cDNA prethodno razrijeđene pet puta s RNaze, DNaze-slobodnom vodom (odnosno, 50 ng cDNA). Smjese početnica i proba za umnažanje gena od interesa te dva referentna gena pribavljene su od proizvođača Applied Biosystems kao već validirani reagensi čije koncentracije i reakcijske uvjete nije potrebno dodatno optimizirati. Početnice su neobilježene, a probe su obilježene fluorescentnom bojom FAM kao izvjestiteljem (eng. *reporter*) te kao prigušivač (eng. *quencher*) sadrže nefluorescentni prigušivač MGB. Za referentne gene odabrani su geni za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (*GAPDH*) i  $\beta$ -aktin (*ACTB*). Korišteni validirani eseji bili su kako slijedi: esej ID: Hs01009006\_m1 za *SIRT1*, Hs00953477\_m1 za *SIRT3*, Hs00156308\_m1 za *CAT*, Hs00533490\_m1 za *SOD1*, Hs00167309\_m1 za *SOD2*, 4310884E za *GAPDH* i Hs99999903\_m1 za *ACTB*. Reakcije umnažanja gena od interesa i referentnog gena za svaki pojedini uzorak provedene su u odvojenim jažicama, u triplikatu. Za provjeru potencijalne kontaminacije s gDNA kao negativna kontrola korišten je uzorak koji je umjesto kalupa cDNA sadržavao RNA, a za provjeru potencijalne kontaminacije s cDNA ili PCR produktom, kao negativna kontrola korištena je voda. Reakcija umnažanja i detekcije fluorescencije provedena je na instrumentu 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Kvantitativni PCR odvijao se pri uvjetima preporučenima od proizvođača: 2 minute pri 50°C, zatim 10 minuta pri 95°C (aktivacija DNA-polimeraze) i potom 40 ciklusa od po 15 sekundi pri 95°C (denaturacija dvolančane DNA) i po 1 minutu pri 60°C (sparivanje lanaca i sinteza DNA, korak u kojem se mjeri fluorescencija). Jačina ekspresije svakog pojedinog ciljnog gena u uzorcima  $t_1$ ,  $t_2$  i  $t_3$  (nakon ronjenja) svake pojedine osobe izražena je u odnosu na uzorak  $t_0$  (prije ronjenja) te iste osobe, a izračunata je prema standardnoj metodi delta-delta-Ct prema Hellemansu i suradnicima [138], koja uključuje normalizaciju prema prosječnoj ekspresiji dva referentna gena u svakom pojedinom uzorku.



## 2.4 Statistička analiza

S obzirom na veličinu uzorka i normalnost raspodjele, izmjereni rezultati prikazani su medijanom i interkvartilnim rasponom te uspoređivani odgovarajućim neparametrijskim testovima. Normalnost raspodjele ispitana je Shapiro-Wilkinsonovim testom. Statistički značajna razlika između uzastopnih mjerenja prije i nakon ronjenja procijenjena je Friedmanovim testom. U slučaju zamijećene statistički značajne razlike između uzastopnih mjerenja ( $P < 0,05$ ), vršena je post-hoc analiza korištenjem Wilcoxonovog testa uz primjenu Bonferronijeve korekcije, što je rezultiralo razinom značajnosti postavljenom na  $P < 0,008$  ( $0,05 / 6 = 0,0083$ ).

Kako bi se ispitala klinički značajna promjena parametara KKS, za sve parametre KKS izračunat je postotak razlike u odnosu prema početnim vrijednostima prije ronjenja te je procijenjen prema izračunatim referentnim vrijednostima promjene (eng. *Reference Change Values*, RCV). RCV je izračunat prema sljedećoj jednadžbi:  $RCV = 2^{1/2} \times Z \times (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$  gdje Z iznosi 1,96 za dvosmjerne promjene parametara za vjerojatnost  $P < 0,05$ ,  $CV_A$  predstavlja koeficijent analitičke varijacije izračunat iz rezultata unutarnje kontrole kvalitete, a  $CV_I$  intraindividualni koeficijent varijacije preuzet iz 2014. ažurirane baze podataka od Minchinela i suradnika [139].

Moguća povezanost varijabli ispitana je Spearmanovom korelacijom. Statistički značajna povezanost (uz  $P < 0,05$ ) tumačena je sukladno Coltonovu kriteriju (za  $r$  0 do 0,25 ili 0 do -0,25 kao nepostojanje povezanosti; za  $r$  0,26 do 0,50 ili -0,26 do -0,50 kao slaba povezanost; za  $r$  0,51 do 0,75 ili -0,51 do -0,75 kao umjerena do dobra povezanost; za  $r$  0,76 do 1 ili -0,76 do -1 kao vrlo dobra do izvrsna povezanost). Statističke analize provedene su koristeći MedCalc statističku verziju softvera 16.4.3 (MedCalc, Ostend, Belgija).

## **3 REZULTATI**

### 3.1 Utjecaj ronjenja na hematološke parametre

U ovom su radu praćene promjene parametara kompletne krvne slike nakon ronjenja. Uzorci krvi analizirani su na hematološkom brojaču unutar sat vremena od vađenja krvi koje je provedeno neposredno prije i nakon ronjenja te 3 i 6 sati nakon ronjenja. Osim statistički značajne promjene rezultata ispitane Friedmanovim testom, također je procijenjena klinički značajna promjena rezultata hematoloških parametara. Budući da vrednovanje kliničke važnosti promjene dva ili više uzastopnih rezultata iste osobe podrazumijeva uzimanje u obzir i analitičke i intraindividualne biološke varijacije [140], klinički značaj uočenih promjena klasično nazvan „presudna razlika“, a danas poznat kao referentna vrijednost promjene (RCV), procijenjen je prema izračunatim vrijednostima RCV-a za svaki parametar.

Utjecaj ronjenja na parametre KKS prikazan je u Tablici 5. Statistički značajno povećanje broja ukupnih leukocita opaženo je 3 i 6 sati nakon ronjenja (~20%, ~25%), ali ne i neposredno nakon ronjenja. Ovom porastu, u odnosu na vrijednosti prije ronjenja, najviše su pridonijeli neutrofilni granulociti koji su statistički značajno porasli odmah nakon ronjenja (~18%) te su nastavili rasti 3 i 6 sati nakon ronjenja (~34%, ~36%). Porast broja neutrofila odmah nakon ronjenja nije bio praćen porastom ukupnog broja leukocita zbog pada broja limfocita (~11%) i monocita (~15%) koji je samo za monocite pokazao statističku značajnost. Međutim, 6 sati nakon ronjenja broj limfocita i monocita također je statistički značajno porastao (~20%, ~23%).

Statistički značajna smanjenja parametara crvene krvne slike zabilježena su 3 i 6 sati nakon ronjenja za: broj eritrocita (~2,6%, ~2,9%), hemoglobin (~2,1%, ~2,8%) i hematokrit (~2,4%, ~3,2%). Opaženo je također, statistički značajno povećanje MCV-a odmah i 3 sata nakon ronjenja te MCHC-a 6 sati nakon ronjenja. Međutim, uzimajući u obzir da je analitička nepreciznost za MCV i MCHC bila veća od poželjne nepreciznosti (eng. *Desirable Specification for Imprecision*, DSI) preuzete iz 2014. ažurirane baze podataka od Minchinela i suradnika [139] opažene razlike za MCV i MCHC treba interpretirati s oprezom (Tablica 6).

**Tablica 5.** Rezultati parametara kompletne krvne slike prije i nakon ronjenja.

Ispitivani parametri	t <sub>0</sub> prije ronjenja	t <sub>1</sub> nakon ronjenja	t <sub>2</sub> 3 h nakon ronjenja	t <sub>3</sub> 6 h nakon ronjenja	P
Leukociti (10 <sup>9</sup> /L)	6,88 (5,74-7,80)	6,54 (5,86-8,90)	7,88* (6,99-9,43)	8,22* (6,62-10,28)	<0,001
Neutrofili (10 <sup>9</sup> /L)	3,57 (3,30-4,78)	4,39* (3,47-5,19)	4,73* (3,96-6,20)	4,89* (3,94-6,37)	<0,001
Limfociti (10 <sup>9</sup> /L)	2,13 (1,61-2,52)	1,90 (1,56-2,17)	2,24 (2,01-2,59)	2,55* (2,13-3,03)	0,002
Monociti (10 <sup>9</sup> /L)	0,45 (0,40-0,63)	0,35* (0,32-0,40)	0,5 (0,37-0,63)	0,52* (0,47-0,74)	<0,001
Eozinofili (10 <sup>9</sup> /L)	0,152 (0,08-0,21)	0,12 (0,07-0,20)	0,12 (0,08-0,22)	0,16 (0,09-0,21)	0,063
Bazofili (10 <sup>9</sup> /L)	0,078 (0,06-0,09)	0,092 (0,07-0,12)	0,087 (0,07-0,09)	0,077 (0,07-0,09)	0,215
Eritrociti (10 <sup>12</sup> /L)	5,22 (5,15-5,39)	5,22 (5,11-5,39)	5,08* (4,94-5,28)	5,11* (4,94-5,27)	<0,001
Hemoglobin (g/L)	155 (151-159)	154 (150-159)	152* (147-155)	152* (145-155)	<0,001
Hematokrit (L/L)	0,468 (0,456-0,483)	0,468 (0,449-0,488)	0,460* (0,454-0,467)	0,461* (0,440-0,468)	<0,001
MCV (fL)	89,8 (87,8-93,0)	90,0* (88,1-93,4)	89,9* (88,2-92,0)	89,4 (88,2-91,5)	<0,001
MCH (pg)	29,4 (29,1-30,7)	29,4 (29,2-30,6)	29,7 (29,0-30,7)	29,6 (29,1-30,4)	0,373
MCHC (g/L)	329 (324-335)	327 (325-332)	331 (326-335)	332* (328-334)	0,024
RDW (%CV)	11,9 (11,6-12,7)	12,0 (11,8-12,5)	11,9 (11,6-12,4)	12,0 (11,7-12,6)	0,067
Trombociti (10 <sup>9</sup> /L)	213 (192-264)	210 (189-249)	216 (195-258)	224 (193-265)	0,059
MPV (fL)	7,35 (6,7-8,4)	7,31 (6,6-9,1)	7,46 (6,6-8,7)	7,53 (6,7-8,1)	0,401

Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. \*Statistički značajna razlika u odnosu na vrijednosti prije ronjenja (t<sub>0</sub>). MCV - prosječni volumen eritrocita (eng. *Mean Corpuscular Volume*, MCV), MCH - prosječna količina hemoglobina u eritrocitu (eng. *Mean Corpuscular Hemoglobin*, MCH), MCHC - prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu (eng. *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*, MCHC), RDW - raspodjela eritrocita po volumenu (eng. *Red blood cell Distribution Width*, RDW), MPV - prosječni volumen trombocita (eng. *Mean Platelet Volume*, MPV).

Kako bi se procijenila klinička važnost uočenih promjena parametara KKS nakon ronjenja za svakog ispitanika izračunat je postotak razlike u odnosu na vrijednosti prije ronjenja prema jednadžbi  $\% \text{ razlike} = [(t_n - t_0) / t_0] \times 100$ , gdje je  $t_n$  vrijednost neposredno nakon ronjenja, 3 i 6 sati nakon ronjenja, a  $t_0$  vrijednost prije ronjenja. Kada se srednja vrijednost postotka razlike svih ispitanika usporedila s vrijednostima RCV-a, izračunatim iz analitičke i biološke varijacije prema jednadžbi navedenoj u poglavlju 2.4, niti jedna razlika rezultata nije bila veća od RCV-a (Tablica 6). Navedeni rezultati upućuju na to da rekreacijsko ronjenje na 30 metara dubine u trajanju od 30 minuta ne uzrokuje klinički značajne promjene parametara KKS.

**Tablica 6.** Procjena klinički značajne promjene rezultata parametara kompletne krvne slike.

Ispitivani parametri	Razlika u odnosu na vrijednosti prije ronjenja (%)			CV <sub>A</sub> (%)	DSI (%)	CV <sub>I</sub> (%)	RCV (%)
	nakon ronjenja	3 h nakon ronjenja	6 h nakon ronjenja				
Leukociti (10 <sup>9</sup> /L)	4,7	20,4	24,5	1,4	5,7	11,4	31,8
Neutrofili (10 <sup>9</sup> /L)	17,8	33,9	35,6	1,7	8,6	17,1	47,6
Limfociti (10 <sup>9</sup> /L)	-7,3	9,0	19,6	3,5	5,1	10,2	29,8
Monociti (10 <sup>9</sup> /L)	-15,3	8,4	22,8	6,4	8,9	17,8	52,4
Eozinofili (10 <sup>9</sup> /L)	-16,7	-10,8	0,0	10,0	10,5	21,0	64,5
Bazofili (10 <sup>9</sup> /L)	2,1	5,4	6,1	9,1	14,0	28,0	81,6
Eritrociti (10 <sup>12</sup> /L)	-0,4	-2,6	-2,9	1,0	1,6	3,2	9,3
Hemoglobin (g/L)	-0,5	-2,1	-2,8	0,7	1,4	2,9	8,1
Hematokrit (L/L)	-0,1	-2,4	-3,2	1,2	1,4	2,7	8,2
MCV (fL)	0,4	0,2	-0,3	0,8 <sup>a</sup>	0,7	1,4	4,5
MCH (pg)	0,1	0,5	0,3	1,1 <sup>a</sup>	0,7	1,4	4,9
MCHC (g/L)	-0,3	0,3	0,7	1,3 <sup>a</sup>	0,5	1,1	4,6
RDW (%CV)	-0,2	-1,0	-0,9	1,8	1,8	3,5	10,9
Trombociti (10 <sup>9</sup> /L)	-2,8	-0,4	2,0	3,4	4,6	9,1	27,0
MPV (fL)	1,6	0,3	0,3	2,6	2,2	4,3	13,9

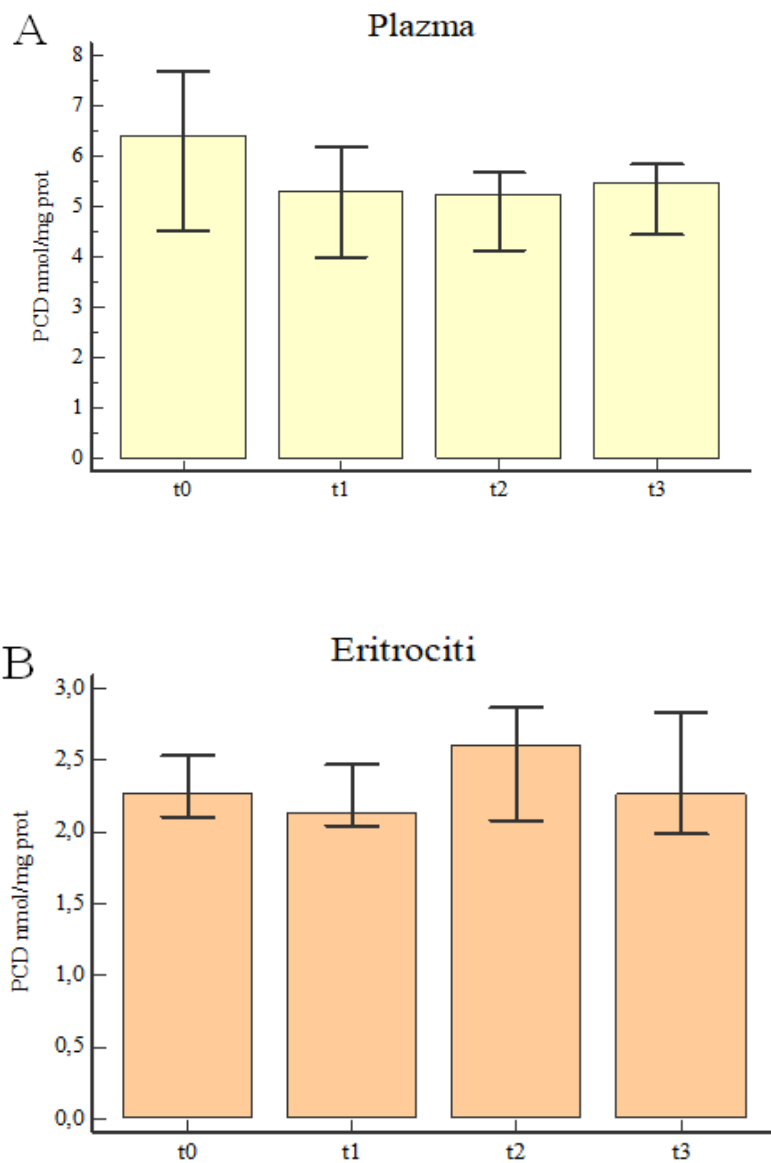
MCV - prosječni volumen eritrocita (eng. *Mean Corpuscular Volume*, MCV), MCH - prosječna količina hemoglobina u eritrocitu (eng. *Mean Corpuscular Hemoglobin*, MCH), MCHC - prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu (eng. *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*, MCHC), RDW - raspodjela eritrocita po volumenu (eng. *Red blood cell Distribution Width*, RDW), MPV - prosječni volumen trombocita (eng. *Mean Platelet Volume*, MPV), CV<sub>A</sub> - koeficijent analitičke varijacije izračunat iz rezultata unutarnje kontrole kvalitete, DSI - poželjna nepreciznost (eng. *Desirable Specification for Imprecision*, DSI) preuzeta iz baze podataka od Minchinela i suradnika [139] prema kojoj je procijenjen CV<sub>A</sub>, CV<sub>I</sub> - intraindividualni koeficijent varijacije preuzet iz baze podataka od Minchinela i suradnika [139], RCV - izračunata referentna vrijednost promjene (eng. *Reference Change Values*, RCV). <sup>a</sup> CV<sub>A</sub> veća od DSI.

## 3.2 Biljezi oksidacijskog oštećenja

Kako bi se ispitao utjecaj prvog ronjenja nakon zimskog razdoblja ne ronjenja na oksidacijsko oštećenje proteina i lipida korišteni su uzorci plazme i eritrocita, krvne frakcije koje se smatraju vrlo osjetljive na štetno djelovanje ROS-a [141]. Biljezi oksidacijskog oštećenja proteina i lipida praćeni su za svih 17 ispitanika neposredno prije i nakon ronjenja te 3 i 6 sati nakon ronjenja.

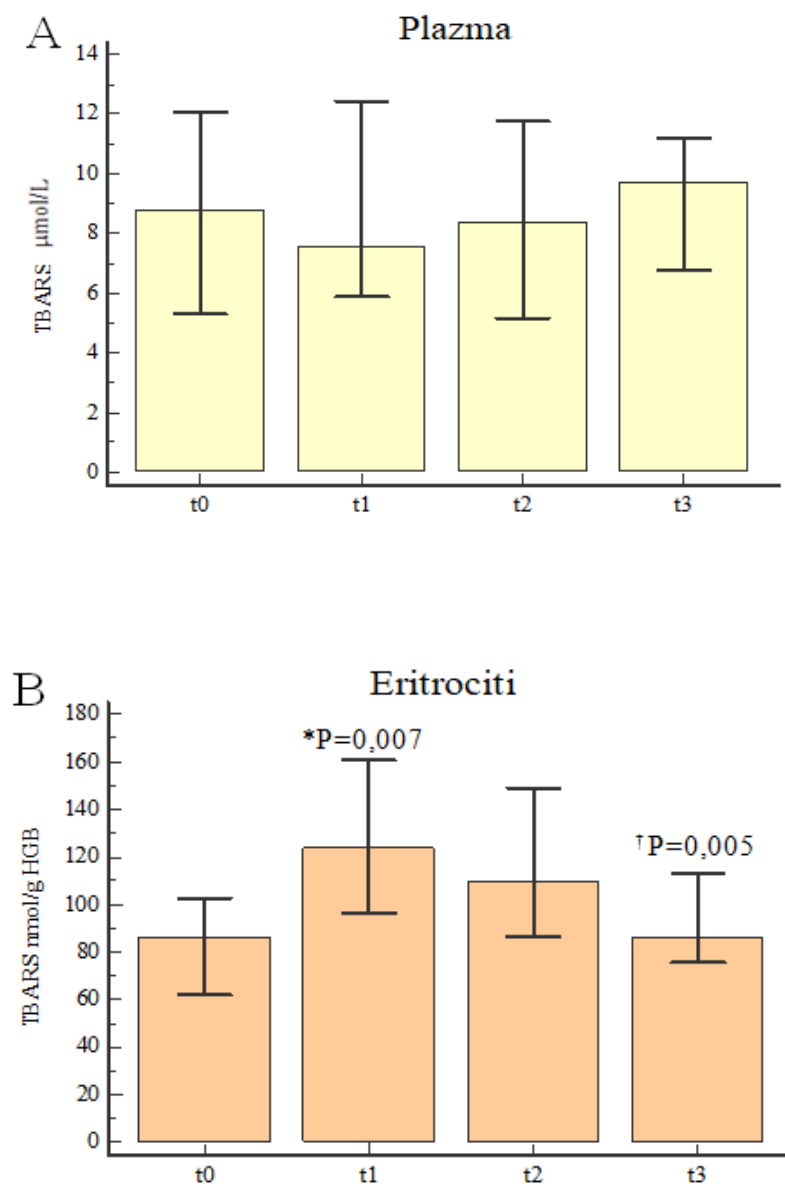
Proteinski karbonili, koji nastaju uvođenjem karbonilnih skupina u proteine kao posljedica djelovanja ROS-a, određeni su mjerenjem proteinskih karbonilnih derivata ELISA metodom. Statistički značajna razlika između vrijednosti PCD-a neposredno prije i nakon ronjenja te 3 i 6 sati nakon ronjenja nije pronađena ni u uzorcima plazme ni u uzorcima eritrocita (Slika 7A i B).

Oksidacijsko oštećenje lipida procijenjeno je mjerenjem produkata lipidne peroksidacije koji reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (TBARS metodom). U uzorcima plazme značajne promjene vrijednosti TBARS-a nisu zapažene ni u jednoj vremenskoj točki nakon ronjenja (Slika 8A). Međutim, ronjenje je značajno utjecalo na lipidnu peroksidaciju u eritrocitima. Neposredno nakon ronjenja, uočeno je statistički značajno povećanje TBARS vrijednosti (~44%,  $P=0,007$ ) u odnosu na vrijednosti prije ronjenja. U sljedećoj ispitivanoj vremenskoj točki, 3 sata nakon ronjenja, povećanje TBARS-a nije imalo statistički značaj, a 6 sati nakon ronjenja vrijednosti su se vratile na početne razine prije ronjenja (Slika 8B).



**Slika 7.** Utjecaj ronjenja na vrijednost proteinskih karbonilnih derivata u plazmi i eritrocitima.

Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. t<sub>0</sub> - neposredno prije ronjenja, t<sub>1</sub> - neposredno nakon ronjenja, t<sub>2</sub> - 3 sata nakon ronjenja, t<sub>3</sub> - 6 sati nakon ronjenja, PCD - proteinski karbonilni derivati.



**Slika 8.** Utjecaj ronjenja na vrijednost TBARS-a u plazmi i eritrocitima.

Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. \*Statistički značajna razlika u odnosu na  $t_0$ . †Statistički značajna razlika u odnosu na  $t_1$ .  $t_0$  - neposredno prije ronjenja,  $t_1$  - neposredno nakon ronjenja,  $t_2$  - 3 sata nakon ronjenja,  $t_3$  - 6 sati nakon ronjenja, TBARS - indeks lipidne peroksidacije.



### 3.3 Aktivnost antioksidacijskih enzima

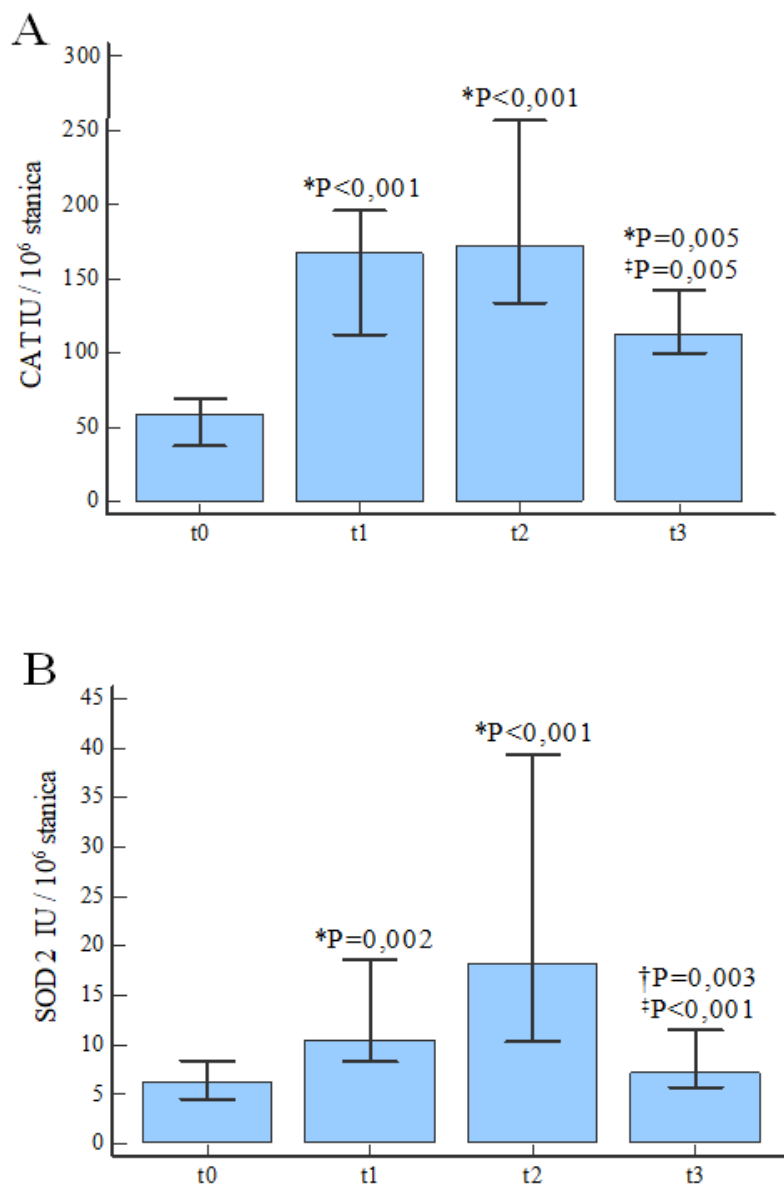
Utjecaj ronjenja na antioksidacijsku obranu ispitan je mjerenjem katalitičke aktivnosti antioksidacijskih enzima u izoliranim mononuklearnim stanicama krvi neposredno prije i nakon ronjenja te 3 i 6 sati nakon ronjenja. Zbog neuspješne izolacije mononuklearnih stanica iz uzorka jednog ispitanika, aktivnost antioksidacijskih enzima mjerena je u uzorcima 16 ispitanika. Spektrofotometrijskim metodama određena je aktivnost katalaze, ukupne SOD te nakon inaktivacije SOD1 KCN-om, i aktivnost SOD2. Aktivnost SOD1 izračunata je oduzimanjem aktivnosti SOD2 od aktivnosti ukupne SOD.

Ronjenje do 30 metara dubine u trajanju od 30 minuta značajno je utjecalo na aktivnost katalaze i SOD2, a posljedično i na povećanje aktivnosti ukupne SOD. Neposredno nakon ronjenja aktivnost katalaze porasla je za ~184% ( $P < 0,001$ ), a 3 sata nakon ronjenja za ~194% ( $P < 0,001$ ) u odnosu na početnu vrijednost prije ronjenja. Premda se u sljedećoj vremenskoj točki, 6 sati nakon ronjenja, aktivnost katalaze smanjila za ~35% ( $P = 0,005$ ) u odnosu na vrijednost 3 sata nakon ronjenja, još uvijek je bila veća (~91%,  $P = 0,005$ ) u odnosu na vrijednost prije ronjenja (Slika 9A).

Neposredno nakon ronjenja, aktivnost SOD2 porasla je ~72% u odnosu na vrijednost prije ronjenja ( $P = 0,002$ ). Najveći porast aktivnosti SOD2 postignut je kao i kod katalaze, 3 sata nakon ronjenja (~196%,  $P < 0,001$ ). Međutim, 6 sati nakon ronjenja pad aktivnosti SOD2, koji je bio u odnosu na vrijednost neposredno nakon ronjenja ~31% ( $P = 0,003$ ) i u odnosu na vrijednost 3 sata nakon ronjenja ~60% ( $P < 0,001$ ), vratio je aktivnost SOD2 na početnu razinu prije ronjenja (Slika 9B).

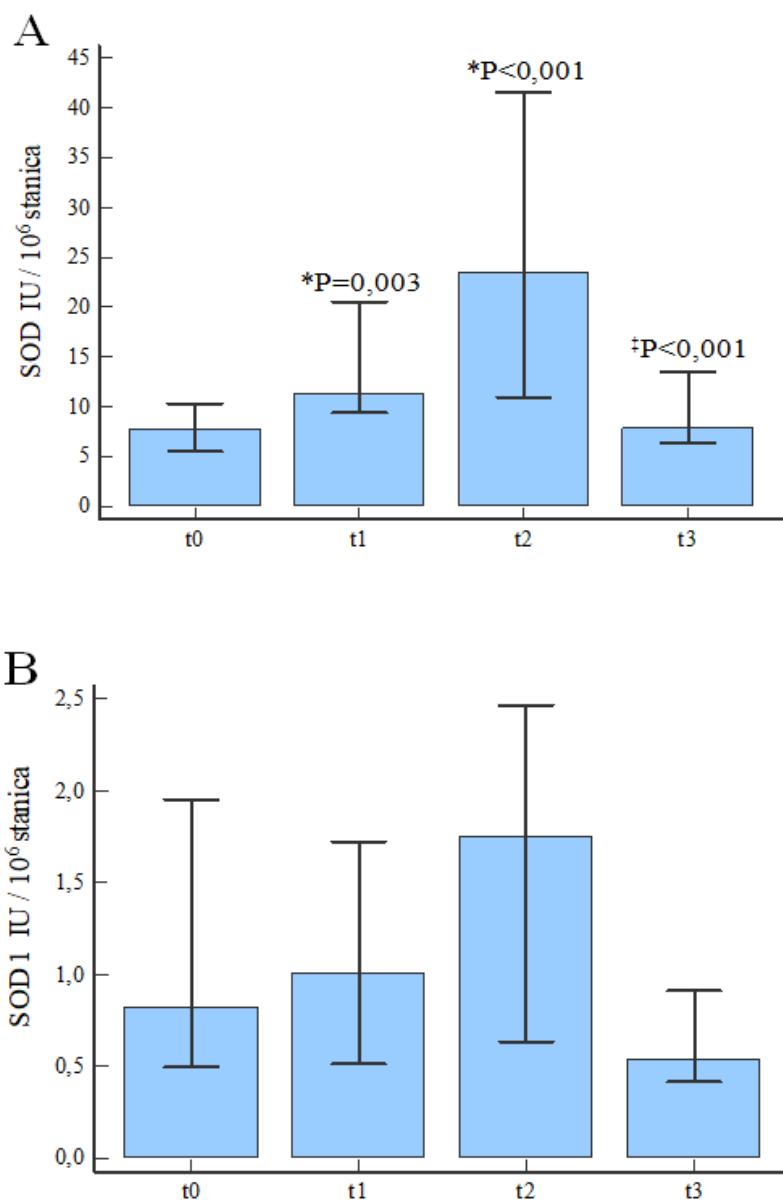
Porast aktivnost ukupne SOD neposredno nakon ronjenja bio je ~47% ( $P = 0,003$ ), a 3 sata nakon ronjenja ~202% ( $P < 0,001$ ) u odnosu na početnu vrijednost prije ronjenja. Smanjenje aktivnosti SOD 6 sati nakon ronjenja, koje je bilo ~66% ( $P < 0,001$ ) u odnosu na vrijednost 3 sata nakon ronjenja, vratilo je aktivnost SOD na početnu vrijednost prije ronjenja, kao i kod aktivnosti SOD2 (Slika 10A).

Premda su promjene aktivnosti SOD1 nakon ronjenja, također pratile obrazac promjena aktivnosti SOD2 i SOD, statistički značaj nije bio zabilježen ni u jednoj vremenskoj točki (Slika 10B).



**Slika 9.** Utjecaj ronjenja na aktivnost katalaze i SOD2 u mononuklearnim stanicama krvi.

Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. \*Statistički značajna razlika u odnosu na  $t_0$ . †Statistički značajna razlika u odnosu na  $t_1$ . ‡Statistički značajna razlika u odnosu na  $t_2$ .  $t_0$  - neposredno prije ronjenja,  $t_1$  - neposredno nakon ronjenja,  $t_2$  - 3 sata nakon ronjenja,  $t_3$  - 6 sati nakon ronjenja, CAT - katalaza, SOD2 - superoksid dismutaza 2.

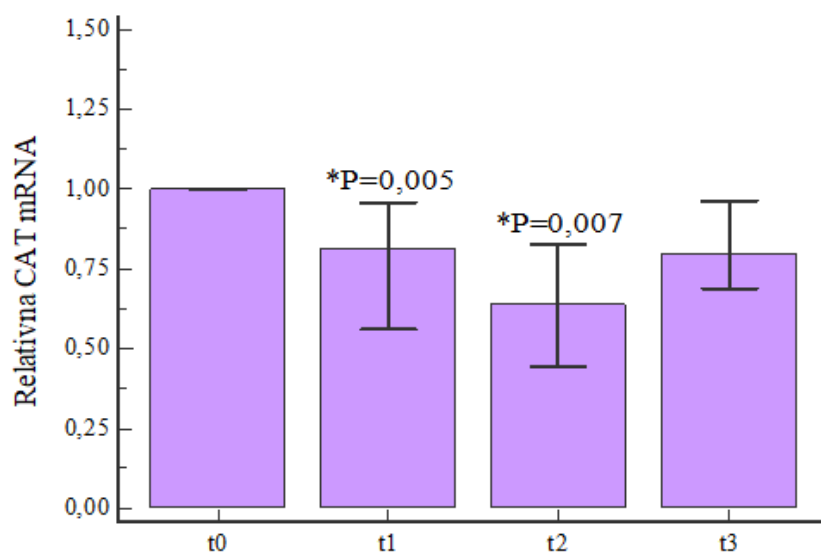


**Slika 10.** Utjecaj ronjenja na aktivnost ukupne SOD i SOD1 u mononuklearnim stanicama krvi. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. \*Statistički značajna razlika u odnosu na t<sub>0</sub>. ‡Statistički značajna razlika u odnosu na t<sub>2</sub>. t<sub>0</sub> - neposredno prije ronjenja, t<sub>1</sub> - neposredno nakon ronjenja, t<sub>2</sub> - 3 sata nakon ronjenja, t<sub>3</sub> - 6 sati nakon ronjenja, SOD - superoksid dismutaza.

### 3.4 Genska ekspresija antioksidacijskih enzima

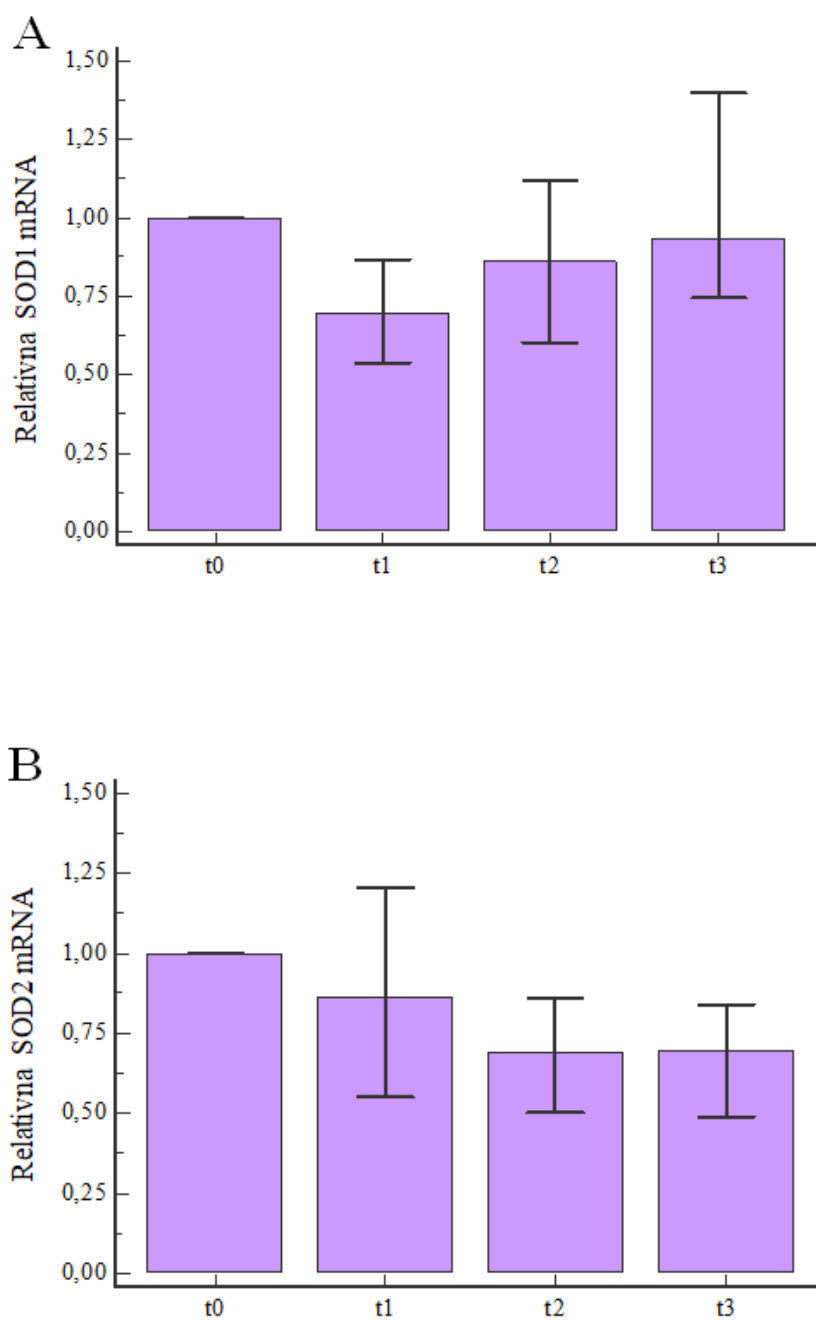
Sljedeći korak u ovom istraživanju bio je ispitati utjecaj ronjenja na gensku ekspresiju antioksidacijskih enzima. Nakon izolacije ukupne RNA iz uzoraka mononuklearnih stanica dobivenih od 16 ronilaca te reverzne transkripcije praćene lančanom reakcijom polimerazom, relativna količina mRNA transkripata gena *CAT*, *SOD1* i *SOD2* određena je kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu prema postupcima opisanim u poglavlju 2.3.6. Izračuni relativne razine mRNA u uzorcima nakon ronjenja normirani su na razinu ekspresije prije ronjenja za svakog ispitanika, uključujući normalizaciju prema prosječnoj ekspresiji dvaju referentnih gena *GAPDH* i *ACTB*.

Statistički značajno sniženje razine mRNA gena *CAT* zabilježeno je neposredno nakon ronjenja (~19%,  $P=0,005$ ) i 3 sata nakon ronjenja (~36%,  $P=0,007$ ), dok statistički značajna razlika nije pronađena 6 sati nakon ronjenja (Slika 11). Statistički značajna razlika nije pronađena za razine mRNA gena *SOD1* i *SOD2* ni u jednoj vremenskoj točki nakon ronjenja, iako je blago smanjenje bilo prisutno (Slika 12A i B).



**Slika 11.** Utjecaj ronjenja na razinu mRNA gena *CAT* u mononuklearnim stanicama krvi.

Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. \*Statistički značajna razlika u odnosu na  $t_0$ .  $t_0$  - neposredno prije ronjenja,  $t_1$  - neposredno nakon ronjenja,  $t_2$  - 3 sata nakon ronjenja,  $t_3$  - 6 sati nakon ronjenja, CAT - katalaza.



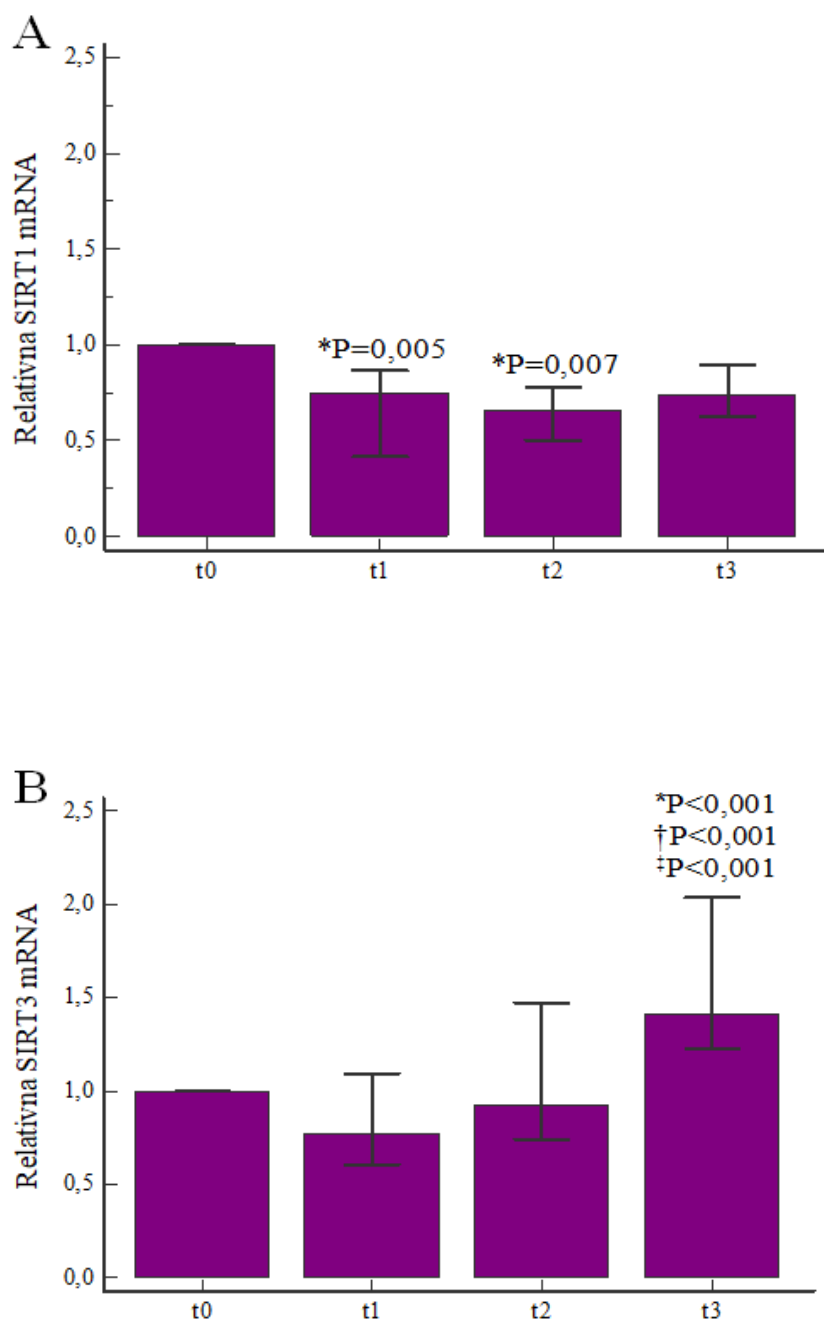
**Slika 12.** Utjecaj ronjenja na razinu mRNA gena *SOD1* i *SOD2* u mononuklearnim stanicama krvi. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom.  $t_0$  - neposredno prije ronjenja,  $t_1$  - neposredno nakon ronjenja,  $t_2$  - 3 sata nakon ronjenja,  $t_3$  - 6 sati nakon ronjenja, SOD - superoksid dismutaza.

### 3.5 Genska ekspresija sirtuina

Mnoga istraživanja na staničnim i životinjskim modelima pokazala su značaj SIRT1 i SIRT3 u regulaciji antioksidacijskih mehanizama [3,101,119,120,122]. Kako bi pridonijeli razumijevanju pretpostavljenog adaptacijskog antioksidacijskog mehanizma i hormeznog odgovora na povećanu produkciju ROS-a ispitano je može li jedan zaron nakon razdoblja ne ronjenja utjecati na ekspresiju gena *SIRT1* i *SIRT3* u mononuklearnim stanicama krvi.

Rezultati analize genskih ekspresija u uzorcima mononuklearnih stanica dobivenih od 16 ronilaca pokazali su smanjenje razine mRNA gena *SIRT1* neposredno nakon ronjenja (~25%,  $P=0,005$ ) koje je ostalo prisutno i 3 sata nakon ronjenja (~34%,  $P=0,007$ ). Međutim, statistički značajna promjena u odnosu na razine prije ronjenja nije opažena 6 sati nakon ronjenja (Slika 13A).

Statistički značajna promjena razine mRNA gena *SIRT3* neposredno i 3 sata nakon ronjenja nije pronađena (Slika 13B). Međutim, zanimljivo otkriće bilo je povećanje razine mRNA gena *SIRT3* 6 sati nakon ronjenja, koja je porasla ~41% u odnosu na razine prije ronjenja ( $P<0,001$ ).



**Slika 13.** Utjecaj ronjenja na razinu mRNA gena *SIRT1* i *SIRT3* u mononuklearnim stanicama krvi.

Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. \*Statistički značajna razlika u odnosu na  $t_0$ . †Statistički značajna razlika u odnosu na  $t_1$ . ‡Statistički značajna razlika u odnosu na  $t_2$ .  $t_0$  - neposredno prije ronjenja,  $t_1$  - neposredno nakon ronjenja,  $t_2$  - 3 sata nakon ronjenja,  $t_3$  - 6 sati nakon ronjenja, SIRT - sirtuin.

## 3.6 Korelacije analize

### 3.6.1 Korelacijska analiza ispitivanih parametara sa životnom dobi ispitanika

Ispitivani parametri oksidacijskog/antioksidacijskog statusa i genske ekspresije sirtuina koji su longitudinalno praćeni neposredno prije i nakon ronjenja te 3 i 6 sati nakon ronjenja sažeto su prikazani u Tablici 7. Budući da su u ovo istraživanje bili uključeni ronioni s rasponom životne dobi od 30 do 52 godine, Spearmanovom korelacijskom analizom ispitana je povezanost životne dobi s dobivenim rezultatima. Korelacijska analiza životne dobi i biljega oksidacijskog oštećenja uključivala je rezultate svih 17 ispitanika, dok je korelacija životne dobi s aktivnostima antioksidacijskih enzima i promjenama genskih ekspresija antioksidacijskih enzima i sirtuina provedena na 16 ispitanika.

Statistički značajna povezanost životne dobi s biljezima oksidacijskog oštećenja nije pronađena ni u jednoj vremenskoj točki nakon ronjenja, kao ni s bazalnim vrijednostima biljega oksidacijskog oštećenja odnosno vrijednostima prije ronjenja (Tablica 8). Nije pronađena povezanost životne dobi s aktivnostima katalaze, ukupne SOD, SOD1 i SOD2 ni u bazalnim vrijednostima, ni u vrijednostima nakon ronjenja (Tablica 9). Promjene ekspresije gena *CAT*, *SOD1*, *SOD2*, *SIRT1* i *SIRT3* također nisu bile u korelaciji sa životnom dobi ispitanika (Tablica 10).



**Tablica 7.** Utjecaj ronjenja na oksidacijski/antioksidacijski status i gensku ekspresiju sirtuina.

Ispitivani parametri	t <sub>0</sub> prije ronjenja	t <sub>1</sub> nakon ronjenja	t <sub>2</sub> 3 h nakon ronjenja	t <sub>3</sub> 6 h nakon ronjenja
<b>Biljezi oksidacijskog oštećenja</b>				
<b>PCD Plazma</b> (nmol/mg prot)	6,41 4,52-7,67	5,30 4,00-6,19	5,25 4,13-5,67	5,46 4,43-5,83
<b>PCD Eritrociti</b> (nmol/mg prot)	2,26 (2,10-2,53)	2,12 (2,04-2,46)	2,6 (2,08-2,86)	2,26 (1,98-2,83)
<b>TBARS Plazma</b> ( $\mu$ mol/L)	8,81 (5,28-12,08)	7,56 (5,88-12,43)	8,38 (5,16-11,77)	9,73 (6,80-11,20)
<b>TBARS Eritrociti</b> (nmol/g HGB)	86,2 (62,2-102,4)	123,8* (96,3-160,9)	109,6 (86,6-149,0)	86,3 <sup>†</sup> (75,5-113,2)
<b>Aktivnost antioksidacijskih enzima u PBMCs uzorcima</b>				
<b>CAT</b> (IU/10 <sup>6</sup> stanica)	58,9 (37,6-69,4)	167,1* (112,4-196,3)	173,0* (134,1-257,2)	112,4* <sup>‡</sup> (100,1-142,5)
<b>SOD1</b> (IU/10 <sup>6</sup> stanica)	0,83 (0,50-1,95)	1,01 (0,52-1,72)	1,75 (0,64-2,47)	0,55 (0,42-0,91)
<b>SOD2</b> (IU/10 <sup>6</sup> stanica)	6,15 (4,48-8,36)	10,55* (8,30-18,59)	18,19* (10,31-39,41)	7,23 <sup>†‡</sup> (5,73-11,57)
<b>SOD</b> (IU/10 <sup>6</sup> stanica)	7,76 (5,57-10,34)	11,38* (9,38-20,61)	23,41* (10,94-41,59)	7,89 <sup>‡</sup> (6,33-13,60)
<b>Promjene genskih ekspresija antioksidacijskih enzima i sirtuina u PBMCs uzorcima</b>				
<b>CAT mRNA</b>	1	0,814* 0,559-0,956	0,638* 0,444-0,826	0,797 0,690-0,962
<b>SOD1 mRNA</b>	1	0,696 0,539-0,868	0,860 0,604-1,118	0,932 0,745-1,399
<b>SOD2 mRNA</b>	1	0,865 0,552-1,204	0,693 0,500-0,860	0,696 0,488-0,839
<b>SIRT1 mRNA</b>	1	0,747* 0,414-0,866	0,661* 0,501-0,780	0,738 0,625-0,895
<b>SIRT3 mRNA</b>	1	0,775 0,602-1,091	0,923 0,744-1,472	1,414* <sup>†‡</sup> 1,224-2,031

Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. \*Statistički značajna razlika u odnosu na t<sub>0</sub>.

<sup>†</sup>Statistički značajna razlika u odnosu na t<sub>1</sub>. <sup>‡</sup>Statistički značajna razlika u odnosu na t<sub>2</sub>. PCD - proteinski karbonilni derivati; TBARS - indeks lipidne peroksidacije; CAT - katalaza; SOD - superoksid dismutaza; SIRT - sirtuin; PBMCs - mononuklearne stanice periferne krvi (eng. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs)

**Tablica 8.** Korelacijska analiza životne dobi ispitanika s biljezima oksidacijskog oštećenja.

	$t_0$ prije ronjenja	$t_1$ nakon ronjenja	$t_2$ 3 h nakon ronjenja	$t_3$ 6 h nakon ronjenja
Životna dob vs. biljezi oksidacijskog oštećenja				
PCD plazma	$r=-0,34$ (P=0,181)	$r=-0,20$ (P=0,440)	$r=-0,16$ (P=0,530)	$r=-0,08$ (P=0,750)
PCD eritrociti	$r=0,23$ (P=0,369)	$r=-0,41$ (P=0,102)	$r=-0,31$ (P=0,224)	$r=-0,18$ (P=0,487)
TBARS plazma	$r=0,17$ (P=0,515)	$r=0,48$ (P=0,051)	$r=0,35$ (P=0,171)	$r=0,34$ (P=0,176)
TBARS eritrociti	$r=-0,41$ (P=0,100)	$r=-0,12$ (P=0,659)	$r=-0,09$ (P=0,728)	$r=0,30$ (P=0,240)

PCD - proteinski karbonilni derivati, TBARS - indeks lipidne peroksidacije.

**Tablica 9.** Korelacijska analiza životne dobi ispitanika s aktivnostima antioksidacijskih enzima.

	$t_0$ prije ronjenja	$t_1$ nakon ronjenja	$t_2$ 3 h nakon ronjenja	$t_3$ 6 h nakon ronjenja
Životna dob vs. aktivnost antioksidacijskih enzima				
CAT	$r=-0,14$ (P=0,617)	$r=-0,35$ (P=0,181)	$r=-0,04$ (P=0,884)	$r=0,10$ (P=0,712)
SOD1	$r=0,04$ (P=0,879)	$r=-0,19$ (P=0,488)	$r=0,21$ (P=0,427)	$r=0,10$ (P=0,716)
SOD2	$r=-0,09$ (P=0,753)	$r=-0,36$ (P=0,168)	$r=0,03$ (P=0,927)	$r=-0,01$ (P=0,957)
SOD	$r=0,02$ (P=0,944)	$r=-0,38$ (P=0,143)	$r=0,08$ (P=0,765)	$r=-0,01$ (P=0,983)

CAT - katalaza, SOD - superoksid dismutaza.

**Tablica 10.** Korelacijska analiza životne dobi ispitanika s promjenama genske ekspresije antioksidacijskih enzima i sirtuina.

	$t_1$ nakon ronjenja	$t_2$ 3 h nakon ronjenja	$t_3$ 6 h nakon ronjenja
Životna dob vs. promjena mRNA gena <i>CAT</i> , <i>SOD1</i> , <i>SOD2</i> , <i>SIRT1</i> i <i>SIRT3</i>			
<i>CAT</i>	$r=0,31$ (P=0,236)	$r=0,39$ (P=0,141)	$r=0,26$ (P=0,341)
<i>SOD1</i>	$r=0,41$ (P=0,118)	$r=0,50$ (P=0,051)	$r=0,18$ (P=0,495)
<i>SOD2</i>	$r=-0,08$ (P=0,761)	$r=0,15$ (P=0,571)	$r=-0,09$ (P=0,728)
<i>SIRT1</i>	$r=0,30$ (P=0,260)	$r=0,25$ (P=0,352)	$r=0,35$ (P=0,185)
<i>SIRT3</i>	$r=0,29$ (P=0,283)	$r=0,30$ (P=0,258)	$r=0,50$ (P=0,051)

CAT - katalaza, SOD - superoksid dismutaza, SIRT - sirtuin.

### 3.6.2 Korelacijska analiza genskih ekspresija sirtuina i antioksidacijskih enzima

Radi boljeg razumijevanja antioksidacijskog odgovora na ronjenje te uloge sirtuina u antioksidacijskom odgovoru analizirana je povezanost između promjena razina mRNA gena ispitivanih sirtuina i antioksidacijskih enzima (Tablica 11). Sve statistički značajne korelacije dobivene Spearmanovom korelacijskom analizom pokazale su pozitivnu povezanost te tumačene sukladno Coltonovu kriteriju opisanom u poglavlju 2.4.

Korelacija promjene ekspresije gena *SIRT1* i *CAT* zabilježena je u svim vremenskim točkama; vrlo dobra do izvrsna povezanost neposredno nakon ronjenja i 3 sata nakon ronjenja ( $r=0.77$ ,  $P<0.001$ ;  $r=0.76$ ,  $P<0.001$ ) te umjerena do dobra povezanost 6 sati nakon ronjenja ( $r=0.74$ ,  $P<0.001$ ). Umjerena do dobra povezanost zabilježena je, također između promjene ekspresije gena *SIRT1* i *SOD1*, 3 i 6 sati nakon ronjenja ( $r=0.71$ ,  $P=0.002$ ;  $r=0.66$ ,  $P=0.005$ ) te između promjene ekspresije gena *SIRT1* i *SOD2* neposredno nakon ronjenja i 3 sata nakon ronjenja ( $r=0.55$ ,  $P=0.026$ ;  $r=0.54$ ,  $P=0.029$ ).

Korelacija promjene ekspresije gena *SIRT3* i *CAT* bila je umjerena do dobra u svim vremenskim točkama ( $r=0.74$ ,  $P=0.001$ ;  $r=0.60$ ,  $P=0.015$ ,  $r=0.75$ ,  $P<0.001$ ), dok je korelacija promjene ekspresije gena *SIRT3* i *SOD2* zabilježena samo neposredno nakon ronjenja ( $r=0.71$ ,  $P=0.001$ ). Promjena ekspresije gena *SOD1* nije korelirala s promjenom ekspresije gena *SIRT3* u niti jednoj vremenskoj točki.

**Tablica 11.** Povezanost promjene genskih ekspresija sirtuina i antioksidacijskih enzima u mononuklearnim stanicama krvi.

	$t_1$ nakon ronjenja	$t_2$ 3 h nakon ronjenja	$t_3$ 6 h nakon ronjenja
promjena mRNA gena <i>SIRT1</i> vs. promjena mRNA gena <i>CAT</i> , <i>SOD1</i> i <i>SOD2</i>			
<i>CAT</i>	$r=0,77^*$ ( $P<0,001$ )	$r=0,76^*$ ( $P<0,001$ )	$r=0,74^*$ ( $P<0,001$ )
<i>SOD1</i>	$r=0,48$ ( $P=0,060$ )	$r=0,71^*$ ( $P=0,002$ )	$r=0,66^*$ ( $P=0,005$ )
<i>SOD2</i>	$r=0,55^*$ ( $P=0,026$ )	$r=0,54^*$ ( $P=0,029$ )	$r=0,21$ ( $P=0,444$ )
promjena mRNA gena <i>SIRT3</i> vs. promjena mRNA gena <i>CAT</i> , <i>SOD1</i> i <i>SOD2</i>			
<i>CAT</i>	$r=0,74^*$ ( $P=0,001$ )	$r=0,60^*$ ( $P=0,015$ )	$r=0,75^*$ ( $P<0,001$ )
<i>SOD1</i>	$r=0,33$ ( $P=0,217$ )	$r=0,41$ ( $P=0,116$ )	$r=0,24$ ( $P=0,360$ )
<i>SOD2</i>	$r=0,71^*$ ( $P=0,001$ )	$r=0,15$ ( $P=0,579$ )	$r=0,28$ ( $P=0,289$ )

\*Statistički značajno ( $P<0,05$ ). *CAT* - katalaza, *SOD* - superoksid dismutaza, *SIRT* - sirtuin.

## **4 RASPRAVA**

S razvojem ronilačke opreme i ronilačkih protokola, SCUBA ronjenje postaje zastupljena rekreacijska aktivnost širom svijeta. Poznato je da redovita i umjerena fizička aktivnost poboljšava funkciju mnogih organskih sustava te djeluje protektivno na zdravlje. Mnoge zasluge u tim procesima pripisuju se umjereno povećanoj produkciji ROS-a i adaptacijskom antioksidacijskom odgovoru [14,142] te stimulaciji imunosnog sustava koja poboljšava otpornost na infekciju [143]. S druge strane, zahtjevna dugotrajna tjelovježba povezuje se sa štetnim učincima oksidacijskog stresa i imunosupresivnim odgovorom u fazi oporavka koji je praćen promjenom broja cirkulirajućih imunskih stanica te slabljenjem njihove funkcije, poznato pod nazivom „otvoreni prozor“ prema infekciji [144,145]. Premda se smatra da je imunski odgovor nakon vježbanja usko povezan s povećanom produkcijom ROS-a, ali i neuroendokrinim čimbenicima kao što su povećano otpuštanje kateholamina te hormona rasta i kortizola [143], o interakcijama između oksidacijskog stresa i imunskih promjena još uvijek se ne zna dovoljno. Međutim, dobro je poznato da je imunski odgovor nakon vježbanja u promjeni hematoloških parametara vrlo sličan kao kod infekcije ili upale [146].

Procijenjeno je da se ~60% liječničkih odluka zasniva na rezultatima laboratorijskih pretraga [147], a određivanje KKS jedna je od najčešće korištenih pretraga, posebice u hitnim stanjima. Stoga, u ovom je radu ispitan utjecaj ronjenja na promjene parametara KKS. S obzirom na to da statistički značajna promjena ne mora biti i klinički značajna promjena na kojoj se temelji klinička odluka, promjene parametara KKS nakon ronjenja također su uspoređene s izračunatim vrijednostima RCV-a. RCV se smatra mjerodavnim pokazateljom kliničke važnosti koji za promjene dva ili više uzastopnih rezultata iste osobe podrazumijeva uzimanje u obzir analitičke i intraindividualne biološke varijacije [140]. Premda promjene parametara KKS nakon ronjenja nisu dosegle klinički značajnu razliku procijenjenu prema RCV-u, praćenje parametara KKS neposredno prije i nakon ronjenja te 3 i 6 sati nakon ronjenja pokazalo je zanimljive promjene parametara bijele i crvene krvne slike.

Značajan porast apsolutnog broja neutrofila opažen već neposredno nakon izrona, koji je još više porastao 3 sata nakon ronjenja, svoj maksimum je dosegao 6 sati nakon ronjenja. Učinak ronjenja na leukocite i limfocite bio je odgođen; dok je povećanje broja leukocita opaženo 3 sata nakon ronjenja, povećanje limfocita pronađeno je 6 sati nakon ronjenja. Zanimljivo, smanjenje broja monocita zabilježeno neposredno nakon izrona, nakon 6 sati također je pokazalo porast u odnosu na vrijednosti prije ronjenja. Povećanje broja neutrofila nakon ronjenja očekivan je rezultat jer fizička aktivnost uzrokuje akutni imunski odgovor i

neutrofilnu mobilizaciju iz marginalnih bazena [148]. Osim toga, kod ronjenja, psihološki stres koji uzrokuje povećano otpuštanja stresnih hormona kao što su kateholamini i kortizol [15,149] i izlaganje hladnom okolišu također može pridonijeti mobilizaciji neutrofila [150,151]. Maksimalni porast neutrofila od 36%, opažen 6 sati nakon ronjenja, upućuje na značajan imunosni odgovor koji obično prati zahtjevne dugotrajne fizičke aktivnosti [152]. Međutim, takve vrste tjelovježbe često su praćene padom broja limfocita koji se povezuje s imunosupresijom [17,141]. U ovom je istraživanju, stoga bitna informacija da rekreacijsko ronjenje na 30 metara u trajanju od 30 minuta nije bilo praćeno smanjenjem broja limfocita, već je rezultiralo njihovim povećanjem 6 sati nakon ronjenja. Razlog povećanja broja limfocita 6 sati nakon ronjenja može se samo nagađati, ali treba uzeti u obzir da je posljedica kombinacije fizičke aktivnosti, psihološkog stresa, izlaganja hladnoći, hiperbariji i hiperoksiji. S obzirom na činjenicu da blaga monocitoza često prati povećanje neutrofila u imunom odgovoru induciranom vježbanjem [153], naročito uslijed izlaganja nižim temperaturama [151], neočekivani je rezultat ovog istraživanja smanjenje broja monocita neposredno nakon ronjenja. Mogući razlog ovog nalaza može biti posljedica transendotelijalne migracije uzrokovane promjenama vaskularne endotelne funkcije koje su opažene kod sukcesivnih zarona, ali i nakon samo jednog zarona [57,154,155].

Premda se imunosni odgovor može razlikovati između rekreacijskih i profesionalnih ronilaca, opaženi su rezultati u skladu s onima dobivenim u nekoliko istraživanja koja su provedena na profesionalnim roniocima [31,55,156]. Porast broja neutrofila bez značajnih promjena limfocita zabilježen je 3 sata nakon ronjenja na 40 metara dubine u trajanju od 25 minuta [31]. Uz to, 3 sata nakon ronjenja na 50 metara dubine u trajanju od 35 minuta opažen je značajan porast neutrofila i leukocita [55]. Međutim, kod profesionalnih ronilaca porast neutrofila nije bio prisutan neposredno nakon ronjenja [31,55], što je uočeno u ovom istraživanju. Razumno je pretpostaviti da je nepodudarnost u brzini mobilizacije neutrofila posljedica razlike imunosnog, ali i hormonalnog odgovora između rekreacijskih i profesionalnih ronilaca. S druge strane, Glavaš i suradnici pokazali su povećanje broja leukocita i neutrofila sa smanjenjem broja limfocita odmah nakon ronjenja na 54 metra dubine u trajanju od 100 minuta [156]. Imajući na umu da je ukupno vrijeme ronjenja u istraživanju Glavaša i suradnika bilo dosta duže nego u gore navedenim i ovom istraživanju (100 minuta vs. ~30 minuta), glavni razlog povećanja leukocita i neutrofila te smanjenja limfocita odmah nakon ronjenja vjerojatno leži u trajanju zarona.

Praćenjem parametara KKS prije i nakon ronjenja također su uočene promjene u crvenoj krvnoj slici. Pad broja eritrocita, hemoglobina i hematokrita opažen je 3 sata nakon ronjenja te je ostao prisutan i 6 sati nakon ronjenja. S obzirom na to da su eritrocitne membrane vrlo osjetljive na oksidacijsko oštećenje [157], smanjenje broja eritrocita, a posljedično i hemoglobina i hematokrita, može biti posljedica štetnog djelovanja ROS-a na eritrocitne membrane, njihovog oštećenja te razaranja eritrocita. Zanimljivo je primijetiti da istraživanja provedena na profesionalnim ronionicima nisu pokazala pad eritrocita i hemoglobina [54,55,156], dok je pad hematokrita zabilježen samo nakon ronjenja na 40 metara [54]. Mogući razlog za spomenute razlike između dobivenih rezultata na rekreacijskim ronionicima i rezultata istraživanja na profesionalnim ronionicima može biti povezan s razvijenijim antioksidacijskim mehanizmima kod profesionalnih ronilaca koji efikasnijim uklanjanjem ROS-a sprječavaju njihovo štetno djelovanje na eritrocitne membrane.

Dosadašnja znanja o utjecaju ronjenja na biljege oksidacijskog oštećenja i antioksidacijski status proizlaze iz istraživanja provedenih na profesionalnim ronionicima. Neusklađeni rezultati spomenutih istraživanja pri praćenju biljega oksidacijskog oštećenja nisu iznenađujući i mogu se objasniti različitim uvjetima u kojima su istraživanja provedena što uključuje različite dubine i trajanja izloženosti hiperbariji, korištene plinske smjese za disanje, vrste uzorka i metode određivanja. Međutim, još je jedan važan čimbenik koji treba razmotriti u pogledu ronjenja, kao i drugih oblika vježbanja, a to je učestalost provođenja koja može dovesti do prilagodbe organizma povećanom stvaranju ROS-a [14]. Budući da mnogi rekreacijski ronionci ronjenje ne prakticiraju redovito, posebice za vrijeme zimskog razdoblja, ovim istraživanjem ispitan je utjecaj prvog zarona nakon razdoblja ne ronjenja (najmanje 5 mjeseci) na biljege oksidacijskog stresa odnosno biljege oksidacijskog oštećenja lipida i proteina. Za praćenje promjena oksidacijskog oštećenja lipida i proteina korišteni su uzorci plazme i eritrocita, krvne frakcije koje se smatraju najosjetljivijim za detekciju štetnog djelovanja ROS-a [141]. Dobiveni rezultati pokazali su da ronjenje do 30 metara dubine u trajanju od 30 minuta ne dovodi do promjene proteinskih karbonilnih derivata, biljega oksidacijskog oštećenja proteina, ni u uzorcima plazme ni u uzorcima eritrocita. Porast lipidne peroksidacije, praćene TBARS metodom, također nije bio pronađen u plazmi ni u jednoj ispitivanoj vremenskoj točki. Međutim, neposredno nakon ronjenja TBARS vrijednosti u eritrocitima bile su značajno povećane u odnosu na vrijednosti prije ronjenja, dok su se 6 sati nakon ronjenja vratile na bazalne vrijednosti prije ronjenja.

Proteinski karbonili smatraju se biljgom ozbiljnog oksidacijskog oštećenja [38], stoga, veća osjetljivost TBARS metode na oksidacijski stres nije iznenađujući rezultat. Međutim, zanimljiv rezultat ovog istraživanja jest veća osjetljivost TBARS metode u frakciji eritrocita, nego u frakciji plazme koja upućuje na veliku osjetljivost eritrocitnih membrana na povećanu produkciju ROS-a te moguć razlog za opaženi pad eritrocita, a posljedično i hemoglobina i hematokrita. Treba spomenuti da se TBARS metoda, iako je naširoko prihvaćena kao vrlo osjetljiva metoda praćenja lipidne peroksidacije, često smatra nedovoljno specifičnom metodom zbog moguće interferencije, posebice kada se oksidacijsko oštećenje lipida povezuje s ljudskim bolestima u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika [158]. Međutim, TBARS metoda može se smatrati pouzdanom kada se mjeri u kontroliranom dosljednom protokolu [159], kao što je to bilo u ovom istraživanju gdje su se vrijednosti TBARS-a longitudinalno pratile kod ispitanika.

Porast biljega oksidacijskog oštećenja lipida mjerenih TBARS metodom, ali u plazmi, također je zabilježen kod profesionalnih policijskih ronilaca nakon ronjenja na 30 metara dubine u trajanju od 30 minuta i s dekompresijom od 3 minute [61]. U navedenom istraživanju lipidna peroksidacija nije bila praćena i u eritrocitima, a spomenuti rezultati u suprotnosti su s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju u frakciji plazme, što se može pripisati nešto drugačijoj izvedbi TBARS metode ili možda drugačijem profilu zarona odnosno dužem zadržavanju na većoj dubini koja se ogleda u potrebnoj dekompresiji tijekom izrona kod policijskih ronilaca. Zanimljivo je što drugo istraživanje istih autora, koje je provedeno s istim protokolom ronjenja za vrijeme redovitog treninga policijskih ronilaca nije pokazalo porast plazmatskih TBARS vrijednosti [62], što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja.

Ovim istraživanjem uočena nepromijenjena razina proteinskih karbonila u eritrocitima i plazmi te lipidne peroksidacije u plazmi, također je pokazana i kod profesionalnih ronilaca nakon ronjenja na 40 metara dubine s ukupnim trajanjem zarona od 25 minuta i dekompresijom od 5 minuta [54]. Međutim, navedeno istraživanje na 40 metara dubine nije pokazalo porast lipidne peroksidacije u eritrocitima, kao ni pad broja eritrocita [54], koji su zabilježeni u ovom istraživanju nakon ronjenja na 30 metara dubine. Unatoč razlikama u dubinama, nepromijenjena razina eritrocitne lipidne peroksidacije i njihovog broja u cirkulaciji vjerojatno je posljedica razvijenog adaptacijskog antioksidacijskog sustava u profesionalnih ronilaca, premda, treba uzeti u obzir i drugačije metode određivanja lipidne peroksidacije, koja je u navedenom istraživanju mjerena kolorimetrijskim određivanjem



MDA, a u ovom istraživanju određivanjem TBARS-a. S druge strane, nakon ronjenja na dubinu od 50 metara s ukupnim trajanjem zarona od 35 minuta i dekompresijskim zaustavljanjem od 9 minuta, ista grupa autora zabilježila je povećanje biljega oksidacijskog oštećenja lipida i DNA u plazmi [55] te proteina u neutrofilima [56]. Razlike rezultata navedenih istraživanja provedenih na 40 i 50 metara dubine upućuju na važnost utjecaja dubine i trajanja hiperbarične izloženosti (koja se očituje i u potrebnoj dekompresiji tijekom izrona) na prekomjerno stvaranje ROS-a i posljedičnu štetu.

Zanimljivo je primijetiti da sva spomenuta istraživanja provedena na profesionalnim ronionicima nisu pružila informaciju o učestalosti ronjenja ispitanika, što može igrati važnu ulogu u adaptacijskom odgovoru na povećanu produkciju ROS-a. Osim toga, očigledno je da različite metode, odabrani biljezi oksidacijskog stresa i vrste uzoraka mogu utjecati na rezultate koji upućuju na negativne posljedice oksidacijskog stresa. Stoga bi standardizacija metoda i preporuke za korištenje biljega oksidacijskog stresa i najosjetljivijih frakcija krvi za njihovo određivanje pridonijele tumačenju štetnog djelovanja povećane produkcije ROS-a ne samo kod ronjenja, već i u istraživanjima povezanosti oksidacijskog stresa s različitim fiziološkim i patološkim stanjima.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da antioksidacijski enzimi u limfocitima (prema korištenim izolacijskim metodama točnije mononuklearnim stanicama periferne krvi) pokazuju vrlo dobru prilagodbu na oksidacijski stres uzrokovan zahtjevnom fizičkom aktivnošću [41,160]. Iz tog su razloga u ovom radu za praćenje promjena aktivnosti antioksidacijskih enzima i razina ekspresije gena nakon ronjenja korištene mononuklearne stanice krvi. Rezultati su pokazali da zaron na 30 metara dubine u trajanju od 30 minuta inducira brzi antioksidacijski odgovor u mononuklearnim stanicama krvi povećanjem aktivnosti katalaze, SOD2 i posljedično aktivnosti ukupne SOD. Premda su aktivnosti katalaze i SOD2 značajno porasle odmah nakon ronjenja, njihove maksimalne vrijednosti zabilježene 3 sata nakon ronjenja upućuju na odgođenu akciju u uklanjanju ROS-a. Mjerenje aktivnosti antioksidacijskih enzima 6 sati nakon ronjenja pokazalo je pad njihove aktivnosti koji se kod SOD2 i ukupne SOD vratio gotovo na vrijednosti prije ronjenja, dok je aktivnost katalaze i dalje ostala značajno veća u odnosu na vrijednosti prije ronjenja. Budući da SOD predstavlja prvu liniju obrane od visoko reaktivnog superoksidnog radikala pretvarajući ga u manje reaktivan  $H_2O_2$  i kisik, dok katalaza ima važnu ulogu pri uklanjanju prekomjernih razina  $H_2O_2$ , razlog povišenim vrijednostima aktivnosti katalaze 6 sati nakon ronjenja, ali ne i SOD2 i ukupne SOD, vjerojatno leži upravo u njihovim ulogama. Premda ovim istraživanjem

nije praćena aktivnost katalaze duže od 6 sati nakon ronjenja, ali uzimajući u obzir da se katalaza smatra jednim od najdjelotvornijih enzima u uvjetima oksidacijskog stresa [53], konstantno prisutna veća aktivnost katalaze može imati važnu ulogu u adaptacijskim mehanizmima na oksidacijski stres.

Porast aktivnosti antioksidacijskih enzima također je zabilježen i u prethodno spomenutim istraživanjima provedenim na profesionalnim ronjocima. Nakon ronjenja na 40 metara dubine uoćen je porast aktivnosti katalaze i GPx u limfocitima, neposredno i 3 sata nakon ronjenja [31]. Aktivnost SOD nije bila mjerena u navedenom istraživanju, a u ostalim istraživanjima promjene aktivnosti antioksidacijskih enzima praćene su u eritrocitima i plazmi. Zanimljivo je primijetiti da je povećanje aktivnosti katalaze i SOD u plazmi opaženo nakon ronjenja na 40 i 50 metara dubine [54,55], dok promjene njihovih aktivnosti nisu pronađene u eritrocitima nakon ronjenja na 30 i 40 metara dubine [54,61,62].

O mehanizmima aktivacije antioksidacijskog odgovora još uvijek se ne zna dovoljno. Stoga je sljedeći korak ovog istraživanja bio ispitati promjene razine ekspresije gena *CAT*, *SOD1* i *SOD2* te *SIRT1* i *SIRT3* za čije se proteinske produkte smatra da imaju značajnu ulogu u antioksidacijskom odgovoru. Premda je zapažen lagani pad razine mRNA za sve ispitivane antioksidacijske enzime, zbog velikih interindividualnih varijacija između ispitanika, statistički značajna promjena utvrđena je samo za pad razine ekspresije gena *CAT* neposredno nakon ronjenja i 3 sata nakon ronjenja. Razlozi neslaganja između promjena aktivnosti katalaze i razine mRNA gena *CAT* mogu se samo nagađati kao posljedica mnogih različitih čimbenika kao što su posttranskripcijska regulacija, učinkovitost translacije, stabilnost mRNA, učinci nekodirajućih RNA i posttranslacijskih događanja uključujući regulaciju enzimske aktivnosti. Porast aktivnosti katalaze uz smanjenje ekspresije gena *CAT*, praćenih u limfocitima, također je opažen nakon vježbe trčanja u trajanju od 45 minuta pri nižim temperaturama (10-12°C), dok je suprotni smjer za ekspresiju gena *CAT* zabilježen nakon iste vježbe pri višim temperaturama (30-32°C) [161]. S obzirom na kompleksne regulacijske mehanizme genske ekspresije, razlozi za opaženo smanjenje mRNA gena *CAT* ostaju nepoznati, ali čini se da temperatura okoliša može utjecati na njih. S druge strane, nekoliko istraživanja pokazalo je porast genske ekspresije antioksidacijskih enzima u limfocitima/mononuklearnim stanicama krvi praćenih nakon dužih intenzivnih fizičkih aktivnosti (trosatna intenzivna vježba, petodnevna biciklistička utrka) [162,163], kao i dužeg razdoblja redovite fizičke aktivnosti (treninzi snage dva puta tjedno tijekom 21 tjedna) [164]. Uzimajući u obzir da je u ovom istraživanju genska ekspresija bila praćena nakon samo

jednog zarona u trajanju od 30 minuta i nakon razdoblja ne ronjenja, postoji mogućnost da bi prakticiranje ronjenja u dužem razdoblju izazvalo isti odgovor.

Otkrića novih puteva stanične signalizacije i molekula kao što su sirtuini otvorila su nova područja redoks biologije koja pokazuju ne samo negativne posljedice povećanog stvaranja ROS-a, već i pozitivne odnosno adaptacijske i hormezne odgovore organizma na staničnim i sustavnim razinama. Može se reći da sirtuini, prozvani „molekulski semafori na raskrižju oksidacijskog stresa“ [4], zbog njihove povezanosti s produženjem životnog vijeka imaju povlašten status u području redoks biologije i istraživanja procesa starenja [3]. Premda su istraživanja posljednjeg desetljeća dala veliki doprinos razumijevanju uloge i značaja sirtuina u oksidacijskom stresu [77,101], istraživanja na ljudskim modelima još uvijek je premalo, posebice u ljudskoj krvi. U ovom je radu pokazano da oksidacijski stres uzrokovan ronjenjem na 30 metara dubine u trajanju od 30 minuta uzrokuje smanjenje ekspresije gena *SIRT1* i značajno povećanje ekspresije gena *SIRT3* u mononuklearnim stanicama krvi. U suprotnosti s opaženim smanjenjem ekspresije gena *SIRT1*, Dumke i suradnici su pokazali povećanje ekspresije gena *SIRT1*, praćene u uzorku mišićnog tkiva dobivenog biopsijom, nakon 3 sata intenzivnog biciklizma i nakon 3 dana prakticiranja ove vrste fizičke aktivnosti [165]. Mogući razlozi neusklađenosti rezultata za promjene ekspresije gena *SIRT1* vjerojatno leže u zahtjevnosti i dužini trajanja fizičke aktivnosti, međutim treba uzeti u obzir i drugu vrstu uzorka i razlike između ispitanika koje je spomenutim istraživanjem obuhvatilo dobro uvježbane bicikliste. U pogledu ekspresije gena *SIRT3*, dobiveni su rezultati u skladu s rezultatima pokazanim od Mestre-Alfaro i suradnika [161]. Navedeni autori pokazali su da trčanje u trajanju od 45 minuta pri temperaturi okoline od 10-12°C dovodi do porasta ekspresije gena *SIRT3* u limfocitima nakon 2 sata, dok taj učinak nije zabilježen nakon iste vježbe na višim temperaturama (30-32°C). S obzirom na to da je u ovom istraživanju zabilježena slična temperatura okoline tijekom ronjenja (14-16°C), unatoč razlikama u vrsti fizičke aktivnosti, porast ekspresije gena *SIRT3* kod nižih temperatura okoline podupire opažanje da izlaganje hladnoći može utjecati na njegovu gensku ekspresiju zapaženo na životinjskom modelu [132]. Nadalje, pokazano je da redovita tjelovježba tijekom dužeg razdoblja može povećati razinu *SIRT3* u skeletnim mišićima starijih i mlađih ispitanika [166,167]. Zanimljivo istraživanje Lanza i suradnika, također je pokazalo da se razina *SIRT3* u ljudskim mišićima smanjuje s dobi kod sjedilačkog načina života, dok utjecaj životne dobi na razinu *SIRT3* nije pronađen kod ljudi koji redovito prakticiraju fizičku aktivnost [168]. Budući da je u ovom istraživanju pokazano da jedan zaron na 30 metara dubine u trajanju od

30 minuta može dovesti do porasta ekspresije gena *SIRT3*, moguće je da bi prakticiranje ronjenja u dužem razdoblju moglo još više stimulirati njegovu gensku ekspresiju. Porast genske i proteinske ekspresije *SIRT3*, kao i aktivnosti, mogao bi biti ključni korak u razvoju adaptacijskih antioksidacijskih mehanizama kod uzastopnih zarona.

Treba spomenuti da dosadašnja znanja o djelovanju *SIRT3* na njegove ciljne mete, opisana u poglavlju 1.4.3, predstavljaju ovog člana obitelji sirtuina kao intrigantnu molekulu s protektivnim i pozitivnim učincima na opće zdravlje. Osim toga, zbog njegove uloge u antioksidacijskom odgovoru i činjenice da je jedini član obitelji sirtuina za kojeg postoje dokazi o povezanosti s dužinom životnog vijeka kod ljudi, *SIRT3* je posvećena velika pažnja u procesima i bolestima povezanim sa starenjem kao što su dijabetes, kardiovaskularne, neurodegenerativne, respiratorne i autoimune bolesti te nastanak tumora [169,170]. Stoga, opažen porast ekspresije gena *SIRT3* upućuje na to da rekreacijsko ronjenje može djelovati na principu hormeze u kojem nisko-umjereno povećanje ROS-a može imati blagotvorno djelovanje na zdravlje i procese povezane sa staničnim starenjem.

Utjecaj životne dobi na nastajanje oksidacijskih oštećenja i aktivnost antioksidacijskih enzima tema je mnogih istraživanja, a nakupljanje oksidacijskih oštećenja jedna je od teorija staničnog starenja [171]. Brojna istraživanja su pokazala veće razine biljega oksidacijskog oštećenja lipida i proteina kod ispitanika starije životne dobi u odnosu na ispitanike mlađe životne dobi [172-175]. S druge strane, još uvijek nije jasno prati li proces starenja porast ili pad aktivnosti antioksidacijskih enzima [175,176]. Kao što je već spomenuto, opažen je i utjecaj životne dobi na proteinsku ekspresiju *SIRT3* [168], kao i smanjenje aktivnosti ukupnih sirtuina iza četrdesete godine života [76]. Iz navedenih razloga u ovom radu korelacijskom analizom ispitana je povezanost životne dobi ispitanika s bazalnim vrijednostima ispitivanih parametara prije ronjenja te njihovim vrijednostima nakon ronjenja. Rezultati korelacijskih analiza pokazali su da nema povezanosti životne dobi ispitanika s bazalnim vrijednostima biljega oksidacijskog oštećenja lipida i proteina i aktivnosti antioksidacijskih enzima niti s njihovim vrijednostima nakon ronjenja. Nije opažena ni povezanost životne dobi ispitanika s promjenama ekspresije gena *CAT*, *SOD1*, *SOD2* te *SIRT1* i *SIRT3* nakon ronjenja. Uzimajući u obzir da je raspon životne dobi ispitanika u ovom istraživanju bio između 30 i 52 godine, navedeni rezultati nisu iznenađujući i zapravo upućuju na homogenu skupinu ispitanika s obzirom na životnu dob.

Međutim, korelacijske analize promjena genskih ekspresija ispitivanih sirtuina i antioksidacijskih enzima pokazale su zanimljive rezultate. Pronađena je pozitivna povezanost između promjene ekspresije gena *SIRT1* i promjene ekspresije gena *CAT*, *SOD1* i *SOD2* te između promjene ekspresije gena *SIRT3* i promjene ekspresije gena *CAT* i *SOD2*, gotovo u svim vremenskim točkama nakon ronjenja. Najveći stupanj korelacije s promjenom ekspresije gena *SIRT1* i *SIRT3* pokazala je promjena ekspresije gena *CAT*. Predstavljeni rezultati u mononuklearnim stanicama krvi upućuju na usku povezanost ispitivanih sirtuina i antioksidacijskih enzima koja se može detektirati u najčešće korištenom biološkom uzorku, uzorku krvi.

Premda su intenzivna istraživanja posljednjih godina pružila brojne odgovore o oksidacijskom stresu induciranom vježbanjem, još je uvijek puno pitanja i suprotnosti, posebice u odnosu na različite oblike rekreacijskih i profesionalnih sportova. SCUBA ronjenje predstavlja poseban oblik oksidacijskog stresa uzrokovanog vježbanjem u kojem je zbog dodatnog utjecaja hiperoksije granica između pozitivnih i negativnih učinaka vrlo skliska. Rezultati prezentirani u ovom radu po prvi put pokazuju utjecaj rekreacijskog ronjenja na oksidacijski/antioksidacijski status i promjene ekspresije gena *SIRT1* i *SIRT3*. Kod rekreacijskih ronilaca koji nisu ronili tijekom zimskog razdoblja antioksidacijski mehanizmi nisu bili dovoljno uspješni da spriječe oksidacijsko oštećenje nakon ronjenja na 30 metara dubine u trajanju od 30 minuta. S druge strane, opažen porast ekspresije gena *SIRT3* daje temelj za blagotvorno djelovanje rekreacijskog ronjenja.

## **5 ZAKLJUČCI**

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i rasprave može se zaključiti sljedeće.

- Rekreativno SCUBA ronjenje praćeno je povećanjem broja leukocita te smanjenjem broja eritrocita, hemoglobina i hematokrita. Izostanak smanjenja broja limfocita upućuje da rekreativno ronjenje ne prati imunosni odgovor kao kod zahtjevne, dugotrajne tjelovježbe gdje je uočena pojava imunosupresije. Zapažene promjene nisu klinički značajne i vjerojatno neće utjecati na kliničku odluku pri interpretaciji nalaza KKS kod ronilaca.
- Nakon zarona na dubinu od 30 metara u trajanju od 30 minuta, antioksidacijski mehanizmi kod ronilaca koji nisu ronili tijekom zimskog razdoblja nisu bili dovoljni da spriječe oksidacijsko oštećenje lipida u eritrocitima, praćeno TBARS metodom. Međutim, porast proteinskih karbonila, koji se smatraju biljekom ozbiljnog oksidacijskog oštećenja proteina, nije bio prisutan. Istraživanja na manjim dubinama nakon različitih razdoblja ne ronjenja mogla bi biti korisna u formiranju smjernica za rekreativno ronjenje.
- Lipidna peroksidacija, praćena TBARS metodom u uzorcima eritrocita i plazme, pokazala se osjetljivijim biljekom oksidacijskog stresa od mjerenja proteinskih karbonila. Eritrociti su se pokazali osjetljivijom frakcijom krvi od plazme za praćenje lipidne peroksidacije TBARS metodom.
- Povećanje aktivnosti katalaze, SOD2 te posljedično ukupne SOD, zapažen već neposredno nakon izrona, pokazuje brzu aktivaciju antioksidacijskih mehanizama na povećanu produkciju ROS-a tijekom ronjenja. Povećanje aktivnosti ispitivanih antioksidacijskih enzima nije bilo praćeno porastom njihove genske ekspresije.
- Jedan zaron uzrokovao je smanjenje razine ekspresije gena *SIRT1* koje se 6 sati nakon ronjenja vratilo na bazalne vrijednosti prije ronjenja te značajno povećanje ekspresije gena *SIRT3* 6 sati nakon ronjenja. Zbog mnogih protektivnih uloga *SIRT3* povezanih s održavanjem mitohondrijskog metabolizma i antioksidacijskim odgovorom, porast ekspresije gena *SIRT3* zapažen nakon samo jednog ronjenja zaslužuje pažnju u daljnjim istraživanjima o utjecaju sukcesivnih zarona na njegovu ekspresiju i aktivnost. Porast ekspresije gena *SIRT3* može biti korak u adaptacijskom odgovoru na ronjenje.

- Životna dob ronilaca (30 do 52 godine) nije bila povezana s bazalnim vrijednostima ispitivanih parametara niti s njihovim promjenama nakon ronjenja.
- Zabilježena pozitivna korelacija promjena genskih ekspresija ispitivanih sirtuina i antioksidacijskih enzima upućuje na njihovu povezanost koja se može detektirati u najčešće korištenom biološkom uzorku, uzorku krvi.
- Istraživanja ronjenjem izazvanog oksidacijskog stresa, zbog dodatnog izlaganja hiperoksiji i niskim temperaturama, mogu pridonijeti novim spoznajama o ulozi sirtuina u antioksidacijskom i hormeznom odgovoru na povećanu produkciju ROS-a.



## **6 POPIS LITERATURE**

- 
- [1] Perovic A, Unic A, Dumic J. Recreational scuba diving: negative or positive effects of oxidative and cardiovascular stress? *Biochem Med* 2014;24:235-247.
- [2] Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *Biomed Res Int* 2014;2014:761264.
- [3] Webster BR, Lu Z, Sack MN, Scott I. The role of sirtuins in modulating redox stressors. *Free Radic Biol Med* 2012;52:281-290.
- [4] Rajendran R, Garva R, Krstic-Demonacos M, Demonacos C. Sirtuins: molecular traffic lights in the crossroad of oxidative stress, chromatin remodeling, and transcription. *J Biomed Biotechnol* 2011;368276.
- [5] Grabowska W, Sikora E, Bielak-Zmijewska A. Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process. *Biogerontology* 2017;18:447-476.
- [6] CMAS, Universal standards and procedures. Dostupno na: <http://www.cmas.org/technique/general-documents>. Pristupljeno: 20. prosinca 2017.
- [7] Bove AA. Diving medicine. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:1479-1486.
- [8] Pendergast DR, Lundgren CE. The underwater environment: cardiopulmonary, thermal, and energetic demands. *J Appl Physiol* 2009;106:276-283.
- [9] Hapfelmeier G, Zieglgänsberger W, Haseneder R, Schneck H, Kochs E. Nitrous oxide and xenon increase the efficacy of GABA at recombinant mammalian GABA(A) receptors. *Anesth Analg* 2000;91:1542-1549.
- [10] Dujčić Z, Obad A, Palada I, Valic Z, Brubakk AO. A single open sea air dive increases pulmonary artery pressure and reduces right ventricular function in professional divers. *Eur J Appl Physiol* 2006;97:478-485.
- [11] Madden LA, Laden G. Gas bubbles may not be the underlying cause of decompression illness - The at-depth endothelial dysfunction hypothesis. *Med Hypotheses* 2009;72:389-392.
- [12] Gore A, Muralidhar M, Espey MG, Degenhardt K, Mantell LL. Hyperoxia sensing: from molecular mechanisms to significance in disease. *J Immunotoxicol* 2010;7:239-254.
- [13] Dean JB, Mulkey DK, Henderson RA 3rd, Potter SJ, Putnam RW. Hyperoxia, reactive oxygen species, and hyperventilation: oxygen sensitivity of brain stem neurons. *J Appl Physiol* 2004;96:784-791.

- [14] Gomes EC, Silva AN, de Oliveira MR. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid Med Cell Longev* 2012;2012:756132.
- [15] Nieman DC. Special feature for the Olympics: Effects of exercise on the immune system: Exercise effects on systemic immunity. *Immunol Cell Biol* 2000;78:496-501.
- [16] Anegg U, Dietmaier G, Maier A, Tomaselli F, Gabor S, Kallus KW, Smolle-Jüttner FM. Stress-induced hormonal and mood responses in scuba divers: a field study. *Life Sci* 2002;70:2721-2734.
- [17] Bøyum A, Rønsen O, Tennfjord VA, Tollefsen S, Haugen AH, Opstad PK, Bahr R. Chemiluminescence response of granulocytes from elite athletes during recovery from one or two intense bouts of exercise. *Eur J Appl Physiol* 2002;88:20-28.
- [18] Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985;311:617-631.
- [19] Cabello-Verrugio C, Ruiz-Ortega M, Mosqueira M, Simon F. Oxidative Stress in Disease and Aging: Mechanisms and Therapies. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:8786564.
- [20] Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem* 2015;30:11-26.
- [21] Luo H, Chiang HH, Louw M, Susanto A, Chen D. Nutrient Sensing and the Oxidative Stress Response. *Trends Endocrinol Metab* 2017;28:449-460.
- [22] Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Hey-Mogensen M, Orr AL, Brand MD. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol* 2013;1:304-312.
- [23] Lane N. *The Vital Question: Why Is Life the Way It Is?* 1st ed. Profile Books Ltd.; London, UK: 2015. str. 237-279.
- [24] Webb R, Hughes MG, Thomas AW, Morris K. The ability of exercise-associated oxidative stress to trigger redox-sensitive signalling responses. *Antioxidants (Basel)* 2017;6. pii:E63.
- [25] Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:1245049.
- [26] Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1972;128:617-630.

- [27] Gille L, Nohl H. The existence of a lysosomal redox chain and the role of ubiquinone. *Arch Biochem Biophys* 2000;375:347-354.
- [28] Van Eeden SF, Klut ME, Walker BA, Hogg JC. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J Immunol Methods* 1999;232:23-43.
- [29] Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 2008;88:1243-1276.
- [30] Freeman BA, Crapo JD. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem* 1981;256:10986-10992.
- [31] Ferrer MD, Sureda A, Batle JM, Tauler P, Tur JA, Pons A. Scuba diving enhances endogenous antioxidant defenses in lymphocytes and neutrophils. *Free Radic Res* 2007;41:274-281.
- [32] Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J Appl Physiol* 2009;106:988-995.
- [33] Reis A, Spickett CM. Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochim Biophys Acta* 2012;1818:2374-2387.
- [34] Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81-128.
- [35] Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006;52:601-623.
- [36] Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in study of human disease. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1151-1161.
- [37] Cai Z, Yan LJ. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *J Biochem Pharmacol Res* 2013;1:15-26.
- [38] Colak E. New markers of oxidative damage to macromolecules. *JMB* 2008;27:1-16.
- [39] Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 2006;10:389-406.
- [40] Nystrom T. A bacterial kind of aging. *PLoS Genet* 2007;3:e224.
- [41] Madian AG, Regnier FE. Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites. *J Proteome Res* 2010;9:3766-3780.
- [42] Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res* 2006;40:1250-1258.

- [43] Shulaev V, Oliver DJ. Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. New tools for reactive oxygen species research. *Plant Physiol* 2006;141:367-372.
- [44] Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74:139-162.
- [45] Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2009;27:120-139.
- [46] Collins AR, Cadet J, Moller L, Poulsen HE, Vina J. Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch Biochem Biophys* 2004;423:57-65.
- [47] Gutteridge JM, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;393:561-564.
- [48] Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* 2001;276:38084-38089.
- [49] Weisiger RA, Fridovich I. Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem* 1973;248:3582-3592.
- [50] Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:2032-2036.
- [51] Lei XG, Cheng WH, McClung JP. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Annu Rev Nutr* 2007;27:41-61.
- [52] Lledías F, Rangel P, Hansberg W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem* 1998;273:10630-10637.
- [53] Hunt CR, Sim JE, Sullivan SJ, Featherstone T, Golden W, Von Kapp-Herr C i sur. Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. *Cancer Res* 1998;58:3986-3992.
- [54] Sureda A, Ferrer MD, Batle JM, Tauler P, Tur JA, Pons A. Scuba diving increases erythrocyte and plasma antioxidant defenses and spares NO without oxidative damage. *Med Sci Sports Exerc* 2009;41:1271-1276.
- [55] Sureda A, Batle JM, Ferrer MD, Mestre-Alfaro A, Tur JA, Pons A. Scuba diving activates vascular antioxidant system. *Int J Sports Med* 2012;33:531-536.

- [56] Sureda A, Batle JM, Capó X, Martorell M, Córdova A, Tur JA, Pons A. Scuba diving induces nitric oxide synthesis and the expression of inflammatory and regulatory genes of the immune response in neutrophils. *Physiol Genomics* 2014;46:647-654.
- [57] Obad A, Marinovic J, Ljubkovic M, Breskovic T, Modun D, Boban M, Dujic Z. Successive deep dives impair endothelial function and enhance oxidative stress in man. *Clin Physiol Funct Imaging* 2010;30:432-438.
- [58] Obad A, Palada I, Valic Z, Ivancev V, Baković D, Wisløff U i sur. The effects of acute oral antioxidants on diving-induced alterations in human cardiovascular function. *J Physiol* 2007;578:859-870.
- [59] Obad A, Valic Z, Palada I, Brubakk AO, Modun D, Dujic Z. Antioxidant pretreatment and reduced arterial endothelial dysfunction after diving. *Aviat Space Environ Med* 2007;78:1114-1120.
- [60] Morabito C, Bosco G, Pilla R, Corona C, Mancinelli R, Yang Z i sur. Effect of pre-breathing oxygen at different depth on oxidative status and calcium concentration in lymphocytes of scuba divers. *Acta Physiol* 2011;202:69-78.
- [61] Radojevic-Popovic R, Zivkovic V, Jeremic N, Sretenovic J, Velicanin N, Bradic J, Jakovljevic V. An evaluation of the redox state in professional scuba divers. *Undersea Hyperb Med* 2015;42:409-416.
- [62] Radojevic-Popovic R, Nikolic T, Stojic I, Jeremic J, Srejevic I, Pesic G, Jakovljevic V. The influence of different types of physical activity on the redox status of scuba divers. *Ser J Exp Clin Res* 2016;17:19-25.
- [63] Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 2007;404:1-13.
- [64] Morris BJ. Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radic Biol Med* 2013;56:133-171.
- [65] Du J, Zhou Y, Su X, Yu JJ, Khan S, Jiang H i sur. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science* 2011;334:806-809.
- [66] Li W, Zhang B, Tang J, Cao Q, Wu Y, Wu C i sur. Sirtuin 2, a mammalian homolog of yeast silent information regulator-2 longevity regulator, is an oligodendroglial protein that decelerates cell differentiation through deacetylating alpha-tubulin. *J Neurosci* 2007;27:2606-2616.
- [67] Sinclair DA. Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech Ageing Dev* 2005;126:987-1002.

- [68] Wątroba M, Szukiewicz D. The role of sirtuins in aging and age-related diseases. *Adv Med Sci* 2016;61:52-62.
- [69] Lin SJ, Defossez PA, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 2000;289:2126-2128.
- [70] Hallows WC, Yu W, Smith BC, Devries MK, Ellinger JJ, Someya S i sur. Sirt3 promotes the urea cycle and fatty acid oxidation during dietary restriction. *Mol Cell* 2011;41:139-149.
- [71] Geng YQ, Li TT, Liu XY, Li ZH, Fu YC. SIRT1 and SIRT5 activity expression and behavioral responses to calorie restriction. *J Cell Biochem* 2011;112:3755-3761.
- [72] Crujeiras AB, Parra D, Goyenechea E, Martínez JA. Sirtuin gene expression in human mononuclear cells is modulated by caloric restriction. *Eur J Clin Invest* 2008;38:672-678.
- [73] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-247.
- [74] Kumar R, Mohan N, Upadhyay AD, Singh AP, Sahu V, Dwivedi S i sur. Identification of serum sirtuins as novel noninvasive protein markers for frailty. *Aging Cell* 2014;13:975-980.
- [75] Couzin-Frankel J. Genetics. Aging genes: the sirtuin story unravels. *Science* 2011;334:1194-1198.
- [76] Villanova L, Vernucci E, Pucci B, Pellegrini L, Nebbioso M, Mauri C i sur. Influence of age and physical exercise on sirtuin activity in humans. *J Biol Regul Homeost Agents* 2013;27:497-507.
- [77] Lappalainen Z. Sirtuins: a family of proteins with implications for human performance and exercise physiology. *Res Sports Med* 2011;19:53-65.
- [78] Tanno M, Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y. Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem* 2007;282:6823-6832.
- [79] Zhang T, Kraus WL. SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: linking NAD(+) metabolism and signaling to the control of cellular functions. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:1666-1675.
- [80] Shah ZH, Ahmed SU, Ford JR, Allison SJ, Knight JR, Milner J. A deacetylase-deficient SIRT1 variant opposes full-length SIRT1 in regulating tumor suppressor p53 and governs expression of cancer-related genes. *Mol Cell Biol* 2012;32:704-716.

- [81] Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A i sur. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 2001;107:137-148.
- [82] Jeong J, Juhn K, Lee H, Kim SH, Min BH, Lee KM i sur. SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. *Exp Mol Med* 2007;39:8-13.
- [83] Erion DM, Yonemitsu S, Nie Y, Nagai Y, Gillum MP, Hsiao JJ i sur. SirT1 knockdown in liver decreases basal hepatic glucose production and increases hepatic insulin responsiveness in diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:11288-11293.
- [84] Potente M, Ghaeni L, Baldessari D, Mostoslavsky R, Rossig L, Dequiedt F i sur. SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes Dev* 2007;21:2644-2658.
- [85] Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y i sur. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004;303:2011-2015.
- [86] Van der Horst A, Tertoolen LG, de Vries-Smits LM, Frye RA, Medema RH, Burgering BM. FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1). *J Biol Chem* 2004;279:28873-28879.
- [87] Giannakou ME, Partridge L. The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends Cell Biol* 2004;14:408-412.
- [88] Kauppinen A, Suuronen T, Ojala J, Kaarniranta K, Salminen A. Antagonistic crosstalk between NF- $\kappa$ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cell Signal* 2013;25:1939-1948.
- [89] Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 2005;434:113-118.
- [90] Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R i sur. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 2004;429:771-776.
- [91] Hayashida S, Arimoto A, Kuramoto Y, Kozako T, Honda S, Shimeno H, Soeda S. Fasting promotes the expression of SIRT1, an NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase, via activation of PPARalpha in mice. *Mol Cell Biochem* 2010;339:285-292.
- [92] Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J i sur. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol* 2006;4:e31.



- [93] Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman TA, Jung SB i sur. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:14855-14860.
- [94] Li X, Zhang S, Blander G, Tse JG, Krieger M, Guarente L. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol Cell* 2007;28:91-106.
- [95] Wang GL, Fu YC, Xu WC, Feng YQ, Fang SR, Zhou XH. Resveratrol inhibits the expression of SREBP1 in cell model of steatosis via Sirt1-FOXO1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;380:644-649.
- [96] Nakahata Y, Sahar S, Astarita G, Kaluzova M, Sassone-Corsi P. Circadian control of the NAD<sup>+</sup> salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* 2009;324:654-657.
- [97] Lee IH, Cao L, Mostoslavsky R, Lombard DB, Liu J, Bruns NE i sur. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:3374-3379.
- [98] Salminen A, Kaarniranta K. SIRT1: regulation of longevity via autophagy. *Cell Signal* 2009;21:1356-1360.
- [99] Yuan J, Minter-Dykhouse K, Lou Z. A c-Myc-SIRT1 feedback loop regulates cell growth and transformation. *J Cell Biol* 2009;185:203-211.
- [100] Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell* 2010;38:864-878.
- [101] Santos L, Escande C, Denicola A. Potential modulation of sirtuins by oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:9831825.
- [102] St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S i sur. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 2006;127:397-408.
- [103] Yang Y, Fu W, Chen J, Olashaw N, Zhang X, Nicosia SV i sur. SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol* 2007;9:1253-1262.
- [104] Han MK, Song EK, Guo Y, Ou X, Mantel C, Broxmeyer HE. SIRT1 regulates apoptosis and Nanog expression in mouse embryonic stem cells by controlling p53 subcellular localization. *Cell Stem Cell* 2008;2:241-251.
- [105] Hasegawa K, Wakino S, Yoshioka K, Tatematsu S, Hara Y, Minakuchi H i sur. Sirt1 protects against oxidative stress-induced renal tubular cell apoptosis by the

- bidirectional regulation of catalase expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;372:51-56.
- [106] Braidy N, Guillemin GJ, Mansour H, Chan-Ling T, Poljak A, Grant R. Age related changes in NAD<sup>+</sup> metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats. *PLoS One* 2011; 6:e19194.
- [107] Bai B, Vanhoutte PM, Wang Y. Loss-of-SIRT1 function during vascular ageing: hyperphosphorylation mediated by cyclin-dependent kinase 5. *Trends Cardiovasc Med* 2014;24:81-84.
- [108] Hwang JW, Yao H, Caito S, Sundar IK, Rahman I. Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence. *Free Radic Biol Med* 2013;61:95-110.
- [109] Chung S, Yao H, Caito S, Hwang JW, Arunachalam G, Rahman I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys* 2010;501:79-90.
- [110] Bellizzi D, Rose G, Cavalcante P, Covello G, Dato S, De Rango F i sur. A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages. *Genomics* 2005;85:258-263.
- [111] Bellizzi D, Dato S, Cavalcante P, Covello G, Di Cianni F, Passarino G i sur. Characterization of a bidirectional promoter shared between two human genes related to aging: SIRT3 and PSMD13. *Genomics* 2007;89:143-150.
- [112] Rose G, Dato S, Altomare K, Bellizzi D, Garasto S, Greco V i sur. Variability of the SIRT3 gene, human silent information regulator Sir2 homologue, and survivorship in the elderly. *Exp Gerontol* 2003;38:1065-1070.
- [113] Sundaresan NR, Samant SA, Pillai VB, Rajamohan SB, Gupta MP. SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70. *Mol Cell Biol* 2008;28:6384-6401.
- [114] Scher MB, Vaquero A, Reinberg D. SirT3 is a nuclear NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes Dev* 2007;21:920-928.
- [115] Kincaid B, Bossy-Wetzl E. Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* 2013;5:48.
- [116] Hallows WC, Lee S, Denu JM. Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:10230-10235.

- [117] Haigis MC, Deng CX, Finley LWS, Kim HS, Gius D. SIRT3 is a mitochondrial tumor suppressor: a scientific tale that connects aberrant cellular ROS, the Warburg effect, and carcinogenesis. *Cancer Res* 2012;72:2468-2472.
- [118] Ahn BH, Kim HS, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A i sur. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:14447-14452.
- [119] Tao R, Coleman MC, Pennington JD, Ozden O, Park SH, Jiang H i sur. Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Mol Cell* 2010;40:893-904.
- [120] Schlicker C, Gertz M, Papatheodorou P, Kachholz B, Becker CF, Steegborn C. Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5. *J Mol Biol* 2008;382:790-801.
- [121] Cimen H, Han MJ, Yang Y, Tong Q, Koc H, Koc EC. Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry* 2010;49:304-311.
- [122] Jacobs KM, Pennington JD, Bisht KS, Aykin-Burns N, Kim HS, Mishra M i sur. SIRT3 interacts with the daf-16 homolog FOXO3a in the mitochondria, as well as increases FOXO3a dependent gene expression. *Int J Biol Sci* 2008;4:291-299.
- [123] Li S, Banck M, Mujtaba S, Zhou MM, Sugrue MM, Walsh MJ. p53-induced growth arrest is regulated by the mitochondrial SirT3 deacetylase. *PLoS One* 2010;5:e10486.
- [124] Hafner AV, Dai J, Gomes AP, Xiao CY, Palmeira CM, Rosenzweig A, Sinclair DA. Regulation of the mPTP by SIRT3-mediated deacetylation of CypD at lysine 166 suppresses age-related cardiac hypertrophy. *Aging (Albany NY)* 2010;2:914-923.
- [125] Bell EL, Emerling BM, Ricoult SJ, Guarente L. SirT3 suppresses hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production. *Oncogene* 2011;30:2986-2996.
- [126] Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E, Jing E, Schwer B, Lombard DB i sur. SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature* 2010;464:121-125.
- [127] Cui Y, Qin L, Wu J, Qu X, Hou C, Sun W i sur. SIRT3 Enhances Glycolysis and Proliferation in SIRT3-Expressing Gastric Cancer Cells. *PLoS One* 2015;10:e0129834.

- [128] Shimazu T, Hirschev MD, Hua L, Dittenhafer-Reed KE, Schwer B, Lombard DB i sur. SIRT3 deacetylates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2 and regulates ketone body production. *Cell Metab* 2010;12:654-661.
- [129] Brown K, Xie S, Qiu X, Mohrin M, Shin J, Liu Y i sur. SIRT3 reverses aging-associated degeneration. *Cell Rep* 2013;3:319-327.
- [130] Jing E, Emanuelli B, Hirschev MD, Boucher J, Lee KY, Lombard D i sur. Sirtuin-3 (Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling via altered mitochondrial oxidation and reactive oxygen species production. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:14608-14613.
- [131] Palacios OM, Carmona JJ, Michan S, Chen KY, Manabe Y, Ward JL i sur. Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1 $\alpha$  in skeletal muscle. *Aging* 2009;1:771-783.
- [132] Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q. SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J Biol Chem* 2005;280:13560-13567.
- [133] Nikolac N, Supak-Smolčić V, Simundić AM, Celap I. Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine: national recommendations for venous blood sampling. *Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. Biochem Med* 2013;23:242-254.
- [134] Vidovic A, Supek F, Nikolic A, Krisko A. Signatures of conformational stability and oxidation resistance in proteomes of pathogenic bacteria. *Cell Rep* 2014;7:1393-1400.
- [135] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358.
- [136] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-126.
- [137] Flohé L, Otting F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol* 1984;105:93-104.
- [138] Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 2007;8:R19.
- [139] Minchinela J, Ricós C, Perich C, Fernández-Calle P, Alvarez V, Domenech M i sur. Biological variation database, and quality specifications for imprecision, bias and total error (desirable and minimum). The 2014 update. Dostupno na: <https://www.westgard.com/biodatabase-2014-update.htm>. Pristupljeno: 23. srpnja 2016.

- [140] Ricós C, Perich C, Minchinela J, Álvarez V, Simón M, Biosca C i sur. Application of biological variation – a review. *Biochem Med* 2009;19:250-259.
- [141] Sureda A, Tauler P, Aguiló A, Cases N, Fuentespina E, Córdova A i sur. Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. *Free Radic Res* 2005;39:1317-1324.
- [142] Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med* 2008;44:153-159.
- [143] Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev* 2000;80:1055-1081.
- [144] Nieman DC. Current perspective on exercise immunology. *Curr Sports Med Rep* 2003;2:239-242.
- [145] Simpson RJ, Kunz H, Agha N, Graff R. Exercise and the Regulation of Immune Functions. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015;135:355-380.
- [146] Peake JM, Neubauer O, Walsh NP, Simpson RJ. Recovery of the immune system after exercise. *J Appl Physiol* 2017;122:1077-1087.
- [147] Hallworth M, Hyde K, Cumming A, Peake I. The future for clinical scientists in laboratory medicine. *Clin Lab Haematol* 2002;24:197-204.
- [148] Sanchis-Gomar F, Lippi G. Physical activity - an important preanalytical variable. *Biochem Med* 2014;24:68-79.
- [149] Zarezadeh R, Azarbayjani MA. The effect of air scuba dives up to a depth of 30 metres on serum cortisol in male divers. *Diving Hyperb Med* 2014;44:158-160.
- [150] Suzuki K, Totsuka M, Nakaji S, Yamada M, Kudoh S, Liu Q i sur. Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. *J Appl Physiol* 1999;87:1360-1367.
- [151] Lombardi G, Ricci C, Banfi G. Effect of winter swimming on haematological parameters. *Biochem Med* 2011;21:71-78.
- [152] Kakanis MW, Peake J, Brenu EW, Simmonds M, Gray B, Hooper SL, Marshall-Gradisnik SM. The open window of susceptibility to infection after acute exercise in healthy young male elite athletes. *Exerc Immunol Rev* 2010;16:119-137.
- [153] Natale VM, Brenner IK, Moldoveanu AI, Vasiliou P, Shek P, Shephard RJ. Effects of three different types of exercise on blood leukocyte count during and following exercise. *Sao Paulo Med J* 2003;121:9-14.

- [154] Marinovic J, Ljubkovic M, Breskovic T, Gunjaca G, Obad A, Modun D i sur. Effects of successive air and nitrox dives on human vascular function. *Eur J Appl Physiol* 2012;112:2131-2137.
- [155] Lambrechts K, Pontier JM, Balestra C, Mazur A, Wang Q, Buzzacott P i sur. Effect of a single, open-sea, air scuba dive on human micro- and macrovascular function. *Eur J Appl Physiol* 2013;113:2637-2645.
- [156] Glavas D, Markotic A, Valic Z, Kovacic N, Palada I, Martinic R i sur. Expression of endothelial selectin ligands on human leukocytes following dive. *Exp Biol Med* 2008;233:1181-1188.
- [157] Santos-Silva A, Rebelo MI, Castro EM, Belo L, Guerra A, Rego C, Quintanilha A. Leukocyte activation, erythrocyte damage, lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents. *Clin Chim Acta* 2001;306:119-126.
- [158] Khoubnasabjafari M, Ansarin K, Jouyban A. Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *Bioimpacts* 2015;5:123-127.
- [159] Niki E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840:809-817.
- [160] Ferrer MD, Tauler P, Sureda A, Tur JA, Pons A. Antioxidant regulatory mechanisms in neutrophils and lymphocytes after intense exercise. *J Sports Sci* 2009;27:49-58.
- [161] Mestre-Alfaro A, Ferrer MD, Banquells M, Riera J, Drobnic F, Sureda A i sur. Body temperature modulates the antioxidant and acute immune responses to exercise. *Free Radic Res* 2012;46:799-808.
- [162] Baghaiee B, Aliparasti MR, Almasi S, Siahkuhian M, Baradaran B. Antioxidant expression response to free radicals in active men and women following to a session incremental exercise; numerical relationship between antioxidants and free radicals. *Asian J Sports Med* 2016;7:e29901.
- [163] Cases N, Sureda A, Maestre I, Tauler P, Aguiló A, Córdova A i sur. Response of antioxidant defences to oxidative stress induced by prolonged exercise: antioxidant enzyme gene expression in lymphocytes. *Eur J Appl Physiol* 2006;98:263-269.
- [164] García-López D, Häkkinen K, Cuevas MJ, Lima E, Kauhanen A, Mattila M i sur. Effects of strength and endurance training on antioxidant enzyme gene expression and activity in middle-aged men. *Scand J Med Sci Sports* 2007;17:595-604.

- [165] Dumke CL, Mark Davis J, Angela Murphy E, Nieman DC, Carmichael MD, Quindry JC i sur. Successive bouts of cycling stimulates genes associated with mitochondrial biogenesis. *Eur J Appl Physiol* 2009;107:419-427.
- [166] Vargas-Ortiz K, Perez-Vazquez V, Diaz-Cisneros FJ, Figueroa A, Jiménez-Flores LM, Rodriguez-DelaRosa G, Macias MH. Aerobic training increases expression levels of sirt3 and pgc-1 $\alpha$  in skeletal muscle of overweight adolescents without change in caloric intake. *Pediatr Exerc Sci* 2015;27:177-184.
- [167] Johnson ML, Irving BA, Lanza IR, Vendelbo MH, Konopka AR, Robinson MM i sur. Differential effect of endurance training on mitochondrial protein damage, degradation, and acetylation in the context of aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2015;70:1386-1393.
- [168] Lanza IR, Short DK, Short KR, Raghavakaimal S, Basu R, Joyner MJ i sur. Endurance exercise as a countermeasure for aging. *Diabetes* 2008;57:2933-2942.
- [169] Ansari A, Rahman MS, Saha SK, Saikot FK, Deep A, Kim KH. Function of the SIRT3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer, and neurodegenerative disease. *Aging Cell* 2017;16:4-16.
- [170] McDonnell E, Peterson BS, Bomze HM, Hirschey MD. SIRT3 regulates progression and development of diseases of aging. *Trends Endocrinol Metab* 2015;26:486-492.
- [171] Viña J, Borras C, Abdelaziz KM, Garcia-Valles R, Gomez-Cabrera MC. The free radical theory of aging revisited: the cell signaling disruption theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 2013;19:779-787.
- [172] Marzani B, Pansarasa O, Marzatico F. 'Oxidative stress' and muscle aging: influence of age, sex, fiber composition and function. *Basic And Applied Myology* 2004;14:37-44.
- [173] Marzani B, Felzani G, Bellomo RG, Vecchiet J, Marzatico F. Human muscle aging: ROS-mediated alterations in rectus abdominis and vastus lateralis muscles. *Exp Gerontol* 2005;40:959-965.
- [174] Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 2002;32:790-796.
- [175] Kasapoglu M, Ozben T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol* 2001;36:209-220.
- [176] Rizvi SI, Maurya PK. Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans. *Mol Biotechnol* 2007;37:58-61.

## **7 POPIS KRATICA**



---

AceCS	acetil-CoA sintetaza
ACTB	aktin beta
ADH	antidiuretski hormon
AGEs	uznapredovali glikozilacijski produkti
ALEs	uznapredovali lipooksidacijski produkti
ALT	alanin-aminotransferaza
ANP	atrijski natriuretski peptid
AP	alkalna fosfataza
ART	ADP-ribozil transferaza
AST	aspartat-aminotransferaza
ATP	adenozin trifosfat
BMI	indeks tjelesne mase
CAT	katalaza
cDNA	komplementarna DNA
CK	kreatin-kinaza
CR	kalorijska restrikcija
CRP	C-reaktivni protein
CV <sub>A</sub>	koeficijent analitičke varijacije
CV <sub>I</sub>	intraindividualni koeficijent varijacije
DAC	deacetilaza
DSI	poželjna nepreciznost
eNOS	endotelna sintaza dušikovog oksida
GDH	glutamat dehidrogenaza
gDNA	genomska DNA
GGT	gama-glutamilttransferaza
GPx	glutation peroksidaza
G6PD	glukoza-6-fosfat dehidrogenaza

---

GR	glutation reduktaza
HBO	hiperbarična oksigenacija
HDAC	histon deacetilaza
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodikov peroksid
HMGCS	3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA sintaza
4-HNE	4-hidroksi-2-nonenal
HOCl	hipokloritna kiselina
IDH	izocitrat dehidrogenaza
KKS	kompletna krvna slika
L <sup>•</sup>	lipidni radikal
LCAD	acil-CoA dehidrogenaza dugih lanaca
LDH	laktat dehidrogenaza
LH	masna kiselina
LO <sup>•</sup>	lipidni alkoksilni radikal
LOH	lipidni alkohol
LOO <sup>•</sup>	lipidni peroksilni radikal
LPO	lipidna peroksidacija
MCH	prosječna količina hemoglobina u eritrocitu
MCHC	prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu
MCV	prosječni volumen eritrocita
MDA	malondialdehid
MPO	mijeloperoksidaza
MPV	prosječni volumen trombocita
mRNA	glasnička RNA
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
O/A status	oksidacijski/antioksidacijski status

---

$O_2^{\cdot -}$	superoksidni anion
$\cdot OH$	hidroksilni radikal
8OHdG	8-hidroksi-2'-deoksigvanozin
$OLOO^{\cdot}$	epoksi-lipidni peroksilni radikal
PBMCs	mononuklearne stanice periferne krvi
PCD	proteinski karbonilni derivati
qRT-PCR	kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu
RCV	referentna vrijednost promjene
RDW	raspodjela eritrocita po volumenu
RNS	reaktivni dušikovi spojevi
$RO^{\cdot}$	alkoksilni radikal
$ROO^{\cdot}$	peroksilni radikal
ROS	reaktivni kisikovi spojevi
SDH	sukcinat dehidrogenaza
SIRT	sirtuin
SOD	superoksid dismutaza
TBA	tio-barbiturna kiselina
TBARS	reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline
TrxR	tioredoksin reduktaza

## **8 ŽIVOTOPIS**

Antonija Perović rođena je 20. svibnja 1974. godine u Dubrovniku gdje je pohađala osnovnu i srednju Medicinsku školu, smjer zdravstveno-laboratorijski tehničar. Godine 1992. upisala je Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer medicinska biokemija. Tijekom studiranja dobila je dvije CEPUS stipendije za boravak u Sveučilišnoj bolnici u Pečuhu i Odjelu za kliničku biokemiju Medicinskog fakulteta u Sofiji. Za dva studentska rada pod vodstvom prof. dr. sc. Mirne Flogel Mrić te prof. dr. sc. Ane Stavljenić Rukavina i prof. dr. sc. Jadranke Sertić nagrađena je Rektorovim nagradama 1994./1995. i 1996./1997. Diplomirala je 1998. godine stekavši zvanje diplomiranog inženjera medicinske biokemije.

Nakon pripravničkog staža, 1999. godine zaposlila se u Medicinsko biokemijskom laboratoriju Doma zdravlja Dubrovnik. U Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku Opće bolnice Dubrovnik radi od 2001. godine, a specijalistički ispit iz medicinske biokemije položila je 2011. godine. Od 2014. godine radi na mjestu voditelja Odjela za laboratorijsku dijagnostiku.

Od 1999. do 2001. godine suradnik je Instituta za oceanografiju u Dubrovniku u obavljanju terenskih zarona na lokaciji Mljetskih jezera. Od 2002. do 2007. godine kao vanjski suradnik, sudjeluje u nastavi u Medicinskoj školi Dubrovnik. Poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti upisala je 2013. godine.

Aktivni je član Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku dijagnostiku (HDMBLM) i Hrvatske komore medicinskih biokemičara (HKMB). Od 1999. godine aktivni je ronilac u kategoriji ronjenje s komprimiranim zrakom.

Aktivno je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova. Dobila je nagradu za najbolji posterski sažetak na 8. kongresu HDMBLM s međunarodnim sudjelovanjem, u Rijeci, 2015. godine. Bila je predsjednica Organizacijskog odbora i predavač na 28. simpoziju HDMBLM, u Zagrebu, 2017. godine. Autor je tri znanstvena članka objavljena u časopisima indeksiranim u *Current Contents* i *Web of Science Core Collection* te autor i koautor 5 sažetaka kongresnih priopćenja objavljenih u časopisima s međunarodnom recenzijom i 2 sažetka kongresna priopćenja objavljena u Knjigama sažetaka Lokus.

## Popis objavljenih radova i kongresnih priopćenja

### 1. Znanstveni radovi u časopisima indeksiranim u *Current Contents (CC)*

1. Perović A, Sobočanec S, Dabelić S, Balog T, Dumić J. Effect of scuba diving on the oxidant/antioxidant status, *SIRT1* and *SIRT3* expression in recreational divers after a winter nondive period. *Free Radic Res* 2018;1-10. [Epub ahead of print].
2. Perovic A, Nikolac N, Braticevic MN, Milcic A, Sobocanec S, Balog T, Dabelic S, Dumic J. Does recreational scuba diving have clinically significant effect on routine haematological parameters? *Biochem Med* 2017;27:325-331.

### 2. Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. Perovic A, Unic A, Dumic J. Recreational scuba diving: negative or positive effects of oxidative and cardiovascular stress? *Biochem Med* 2014;24:235-47.

### 3. Sažeci kongresnih priopćenja objavljeni u časopisima s međunarodnom recenzijom

1. Milčić A, Njire Bratičević M, Perović A. Tourniquet influence on ionized calcium determination: to be avoided or to be applied? 4<sup>th</sup> EFLM-BD European Conference on Preanalytical Phase, Amsterdam, Nizozemska, 2017. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:eA1-eA66.
2. Perović A, Njire Bratičević M, Ljubimir D. Ionized calcium in serum – the influence of time periods from sampling to centrifugation, and from centrifugation until analysis. 8<sup>th</sup> Congress of the Croatian society of medical biochemistry and laboratory medicine with international participation, Rijeka, Hrvatska 2015. *Biochem Med* 2015;25:S55-S155.
3. Njire Bratičević M, Perović A, Ljubimir D. Comparison of within-laboratory precision, trueness and a total error of measurement procedures for CMIA and ECLIA methods in cyclosporine measurement. 8<sup>th</sup> Congress of the Croatian society of medical biochemistry and laboratory medicine with international participation, Rijeka, Hrvatska 2015. *Biochem Med* 2015;25:S55-S155.
4. Perović A, Njire Bratičević M. Another perspective on reducing preanalytical errors-nurse education. 3<sup>rd</sup> European Conference on Preanalytical Phase - In pursuit of harmony. Porto, Portugal 2015. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:eA1-eA91.

5. Čelap I, Juriček J, Perović A, Puc N, Šupak Smolčić V, Vukasović I. Quality specifications based on biological variation – where are we? IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, EuroMedLab Milano, Italija 2013. *Biochimica Clinica* 2013;37:S417.

#### **4. Sažeci kongresnih priopćenja objavljeni u knjigama sažetaka**

1. Njire Bratičević M, Perović A, Ljubimir D, Đurović O. Usporedivost ECLIA i CMIA metode za određivanje koncentracije korionskog gonadotropina. Simpozij Lokus, Tuheljske toplice 2016. Knjiga sažetaka.
2. Perović A. Procjena unutarlaboratorijske preciznosti i mjerne istinitosti tumorskih biljega AFP, CA 125, CA 15-3, CA 19-9, CEA i PSA na analizatoru Abbott ARCHITECT i2000SR. Simpozij Lokus, Vodice 2013. Knjiga sažetaka.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

## OKSIDACIJSKI I ANTIOKSIDACIJSKI STATUS I EKSPRESIJA SIRTUINA NAKON RONJENJA S KOMPRIMIRANIM ZRAKOM

ANTONIJA PEROVIĆ

Ronjenje s komprimiranim zrakom predstavlja poseban oblik oksidacijskog stresa izazvanog vježbanjem jer je povećano stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) posljedica ne samo zahtjevne fizičke aktivnosti, već i hiperoksije, koja nastaje uslijed disanja kisika pod povišenim tlakom. Smatra se da bi učinkovitost antioksidacijskih enzima mogla ovisiti o aktivnosti sirtuina (SIRT), molekula osjetljivih na povećanu produkciju ROS-a, koje imaju sposobnost povećati ekspresiju i aktivnost antioksidacijskih enzima. Cilj je ovog rada bio ispitati oksidacijski/antioksidacijski status i ekspresiju gena *SIRT1* i *SIRT3* nakon zarona s komprimiranim zrakom kod rekreacijskih ronilaca koji nisu ronili tijekom zimskog razdoblja.

U istraživanje je bilo uključeno 17 ronilaca, muškog spola, raspona životne dobi od 30 do 52 godine. Uzimanje krvi bilo je provedeno neposredno prije i nakon ronjenja na 30 metara dubine u trajanju od 30 minuta te 3 i 6 sati nakon ronjenja. U uzorcima krvi određeni su parametri kompletne krvne slike, u eritrocitima i plazmi praćeni su biljezi oksidacijskog oštećenja lipida i proteina, mjerenjem koncentracije tiobarbiturnih reaktivnih supstanci (TBARS) i proteinskih karbonila, dok su aktivnosti antioksidacijskih enzima katalaze (CAT), ukupne superoksid dismutaze (SOD) te izoformi SOD1 i SOD2, kao i ekspresija gena *CAT*, *SOD1* i *SOD2* te *SIRT1* i *SIRT3* bili praćeni u mononuklearnim stanicama krvi.

Rezultati ovog rada pokazali su da povećanje broja leukocita te smanjenje broja eritrocita, hemoglobina i hematokrita nakon ronjenja nisu klinički značajne promjene. Zapažen porast aktivnosti CAT, SOD2 i SOD neposredno nakon ronjenja nije bio dovoljan da spriječi porast eritrocitnih TBARS vrijednosti. Budući da promjene TBARS vrijednosti u plazmi, kao ni promjene proteinskih karbonila u plazmi i eritrocitima nisu nađene nakon ronjenja, lipidna peroksidacija u eritrocitima pokazala se najosjetljivijim ispitivanim parametrom oksidacijskog stresa. Povećanje aktivnosti ispitivanih antioksidacijskih enzima nije bilo praćeno porastom njihove genske ekspresije. Smanjenje ekspresije gena *SIRT1* izazvano zaronom, doseglo je bazalnu vrijednost 6 sati nakon ronjenja, kada je uočen porast ekspresije gena *SIRT3*.

Ovo je istraživanje pokazalo da zaron na 30 metara dubine, nakon razdoblja ne ronjenja, uzrokuje oksidacijsko oštećenje dajući dobru osnovu za daljnja usmjerena istraživanja u području rekreacijskog ronjenja koja bi mogla biti korisna u formiranju smjernica za rekreacijske ronioce. Uz to, opažen porast ekspresije gena *SIRT3* pridonosi razumijevanju pretpostavljenog adaptacijskog antioksidacijskog mehanizma i hormeznog odgovora na povećanu produkciju ROS-a.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 98 stranica, 13 slika, 11 tablica i 176 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: ronjenje, hiperoksija, oksidacijski stres, sirtuin 1, sirtuin 3

Mentori: dr. sc. Jerka Dumić, red. prof.

dr. sc. Sandra Sobočanec, viša znanstv. sur.

Povjerenstvo: dr. sc. Tihana Žanić Grubišić, prof. emer.

dr. sc. Tihomir Balog, nasl. red. prof., znanstv. savjetnik

dr. sc. Danica Galešić Ljubanović, nasl. red. prof.

Rad je prihvaćen: 11. srpnja 2018.



## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral thesis

### EFFECT OF SCUBA DIVING ON THE OXIDANT/ANTIOXIDANT STATUS AND SIRTUINS EXPRESSION

ANTONIJA PEROVIĆ

SCUBA diving represents a special form of exercise-induced oxidative stress since the increased production of reactive oxygen species (ROS) is a result not only of a demanding physical activity, but also of hyperoxia, which occurs due to breathing oxygen under increased pressure. It is believed that the effectiveness of antioxidant defense enzymes could be dependent on the activity of sirtuins (SIRT), molecules sensitive to the increased production of ROS, which have the ability to increase the expression and activation of antioxidant enzymes. The aim of this study was to examine the effects of scuba diving on oxidative/antioxidative status, as well as *SIRT1* and *SIRT3* gene expressions in recreational divers after a winter non-dive period.

The study included 17 male recreational divers median age (range) 41 (30-52) years. Blood samples were taken before and immediately after diving at a depth of 30 m for 30 min, 3 h and 6 h after diving. The changes of the following parameters were examined: complete blood counts, oxidative damage markers of lipids and proteins in erythrocytes and plasma, by measuring the formation of thiobarbituric reactive substances (TBARS) and protein carbonyl derivatives (PCD), while the activities of antioxidant enzymes; catalase (CAT), total superoxide dismutase (SOD), and isoforms SOD1 and SOD2, as well as *CAT*, *SOD1*, *SOD2*, *SIRT1* and *SIRT3* gene expression were monitored in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

The increase of leukocyte count and the decrease of erythrocyte count, hemoglobin and hematocrit observed after diving did not show clinical significance. The elevation of CAT, SOD2 and SOD activities observed after diving was not sufficient to prevent the increase in erythrocyte TBARS values. Since we found no difference for plasma TBARS level and also for carbonylated proteins level in either plasma or erythrocytes, peroxidative damage in erythrocytes appears to be the most pronounced response to oxidative stress. Elevation of the antioxidant enzymes activities was not accompanied by the increase of their gene expression. The decrease of *SIRT1* gene expression induced by diving, reached its basal level 6 h after the dive, when the increase of *SIRT3* gene expression was observed.

This study showed that the first dive to 30 m after a non-dive season causes oxidative damage, providing a good basis for further research in the field of recreational diving, which could be useful for forming the diving recommendations. In addition, the observed increase of *SIRT3* gene expression contributes to the understanding of the assumed adaptation antioxidant mechanism and the hormesis response to increased ROS production.

Thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 98 pages, 13 figures, 11 tables and 176 references. Original is in Croatian language.

Keywords: diving, hyperoxia, oxidative stress, sirtuin 1, sirtuin 3

Supervisors: Full Professor Jerka Dumić, Ph.D.  
Sandra Sobočanec, Ph.D., Associate Research Scientist

Reviewers: Emeritus Professor Tihana Žanić Grubišić, Ph.D.  
Adjunct Professor Tihomir Balog, Ph.D., Senior Research Scientist  
Adjunct Professor Danica Galešić Ljubanović, Ph.D.

Accepted: 11<sup>th</sup> July 2018.