

# Utjecaj ronjenja s komprimiranim plinskim smjesama na vaskularnu funkciju i humoralne biljege integriteta endotela i središnjeg živčanog sustava

---

**Bilopavlović, Nada**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2017**

*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:163:619091>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-18**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

NADA BILOPAVLOVIĆ

**UTJECAJ RONJENJA S KOMPRIMIRANIM  
PLINSKIM SMJESAMA NA VASKULARNU  
FUNKCIJU I HUMORALNE BILJEGE  
INTEGRITETA ENDOTELA I SREDIŠNJEG  
ŽIVČANOG SUSTAVA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

NADA BILOPAVLOVIĆ

**EFFECT OF SCUBA DIVING ON VASCULAR  
FUNCTION AND HUMORAL MARKERS OF  
ENDOTHELIAL AND CENTRAL NERVOUS  
SYSTEM INTEGRITY**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016.



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO BIOKEMIJSKI FAKULTET

NADA BILOPAVLOVIĆ

**UTJECAJ RONJENJA S KOMPRIMIRANIM  
PLINSKIM SMJESAMA NA VASKULARNU  
FUNKCIJU I HUMORALNE BILJEGE  
INTEGRITETA ENDOTELA I SREDIŠNJEG  
ŽIVČANOG SUSTAVA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Jasna Marinović Ljubković

Zagreb, 2016.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

NADA BILOPAVLOVIĆ

**EFFECT OF SCUBA DIVING ON VASCULAR  
FUNCTION AND HUMORAL MARKERS OF  
ENDOTHELIAL AND CENTRAL NERVOUS  
SYSTEM INTEGRITY**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Jasna Marinović Ljubković

Zagreb, 2016.

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 u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Split i dijelom u Zavodu za integrativnu fiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

## **ZAHVALJUJEM**

mentorici prof.dr.sc. Jasni Marinović Ljubković na svemu,

doc.dr.sc. Ilzi Salamunić i prof.dr.sc. Željku Dujiću jer su omogućili ostvarenje ovog rada,

osoblju Zavoda za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku KBC Split,

mojim kolegicama na pomoći i podršci,

**mojim voljenima na svemu...**

## SAŽETAK

Ronjenje s komprimiranim plinovima je često praćeno stvaranjem plinskih mjehurića u krvi i hiperoksijom, što se smatra mogućim uzrocima endotelne disfunkcije nakon ronjenja. Endotelna disfunkcija se povezuje s asimptomatskim kardiovaskularnim i neurološkim promjenama nakon ronjenja s komprimiranim plinovima.

Cilj ove disertacije je istražiti fiziološke i biokemijske promjene vaskularne i endotelne funkcije, te ispitati ima li znakova narušenog integriteta SŽS-a nakon ronjenja s komprimiranim plinskim smjesama. Pritom su testirane sljedeće hipoteze: asimptomatski zaroni s komprimiranim zrakom će uzrokovati promjene biokemijskih parametara endotelne funkcije i oksidacijskog stresa; asimptomatski zaroni će imati različiti utjecaj na vaskularnu funkciju s obzirom na vrstu korištene plinske smjese za disanje; asimptomatski zaroni će u prisutnosti arterijalizacije plinskih mjehurića uzrokovati porast koncentracije humoralnih biljega oštećenja endotela i središnjeg živčanog sustava.

Istraživanje je obuhvatilo tri studije. U prvoj studiji na 15 ispitanika istražene su promjene sljedećih parametara nakon ronjenja s komprimiranim zrakom: vWf-a, PAI-1-a, hsCRP-a kao pokazatelja endotelne funkcije, te adenoza, TBARS i FRAP kao pokazatelja oksidacijskog statusa uz istovremeno praćenje stupnja stvaranja mjehurića. U drugoj studiji na 10 ispitanika uspoređivan je utjecaj ronjenja sa zrakom i ronjenja s nitrox-om na vaskularnu funkciju ispitivanjem promjena pokazatelja arterijske elastičnosti: brzine pulsnog vala i augmentacijskog indeksa, pokazatelja endotelne funkcije mjerenjem protokom posredovane dilatacije (FMD), te koncentracije nitrita u plazmi. Usporedba je uključivala i stupanj stvaranja mjehurića nakon zarona. U trećoj studiji na 16 ispitanika istraženo je dovodi li arterijalizacija mjehurića do promjene koncentracije endotelina-1, S100-B i NSE u krvi odnosno do pojave znakova narušenog integriteta endotela i središnjeg živčanog sustava.

Ronjenje je uzrokovalo značajno stvaranje plinskih mjehurića u sve tri studije. Arterijalizacije su zabilježene u sve tri studije i bile su praćene visokim stupnjem stvaranja mjehurića. Značajno veći stupanj stvaranja mjehurića i češće arterijalizacije uslijedili su nakon ronjenja sa zrakom u odnosu na nitrox. Indikatori arterijske elastičnosti pokazali su oprečne promjene nakon ronjenja s obje plinske smjese. Brzina pulsnog vala je porasla sugerirajući porast krutosti arterija, dok se augmentacijski indeks smanjio nakon ronjenja. Ronjenje s nitrox-om pokazuje veći učinak na protokom posredovanu dilataciju u odnosu na ronjenje sa zrakom upućujući na veći utjecaj hiperoksije na endotelnu funkciju od plinskih mjehurića. Ronjenje sa

zrakom u prvoj studiji nije polučilo promjenu oksidacijskog statusa izuzev blagog porasta antioksidacijskog kapaciteta nakon ronjenja. Mjerenje endotelnih parametara nije otkrilo promjene izuzev PAI-1 u prvoj studiji koji pokazuje pad aktivnosti nakon ronjenja. Promjenu humoralnih biljega oštećenja SŽS-a u vidu porasta nakon ronjenja otkriva samo S-100B, ali bez dokaza o oštećenju integriteta SŽS-a budući se sličan porast očitovao i nakon kontrolnog zarona bez stvaranja plinskih mjehurića i arterijalizacije.

Ovim istraživanjem je pokazano da asimptomatski zaroni sa zrakom ne uzrokuju promjene biokemijskih pokazatelja endotelnog oštećenja unatoč prisutnosti plinskih mjehurića u krvi, te da je potaknuta antioksidacijska obrana mogući mehanizam zaštite od endotelne disfunkcije. Značajniji negativni učinak nitrox-a na endotel u odnosu na zrak, unatoč manjem stvaranju plinskih mjehurića i njihovoj rjeđoj arterijalizaciji, upućuje na endotelno oštećenje uzrokovano hiperoksijom i na potrebu za dodatnim istraživanjima mehanizama endotelnih promjena.

Ključne riječi: plinski mjehurići, hiperoksija, endotelna disfunkcija, oštećenje SŽS-a

## SUMMARY

**Background:** Diving with compressed gases (SCUBA diving) is often associated with occurrence of gas bubbles in the blood and hyperoxia, which are possible causes of endothelial dysfunction after diving. Endothelial dysfunction is associated with asymptomatic cardiovascular and neurological changes caused by SCUBA diving.

The aim of this study is to explore the physiological and biochemical changes of vascular and endothelial function, as well as to examine the signs of impaired CNS integrity after diving with compressed gas mixtures. The following hypotheses were tested: asymptomatic dives with compressed air will change the biochemical parameters of endothelial function and oxidative stress after dive; asymptomatic dives will have different effects on vascular function considering different types of breathing gases; and, finally, asymptomatic dives will cause increased levels of humoral markers of endothelial damage and CNS integrity due to arterializations of gas bubbles.

**Methods:** Three studies were performed. The first study including 15 participants examined changes of vWf, PAI-1 and hsCRP which served as indicators of endothelial function, as well as adenosine, TBARS and FRAP as indicators of oxidative state while the bubble grades were also monitored after dives with compressed air. In the second study that included 10 divers, the effects of diving with air and nitrox on vascular function were compared by examining the indicators of arterial elasticity: pulse wave velocity and augmentation index; indicators of endothelial function through assessment of flow-mediated dilation (FMD) and nitrite concentrations in plasma; and assessment of bubble production. Third study which included 16 subjects examined whether bubble arterializations lead to increase in blood levels of endothelin-1, S100-B and NSE, which would suggest an impaired endothelium and CNS integrity.

**Results:** Diving resulted in significant production of bubbles in all three studies. Arterializations were recorded in all three studies and were accompanied by high bubble grade. Diving with air in the first study did not change the oxidative status with the exception of a slight increase in antioxidant capacity after diving. Assessment of endothelial parameters did not reveal any changes, except PAI-1, activity of which declined after diving (first study). Air dives resulted in significantly greater degree of bubble formation as compared to nitrox and with more frequent arterializations. The indicators of arterial stiffness showed opposite

changes after diving with both gas mixtures: pulse wave velocity has increased, suggesting an increase in arterial stiffness, while the augmentation index decreased after each dive. Diving with nitrox resulted in significantly more decreased flow-mediated dilation as compared to diving with air, thus indicating a greater effect of hyperoxia on the endothelial function *versus* gas bubbles. Measurement of humoral markers of CNS integrity revealed an increase in blood levels of S100-B, but without evidence of impaired CNS integrity due to similar increases after a control dive (without significant bubble formation and arterializations).

**Conclusions:** It was found that asymptomatic dives with air do not affect levels of biochemical indicators of endothelial function despite significant degree of gas bubbles in the blood. The triggered antioxidant defense could be the potential mechanism of protection against endothelial dysfunction. Significantly greater negative effect on endothelial function of nitrox as compared to air diving, that occurred despite lower bubble grade and less frequent arterializations, suggests hyperoxia-induced damage and points to necessity of further investigations on the mechanisms of endothelial changes after asymptomatic dives.

**Keywords:** gas bubbles, hyperoxia, endothelial dysfunction, diving, CNS integrity

|                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.UVOD.....</b>                                                                                 | <b>1</b>  |
| 1.1. Dekompresija i plinski mjehurići.....                                                         | 2         |
| 1.2. Dekompresijska bolest.....                                                                    | 3         |
| 1.3. Kardiovaskularni učinci ronjenja s komprimiranim plinskim smjesama.....                       | 5         |
| 1.3.1. Endotelna disfunkcija.....                                                                  | 6         |
| 1.3.1.1. Uloga dušikovog oksida.....                                                               | 9         |
| 1.3.1.2. Uloga hiperoksije.....                                                                    | 10        |
| 1.3.1.3. Biokemijski pokazatelji endotelne disfunkcije.....                                        | 11        |
| 1.3.1.4. Pokazatelji funkcije krvnih žila.....                                                     | 17        |
| 1.4. Oštećenje središnjeg živčanog sustava uslijed ronjenja s komprimiranim plinskim smjesama..... | 21        |
| 1.4.1. Humoralni biljezi oštećenja SŽS-a.....                                                      | 22        |
| <b>2. OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>                                                                   | <b>26</b> |
| 2.1. Ciljevi i hipoteze.....                                                                       | 26        |
| <b>3. ISPITANICI I METODE.....</b>                                                                 | <b>28</b> |
| 3.1. Opis istraživanja.....                                                                        | 28        |
| 3.2. Studija 1.....                                                                                | 31        |
| 3.2.1. Ispitanici.....                                                                             | 31        |
| 3.2.2. Protokol ronjenja.....                                                                      | 31        |
| 3.2.3. Određivanje plinskih mjehurića.....                                                         | 31        |
| 3.2.4. Biokemijske analize u krvi.....                                                             | 32        |
| 3.2.5. Statistička analiza.....                                                                    | 34        |
| 3.3. Studija 2.....                                                                                | 34        |
| 3.3.1. Ispitanici.....                                                                             | 34        |
| 3.3.2. Protokol ronjenja.....                                                                      | 35        |
| 3.3.3. Određivanje plinskih mjehurića.....                                                         | 35        |
| 3.3.4. Određivanje brzine pulsno vala i augmentacijskog indeksa.....                               | 35        |

|                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.5. Određivanje protokom posredovane dilatacije.....                                                    | 36        |
| 3.3.6. Određivanje koncentracije nitrita u krvi.....                                                       | 37        |
| 3.3.7. Statistička analiza.....                                                                            | 37        |
| 3.4. Studija 3.....                                                                                        | 38        |
| 3.4.1. Ispitanici.....                                                                                     | 38        |
| 3.4.2. Protokol ronjenja.....                                                                              | 38        |
| 3.4.3. Određivanje plinskih mjehurića.....                                                                 | 38        |
| 3.4.4. Biokemijske analize u krvi.....                                                                     | 39        |
| 3.4.5. Statistička analiza.....                                                                            | 39        |
| <b>4. REZULTATI.....</b>                                                                                   | <b>40</b> |
| 4.1. Studija 1.....                                                                                        | 40        |
| 4.1.1. Plinski mjehurići.....                                                                              | 40        |
| 4.1.2. Biokemijske analize u krvi.....                                                                     | 42        |
| 4.2. Studija 2.....                                                                                        | 48        |
| 4.2.1. Plinski mjehurići.....                                                                              | 48        |
| 4.2.2. Brzina pulsnog vala i augmentacijski indeks.....                                                    | 50        |
| 4.2.3. Protokom posredovana dilatacija.....                                                                | 53        |
| 4.2.4. Nitriti u krvi.....                                                                                 | 56        |
| 4.3. Studija 3.....                                                                                        | 58        |
| 4.3.1. Plinski mjehurići.....                                                                              | 58        |
| 4.3.2. Humoralni biljezi.....                                                                              | 60        |
| <b>5. RASPRAVA.....</b>                                                                                    | <b>63</b> |
| 5.1. Učinak ronjenja s komprimiranim zrakom na biljege endotelnog oštećenja i oksidacijskog stresa.....    | 63        |
| 5.2. Učinak ronjenja s komprimiranim plinskim smjesama na vaskularnu funkciju.....                         | 66        |
| 5.3. Učinak ponovljenih zarona s komprimiranim zrakom na humoralne biljege oštećenja endotela i SŽS-a..... | 69        |
| <b>6. ZAKLJUČCI.....</b>                                                                                   | <b>73</b> |

|                              |           |
|------------------------------|-----------|
| <b>7. LITERATURA.....</b>    | <b>74</b> |
| <b>8. POPIS KRATICA.....</b> | <b>82</b> |
| <b>9. ŽIVOTOPIS.....</b>     | <b>84</b> |

## 1. UVOD

Ronjenje s komprimiranom plinskom smjesom ili „SCUBA“ („Self Contained Underwater Breathing Apparatus“) ronjenje podrazumijeva način ronjenja s vlastitim spremnikom komprimirane plinske smjese za disanje (autonomni ronilački aparat) i ostalom pripadajućom opremom koja ovisi o svrsi i tipu ronjenja. Ovakav način ronjenja se provodi u profesionalne i rekreacijske svrhe. Rekreacijsko ronjenje s autonomnim ronilačkim aparatom podrazumijeva ronjenje do 40 m morske dubine i zadnjih je desetljeća postalo vrlo zastupljeno širom svijeta. Unatoč velikoj zastupljenosti rekreacijskog ronjenja i modernoj opremi, ronjenje i dalje nosi značajne rizike po zdravlje ronilaca čak i uz najstrože pridržavanje protokola i dekompresijskih tablica. Tijekom ronjenja ronionci su izloženi bitno promijenjenim okolišnim uvjetima. Uronjenost tijela u vodu (imerzija) dovodi do značajnog utjecaja hidrostatskog tlaka vode na krvožilni sustav s posljedičnom centralnom redistribucijom krvnog volumena (prema intratorakalnoj vaskularnoj mreži) koju dodatno pospješuje periferna, hladnoćom uzrokovana vazokonstrikcija [1]. Ronionci su također izloženi povišenom tlaku udahnutog zraka ili plinske smjese (hiperbarija), te povišenom tlaku kisika u krvi i tkivima (hiperoksija).

Razina hiperbarije i hiperoksije ovisi o dubini ronjenja, budući da okolišni tlak raste linearno s dubinom (svakih 10 m morske dubine tlak naraste za 101 kPa). Svako povišenje okolišnog tlaka uslijed povećanja dubine, prema Daltonovom zakonu dovodi do proporcionalnog povećanja parcijalnog tlaka svake od komponenti smjese za udisanje. Utjecaj ostalih plinova na organizam ovisi o vrsti udahnute plinske smjese. Najčešće korištena plinska smjesa je komprimirani zrak, dok se rjeđe koriste posebne plinske smjese poput nitrox-a (mješavina dušika i kisika), heliox-a (mješavina helija i kisika) i trimix-a (mješavina helija, kisika, dušika). Odabir smjese ovisi o učincima pojedinog plina s obzirom na trajanje i dubinu zarona. Ronjenje s komprimiranim zrakom, koje je najčešći oblik rekreacijskog ronjenja, može dovesti do dušikom uvjetovane narkoze ispod 30 m morske dubine i otežanog disanja ispod 50 m dubine. Stopostotni kisik u hiperbaričnim uvjetima se može koristiti samo za plitke zarone (6-8 m morske dubine), dok se pri većim tlakovima javlja izrazito toksični utjecaj hiperoksije. Zbog toga se stopostotni kisik koristi uglavnom za vojne i eksperimentalne zarone, te kao dekompresijski plin. Nitrox, smjesa dušika i kisika u kojoj dušik čini manje od 80% smjese, se sve češće koristi za tehničko i rekreacijsko ronjenje jer omogućuje dulje trajanje zarona i kraću dekompresiju. Nitrox se također može koristiti kao

dekompresijski plin. Potencijalna opasnost pri korištenju nitrox-a je kisikom uvjetovana toksičnost, koja se javlja samo kod neprikladno upotrijebljenih mješavina s obzirom na dubinu. Trimix, mješavina helija, kisika i dušika se koristi za duboke tehničke i rekreacijske zarone, jer smanjuje dušikom uvjetovanu narkozu te je manje gustoće u stlačenim uvjetima što smanjuje napor pri disanju. Korištenjem trimix-a se izbjegava hiperoksija i smanjen je rizik od hiperbaričnog neurološkog sindroma. Međutim, nedostatak ove smjese je tehnički zahtjevna priprema smjese [1].

Dekompresija koja nastaje izranjanjem zbog pada okolišnog tlaka uzrokuje i pad tlaka udahnutog plina što može dovesti do prezasićenja („supersaturacije“) krvi s plinom i stvaranja plinskih mjehurića u cirkulaciji pogotovo ako brzina pada okolišnog tlaka nadilazi brzinu eliminacije plinova iz tkiva [2]. Promjene okolišnih uvjeta tijekom ronjenja koje uključuju hiperbariju, hladnoću, hiperoksiju, te dekompresiju izazivaju različite fiziološke promjene koje mogu imati i patofiziološke posljedice s promjenama hemodinamike i kardiovaskularne funkcije [3].

### **1.1. Dekompresija i plinski mjehurići**

Tijekom ronjenja s komprimiranim plinskim smjesama udahnuti inertni plin se otapa u tkivima ovisno o dubini i trajanju zarona. S vremenom se može uspostaviti ravnoteža između plina za udisanje i tkiva što predstavlja zasićenje ili saturaciju. Prema Henry-evom zakonu, izlaganje povećanim tlakovima prilikom ronjenja će dovesti do povećane količine udahnutog plina otopljenog u tkivima. Tijekom smanjenja dubine i pri tom pada okolišnog tlaka prilikom izranjanja na površinu, otopljeni plin difundira iz tkiva u krv, te iz krvi u pluća, odakle se uklanja izdisajem. Međutim, kada parcijalni tlak inertnog plina u krvi i tkivima naglo postane veći od okolišnog tlaka (na primjer tijekom prebrzog ili naglog izrona), dolazi do prezasićenja tkiva inertnim plinom i do nastanka plinskih mjehurića u tkivima i krvi. Pritom će broj mjehurića biti veći što je bio veći stupanj tkivnog zasićenja plinom. Veličina mjehurića inertnog plina je raznolika. Promjer mjehurića može biti u rasponu od 19 do 700  $\mu\text{m}$  [4].

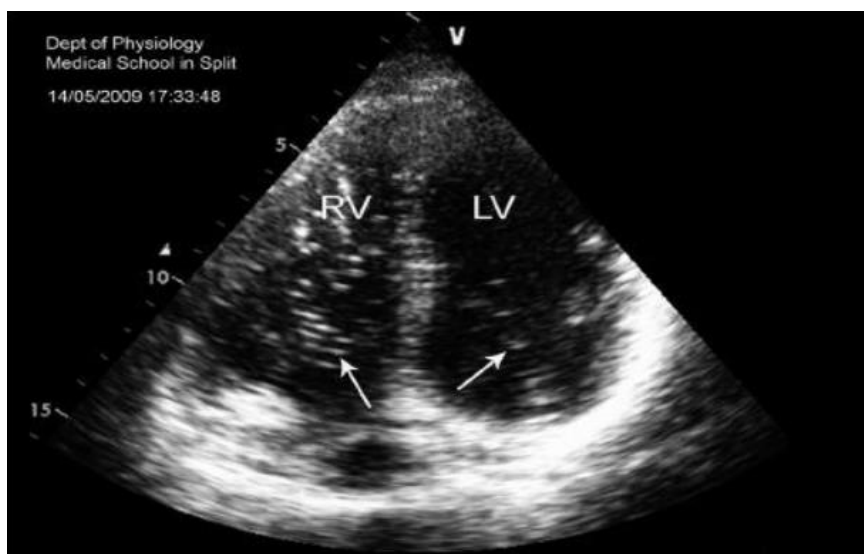
Plinski mjehurići sastavljeni uglavnom od dušika stvaraju se vrlo često tijekom dekompresije, jer je za njihov nastanak potrebna niska razina prezasićenja dušikom (prag saturacije za dušik je 11.700 kPa). Nedavno je postavljena hipoteza o postojanju „plinskih klica/jezgara“ („gas nuclei“) promjera oko 1  $\mu\text{m}$  koje, uz prezasićenje plinom, sudjeluju u stvaranju mjehurića [5]. Nastanak plinskih mjehurića iz prisutnih plinskih jezgara olakšavaju hidrofobne površine endotela krvnih žila, fascije mišića i tetiva, koji su ujedno i glavna mjesta

na kojima se stvaraju plinski mjehurići. Rast plinskih mjehurića iz mikrojezgara se može odvijati tijekom ili nakon dekompresijske faze ronjenja [6]. Pretjerano stvaranje plinskih mjehurića može dovesti do dekompresijske bolesti koja predstavlja najozbiljniju komplikaciju ronjenja.

## **1.2. Dekompresijska bolest**

Dekompresijska bolest, iako rijetka, predstavlja najopasniju komplikaciju ronjenja s komprimiranim plinskim smjesama koja može dovesti do trajnih neuroloških oštećenja, pa čak i smrti. Inače se dekompresijska bolest javlja u širokom rasponu manifestacija koje uključuju simptome poput slabosti, umora, glavobolje, prolazne nelagode, trnjenja, kožnih manifestacija, dok teži oblici bolesti uključuju respiratorne, spinalne, audiovestibularne i neurološke simptome. Najteži oblici dekompresijske bolesti mogu uključivati više organskih sustava i završiti fatalno [2].

Veliki broj studija upućuje na povezanost dekompresijske bolesti sa stvaranjem ekstrasvaskularnih i intravaskularnih plinskih mjehurića (Slika 1). Ekstrasvaskularni mjehurići mogu dovesti do mehaničke ozljede tkiva, distorzije i posljedično boli, dok intravaskularni mjehurići mogu začepiti krvne žile te smanjiti tkivnu perfuziju i eliminaciju inertnih plinova [2]. Većina intravaskularnih mjehurića nastaje u venskoj cirkulaciji pri čemu ih pluća filtriraju i ujedno sprječavaju njihov ulazak u sistemsku cirkulaciju. Izuzetci su preplavlјivanje plućne cirkulacije prevelikim brojem mjehurića, plućna barotrauma te prisutnost srčanog septalnog defekta odnosno otvorenog foramen ovale („patent foramen ovale“; PFO), kada mjehurići ulaze u arterijsku cirkulaciju (tzv. arterijalizacija mjehurića) te mogu dovesti do arterijske plinske embolije. PFO se pronalazi u 20-30 % zdravih osoba [7]. Mali septalni defekt obično nema značaja u prijenosu mjehurića u arterijski sistemski krvotok jer kroz njega prolazi zanemariva količina krvi i mjehurića. Međutim, veliki septalni defekt dovodi do arterijalizacije mjehurića s potencijalnom opasnošću od njihova štetnog učinka. Uobičajena mjesta distribucije mjehurića nakon njihove arterijalizacije su moždana cirkulacija i srednja moždana arterija, gdje intravaskularni mjehurići mogu dovesti do smanjenja moždanog protoka krvi, započeti upalni odgovor, te narušiti integritet krvno-moždane barijere s razvojem edema mozga i neurološkog oblika dekompresijske bolesti [1].



**Slika 1.** Plinski mjehurići u srcu nakon ronjenja. Ehokardiografski prikaz četiri srčane komore snimljen 45 minuta nakon zarona kod jednog od ispitanika. Plinski mjehurići su vidljivi u lijevoj i desnoj srčanoj šupljini (označeno strelicama). RV – desna klijetka (right ventricle), LV – lijeva klijetka (left ventricle) [8].

Iako je dekompresijska bolest dugo povezivana s učincima plinskih mjehurića nastalih tijekom dekompresije, bilo je slučajeva dekompresijske bolesti u ronilaca bez ili sa vrlo malo mjehurića u cirkulaciji [9]. Stoga je postavljena hipoteza o plinskim mjehurićima kao pogoršavajućem čimbeniku, a ne uzroku dekompresijske bolesti [10].

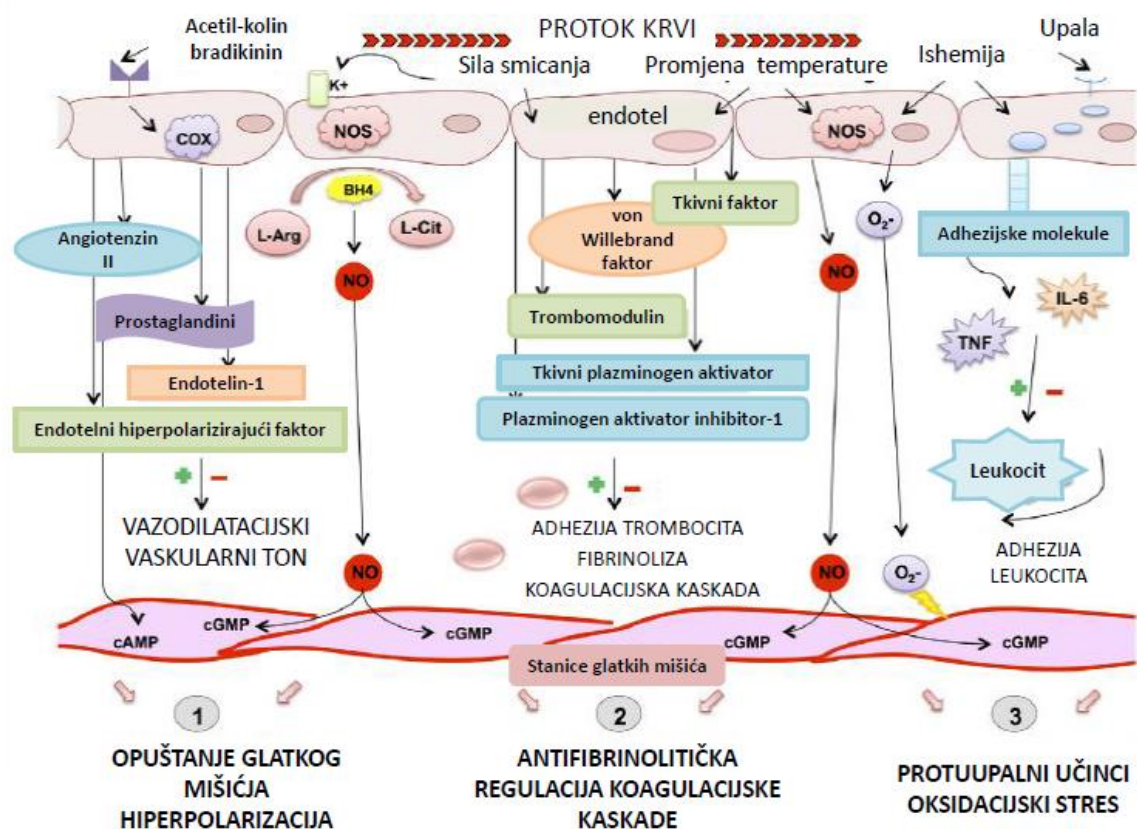
### **1.3. Kardiovaskularni učinci ronjenja s komprimiranim plinskim smjesama**

U brojnim studijama je pokazano da plinski mjehurići vrlo često nastaju nakon uobičajenih rekreativnih zarona prilikom kojih su poštivana sva pravila dekompresije. Takvi plinski mjehurići najčešće ne uzrokuje kliničke simptome, pa su nazvani „tihim mjehurićima“. Unatoč tome, ronjenje s komprimiranim plinskim smjesama često uzrokuje asimptomatske promjene kardiovaskularne funkcije: smanjenje kontraktilne snage lijeve klijetke s povećanjem razine atrijskog natriuretskog peptida u krvi, porast tlaka u plućnoj arteriji i blagi plućni edem, te endotelna disfunkcija [3, 11].

Navedene kardiovaskularne promjene često su povezivane s nastankom „tihih“ mjehurića. Na stijenci krvnih žila, intravaskularni mjehurići mogu oštetiti luminalni sloj surfaktanta i endotelne stanice te dovesti do endotelne aktivacije koja se povezuje s istodobnim izražavanjem upalnih, prokoagulantnih i vazokonstriktorskih svojstava [12]. Interakcija mjehurića s endotelom krvnih žila može uzrokovati ljuštenje stanica te narušiti čvrste spojeve („tight junctions“) endotelnih stanica. Mjehurići također mogu reagirati s krvnim elementima i plazmatskim proteinima te dovesti do aktivacije upalnih faktora i agregacije trombocita s aktivacijom komplementa, te koagulacijske i fibrinolitičke kaskade. Takvo endotelno oštećenje intravaskularnim mjehurićima dovodi do povećane propusnosti kapilara, ekstravazacije krvne plazme i hemokoncentracije [1]. Interakcija plinskih mjehurića s endotelom također dovodi do fragmentiranja endotelnih stanica i otpuštanja endotelnih mikročestica („endothelial microparticles“) koje i same mogu dodatno pogoršati endotelnu funkciju [13]. Naime, endotelne mikročestice slobodno prolaze kroz plućni filter, te ulaze u arterijsku cirkulaciju uzrokujući promjene arterijskog endotela. Na taj se način endotelno oštećenje može razviti na udaljenim mjestima arterijskog sustava, čak bez arterijalizacije mjehurića ili kontakta arterijskog endotela s mjehurićima plina [14].

### **1.3.1. Endotelna disfunkcija**

Iako je struktura endotela koji prekriva unutrašnje stijenke svih krvnih žila jednostavna, on predstavlja funkcionalno složen sustav. Endotelne stanice su neprekidno izložene raznolikim humoralnim, mehaničkim i hemodinamskim utjecajima, te se na njih prilagođavaju akutnim i kroničnim promjenama. Endotel je sposoban odgovoriti na kemijske i fizikalne signale stvaranjem mnogih čimbenika koji reguliraju vaskularnu homeostazu odnosno vaskularni ton, staničnu adheziju, tromborezistenciju, proliferaciju stanica glatkog mišićja i upalu žilnih stijenki (Slika 2) [12].



**Slika 2.** Endotelna funkcija uključuje: 1) regulaciju vaskularnog tona balansiranim stvaranjem vazodilatacijskih i vazokonstriktorskih čimbenika; 2) kontrolu krvnog protoka i procesa zgrušavanja stvaranjem čimbenika koji reguliraju aktivnost trombocita, koagulacijski i fibrinolitički proces; 3) regulaciju upalnih procesa ekspresijom citokina i adhezijskih molekula; cAMP = ciklički adenzin-monofosfat, cGMP = ciklički gvanozin-monofosfat, COX = ciklooksigenaza, NOS = sintaza dušikovog oksida, NO = dušikov oksid, L-Arg = L-arginin, L-Cit = L- citrulin, BH<sub>4</sub> – tetrahidrobiopterin, O<sub>2</sub><sup>-</sup> = superoksid anion, IL = interleukin, TNF = faktor tumorske nekroze (tumor necrosis factor).

Prilagođeno iz [15]

Endotelna disfunkcija je povezana sa smanjenjem arterijske elastičnosti i jedna je od prvih potencijalno reverzibilnih manifestacija kardiovaskularne patologije [16, 17]. Endotelna disfunkcija obuhvaća široki raspon patofizioloških stanja počevši s mehaničkom ozljedom žilne intime do globalne endotelne aktivacije koja može rezultirati i očitim patološkim stanjima. Disfunkcija endotela započinje povećanjem njegove propusnosti, deformiranjem endotelnih stanica, prekidom bliskih staničnih kontakata i nastankom patoloških pukotina nakon čega slijedi upalni odgovor. Reakcijom na ozljedu, endotelna stanica mijenja fenotip neaktivne „mirne“ u aktivirani fenotip s izraženim proupalnim, prokoagulantnim i vazokonstriktorskim svojstvima. Aktivacijom endotela dolazi do ekspresije adhezijskih molekula, povećanog otpuštanja citokina, aktivacije trombocita, te proliferacije i migracije stanica glatkog mišićja [16.]. U fazi aktiviranosti, endotelne stanice mijenjaju stvaranje brojnih faktora koji osim svojih bioloških djelovanja, služe i kao izravni pokazatelji endotelne (dis)funkcije. Pokazatelji endotelne (dis)funkcije uključuju: adhezijske molekule (E-selektin, VCAM-1, ICAM-1, P-selektin), prokoagulantne molekule poput von Willebrandovog faktora (vWf) i inhibitora plazminogen aktivatora (PAI-1), te fragmente membrana endotelnih stanica (endotelne mikročestice) [12].

Veći broj studija je pokazao da ronjenje s komprimiranim plinskim smjesama dovodi do poremećaja endotelne funkcije, a dokazi o endotelnim promjenama nakon ronjenja se odnose na različite manifestacije koje se povezuju s učinkom plinskih mjehurića i/ili oksidacijskog stresa. [18-20]. Nekolicina radova otkriva porast broja endotelnih mikročestica te pojačanu ekspresiju VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) adhezijskih molekula nakon simuliranih zarona s komprimiranim zrakom [21] kao i aktivaciju neutrofila i interakciju neutrofila i trombocita [22]. Ronjenje s komprimiranim zrakom može potaknuti upalne reakcije u krvi s pojačanom ekspresijom adhezijskih molekula, aktivacijom koagulacije i povećanom količinom mikročestica [23], [22]. Analiza transkriptoma nakon ronjenja pokazala je pojačanu regulaciju neutrofilnih, monocitnih i makrofagnih gena što upućuje na podizanje mijeloidnog prirođenog imuniteta nakon ronjenja i protuupalni odgovor [24]. Novije studije također upućuju na povezanost dekompresijske bolesti s prolaznim gubitkom endotelne homeostaze uzrokovane hiperoksijom na dubini s plinskim mjehurićima kao pogoršavajućim faktorom [10], ali zapravo nije jasno je li veći doprinos oksidacijskog stresa ili plinskih mjehurića u razvoju endotelne disfunkcije.

### 1.3.1.1. Uloga dušikovog oksida

Neprimjerena aktivacija endotela je u osnovi endotelne disfunkcije, a nedovoljna raspoloživost dušikovog oksida (NO) jedno je od njenih glavnih obilježja [25]. Naime, upravo NO posreduje većinu homeostatskih funkcija endotela održavajući ga u stanju mirovanja inhibirajući upalne procese, staničnu proliferaciju i trombozu putem nitrozilacije cisteinskih ostataka mnogih regulatornih proteina kojima tako smanjuje biološku aktivnost. NO također ograničava i oksidativnu fosforilaciju u mitohondrijima. Nadalje, NO djeluje i kao vazodilatacijski čimbenik kojega u velikoj mjeri stvara endotelna izoforma sintaze dušikovog oksida (eNOS). NO difundira u stanice vaskularnog glatkog mišićja i aktivira gvanilat ciklazu uzrokujući vazodilataciju posredovanu cikličkim gvanozin-monofosfatom (cGMP-om). Glavni izvor NO su endotelne stanice, tako da se endotelni poremećaji koji uzrokuju poremećenu aktivnost eNOS-a očituju smanjenom bioraspoloživošću NO. Glavni aktivator eNOS-a je sila smicanja ili „shear stress“ koja djeluje preko mehanoreceptora na endotelnim stanicama [26]. Međutim, eNOS mogu također aktivirati bradikinin, adenozin, VEGF i serotonin [12]. Osim NO postoje i ostali endotelni vazoaktivni čimbenici poput vazodilatacijskog prostaciklina i endotelnog hiperpolarizirajućeg faktora, te vazokonstriktorskog endotelina-1 [27]. Upravo nerazmjer raspoloživosti NO i aktivnosti vazokonstriktorskih čimbenika može dovesti do prevage vazokonstriktorskog učinka u endotelnoj disfunkciji.

Smanjena bioraspoloživost NO može biti uzrokovana nedostatkom supstrata (L-arginin) i kofaktora (tetrahidrobiopterin) za njegovu sintezu što ima za posljedicu smanjenu aktivnost eNOS-a. Međutim, biološka aktivnost NO može biti poništena i kemijskim reakcijama s njegovim endogenim inhibitorima. Slobodni kisikovi radikali poput superoksidnog aniona  $O_2^{\cdot-}$  igraju glavnu ulogu u inhibiciji aktivnosti NO. Sve stanice uključujući i endotelne stvaraju  $O_2^{\cdot-}$  čija proizvodnja značajno poraste nakon endotelne aktivacije. Enzimatsko porijeklo  $O_2^{\cdot-}$  je raznoliko te uključuje NADPH oksidazu, ksantin oksidazu, lipooksigenazu, NOS i druge. NOS postaje generator reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) uslijed nedostatka kofaktora tetrahidrobiopterina koji stabilizira dimernu strukturu enzima i olakšava vezanje supstrata l-arginina. U slučaju nedostatka tetrahidrobiopterina, NOS stvara  $O_2^{\cdot-}$  i vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ). Superoksid anion uklanja NO reagirajući s njim, što rezultira višestrukim uklanjanjem NO jer nastaje snažni oksidans peroksinitrit ( $ONOO^{\cdot-}$ ). Peroksinitrit može oksidirati kofaktor NOS-a, tetrahidrobiopterin i tako smanjiti stvaranje NO, a pojačati daljnje stvaranje  $O_2^{\cdot-}$ . Također, peroksinitrit može nastaviti oksidacijske procese i stvoriti druge

reaktivne kisikove i dušikove spojeve [25, 28], te dovesti do iscrpljenja antioksidacijskog kapaciteta stanice. Dakle, interakcijom ROS i NO uspostavlja se začarani krug koji rezultira nastavkom endotelne aktivacije i razvojem upale koja dodatno potiče stvaranje reaktivnih kisikovih radikala, a smanjuje protektivni utjecaj NO na endotelnu funkciju. Smanjenje bioraspoloživosti dušikovog oksida uzrokuje poremećaj vaskularne funkcije s posljedičnom endotelnom disfunkcijom. Endotelna disfunkcija nakon ronjenja je potvrđena mnogim studijama [18],[29],[19],[20] ali točan uzrok joj nije definiran. Budući je u podlozi endotelne disfunkcije nedovoljna raspoloživost NO, postoji mogućnost da prilikom ronjenja dolazi do njegove pojačane potrošnje i smanjenog stvaranja.

### 1.3.1.2. Uloga hiperoksije

Reaktivni kisikovi spojevi (ROS) uključuju superoksid anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hipoklornu kiselinu ( $HClO$ ) i hidroksilni radikal ( $\cdot OH$ ). Različiti metabolički biokemijski procesi normalno dovode do stvaranja ROS-a, a hoće li stvoreni radikali imati pozitivne ili negativne učinke, ovisi o njihovoj koncentraciji i mjestu stvaranja unutar stanice. Njihovo stvaranje je povećano tijekom staničnog izlaganja hiperoksiji, ali i pri pojačanoj tjelesnoj aktivnosti koja također generira ROS (raznim mehanizmima npr. jedan od mehanizama je stimulacija prijenosa elektrona kroz mitohondrijski respiratorni lanac i oksidativna fosforilacija [30]. U slučaju povećanja proizvodnje ROS-a, postoji opasnost od iscrpljivanja antioksidansa koji im se suprotstavljaju [31]. Antioksidansi u vrlo niskim koncentracijama u odnosu na oksidacijske supstrate odgađaju i sprječavaju njihovu oksidaciju. U skupinu enzimatskih antioksidansa pripadaju superoksid dismutaza, katalaza, glutation-ovisna reduktaza, peroksidaza i drugi koji uklanjaju ROS izravno enzimskom katalizom. Osim enzimatskih antioksidansa, postoje i ne-enzimatski antioksidansi poput vitamina C i E, tioredoksina, glutationa, mokraćne kiseline,  $\beta$ -karotena i drugih, koji reagiraju sa slobodnim radikalima dajući im elektron čime umanjuju njihovu reaktivnost i pretvaraju ih u ne-radikale.

Tijekom ronjenja s komprimiranom plinskom smjesom u čijem se sastavu uvijek nalazi kisik dolazi do udisanja kisika pod hiperbaričnim uvjetima te izlaganja organizma hiperoksiji. Hiperoksija može uzrokovati pojačano stvaranje ROS-a i oksidacijski stres, čijim posredovanjem dolazi do smanjenja bioraspoloživosti NO i endotelne disfunkcije. U prilog tome ide i opažanje da akutno izlaganje vitaminima C i E u svrhu poboljšanja antioksidacijskog kapaciteta dovodi do značajnog smanjenja endotelne disfunkcije nakon

ronjenja na dubinu od 30 m [29]. Nadalje, opisano je smanjeno otpuštanje endotelnih mikročestica kao pokazatelja endotelne aktivacije nakon simuliranog ronjenja sa zrakom na 18 m u ispitanika koji su primili vitamine C i E u odnosu na kontrolne ispitanike [32]. Također, nakon dubokih zarona (55 do 80 m dubine) s trimix plinskom smjesom (14% O<sub>2</sub>, 45% He i 41% N<sub>2</sub>), endotelna disfunkcija je bila popraćena porastom lipidne peroksidacije kao pokazateljem pojačanog oksidacijskog stresa [19].

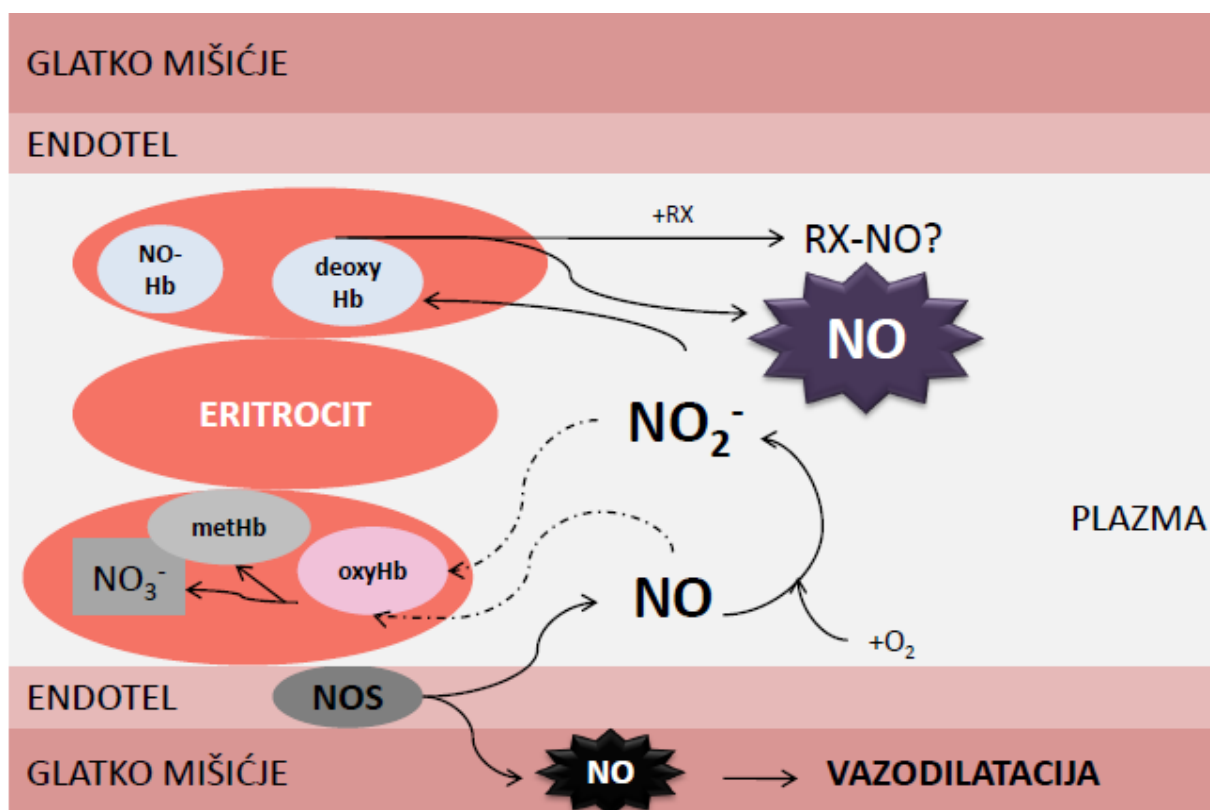
Uloga hiperbaričnog kisika u razvoju endotelne disfunkcije nije potpuno jasna. Naime, pokazalo se da je značajno smanjenje endotelne funkcije nastupilo nakon ronjenja sa zrakom ali ne i nakon ronjenja s kisikom što upućuje na to da hiperbarični kisik nije jedini uzrok endotelne disfunkcije [20]. Sam kisik kao molekula ne izaziva izravno oksidacijski stres ali predstavlja izvor svih ROS. Međutim uslijed fizičke aktivnosti prilikom ronjenja dolazi do pojačane potrošnje kisika što bi moglo biti uzrokom i pojačanog stvaranja ROS. Povećano stvaranje ROS uslijed pojačane metaboličke aktivnosti može dovesti i do pojačanog stvaranja antioksidacijskih enzima [33]. Primjerice, nađen je povećan antioksidacijski status nakon ronjenja na 40 m, što upućuje na poboljšano sprječavanje nastanka oksidacijske štete uzrokovane reaktivnim kisikovim spojevima koje uključuje smanjenu raspoloživost NO i vazokonstrikciju [34, 35].

### **1.3.1.3. Biokemijski pokazatelji endotelne disfunkcije**

Budući da endotel obavlja brojne funkcije u organizmu putem molekula koje stvara, njegova se funkcija može pratiti upravo određivanjem cirkulirajućih molekula endotelnog porijekla. Takva mjerenja omogućuju uvid u mehanizme i težinu endotelne disfunkcije, te nadopunjuju fiziološke testove endotelne vaskularne kontrole. Zdravi endotel ima vazodilatacijska, antioksidacijska, antitrombotska, protuupalna, antikoagulantna i fibrinolitička svojstva, te pokazuje primjerenu proizvodnju NO. Disfunkcionalni endotel ima suprotna obilježja: vazokonstrikcijska, prooksidacijska, proupalna, protrombotska, prokoagulacijska te antifibrinolitička djelovanja koja mogu rezultirati promijenjenom razinom nitrita, endotelina-1, von Willebrandovog faktora, inhibitora plazminogen aktivatora i C reaktivnog proteina u krvi.

## Nitriti

Nitriti predstavljaju oksidacijski produkt NO. Naime, nakon stvaranja u endotelu, NO difundira u lumen krvne žile te potom u eritrocite gdje reagira s oksihemoglobinom pri čemu nastaje methemoglobin i nitrat. Reakcija je toliko brza, da bi se sav raspoloživi NO u krvi potrošio na reakciju s hemoglobinom, ukoliko hemoglobin ne bi bio odvojen u eritrocitima. Međutim, eritrocitna membrana zajedno sa zonom plazme bez eritrocita duž površine vaskularnog endotela stvara difuzijsku barijeru između NO i hemoglobina čime se sprječava njegovo potpuno uklanjanje. Na taj je način omogućen difuzijski gradijent NO između endotela i glatkog mišićja te osigurana njegova parakrina aktivnost. Osim toga, dio intravaskularnog NO koji izbjegne hemoglobin reagira s kisikom u plazmi stvarajući nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) i druge NO produkte koji bi mogli predstavljati intravaskularno skladište dušikovog oksida. Naime nitriti ( $\text{NO}_2^-$ ) također mogu ući u eritrocite i reagirati s hemoglobinom. Ukoliko reagiraju s oksihemoglobinom, nastaju nitrati i methemoglobin, dok reakcijom s deoksihemoglobinom nastaje NO, nitrozil Hb(NHb) i drugi NO produkti (RX-NO). Nije poznato otpušta li se stvoreni NO direktno iz eritrocita ili se transformira u neki NO produkt (RX-NO) [36].



**Slika 3.** Dušikov oksid (NO) i nitriti ( $\text{NO}_2^-$ ) u krvi. NO nastaje aktivnošću endotelne NOS i difundira u vaskularno glatko mišićje gdje potiče vazodilataciju. Ostatak NO difundira u lumen krvne žile te potom u eritrocit u kojem reagira s oksihemoglobinom (oxHb), stvarajući nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) i methemoglobin (metHb). Dio intravaskularnog/plazmatskog NO reagira s kisikom stvarajući nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ). Nitriti mogu difundirati u eritrocite i reagirati s oxHb te stvarati nitrate i metHb, ili u reakciji s deoksiHb stvarati NO i NO produkte.

Prilagođeno prema [36]

Većina nitrita u krvi potječe od endotelne NOS aktivnosti (~90%) što se zaključuje iz podataka da stimulacija i inhibicija endotelne NOS rezultiraju promjenom koncentracije nitrita, ali ne i nitrata [37, 38]. Plazmatski nitriti odražavaju udio u ukupnoj sintezi NO i široko su prihvaćeni kao indeks NOS aktivnosti *in vivo* [39]. Na primjer, kod pacijenata s endotelnom disfunkcijom u kojih je određivana koncentracija nitrita u plazmi i protokom uvjetovana dilatacija (indikator endotelne disfunkcije i *in vivo* NOS aktivnosti), pokazao se pad koncentracije nitrita te smanjenje protokom uvjetovane dilatacije u odnosu na zdrave ispitanike pri čemu su oba parametra značajno korelirala [39]. Dakle, endogeno stvaranje NO se može pratiti određivanjem koncentracije nitrita u plazmi koja reflektira aktivnost konstitutivne odnosno endotelne NOS i bioraspoloživost NO, pa prema tome i endotelnu funkciju [36].

#### Von Willebrandov faktor

Von Willebrandov faktor (vWf) se stvara i pohranjuje u endotelnim stanicama i megakariocitima. Njegov prekursor je pro-vWf, koji u endotelnim stanicama prolazi nekoliko post-tranlacijskih modifikacija odnosno podliježe glikozilaciji, multimerizaciji i endoproteolitičkom izrezivanju. Multimer visoke molekularne mase se regulirano otpušta iz endotelnih stanica ili skladišti u Weibel Paladijevim tjelešcima odakle se može brzo otpustiti u krv egzocitozom. Ulaskom u krv, brzo se procesuiru u manje multimerne [40], te kao multimerni glikoprotein ima višestruke funkcije. On u krvi djeluje kao nosač i stabilizator faktora VIII, dok njegove ostale funkcije uključuju posredovanje adhezije trombocita na subendotel i agregacije trombocita. Dakle, s obzirom na svoje fiziološke učinke, vWF spada u prokoagulantne čimbenike. Njegove raznolike funkcije su posredovane njegovim različitim funkcionalnim domenama poput veznih mjesta za kolagen, heparin, GPIIb/IIIa i faktor VIII [41].

Otpuštanje vWf iz trombocitnih granula i endotelnih stanica je odgovor na vaskularnu ozljedu. Cirkulirajući vWf se u normalnim homeostatskim uvjetima ne veže za trombocite, nego samo u slučaju oštećenja endotela i izlaganja subendotelnog matriksa, kao što se ni trombociti ne vežu za njega dok nisu aktivirani. Većina vWF-a u cirkulaciji potječe iz endotela i određena je reguliranom sekrecijom iz Weibel Paladijevih tjelešaca, koju potiču  $O_2^-$ , citokini, te medijatori upale i tromboze. Naime, vWf je i reaktant akutne faze, te tijekom upale poraste njegova razina u krvi (iznad jedva mjerljivih razina koje su inače prisutne u fiziološkim uvjetima) [42]. Nadalje, postoje studije koje ukazuju da NO može smanjiti

sekreciju vWf-a [41]. Dakle, s obzirom na navedene regulatore sekrecije vWF-a, te njegove brojne učinke, plazmatska razina vWF-a može odražavati trenutno stanje endotela odnosno endotelnu aktivaciju i disfunkciju, te stoga biti promijenjena nakon ronjenja s komprimiranim plinskim smjesama.

#### Inhibitor aktivatora plazminogena tip 1

Inhibitor aktivatora plazminogena tip 1 (PAI-1) je glikoprotein mase 50 kD koji ne sadrži cisteinske ostatke. Pripada obitelji inhibitora serinskih proteaza (serine protease inhibitors - SERPINs) za koje se smatra da dijele istu tercijarnu strukturu. Jedan je od inhibitora tkivnog aktivatora plazminogena (tPA) i urokinaznog aktivatora plazminogena (uPA) koji su moćni aktivatori plazminogena i fibrinolize. PAI-1 ima široku tkivnu zastupljenost, ali ga ima i u krvi, te izvanstaničnom matriksu [43]. PAI-1 se otpušta u cirkulaciju iz jetre, stanica glatkih mišića, adipocita i trombocita u fiziološkim uvjetima. Međutim tijekom patoloških stanja kao što je sistemska upala, veće količine PAI-1 mogu lučiti i endotelne stanice, tako da se PAI-1, kao i vWf, također može smatrati produktom odgovora akutne faze [44]. Plazmatska aktivnost PAI-1 može biti mjera prokoagulantnih posljedica endotelne aktivacije, jer porast njegove aktivnosti ukazuje na prokoagulantnu prevagu u krvnoj homeostazi koja se događa uslijed endotelne aktivacije [12]. Povećana aktivnost PAI-1 u krvi se povezuje s povećanim rizikom za kardiovaskularne bolesti [45].

#### Endotelin

Endotelin je cirkulirajući hormon i parakrini čimbenik uključen u regulaciju vaskularnog tona i sistemskog krvnog tlaka. Stvaranje endotelina je potaknuto adrenalinom, interleukinom-1, trombinom, uvjetima niskih ili oscilirajućih smičnih sila na endotelu („shear stress“), hipoksijom, te oštećenjem endotelnih stanica. Potječe iz obitelji endotelina koja obuhvaća tri različita izopeptida od kojih je endotelin-1 (ET-1) najmoćniji vazokonstriktor. Stvara se u endotelnim stanicama kao preproendotelin kojega signalna peptidaza izrezuje u proendotelin-1. Pretvorbu proendotelina-1 u endotelin-1, peptid sastavljen od 21 aminokiseline, omogućuje endotelin-konvertirajući enzim [42]. ET-1 svoje djelovanje ostvaruje preko endotelinskih receptora ET<sub>A</sub> i ET<sub>B</sub>. ET<sub>B</sub> se nalaze na endotelnim stanicama i posreduju vazodilataciju, dok se ET<sub>A</sub> nalaze na fibroblastima i stanicama glatkih mišića krvnih žila i posreduju vazokonstrikciju, staničnu proliferaciju, upalu i fibrozu.

ET-1 može potaknuti endotelnu disfunkciju utječući na djelovanje NO. Prekomjerna ekspresija ET-1 i stimulacija endotelinskih receptora potiče stvaranje ROS-a u krvožilju i smanjenje količine tetrahidrobiopterina, ključnog kofaktora u stvaranju NO. Stimulacija ET<sub>B</sub> također inducira proupalni fenotip endotelnih stanica, a stimulacija ET<sub>A</sub> potiče prianjanje leukocita na endotel. Dakle, ET-1 promovira vaskularnu upalu potičući ekspresiju adhezijskih molekula, aktivaciju monocita i oksidacijski stres [27], te je jedan od ključnih faktora za razvoj endotelne disfunkcije.

Moždane krvne žile su posebno osjetljive na djelovanje ET-1, koji se stvara i u mozgu [46]. Stvaranje ET-1 u moždanoj cirkulaciji je potaknuto hipoksijom i niskom razinom smične sile uslijed pada perfuzijskog tlaka prilikom akutne cerebralne ishemije. Oštećenje endotelnih stanica i neurona može dovesti do pojačanog „curenja“ ET-1 u krv [47], tako da se porast ET-1 u plazmi može dovesti u vezu i s moždanom ozljedom ishemijskog porijekla.

#### C – reaktivni protein

C – reaktivni protein (CRP) je reaktant akutne faze i nespecifičan biljeg upale koji se uglavnom stvara u hepatocitima kao odgovor na djelovanje raznih citokina. Glavni regulator stvaranja CRP-a je interleukin-6 (IL-6) kojeg otpuštaju leukociti u odgovoru na infekciju ili traumu, te stanice vaskularnog glatkog mišićja u aterosklerotskom procesu. Naime, CRP izravno veže oksidirane lipoproteine niske gustoće (oxLDL) i prisutan je unutar lipidnih plakova. CRP ima proupalni učinak u aterosklerotskim plakovima, potiče imunološki odgovor olakšavajući prianjanje monocita i njihovu ekstravazaciju [48]. U *in vitro* studijama je nađena povezanost CRP-a s inhibicijom eNOS-a i poremećenom reaktivnošću krvnih žila [49]. Također, CRP može aktivirati endotelne stanice tako da se povećanje plazmatske koncentracije CRP-a može dovesti u vezu s endotelnom aktivacijom i vaskularnom disfunkcijom [50]. Nadalje, CRP potiče stvaranje O<sub>2</sub><sup>•-</sup> putem NADPH oksidaze, smanjuje bioraspoloživost NO [51] i inhibira o endotelu ovisnu dilataciju posredovanu dušikovim oksidom [52]. Brojne studije na ljudima su pokazale obrnutu korelaciju između razine CRP-a u krvi i endotelne vaskularne reaktivnosti [49].

#### Adenozin

Adenozin je signalna molekula uključena u modulaciju fizioloških odgovora u svim tkivima sisavaca. Kao regulator vaskularne funkcije ima vazodilatacijsko djelovanje te

povećava protok krvi u tkivima tijekom povećane metaboličke aktivnosti poput tjelovježbe ili tijekom ishemije. Adenozin ima također zaštitni učinak na tkiva zahvaćena ishemijom. Povišena razina adenozina u krvi je nađena nakon ronjenja na dah i to pogotovo u ronilaca s potpunim gubitkom svijesti [53]. Kao endogeni nukleozid, adenozin je biokemijski posrednik staničnog metabolizma koji u endotelnim stanicama može imati antioksidacijski zaštitni učinak. Naime, *in vitro* studija u kojoj su ispitivani učinci adenozina na endotelnu disfunkciju potaknutu vodikovim peroksidom, potvrdila je takav učinak, s tim da je adenozin spriječio smanjenje aktivnosti eNOS i poboljšao stvaranje NO, te posredovao uklanjanje slobodnih kisikovih radikala [54]. Eksperimentalni podaci o eventualnoj promjeni koncentracije adenozina u krvi uslijed ronjenja s komprimiranim plinovima do sada nisu poznati.

#### **1.3.1.4. Pokazatelji funkcije krvnih žila**

Hemodinamske promjene koje se odražavaju promjenama sistoličkog, dijastoličkog i pulsog tlaka u velikoj su mjeri uzrokovane promjenama funkcije elastičnih svojstava velikih krvnih žila. Elastičnost krvnih žila naročito utječe na sistolički tlak i tlak pulsa. Naime, srce izbacuje krv u velike elastične arterije (aorta i njezine velike grane) iz kojih dopire u periferna tkiva kroz relativno neelastične periferne arterije. Elastična svojstva proksimalnih arterija rezultat su većeg udjela elastina u odnosu na kolagen, s tim da elastinski udio progresivno opada prema periferiji u kojoj dominiraju kruće i više mišićne arterije poput brahijalne i radijalne. Elastičnost određenog arterijskog segmenta nije stalna nego se mijenja s obzirom na tlak rastezanja. Porast tlaka dovodi do razmjешtanja neelastičnih kolagenskih vlakana te do smanjenja elastičnosti. Nadalje, osim strukturnih karakteristika određenih kolagenom i elastinom, na elasticitet krvnih žila utječe i udio glatkih mišićnih vlakana, te ga može mijenjati mišićni tonus koji je pod utjecajem raznih faktora (npr. simpatički živčani sustav, renin-angiotenzin-aldosteron sustav, endotel). Dokazi iz studija provedenih na životinjama i na ljudima sugeriraju da je endotel važan regulator arterijske krutosti i strukturno i funkcionalno. Naime, endotelna disfunkcija popraćena pojačanom vazokonstrikcijom zbog porasta endotelina-1 i drugih vazokonstriktora može dovesti i do povećane arterijske krutosti. Osim toga, brojne intervencije u svrhu smanjenja arterijske krutosti su dovele do poboljšanja i endotelne funkcije [55]. Tako da ispitivanje funkcije krvnih žila može uključivati ispitivanje funkcije samog endotela kao i parametara koji ukazuju na elasticitet žila. Funkciju endotela može se ispitivati mjerenjem protokom posredovane vazodilatacije („flow mediated dilatation“, FMD), a arterijsku elastičnost

određivanjem brzine pulsnog vala („pulse wave velocity“, PWV) i augmentacijskog indeksa (Aix). Međutim, niti jedan od ovih testova nisu direktni pokazatelji funkcije velikih sistemskih arterija nego regionalnih ili lokalnih (npr. brahijalne ili radijalne), dok se primjerice krutost velikih sistemskih arterija može samo procjenjivati iz cirkulacijskih modela [12].

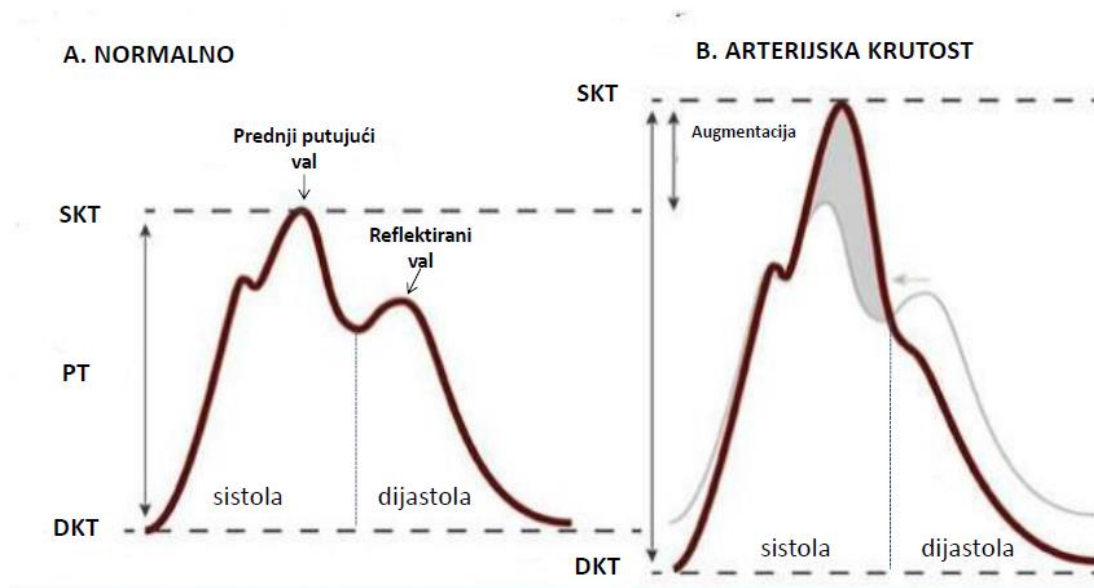
#### Protokom posredovana dilatacija

Protokom posredovana dilatacija ili FMD je neinvazivna ultrazvučna metoda kojom se procjenjuje vaskularna funkcija perifernih sistemskih arterija. Predstavlja zlatni standard za klinička istraživanja endotelne funkcije perifernih arterija [12]. Ovom metodom se mjeri promjer brahijalne arterije prije i poslije porasta smičnog naprezanja izazvanog reaktivnom hiperemijom (odgovor na ishemiju uzrokovanu napuhavanjem manžete tlakomjera). Naime, reaktivni porast protoka krvi (hiperemija) uzrokuje porast smicanja koji ima za posljedicu porast aktivnosti eNOS, te posljedično porast količine NO koji uzrokuje vazodilataciju i povećanje promjera brahijalne arterije. Postotak porasta promjera brahijalne arterije je mjera endotelne funkcije, jer ukazuje na raspoloživost NO koji posreduje dilataciju žile [56]. Tako da bi svi čimbenici koji utječu na dostupnost NO odnosno endotelnu funkciju mogli dovesti do promjene FMD-a. Nedostatak NO trebao bi uzrokovati pad FMD-a odnosno smanjen porast promjera brahijalne arterije nakon reaktivne hiperemije. Dosadašnje studije su pokazale pad FMD-a nakon ronjenja s komprimiranim plinovima [18],[19]

#### Brzina pulsnog vala i augmentacijski indeks

Brzina pulsnog vala ili PWV je direktna mjera arterijske krutosti koja odgovara propagativnom modelu sistemske cirkulacije. Naime raznolika viskoelastična svojstva arterijskog stabla i adaptivni mehanizmi onemogućuju ekstrapolaciju osobina jednog arterijskog segmenta na čitav krvožilni sustav. Zbog toga su razvijeni modeli koji opisuju sistemsku cirkulaciju u cjelini poput propagativnog modela. Propagativni model podrazumijeva arterijsko stablo kao jednu viskoelastičnu cijev koja zbog svojih različito raspoređenih elastičnih svojstava dozvoljava stvaranje tlačnog vala koji započinje izbacivanjem krvi iz lijeve klijetke, te se širi njenom dužinom prema periferiji, ali brojne grane i visoka razina otpora uvjetuju stvaranje retrogradnog vala refleksijom. Refleksija se događa na perifernim račvištima malih mišićnih arterija, a može je uzrokovati i sam gradijent

krutosti duž arterijskog stabla. Što su arterije kruće, to je brzina i vodećeg i retrogradnog pulsno vala veća, te omogućuje da se retrogradni val podudara sa sistoličkim valom i na taj način poveća amplitudu sistoličkog tlaka uz sniženje dijastoličkog tlaka. U slučaju kada je arterijska krutost normalna, retrogradni val se vrati u aortu tijekom dijastole, te na taj način poveća koronarni protok. Amplituda tlačnog vala je veća u perifernim krućim arterijama zbog amplifikacijskog fenomena uzrokovanog bržom refleksijom u krućim arterijama, te bližim mjestima refleksije. Obično se određuje brzina pulsno vala između karotidne i femoralne arterije, jer između ta dva mjesta pulsni val putuje kroz veći dio arterijskog stabla. [57]. Porast krvno tlaka kao i srčana frekvencija mogu također povisiti brzinu pulsno vala.



**Slika 4.** Shematski prikaz pulsno vala u normalnim i krutim arterijama. Pulsni val se širi u normalnim popustljivim arterijama od srca prema periferiji stvarajući sistolički vršak dok se reflektirani val vraća u centralnu aortu povećavajući dijastolički tlak (A). U krutim arterijama se valna refleksija događa ranije pa reflektirani val stiže u sistoli i povećava sistolički tlak dok dijastolički opada (B). SKT = sistolički krvni tlak; DKT = dijastolički krvni tlak; PT = pulsni tlak.

Augmentacijski indeks (Aix) je indirektni pokazatelj arterijske krutosti i direktna mjera refleksije aortnog pulsog vala koji se sastoji od inicijalnog vala nastalog kontrakcijom lijeve klijetke i kasnijeg reflektiranog vala. Augmentacija je učinak reflektiranog vala na vršni sistolički tlak, odnosno mjera amplifikacije sistoličkog tlaka refleksijom pulsog tlaka [58]. Augmentacijski indeks je definiran razlikom drugog sistoličkog vršnog tlaka nastalog refleksijom i prvog sistoličkog vršnog tlaka nastalog prije refleksije, izražene kao postotak tlaka pulsa. Stoga negativan Aix imaju mladi zdravi ljudi, dok starenje odnosno gubitak elastičnosti arterija dovodi Aix u pozitivnu vrijednost [55]. Aix se određuje analizom oblika arterijskog vala na centralnoj razini, dakle aortnog vala, čiji se oblik rekonstruira iz karotidnog ili radijalnog vala.

Aix nije dakle određen samo elastičnošću arterija i brzinom pulsog vala, nego ovisi i o ventrikularnoj kontraktilnosti, trajanju ventrikularnog izbacivanja i srčanoj frekvenciji [57]. Budući da arterijska elastičnost odnosno krutost nije konstantna i, između ostalog, je određena i endotelnom funkcijom, za očekivati je da promjene endotelne funkcije uslijed ronjenja s komprimiranim plinovima mogu dovesti do promjene PWV-a i Aix-a.

#### **1.4. Oštećenje središnjeg živčanog sustava uslijed ronjenja s komprimiranim plinskim smjesama**

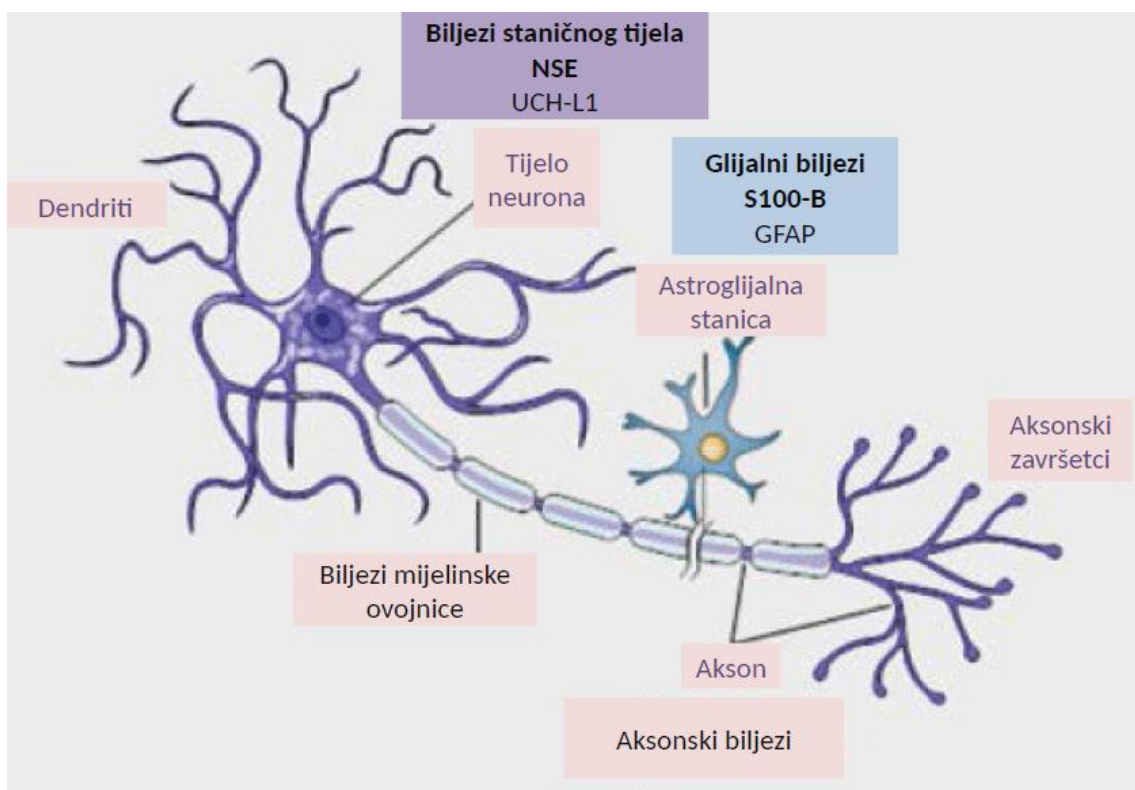
Rastući broj studija upućuje na mogućnost nastanka dugoročnih neuroloških oštećenja uslijed ronjenja bez obzira na odsutnost očitih kliničkih simptoma [59-61]. Naime, pretpostavlja se da veća oštećenja nastaju kumulativno iz manjih sub-kliničkih neurotrauma. Brojne lezije u mozgu otkrivene u ronilaca najčešće se povezuju s arterijskom embolijom odnosno prisutnošću plinskih mjehurića u moždanoj cirkulaciji [62]. Septalni defekt u srcu ili PFO mogući je put arterijalizacije mjehurića nastalih dekompresijom, a dugo se smatralo i jedini. U jednoj od studija se pokazalo da postotak prisutnosti PFO u populaciji odgovara postotku ronilaca s moždanim oštećenjima [63]. MRI snimanja moždanih lezija kod sportskih ronilaca su pokazala veću učestalost višestrukih lezija u mozgu u ronilaca s PFO nego u ostalih i to naročito u onih s velikim PFO [62]. Međutim, ipak u većine ronilaca s velikim PFO nisu nađene moždane lezije.

Ehokardiografija visoke rezolucije je pokazala da se arterijalizacija plinskih mjehurića događa znatno češće nego bi bilo očekivano s obzirom na prisutnost PFO [64], te da u određenim uvjetima mjehurići mogu arterijalizirati i putem plućne cirkulacije (intrapulmonalni šantovi) [65]. Tako da je PFO samo jedan rizični čimbenik u nastanku

moždane ozljede, a točan uzrok i mehanizam nastanka moždanog oštećenja uslijed ronjenja još nije poznat. Moždana cirkulacija je uobičajeno mjesto distribucije plinskih mjehurića koji mogu biti uzrokom ozljede bilo vaskularnom okluzijom ili oštećenjem endotela i narušavanjem integriteta krvno-moždane barijere [1].

#### **1.4.1. Humoralni biljezi oštećenja središnjeg živčanog sustava**

Humoralni biljezi koji se mogu mjeriti u krvi kao pokazatelji oštećenja središnjeg živčanog sustava (SŽS) upravo iz njega i potječu. Neki od biljega se nalaze i u drugim tkivima, te ih normalno u određenoj koncentraciji ima u krvi. Međutim, porast njihove koncentracije u krvi zapravo ukazuje na moguće oštećenje SŽS-a. Takvi biljezi su S100-B, neuron-specifična enolaza (NSE) i endotelin-1 o kojem je već bilo riječ kao endotelnom biljegu. Navedeni biljezi u krv dopijevaju prolaskom kroz krvno-moždanu barijeru koja i sama može biti oštećena, te zbog toga u većoj mjeri propusna. Krvno-moždana barijera je građena od mikrovaskularnih endotelnih stanica koje su povezane čvrstim vezama („tight junctions“) i koje onemogućuju direktnu komunikaciju krvi i SŽS-a. Perivaskularni periciti i mikroglia stanice se također smatraju aktivnim komponentama barijere. Mikrovaskularni endotel dijeli zajedničku bazalnu membranu s astrocitima i pericitima, a astrociti sa svojim krajnjim nožicama čvrsto obuhvaćaju endotelne stanice. Tako da su glijalne nožice moguća komunikacija između neurona i kapilara. U mnogim oštećenjima SŽS-a dolazi do narušavanja krvno-moždane barijere i porasta njezine propusnosti zbog nastanka abnormalnih staničnih čvrstih veza i pojačanog vezikularnog transporta. U tom slučaju kroz barijeru mogu prolaziti proteinske molekule sintetizirane u glijalnim stanicama, ali i sastojci oštećenih živčanih stanica. Iz tih razloga, pojava biljega iz SŽS-a u krvi ukazuje na otvaranje krvno-moždane barijere i neurološko oštećenje ako je biljeg porijeklom iz živčanih stanica. [66]



**Slika 5. Neuroanatomsko porijeklo biljega moždane ozljede;** NSE = neuron specifična enolaza; UCH-L1 = ubikvitin C-terminalna hidrolaza L1; S100-B; GFAP = glijalni fibrilarni kiseli protein; Prilagođeno prema [67]

## S100-B

S100-B je protein koji veže kalcij, te je uključen u regulaciju mnogih unutarstaničnih procesa poput signalizacije, regulacije enzimatske aktivnosti i inhibicije fosforilacije proteina, te homeostaze kalcija. Također je uključen u rast aksona, glijalnu proliferaciju i diferencijaciju živčanih stanica. Izoforme  $\alpha\beta$  i  $\beta\beta$  se nalaze u citoplazmi astroglijalnih stanica SŽS-a koje ih i stvaraju, te se označavaju kao S100-B, a izoforme  $\beta\beta$  ima i u Schwannovim stanicama. Izvan SŽS-a, S100-B je prisutan u masnom i mišićnom tkivu, ali u malim koncentracijama, te u malignim melanomskim stanicama. Stoga porijeklo ovog proteina u cirkulaciji ne mora biti isključivo SŽS, nego može biti i mišićno i masno tkivo pogotovo uslijed intenzivnije fizičke aktivnosti koja pak može prouzrokovati mišićnu ozljedu ili aktivirati adipocite [68]. Međutim, ovaj protein ipak ima prihvatljivu specifičnost za moždanu ozljedu, te visoku osjetljivost, jer mu koncentracija raste brzo nakon traumatične ozljede mozga [69], a ekstrakranijalno porijeklo proteina u cirkulaciji se može isključiti mjerenjem dodatnih biljega moždanog oštećenja poput NSE kao i mjerenjem aktivnosti mišićnih enzima u cirkulaciji poput kreatin-kinaze [70]. Koncentracija ovog biljega u krvi može narasti i uslijed otvaranja krvno-moždane barijere odnosno njezinog narušenog integriteta kao i astroglijalne aktivacije, a da pritom nije došlo do moždanog oštećenja [66]. Upravo ova svojstva čine S100-B dobrim biljegom za detekciju mogućih promjena SŽS-a uslijed ronjenja s komprimiranim plinskim smjesama, koje mogu uključivati endotelnu disfunkciju moždane mikrovaskulature odnosno krvno-moždane barijere, kao i neuronalno oštećenje prouzrokovano učincima plinskih mjehurića. Naime, povišena koncentracija S100-B u krvi je pronađena nakon voljne apneje kod ronjenja na dah što upućuje na narušen integritet SŽS-a [71]. Povišena razina S100-B u krvi je također izmjerena u eksperimentalnih životinja podvrgnutih hiperbariji, te je korelirala s razinom plinskih mjehurića u desnom srcu nakon zarona što bi moglo ukazivati na neurološku ozljedu uzrokovanu dekompresijom [72]. Postoji i studija na ronionicima koja nije pokazala porast S100-B nakon ronjenja s komprimiranim nitrox-om, ali je provedena na vrlo malom broju ispitanika i bez uvida u razinu stvaranja plinskih mjehurića nakon zarona [73].

## Neuron-specifična enolaza

Neuron-specifična enolaza (NSE) je izoforma glikolitičkog enzima koji prevodi 2-fosfo-D-glicerat u fosfoenolpiruvat. Enolaza je inače heterodimer koji može sadržavati  $\alpha$ ,  $\beta$ , i  $\gamma$

podjedinice. Izoenzim  $\gamma\gamma$  je neuron specifičan i nalazi se u citoplazmi neurona [74]. Intaktni neuroni ne izlučuju enzim u izvanstaničnu tekućinu, nego se NSE može osloboditi iz stanica samo staničnim oštećenjem [75], čineći ga biljekom koji izravno ukazuje na oštećenje neurona. NSE je prisutan i u perifernim neuroendokrinim stanicama i nekim rjeđim tumorima poput karcinoma pluća malih stanica, te u trombocitima i eritrocitima. Povišena koncentracija NSE u krvi i likvoru pronađena je kod pacijenata s moždanim udarom, moždanim krvarenjem i nakon oživljavanja, te kod pacijenata s moždanom ozljedom uslijed sepse i septičkog šoka [76]. Visoke vrijednosti u krvi se javljaju i kod traumatične ozljede glave te koreliraju s jačinom ozljede [77]. Određena mala koncentracija NSE je normalno prisutna u krvi, pa njegova primjena kao biljega neuronalnog oštećenja podrazumijeva praćenje porasta koncentracije u krvi kao i isključivanje ostalih stanja koja mogu biti uzrokom povećanja poput hemolize [78].

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

### 2.1. Ciljevi i hipoteze

Glavni cilj ove doktorske disertacije je istražiti biokemijske i fiziološke promjene endotelne i vaskularne funkcije, te promjene humoralnih biljega integriteta središnjeg živčanog sustava nakon ronjenja s komprimiranim plinskim smjesama.

Navedeni cilj istraživanja ostvaruje se testiranjem sljedećih hipoteza:

Hipoteza 1: Asimptomatski zaroni s komprimiranim zrakom uzrokuju promjene biokemijskih parametara endotelne funkcije i oksidacijskog stresa.

Hipoteza 2: Asimptomatski zaroni imaju različiti utjecaj na vaskularnu funkciju s obzirom na vrstu korištene plinske smjese za disanje.

Hipoteza 3: Asimptomatski zaroni u prisutnosti arterijalizacije plinskih mjehurića uzrokuju porast koncentracije humoralnih biljega oštećenja endotela i središnjeg živčanog sustava.

Navedene hipoteze su testirane trima odvojenim studijama, od kojih je svaka testirala jednu hipotezu.

U prvoj studiji su ispitivane promjene biokemijskih pokazatelja endotelne funkcije nakon ronjenja s komprimiranim zrakom: aktivnost von Willebrandova faktora i inhibitora aktivatora plazminogena u plazmi, te koncentracija C reaktivnog proteina kao i promjene oksidacijskog statusa mjerenjem koncentracije adenzina, mjerenjem razine lipidne peroksidacije (TBARS) i određivanjem plazmatskog antioksidacijskog kapaciteta (FRAP) uz istovremeno praćenje razine stvaranja plinskih mjehurića. Cilj je bio istražiti dolazi li do promjena navedenih pokazatelja uslijed ronjenja s komprimiranim zrakom, te postoji li povezanost promjene oksidacijskog statusa i razine plinskih mjehurića sa pokazateljima endotelne funkcije. Takav pristup može omogućiti dobivanje odgovora na pitanje, što više doprinosi endotelnoj disfunkciji, oksidacijski stres ili plinski mjehurići.

U drugoj studiji ispitan je utjecaj ronjenja s različitim plinskim smjesama za disanje na vaskularnu funkciju. Pritom su korištene plinske smjese bile zrak koji ima veći udio dušika i dovodi do većeg stvaranja plinskih mjehurića, te nitrox sa većim udjelom kisika odnosno potencijalno većim izvorom oksidacijskog stresa uslijed izloženosti većoj hiperoksiji. Ispitivanje razlike u vaskularnoj funkciji nakon zarona s dvije različite plinske smjese mjerenjem protokom posredovane dilatacije, brzine pulsog vala i augmentacijskog indeksa, te mjerenjem koncentracije nitrita uz istovremeno određivanje razine stvaranja plinskih

mjehurića, može pomoći u identifikaciji faktora koji značajnije pridonosi endotelnoj disfunkciji (hiperoksija ili plinski mjehurići).

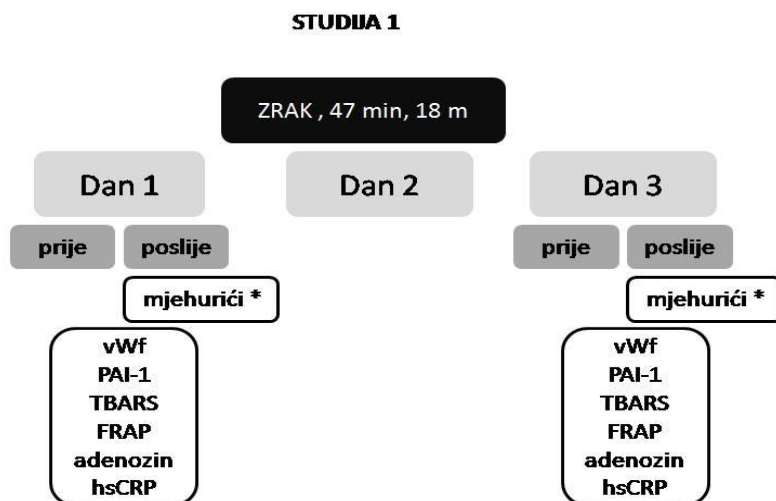
U trećoj studiji ispitano je dovodi li arterijalizacija plinskih mjehurića do promjene koncentracije endotelina-1, S100-B i NSE u krvi, odnosno do pojave znakova narušenog integriteta endotela i središnjeg živčanog sustava. Na taj način su ispitani neki od potencijalno negativnih učinaka plinskih mjehurića nastalih uslijed ronjenja s komprimiranim plinovima, budući da arterijalizirani mjehurići vrlo često završavaju svoj put u moždanoj cirkulaciji.

### 3. ISPITANICI I METODE

#### 3.1. Opis istraživanja

Ovo istraživanje obuhvatilo je tri odvojene studije od kojih je svaka studija ispitivala jednu od prethodno navedenih hipoteza.

U prvoj studiji su istražene endotelne promjene nakon ronjenja te njihovi mogući uzroci, stvaranje plinskih mjehurića i oksidacijski stres. Mjereni su pokazatelji endotelnih promjena i oksidacijskog statusa prije i poslije zarona, dok je stupanj stvaranja mjehurića procijenjen u više vremenskih točaka nakon ronjenja. Kao pokazatelji endotelnih promjena su mjereni: vWf, PAI-1, hsCRP i adenozin. Pokazatelji oksidacijskog statusa mjereni u ovoj studiji su produkti lipidne peroksidacije (TBARS) i jedan od pokazatelja antioksidacijskog kapaciteta plazme (FRAP). Svi parametri su određivani prvi i treći dan serije zarona kako bi se ispitao i mogući kumulativni učinak ronjenja na ispitivane promjene. Tijek studije 1 prikazan je na slici (Slika 6).

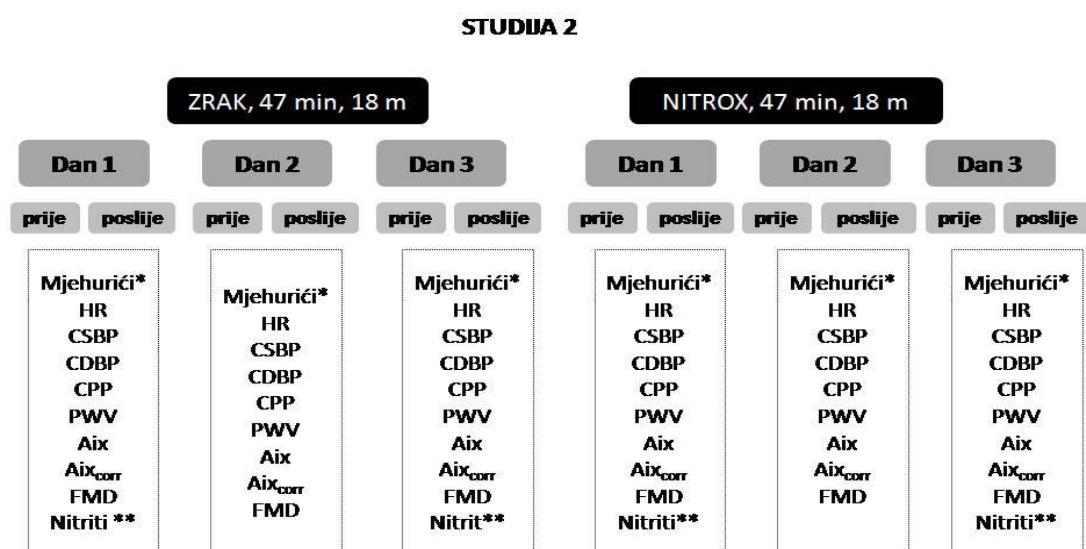


**Slika 6.** Shematski prikaz studije 1

\* stupanj stvaranja mjehurića mjeri se u više vremenskih točaka nakon zarona

U drugoj studiji je istražen utjecaj različitih plinskih smjesa na vaskularnu funkciju praćenjem stvaranja mjehurića uz mjerenje koncentracije nitrita u plazmi kao biokemijskog

pokazatelja endotelnih promjena, FMD-a kao funkcijskog pokazatelja endotelnih promjena i parametara elastičnosti krvnih žila prije i poslije zarona. Parametri elastičnosti krvnih žila i FMD su određivani svaki dan prije i poslije zarona. Stupanj stvaranja mjehurića određivao se svaki dan nakon zarona, a koncentracija nitrita u plazmi samo prvi i treći dan serije zarona. Serijom zarona ispitivao se mogući kumulativni učinak ronjenja s pojedinom plinskom smjesom na mjerene parametre. Tijek studije 2 je prikazan na slici (Slika 7). Usporedba promjene parametara uslijed ronjenja sa zrakom u odnosu na ronjenje s nitrox-om je u svrhu identifikacije čimbenika koji značajnije pridonosi vaskularnim promjenama (plinski mjehurići ili hiperoksija). Zrak s većim udjelom dušika je potencijalno značajniji izvor dušikovih plinskih mjehurića, a nitrox je s većim udjelom kisika potencijalno značajniji izvor oksidacijskog stresa.



**Slika 7.** Shematski prikaz studije 2

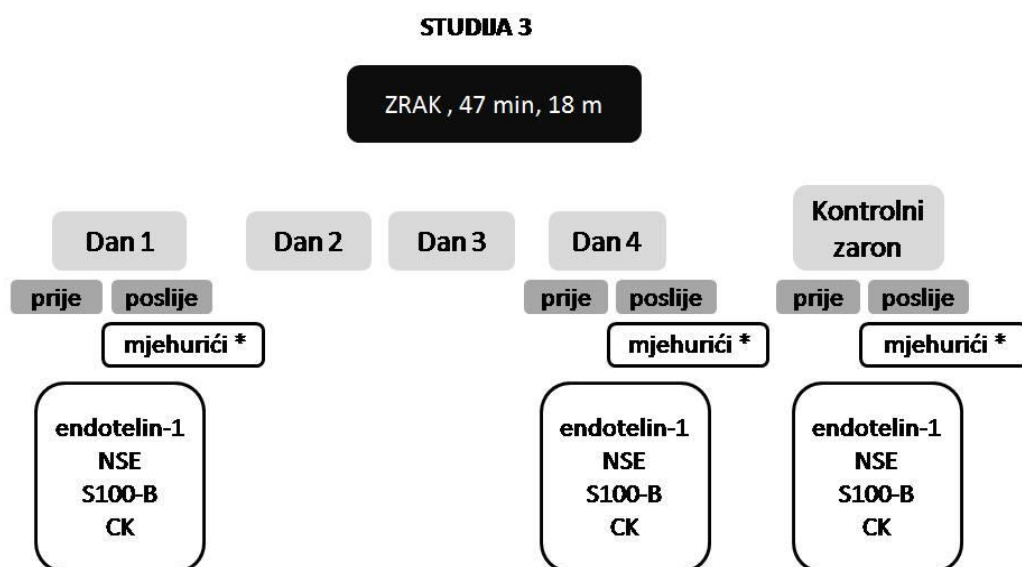
HR = srčana frekvencija; CSBP = centralni sistolički krvni tlak; CDBP = centralni dijastolički krvni tlak; CPP = centralni tlak pulsa; PWV = brzina pulsog vala; Aix = augmentacijski indeks; Aix<sub>corr</sub> = korigirani augmentacijski indeks; FMD = protokom posredovana dilatacija.

\* stupanj stvaranja mjehurića određuje se u dvije vremenske točka nakon zarona

\*\* koncentracija nitrita u plazmi određuje se prvi i treći dan

Trećom studijom je istraženo dovodi li arterijalizacija plinskih mjehurića do narušavanja integriteta središnjeg živčanog sustava, te ima li narušen integritet SŽS-a veze s endotelnom disfunkcijom. U tu svrhu praćeno je stvaranje plinskih mjehurića kao i njihova arterijalizacija u više vremenskih točaka te su mjereni S100-B i NSE kao pokazatelji oštećenja SŽS-a prije i poslije zarona. Endotelin-1 je mjeren i kao biljeg endotelne disfunkcije i kao pokazatelj moždanog oštećenja. CK je određivan u svrhu isključivanja mišićnog porijekla porasta S-100B u krvi. Svi parametri su određivani prvi i četvrti dan serije zarona u svrhu ispitivanja mogućeg kumulativnog učinka ronjenja.

Treća studija je uključivala i kontrolni zaron obavljen s vremenskim odmakom od eksperimentalnih zarona pod istim uvjetima izuzev dubine zarona. Naime kontrolni zaron je trebao isključiti stvaranje plinskih mjehurića pa je obavljen na dubini od 5 m. Time je ispitano dolazi li do identičnih promjena mjerenih humoralnih biljega i bez prisustva dušikovih plinskih mjehurića.



**Slika 8.** Shematski prikaz studije 3

\* stupanj stvaranja mjehurića određuje se u više vremenskih točaka poslije zarona

U opisanom istraživanju koje je obuhvatilo tri navedene studije ispitivane su promjene biokemijskih parametara uslijed ronjenja s komprimiranim plinskim smjesama. Kao moguća

posljedica biokemijskih promjena, ispitivane su funkcijske promjene samog endotela, te u širem smislu i krvnih žila. U tu svrhu su provedena mjerenja FMD-a (protokom posredovane dilatacije) i parametara elastičnosti krvnih žila koja su obavili stručni suradnici Zavoda za integrativnu fiziologiju Medicinskog fakulteta u Splitu. Isti su obavili ultrazvučna mjerenja za detekciju plinskih mjehurića i određivanje stupnja njihovog stvaranja, određivanih u sve tri studije istraživanja kao mogući uzrok biokemijskim promjenama. Prikazi rezultata nebiokemijskih testiranja obavljenih od strane stručnih suradnika Zavoda za integrativnu fiziologiju Medicinskog fakulteta u Splitu bit će korišteni kao nadopuna interpretaciji biokemijskih rezultata i označeni u poglavlju rezultata pod oznakom (§).

### **3.2. Studija 1**

#### **3.2.1. Ispitanici**

U studiju je uključeno 16 ronilaca s važećom dozvolom za ronjenje sa zrakom. Prosječna dob ronilaca bila je  $36,7 \pm 8,1$  godina, prosječna visina  $175,2 \pm 9,2$  cm i prosječna težina  $77,8 \pm 16,9$  kg. Svi ispitanici su bili nepušači. Ronioci su bili obavezni suzdržavati se od svih ronilačkih aktivnosti dva tjedna prije početka studije, a 24 sata prije zarona im je bila zabranjena jača fizička aktivnost. Na sam dan zarona nisu smjeli konzumirati kofein niti kalorične obroke.

#### **3.2.2. Protokol ronjenja**

Ronioci su obavili seriju od tri zarona tijekom tri uzastopna dana na dubinu od 18 m u trajanju od 47 minuta s izranjanjem od 2 minute koristeći mokra ronilačka odijela i Galileo ronilački kompjuter (Uwatec, Johnson Outdoors Inc., Racine, WI, USA). Temperatura mora je bila  $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$  na površini i  $16 \pm 1^{\circ}\text{C}$  na dnu. Tijekom zarona ronioci su vježbali intenzitetom od 30 % predviđene maksimalne srčane frekvencije za njihovu dob. Prije i poslije zarona su napravljena mjerenja i uzorkovanje krvi u odgovarajućem vremenu. Testiranja su rađena uvijek u isto doba dana kako bi se izbjegle dnevne varijacije mjerenih parametara.

#### **3.2.3. Određivanje plinskih mjehurića**

Petnaest minuta nakon svakog zarona, ronionci su postavljeni u ležeći lijevi bočni položaj kako bi se ultrazvučnom sondom (1,5 – 3,3 MHz; Vivid q ultrazvučni aparat visoke rezolucije; GE, Milwaukee, WI, USA), pozicioniranom prekardijalno, dobila jasna slika četiriju srčanih komora. Plinski mjehurići su se opažali kao odjeci visokog intenziteta u srčanim šupljinama u stanju mirovanja i nakon fleksije desne, pa lijeve noge kako bi se pokrenuli mjehurići iz venskog sustava. Procjena broja mjehurića je napravljena u 30., 60. i 90. minuti nakon zarona sporazumom opažanja dvaju iskusnih promatrača, s time da je za svaku procjenu snimljeno najmanje 10 srčanih ciklusa. Određivanje stupnja stvaranja mjehurića („bubble grade“) je izvedeno korištenjem modificirane Brubakk-ove skale: stupanj 0 – bez mjehurića, 1 – sporadični mjehurići, 2 – barem jedan mjehurić u 4 srčana ciklusa, 3 – barem jedan mjehurić po srčanom ciklusu, 4 – kontinuirano stvaranje mjehurića (4a – barem jedan mjehurić/cm<sup>2</sup> u svim okvirima, 4b – barem tri mjehurića/cm<sup>2</sup> u svim okvirima, 4c – gotovo potpuno zabijeljenje, ali se individualni mjehurići mogu razaznati), 5 – zabijeljenje („[65]“) u kojem se individualni mjehurići ne razaznaju [79, 80]. Ultrazvučna određivanja plinskih mjehurića su obavili stručni suradnici Zavoda za integrativnu fiziologiju Medicinskog fakulteta u Splitu. Rezultati ovih mjerenja bit će označeni oznakom §.

#### 3.2.4. Biokemijske analize u krvi

Venska krv je uzorkovana 45 minuta prije i 120 minuta poslije zarona, prvog i trećeg dana u seriji. Uzorci krvi su se uzimali u spremnike s Li-heparinom i s Na-citratom, nakon čega su uzorci u spremnicima s Li-heparinom centrifugirani 10 minuta na 1600 x g, a uzorci s Na-citratom 15 minuta na 2000 x g. Odvojena plazma se odmah pohranjivala zamrzavanjem na – 20 ° C do provođenja analiza.

Krvna plazma odvojena u hepariniziranim uzorcima krvi služila je za određivanje produkata lipidne peroksidacije metodom TBARS („Thio Barbituric Acid Reactive Substances“), antioksidansa metodom FRAP („Ferric Reducing Ability of Plasma“), te adenoza i hsCRP-a (visoko osjetljivi C reaktivni protein).

Krvna plazma odvojena iz uzoraka krvi u spremnicima s Na-citratom služila je za određivanje aktivnosti vWf-a i PAI-1-a.

#### TBARS

TBARS („Thio Barbituric Acid Reactive Substances“) metoda služi za mjerenje razine lipidne peroksidacije, te se zasniva na reakciji malondialdehida (MDA; jedan od krajnjih produkata lipidne peroksidacije) s tiobarbiturnom kiselinom (TBA). Apsorbancija TBA:MDA spoja je mjerena spektrofotometrom (Specord 200, Analytik Jena Inc, Jena, Germany) na 532 nm što predstavlja apsorpcijski maksimum spoja. Kako bi se korigirala pozadinska apsorbancija, mjerila se i apsorbancija na 572 nm, čija je vrijednost oduzimana od vrijednosti izmjerenih na 532 nm. Dobiveni rezultati su uspoređivani sa standardnom krivuljom dobivenom koristeći različite koncentracije MDA izražene kao  $\mu\text{mol/l}$  MDA [81].

#### FRAP

FRAP („Ferric Reducing Ability of Plasma“) metoda služi za određivanje plazmatskog antioksidacijskog kapaciteta, kojom se antioksidansi plazme spektrofotometrijski određuju kao reducensi  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$ . Redukcijom nastali  $\text{Fe}^{2+}$  se kelira s TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin) u kompleks koji apsorbira na 593 nm [82]. Apsorbancija na 593 nm izmjerene spektrofotometrom (Specord 200, Analytik Jena Inc., Jena, Germany) uspoređivane su sa standardnom krivuljom napravljenom mjerenjem različitih koncentracija Troloxa (u vodi topivi analog vitamina E, TE). Izmjereni rezultati su izraženi kao  $\text{mmol/l}$  ekvivalenata TE.

#### Adenozin

Adenozin u plazmi je određivan spektrofotometrijskom metodom koju su opisali Hans Möllering i Hans-Ulrich Bergmeyer. Mjeren je pad apsorbancije na 265 nm uslijed enzimske pretvorbe adenozina u inozin, koji ima maksimum apsorpcije na toj valnoj duljini, pod katalitičkim djelovanjem adenozin deaminaze. Izmjerene promjene apsorbancije uspoređivale su se s apsorbancijom standarda adenozina koncentracije slične očekivanim koncentracijama adenozina u plazmi. Korišteni spektrofotometar je DU800 (Beckman Coulter). Adenozin deaminaza tip X iz goveđe slezene u otopini glicerola (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) je korištena za pretvorbu adenozina u inozin, a adenozin (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) je korištena za pripremu standardne otopine.

#### Visoko osjetljivi CRP

Visoko osjetljivi (hsCRP) je određivan imunoturbidimetrijskom metodom korištenjem komercijalnog testa za visoko osjetljivi CRP na automatskom analizatoru Beckman Coulter AU 680 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

Von Willebrand faktor

Von Willebrand (VWf) je određivan komercijalnim testom BC vWf za određivanje ristocetinske aktivnosti vWf-a turbidimetrijskim principom na BCS automatskom koagulacijskom analizatoru (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg/Germany)

PAI-1

PAI-1 je određivana komercijalnim testom Berichrom PAI za određivanje aktivnosti PAI-1 u plazmi kromogenom metodom na BCS automatskom koagulacijskom analizatoru (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg/Germany).

### 3.2.5. Statistička analiza

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama. Normalnost distribucija je ispitivana za sve parametre Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Sve usporedbe mjerenih parametara prije i poslije zarona za pojedinačne zarone analizirane su studentovim parnim t-testom kao i usporedbe rezultata za pojedini parametar prije zarona prvog i trećeg dana u svrhu ispitivanja kumulativnog učinka serije od tri zarona. Stupnjevi stvaranja mjehurića su prikazani kao medijani (25-ti do 75-ti kvartilni rang) te su uspoređivani Friedmanovom analizom varijance. Korelacija promjene endotelnih parametara nakon zarona ( $\Delta = \text{prije} - \text{poslije}$ ) sa stupnjem stvaranja mjehurića je ispitivana Spearmanovim koeficijentom korelacije u slučaju statistički značajne promjene ispitivanih endotelnih parametara nakon zarona. Razina statističke značajnosti je  $p < 0,05$ . Analiza je izvršena koristeći program Statistica 7.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

## 3.3. Studija 2

### 3.3.1. Ispitanici

U studiju je uključeno 10 ronilaca s važećom dozvolom za ronjenje sa zrakom i tehničkim plinovima (zrak i nitrox). Ronioci su dobi od  $40,3 \pm 2,6$  godine, prosječne visine  $1,8 \pm 0,1$  metar i prosječne težine  $93,6 \pm 11,1$  kilogram. Svih deset ronilaca su nepušači. Ronioci su bili obavezni suzdržavati se od vježbanja i jače fizičke aktivnosti 24 sata prije zarona, prekinuti ronilačke aktivnosti najmanje dva tjedna prije studije, a na dan zarona nisu smjeli konzumirati kofein i hranu koja sadrži nitrate.

### 3.3.2. Protokol ronjenja

Ronioci su obavili dvije serije zarona. Svaka serija se sastojala od tri zarona tijekom tri uzastopna dana. Između serija je napravljena pauza u ronilačkim aktivnostima u trajanju od od petnaest dana. Jedna serija je uključivala zarone sa zrakom, a druga s nitrox-om 36 (36% kisika i 64% dušika). Svi zaroni su bili bez dekompresije na dubini od 18 m u trajanju od 47 minuta. Temperatura mora je bila  $20 \pm 3^\circ \text{C}$  na površini i  $16 \pm 1^\circ \text{C}$  na dnu. Ronioci su koristili mokra odijela i Galileo ronilački kompjuter (Uwatec, Johnson Outdoors Inc., Racine, WI, USA). Tijekom zarona ronioci su vježbali intenzitetom od 30 % predviđene maksimalne srčane frekvencije za njihovu dob. Prije i poslije zarona su napravljena mjerenja i uzorkovanje krvi u odgovarajućem vremenu. Testiranja su se obavljala uvijek u isto doba dana kako bi se izbjegle dnevne varijacije mjerenih parametara.

### 3.3.3. Određivanje plinskih mjehurića

Petnaest minuta nakon svakog zarona, ronioci su postavljeni u ležeći, lijevi bočni položaj, kako bi se postigla jasna slika svih srčanih komora korištenjem standardne ultrazvučne sonde (1,5 – 3,3 MHz) povezane s Vivid q ultrazvučnim aparatom (GE, Milwaukee, WI, USA). Plinski mjehurići su određivani u stanju mirovanja i nakon dva zakašljaja, u dvadesetoj i četrdesetoj minuti nakon izranjanja prema metodi koju su opisali Eftedal i Brubakk [79, 80] već opisanoj za prvu studiju. Ultrazvučna određivanja plinskih mjehurića su obavili stručni suradnici Zavoda za integrativnu fiziologiju Medicinskog fakulteta u Splitu. Rezultati ovih mjerenja bit će označeni oznakom §.

### 3.3.4. Određivanje brzine pulsog vala i augmentacijskog indeksa

Mjerenja za određivanje brzine karotidno-femoralnog pulsno vala i valne refleksije u svrhu određivanja augmentacijskog indeksa obavljena su SphygmoCor sistemom (Verzija 8.1; AtCor Medical Inc, Australija) na principu aplanacijske tonometrije prije i poslije svakog zarona netom nakon mjerenja FMD-a. Mjerenja su obavili stručni suradnici Zavoda za integrativnu fiziologiju Medicinskog fakulteta u Splitu. Rezultati ovih mjerenja bit će označeni oznakom §.

Brzina karotidno-femoralnog pulsno vala ( $PWV_{c-f}$ ) je određivana s istovremenim elektrokardiografskim (EKG) praćenjem u dva koraka. U prvom koraku je bilježen karotidni pulsni val, a u drugom femoralni. EKG-om se pratio prethodno definirani dio pulsno vala odnosno R vršak koji označava kraj diastole.  $PWV_{c-f}$  se izračunao iz udaljenosti koju je prošao pulsni val i vremena trajanja prolaska. Udaljenost se mjerila površinski između mjesta snimanja vala skalom kalibriranom u centimetrima.

Određivanje augmentacijskog indeksa zahtijeva analizu aortnog (centralnog) oblika vala koji se procjenjuje iz SphygmoCor-om zabilježenih radijalnih tlakova pri čemu se SphygmoCor kalibrira korištenjem dvaju tlakova izmjerenih ručno, živinim tlakomjerom. Augmentacijski indeks se računao prema formuli:  $Aix (\%) = [(P_2 - P_1)/PP] \times 100$ , gdje je  $P_1$  inicijalni sistolički tlak,  $P_2$  je tlak nastao refleksijom pulsno vala, a  $PP$  je tlak pulsa [58]. Računao se i  $Aix_{corr}$  koji predstavlja Aix korigiran za srčanu frekvenciju od 75 udaraca/min. Srednja vrijednost dvaju mjerenja koja zadovoljavaju programsku kontrolu kvalitete su uzimana za analizu rezultata  $PWV$  i Aix.

### 3.3.5. Određivanje protokom posredovane dilatacije

Mjerenje FMD-a je napravljeno neposredno prije i poslije zarona nakon prvog određivanja stupnja stvaranja mjehurića (20 minuta nakon izranjanja). Ispitanici su smješteni u mirnu prostoriju temperature 22° C gdje su se odmarali petnaestak minuta u ležećem položaju u kojem je obavljeno mjerenje. Za mjerenje je korištena linearna sonda frekvencije 5,7 – 13,3 MHz povezana s Vivid Q ultrazvukom. Promjer brahijalne arterije je određivan iz slike uzdužnog presjeka arterije s vidljivim sučeljem lumena i intime krvne žile na oba zida (anteriorni i posteriorni) analizom najmanje 10 srčanih ciklusa. Tijekom snimanja elektrokardiografski se pratio nastanak R vrška u svrhu identifikacije kraja diastole kako bi se promjer mjerio prema srčanom ciklusu. Nakon provedenog mjerenja bazalnog promjera, prekinuta je arterijska cirkulacija u trajanju od 5 min napuhivanjem manžete tlakomjera na 240 mmHg. Tako je nakon ispuhivanja manžete nastupila reaktivna hiperemija, izazvana

prolaznom ishemijom, odnosno stanje visokog protoka krvi. Stanje visokog protoka krvi povećava smično naprezanje koje uzrokuje vazodilataciju posredovanu dušikovim oksidom. Promjer dilatirane brahijalne arterije nakon ispuhivanja manžete je mjereno svakih 30 s tijekom 3 minute iz pohranjenih slika, koristeći za tu svrhu posebno razvijeni program [83]. FMD se izrazio kao postotak porasta promjera brahijalne arterije od stanja mirovanja do maksimalne dilatacije [56]. Mjerenja su obavili stručni suradnici Zavoda za integrativnu fiziologiju Medicinskog fakulteta u Splitu. Rezultati ovih mjerenja bit će označeni oznakom §.

### 3.3.6. Određivanje koncentracije nitrita u krvi

Venska krv je vađena u spremnik s Li-heparinom prije i poslije prvog i trećeg zarona u svakoj seriji zarona, te se odmah centrifugirala (10 min na 800 x g pri 4° C) kako bi se odvojila plazma koja je potom zamrznuta na -80° C do analize. Koncentracija nitrita se određivala u pohranjenim uzorcima plazme metodom plinske kromatografije – masene spektrometrije nakon prethodne obrade uzoraka plazme kojom se nitriti u plazmi prevode u pentaflorobenzil derivate. Derivatizacija se provodila u acetonu kojeg se dodaje u uzorke plazme nakon što im se prethodno dodao interni standard ( $^{15}\text{N}$ ) nitrit. Slijedila je inkubacija od 5 min na 50° C nakon dodatka 2,3,4,5,6-pentafluorobenzil bromida (PFB-Br). Aceton se evaporirao u struji dušika, a reakcijski produkti odnosno pentaflorobenzil derivati (PFB- $\text{NO}_2$  i PFB- $^{15}\text{NO}_2$ ) su se ekstrahirali u toluen. Toluenski uzorci su se pohranili dobro zatvoreni na sobnoj temperaturi do određivanja njihove koncentracije plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom [84].

### 3.3.7. Statistička analiza

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama. Normalnost distribucija je ispitivana za sve parametre Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Sve usporedbe mjerenih parametara prije i poslije zarona za pojedinačne zarone analizirane su studentovim parnim t-testom za zavisne uzorke kao i usporedbe promjena parametara nakon ronjenja sa zrakom i nitrox-om po danu. Friedman ANOVA analiza za ponovljena mjerenja je korištena za ispitivanje promjene mjerenih parametara u seriji zarona usporedbom izmjerenih vrijednosti prije zarona za parametre koji su se promijenili nakon zarona. Stupnjevi stvaranja mjehurića su prikazani kao medijani (25-ti do 75-ti kvartilni rang) te su uspoređivani u

dvadesetoj i četrdesetj minuti između zarona sa zrakom i zarona sa nitrox-om Wilcoxonovim testom. Razina značajnosti je  $p < 0,05$ . Analiza je izvršena koristeći softver Statistica 7.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA)

### 3.4. Studija 3

#### 3.4.1. Ispitanici

Studija je uključivala 16 zdravih ronilaca s važećom dozvolom za ronjenje s komprimiranim zrakom. Prosječna dob ronilaca je  $36,8 \pm 1,7$ , prosječna visina  $1,82 \pm 0,01$  m, prosječna težina  $89 \pm 2,5$  kg, a prosječni indeks tjelesne mase  $27,0 \pm 0,7$  kg/m<sup>2</sup>. Svi uključeni ispitanici su nepušači. Kao i u prethodnim studijama, ronioni su bili obavezni suzdržavati se od vježbanja i jače fizičke aktivnosti 24 sata prije zarona, te su morali prekinuti ronilačke aktivnosti u trajanju od najmanje dva tjedna prije studije, a na dan zarona nisu smjeli konzumirati kofein.

#### 3.4.2. Protokol ronjenja

Ronioni su obavili seriju od četiri eksperimentalna zarona tijekom četiri uzastopna dana koristeći mokra odijela, Galileo ronilački kompjuter i zrak za disanje. Dubina zarona je bila 18 m, a trajanje 47 minuta, dok je izranjanje trajalo dvije minute. Tijekom zarona, ronioni su umjereno vježbali intenzitetom od 30% maksimalne srčane frekvencije predviđene prema dobi. Temperatura mora je bila  $20 \pm 3^{\circ}$  C na površini i  $16 \pm 1^{\circ}$  C na dnu. Isti ronioni su obavili i kontrolni zaron tri mjeseca nakon eksperimentalnih zarona. Kontrolni zaroni su se odvijali pod istim uvjetima (trajanje, temperatura mora i intenzitet vježbanja) izuzev dubine koja je ovom prilikom bila 5 m i odabrana je s ciljem izostanka stvaranja plinskih mjehurića.

#### 3.4.3. Određivanje plinskih mjehurića

Isto kao i u prethodnim studijama ispitanici su unutar petnaest minuta nakon svakog zarona postavljeni u ležeći lijevi bočni položaj kako bi se ultrazvučnom sondom (1.5 – 3.3 MHz; Vivid q ultrazvučni uređaj) dobila jasna slika četiriju srčanih komora. Plinski mjehurići su se bilježili svakih 20 minuta tijekom dva sata nakon izranjanja kao što je opisano ranije za prvu studiju.

#### 3.4.4. Biokemijske analize u krvi

Biokemijska analiza izvedena je na uzorku plazme odvojene od uzorka krvi uzetog u spremnik s Li-heparinom 45 minuta prije zarona i 80 minuta nakon zarona, prvi i četvrti dan serije zarona na 18 m, te u istim vremenskim točkama prilikom kontrolnog zarona. Uzorci krvi su centrifugirani 10 minuta na 1600 x g i odmah pohranjeni zamrzavanjem na -20° C. U pohranjenim uzorcima naknadno su određivani endotelin – 1, S100-B , NSE i CK. Koncentracija endotelina - 1 u plazmi je određivana ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) imunokemijskom analizom koristeći komercijalno dostupan test „The Quntikine Human Endothelin – 1 ELISA immunoassay“ (R&D Systems Inc, Minneapolis, USA). Koncentracije S100-B i NSE u plazmi su se određivale “ECLIA” imunokemijskom metodom elektrokemiluminiscencije na automatskom analizatoru Cobas e 601 (Modular Analytics E170, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Aktivnost CK se određivala IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) preporučenom spektrofotometrijskom metodom na automatskom analizatoru Beckman Coulter AU 2700 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

#### 3.4.5. Statistička analiza

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama . Normalnost distribucija je potvrđena za sve parametre Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Sve usporedbe mjerenih parametara prije i poslije zarona za pojedinačne zarone analizirane su studentovim parnim t-testom za zavisne uzorke. Kumulativni učinak serije od četiri zarona je testiran za parametre kod kojih je utvrđena promjena nakon zarona i to usporedbom rezultata mjerenja prije zarona prvog i četvrtog dana parnim t-testom. Stupnjevi stvaranja mjehurića su prikazani kao medijani (25-ti do 75-ti kvartilni rang) te su uspoređivani Friedmanovom analizom varijance, dok je Wilcoxonovim testom ispitivana razlika u stupnju stvaranja mjehurića između prvog i četvrtog dana za svaku pojedinu vremensku točku mjerenja. Razina značajnosti je  $p < 0,05$ . Analiza je izvršena koristeći program Statistica 7.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Studija 1

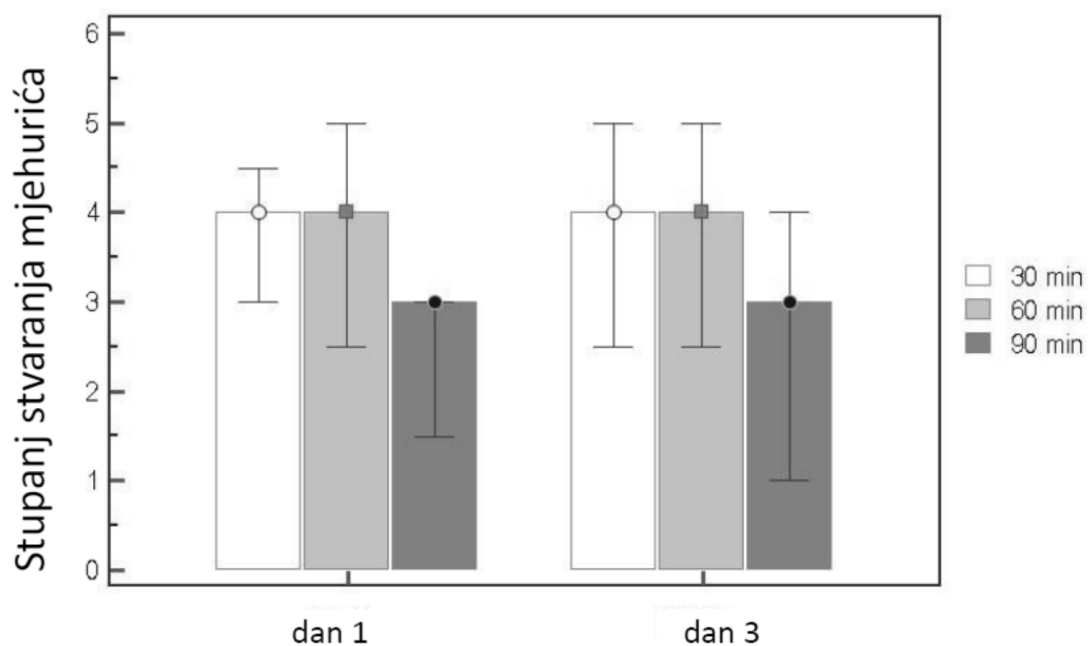
Studija 1 je ispitivala dolazi li do endotelnih promjena uslijed asimptomatskog ronjenja s komprimiranim zrakom mjerenjem biokemijskih pokazatelja, te nastaje li oksidacijski stres kao jedan od mogućih uzroka takvih promjena uz nastanak plinskih mjehurića prilikom dekompresije. U tu svrhu se se određivali plinski mjehurići, biokemijski pokazatelji oksidacijskog statusa odnosno TBARS i FRAP te biokemijski pokazatelji endotelne (dis)funkcije vWf, PAI-1, hsCRP i adenzin.

#### 4.1.1. Plinski mjehurići (Š)

Tijekom studije 1 svi ronionci su uspješno završili zadane zarone, te nitko nije prijavio simptome ili znakove dekompresijske bolesti. Testirani zaroni su rezultirali značajnom proizvodnjom plinskih mjehurića u venskoj cirkulaciji, te je njihov stupanj stvaranja u prvom i trećem danu studije prikazan na slici (Slika 9).

Stvaranje plinskih mjehurića nakon zarona u tridesetoj i šezdesetoj minuti je bilo izraženo s medijanom stupnjeva 4 (odgovara 4a stupnju prema Brubakk-ovoj skali), te se značajno razlikuje od stupnja stvaranja mjehurića u devedesetoj ( $p < 0,001$ ) kad je medijan stupnjeva 3 (odgovara 3 stupnju prema Brubakk-ovoj skali). Između prvog i trećeg dana nije bilo razlike u stupnju stvaranja mjehurića ni za jednu vremensku točku praćenja ( $p = 0,850$  za 30 min;  $p = 0,769$  za 60 min; i  $p = 0,569$  za 90 min).

Arterijalizacija je opažena kod dva ronionca u tridesetoj minuti, te kod jednog od njih i u šezdesetoj minuti. Kao što je i ranije opaženo [64], arterijalizacije su bile praćene visokim stupnjem stvaranja mjehurića (najmanje 4a). U devedesetoj minuti nije detektirana arterijalizacija plinskih mjehurića.



**Slika 9.** Prikaz stupnja stvaranja plinskih mjehurića nakon zarona (§). Prikazane vrijednosti su medijani (prazni kružić 30. min, sivi kvadratić 60. min, puni crni kružić 90. min), te 25-ti do 75-ti kvartilni rangovi stupnja stvaranja mjehurića u 30., 60. i 90. minuta nakon zarona u prvom i trećem danu; (4=4a, 5=4b, 6=4c).

#### 4.1.2. Biokemijske analize u krvi

##### Endotelni biljezi

Aktivnost PAI-1 u plazmi se značajno smanjila nakon svih zarona prvog i trećeg dana u seriji, dok praćenje aktivnosti vWf-a nije otkrilo značajnu promjenu nakon zarona ni prvog, niti trećeg dana (Tablica 1).

Usporedba aktivnosti PAI-1 mjerenih prije zarona prvog i trećeg dana nije pokazala statistički značajnu razliku ( $p=0,284$ ), što bi isključivalo kumulativan učinak ronjenja sa zrakom kroz tri dana na aktivnost PAI-1.

Ispitivanje korelacije promjene aktivnosti PAI-1 nakon zarona ( $\text{delta} = \text{prije} - \text{poslije}$ ) sa stupnjem stvaranja mjehurića u pojedinim vremenskim točkama praćenja otkrilo je značajnu pozitivnu korelaciju u tridesetoj i šezdesetoj minuti trećeg dana zarona. Spearmanov koeficijent korelacije i u tridesetoj i u šezdesetoj minuti trećeg dana je 0,639 ( $p = 0,0077$ ).

Korelacije nisu nađene u tridesetoj ( $p=0,620$ ), šezdesetoj ( $p=0,477$ ) i devedesetoj ( $p=0,459$ ) minuti prvog dana kao ni devedesetoj ( $p=0,134$ ) trećeg dana.

**Tablica 1.** Prikaz aktivnosti PAI-1 i vWf prije i poslije zarona prvog i trećeg dan

| <b>PAI-1 (U/ml)</b> | <b>Prije zarona</b> | <b>Poslije zarona</b> | <b>p</b> |
|---------------------|---------------------|-----------------------|----------|
| Dan 1               | 2,13±1,47           | 1,63±0,93             | 0,017*   |
| Dan 3               | 2,46±1,72           | 1,78±1,37             | 0,012*   |
| <b>VWf (1/1)</b>    | <b>Prije zarona</b> | <b>Poslije zarona</b> | <b>p</b> |
| Dan 1               | 1,06±0,35           | 1,02±0,36             | 0,123    |
| Dan 3               | 1,16±0,42           | 1,12±0,38             | 0,345    |

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija \* statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između rezultata izmjerenih prije i poslije zarona dobivena parnim t-testom

## Oksidacijski status

Oksidacijski status prije i poslije zarona prvog i trećeg dana je određen mjerenjem produkata lipidne peroksidacije metodom TBARS kao indikatora razine oksidacijskog stresa, te određivanjem plazmatskog antioksidacijskog kapaciteta metodom FRAP. Rezultati određivanja TBARS i FRAP prikazani su u tablici (Tablica 2).

Značajna promjena koncentracije TBARS prije i poslije zarona prvog ( $p=0,135$ ) i trećeg ( $p=0,258$ ) dana nije opažena, kao ni razlika u koncentracijama prije zarona prvog i trećeg dana ( $p=0,281$ ) sugerirajući da ronjenje nije dovelo do povišenja razine lipidne peroksidacije.

Plazmatski antioksidacijski kapacitet je blago, ali statistički značajno ( $p=0,0157$ ) porastao nakon prvog zarona, ali ne i nakon trećeg zarona. Usporedbom antioksidacijskog kapaciteta prije zarona prvog i trećeg dana također nije opažena razlika ( $p=0,311$ ) pa izostaje dokaz o kumulativnom učinku ronjenja sa zrakom na antioksidacijski status kroz tri dana ronjenja.

**Tablica 2.** Prikaz TBARS ( $\mu\text{mol MDA/l}$ ) i FRAP ( $\mu\text{mol TE/l}$ )

| <b>TBARS (<math>\mu\text{mol MDA/l}</math>)</b> | <b>Prije zarona</b> | <b>Poslije zarona</b> | <b>p</b> |
|-------------------------------------------------|---------------------|-----------------------|----------|
| Dan 1                                           | 0,29 $\pm$ 0,06     | 0,30 $\pm$ 0,06       | 0,135    |
| Dan 3                                           | 0,30 $\pm$ 0,05     | 0,32 $\pm$ 0,06       | 0,258    |

| <b>FRAP (mmol TE/l)</b> | <b>Prije zarona</b> | <b>Poslije zarona</b> | <b>p</b> |
|-------------------------|---------------------|-----------------------|----------|
| Dan 1                   | 0,49 $\pm$ 0,08     | 0,52 $\pm$ 0,08       | 0,016*   |
| Dan 3                   | 0,51 $\pm$ 0,09     | 0,52 $\pm$ 0,09       | 0,080    |

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija

\* statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između rezultata izmjerenih prije i poslije zarona dobivena parnim t-testom

### Visoko-osjetljivi C reaktivni protein (hsCRP)

Rezultati mjerenja hsCRP (Tablica 3) nisu otkrili promjenu koncentracije ovog biljega nakon zarona prvog dana ( $p=0,140$ ), kao ni trećeg dana ( $p=0,056$ );

### Adenozin

Koncentracije adenozina u plazmi prije i poslije zarona, unatoč višestrukim pokušajima, nisu izmjerene gore opisanom metodom zbog tehničkih poteškoća u mjerenju mikrolitarskih volumena uzorka u spektrofotometrijskim kivetama predviđenim za mjerenje u UV području spektra. Opisanom metodom nije bilo moguće izmjeriti adenozin u raspoloživom volumenu uzorka.

**Tablica 3.** Prikaz koncentracija hsCRP prije i poslije zarona prvog i trećeg dana.

| hsCRP (mg/l) | Prije zarona | Poslije zarona | p     |
|--------------|--------------|----------------|-------|
| Dan 1        | 1,20±1,19    | 1,17±1,15      | 0,140 |
| Dan 3        | 0,99±1,42    | 0,95±1,36      | 0,056 |

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardne devijacije.

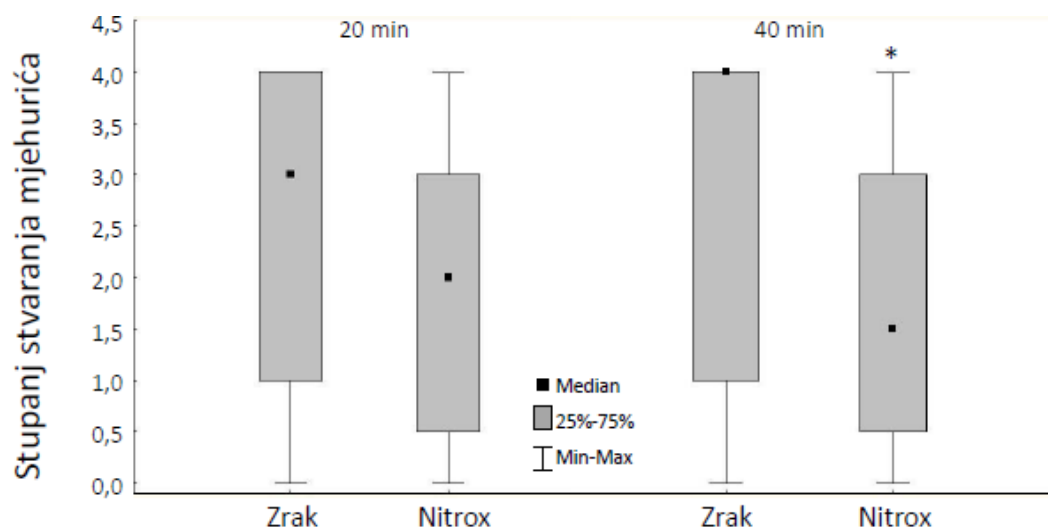
Rezultati izmjereni prije i poslije zarona uspoređeni su parnim t-testom

## 4.2. Studija 2

Studija 2 istraživala je učinak različitih plinskih smjesa za udisanje na funkciju krvnih žila ispitivanjem endotelne funkcije uključujući biokemijski i funkcijski pokazatelj, te određivanjem parametara elastičnosti krvnih žila. Mjerenja su obuhvatila određivanje stupnja stvaranja mjehurića, određivanje koncentracije nitrita u plazmi, određivanje protokom posredovane dilatacije (FMD), te parametara elastičnosti krvnih žila odnosno brzine pulsnog vala (PWV) i augmentacijskog indeksa (Aix). Određivanje plinskih mjehurića, mjerenja FMD-a i parametara elastičnosti krvnih žila obavljena su od strane stručnih suradnika Zavoda za integrativnu fiziologiju Medicinskog fakulteta u Splitu.

### 4.2.1. Plinski mjehurići (S)

Tijekom studije 2 svi ronionici su uspješno završili zadane zarone, te nitko nije prijavio simptome ili znakove dekompresijske bolesti. Testirani zaroni su rezultirali značajnom proizvodnjom plinskih mjehurića u venskoj cirkulaciji (Slika 10). Značajno veća prisutnost plinskih mjehurića se pokazala nakon svih zarona sa zrakom u odnosu na zarone s nitrox-om u četrdesetoj minuti ( $p=0,022$ ) dok dvadeseta minuta nije otkrila razliku ( $p=0,130$ ). Arterijalizacije su zabilježene kod sedam ronilaca nakon ronjenja sa zrakom, te kod dvoje nakon ronjenja s nitrox-om.



**Slika 10.** Stupanj stvaranja venskih plinskih mjehurića nakon ronjenja sa zrakom i nitrox-om u 20. i 40. minuti (§). Prikazani su medijani, te 25-ti do 75-ti kvartilni rangovi (sivi pravokutnici) stupnjeva stvaranja venskih plinskih mjehurića nakon zarona;

\* statistički značajna razlika ( $p = 0.022$ ) između stupnja stvaranja mjehurića nakon zarona sa zrakom vs. nitrox-om u četrdesetoj minuti

#### 4.2.2. Brzina arterijskog pulsog vala i augmentacijski indeks (§)

Indikatori arterijske krutosti i refleksije pulsog vala su se značajno promijenili nakon svakog zarona (Tablica 4 i 5). Brzina karotidno-femoralnog pulsog vala je porasla nakon svih zarona sa zrakom i s nitrox-om upućujući na povećanje arterijske krutosti. Porast  $PWV_{c-f}$ -a s nitrox-om u trećem danu nije dosegao statističku značajnost. Usporedba veličine porasta ( $\Delta = \text{prije} - \text{poslije}$ )  $PWV_{c-f}$ -a nakon zarona nije otkrila značajnu razliku između zarona sa zrakom i zarona s nitrox-om. Veličina porasta  $PWV_{c-f}$ -a se nije razlikovala prvi dan ( $p=0,053$ ), drugi dan ( $p=0,961$ ) niti treći dan ( $p=0,213$ ) između zarona sa zrakom i zarona s nitrox-om. Međutim, augmentacijski indeks se smanjio nakon svakog zarona bez obzira na korištenu plinski smjesu indicirajući slabiju valnu refleksiju.

Analiza rezultata mjerenja  $PWV_{c-f}$ -a prije zarona u svrhu ispitivanja kumulativnog učinka ronjenja nije otkrila promjenu  $PWV_{c-f}$ -a u seriji zarona sa zrakom ( $p=0,286$ ) kao ni s nitrox-om ( $p=0,538$ ). Ispitivanje eventualnog kumulativnog učinka u seriji zarona nije otkrilo značajnu razliku ni za  $Aix$  u seriji zarona sa zrakom ( $p=0,175$ ) kao ni s nitrox-om ( $p=0,818$ ), te ni za  $Aix_{corr}$  za zrak ( $p=0,398$ ) kao ni za  $Aix_{corr}$  za nitrox ( $p=0,502$ ).

Statistički značajna promjena srčane frekvencije, sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka kao i tlaka pulsa nije opažena osim treći dan zarona sa zrakom kada se pokazao pad sistoličkog tlaka, te je uočljiva blaga tendencija pada dijastoličkog krvnog tlaka nakon svih zarona.

**Tablica 4.** Parametri elastičnosti krvnih žila, srčana frekvencija i krvni tlak za zarone sa zrakom (§)

|                         |       | Zrak         |                |        |
|-------------------------|-------|--------------|----------------|--------|
|                         |       | Prije zarona | Poslije zarona | p      |
| HR (otkucaji u minuti)  | Dan 1 | 59,8 ± 7,7   | 61,0 ± 11,7    | 0,700  |
|                         | Dan 2 | 59,3 ± 9,3   | 58,9 ± 7,2     | 0,400  |
|                         | Dan 3 | 58,9 ± 7,2   | 61,2 ± 7,45    | 0,126  |
| CSBP (mmHg)             | Dan 1 | 104,7 ± 7,1  | 102,2 ± 7,8    | 0,241  |
|                         | Dan 2 | 103,5 ± 5,1  | 104,1 ± 10,3   | 0,762  |
|                         | Dan 3 | 103,5 ± 7,2  | 98,9 ± 6,6     | 0,016* |
| CDBP (mmHg)             | Dan 1 | 77,5 ± 7,3   | 76,5 ± 7,5     | 0,641  |
|                         | Dan 2 | 77,2 ± 5,7   | 77,4 ± 8,9     | 0,925  |
|                         | Dan 3 | 76,9 ± 9,2   | 73,9 ± 8,5     | 0,070  |
| CPP (mmHg)              | Dan 1 | 27,2 ± 3,9   | 25,7 ± 4,7     | 0,048  |
|                         | Dan 2 | 26,3 ± 2,1   | 26,8 ± 5,0     | 0,664  |
|                         | Dan 3 | 26,6 ± 5,6   | 25,0 ± 4,6     | 0,299  |
| Aix (%)                 | Dan 1 | 4,3 ± 7,6    | -2,6 ± 11,7    | 0,006* |
|                         | Dan 2 | 5,8 ± 7,5    | 0,6 ± 9,5      | 0,004* |
|                         | Dan 3 | 7,7 ± 8,3    | 1,5 ± 8,4      | 0,005* |
| Aix <sub>corr</sub> (%) | Dan 1 | -1,9 ± 5,5   | -9,3 ± 8,7     | 0,002* |
|                         | Dan 2 | -2,4 ± 5,7   | -6,1 ± 8,1     | 0,010* |
|                         | Dan 3 | -0,1 ± 6,8   | -5,1 ± 7,1     | 0,006* |
| PWVc-f (m/s)            | Dan 1 | 6,7 ± 0,6    | 7,0 ± 0,7      | 0,040* |
|                         | Dan 2 | 6,4 ± 0,8    | 6,9 ± 0,8      | 0,002* |
|                         | Dan 3 | 6,2 ± 0,9    | 6,7 ± 0,7      | 0,005* |

srčana frekvencija („heart rate“, HR), centralni sistolički krvni tlak („central systolic blood pressure“, CSBP), centralni dijastolički krvni tlak („central diastolic blood pressure“, CDBP), centralni tlak pulsa („central pulse pressure“, CPP), augmentacijski index (Aix), augmentacijski index korigiran za HR (Aix<sub>corr</sub>), brzinu karotidno-femoralnog pulsnog vala („carotid-to-femoral pulse wave velocity“, PWVc-f).

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardne devijacije rezultata mjerenja (§)

\*p<0,05 prije vs. poslije zarona dobivena parnim t-testom

**Tablica 5.** Parametri elastičnosti krvnih žila, srčana frekvencija i krvni tlak za zarone sa nitrox-om (§)

|                              |       | Nitrox       |                |         |
|------------------------------|-------|--------------|----------------|---------|
|                              |       | Prije zarona | Poslije zarona | p       |
| HR<br>(otkucaji u<br>minuti) | Dan 1 | 58,6 ± 8,1   | 58,4 ± 10,0    | 0,944   |
|                              | Dan 2 | 60,7 ± 8,4   | 57,8 ± 6,3     | 0,093   |
|                              | Dan 3 | 59,1 ± 6,0   | 60,5 ± 9,8     | 0,451   |
| CSBP<br>(mmHg)               | Dan 1 | 103,9 ± 5,9  | 102,2 ± 6,1    | 0,528   |
|                              | Dan 2 | 104,3 ± 2,1  | 101,9 ± 5,4    | 0,252   |
|                              | Dan 3 | 106,1 ± 5,5  | 94,2 ± 16,7    | 0,082   |
| CDBP<br>(mmHg)               | Dan 1 | 77,6 ± 7,6   | 75,6 ± 7,6     | 0,340   |
|                              | Dan 2 | 79,1 ± 6,6   | 74,8 ± 7,9     | 0,055   |
|                              | Dan 3 | 78,4 ± 7,2   | 75,2 ± 7,2     | 0,161   |
| CPP<br>(mmHg)                | Dan 1 | 26,4 ± 4,7   | 26,6 ± 5,0     | 0,928   |
|                              | Dan 2 | 25,2 ± 5,5   | 27,1 ± 4,1     | 0,200   |
|                              | Dan 3 | 27,8 ± 5,0   | 19,0 ± 14,7    | 0,227   |
| Aix (%)                      | Dan 1 | 9,1 ± 5,0    | 0,6 ± 8,7      | 0,006*  |
|                              | Dan 2 | 8,8 ± 6,1    | 2,2 ± 7,6      | 0,001*  |
|                              | Dan 3 | 10,6 ± 4,8   | 1,0 ± 7,3      | 0,001*  |
| Aix <sub>corr</sub> (%)      | Dan 1 | 1,1 ± 3,6    | -6,8 ± 5,5     | 0,015*  |
|                              | Dan 2 | 2,0 ± 4,7    | -6,2 ± 5,8     | <0,001* |
|                              | Dan 3 | 3,2 ± 3,9    | -6,0 ± 4,9     | 0,001*  |
| PWVc-f<br>(m/s)              | Dan 1 | 6,3 ± 0,6    | 7,0 ± 0,4      | 0,005*  |
|                              | Dan 2 | 6,6 ± 0,4    | 7,1 ± 0,7      | 0,007*  |
|                              | Dan 3 | 6,5 ± 0,7    | 6,7 ± 0,6      | 0,189   |

srčana frekvencija („heart rate“, HR), centralni sistolički krvni tlak („central systolic blood pressure“, CSBP), centralni dijastolički krvni tlak („central diastolic blood pressure“, CDBP), centralni tlak pulsa („central pulse pressure“, CPP), augmentacijski index (Aix), augmentacijski index korigiran na normalnu srčanu frekvenciju (Aix<sub>corr</sub>), brzinu karotidno-femoralnog pulsog vala („carotid-to-femoral pulse wave velocity“, PWVc-f).

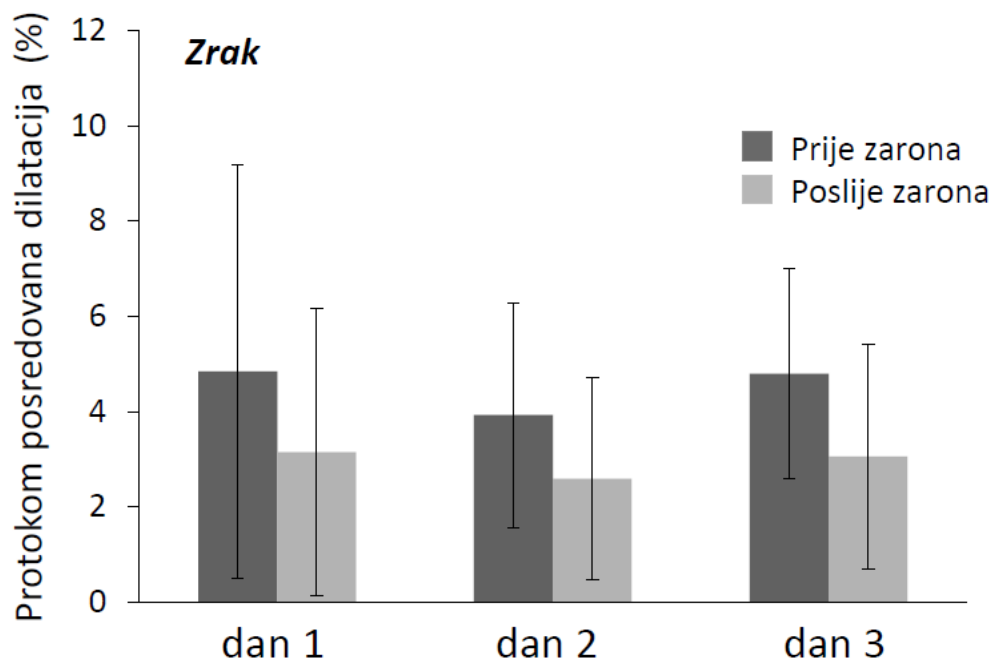
Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardne devijacije rezultata mjerenja (§)

\*p<0,05 prije vs. poslije zarona dobivena parnim t-testom

#### 4.2.3. Protokom posredovana dilatacija (§)

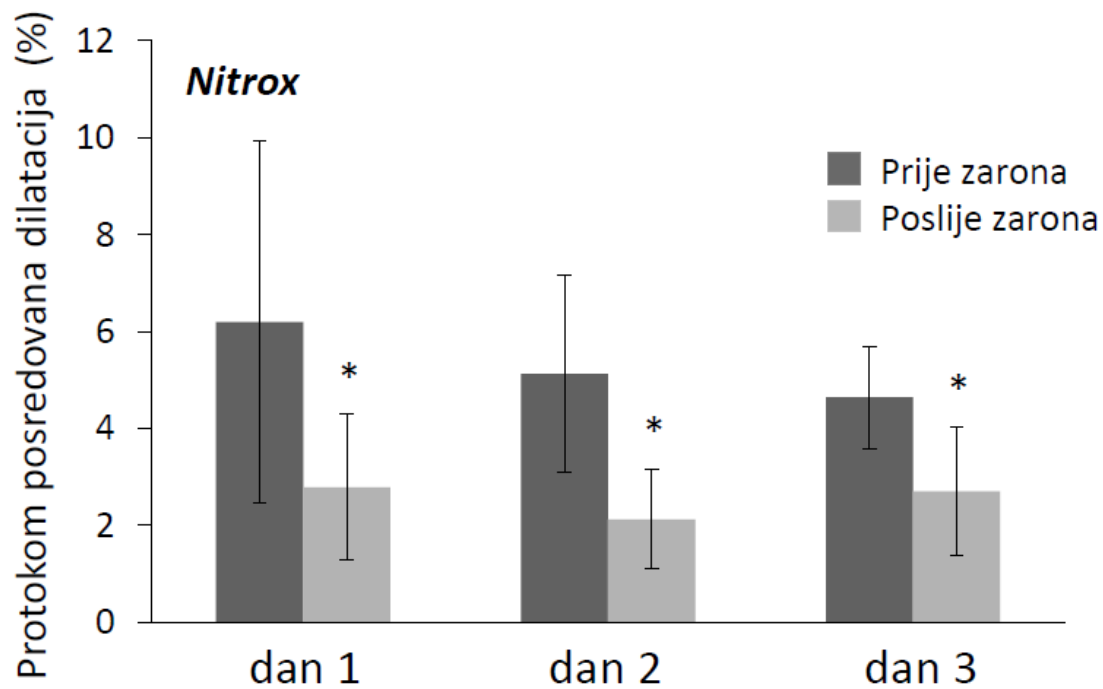
Rezultati mjerenja protokom posredovane dilatacije (FMD) su prikazani na slikama (Slika 11 i 12). Iako postoji trend pada FMD vrijednosti nakon ronjenja sa zrakom, više izražen i statistički značajan pad je nađen samo nakon ronjenja s nitrox-om.

Ispitivanje promjene FMD-a prije zarona u seriji zarona nije otkrilo razliku kod ronjenja sa zrakom ( $p=0,637$ ) kao niti u seriji zarona s nitrox-om ( $p=0,884$ ), pa dokazi o kumulativnom učinku serije od tri zarona u tri dana na FMD izostaju za obje plinske smjese.



**Slika 11.** Protokom posredovana dilatacija („flow mediated dilation“, FMD). Prikazane su srednje vrijednosti FMD  $\pm$  standardne devijacije prije i poslije zarona sa zrakom za svaki dan (dan 1, dan 2 i dan 3). (§)

Statistički značajne razlike prije vs. poslije zarona, testirane parnim t-testom, nema: dan 1 ( $p=0,057$ ), dan 2 ( $p=0,315$ ), dan 3 ( $p=0,201$ ).



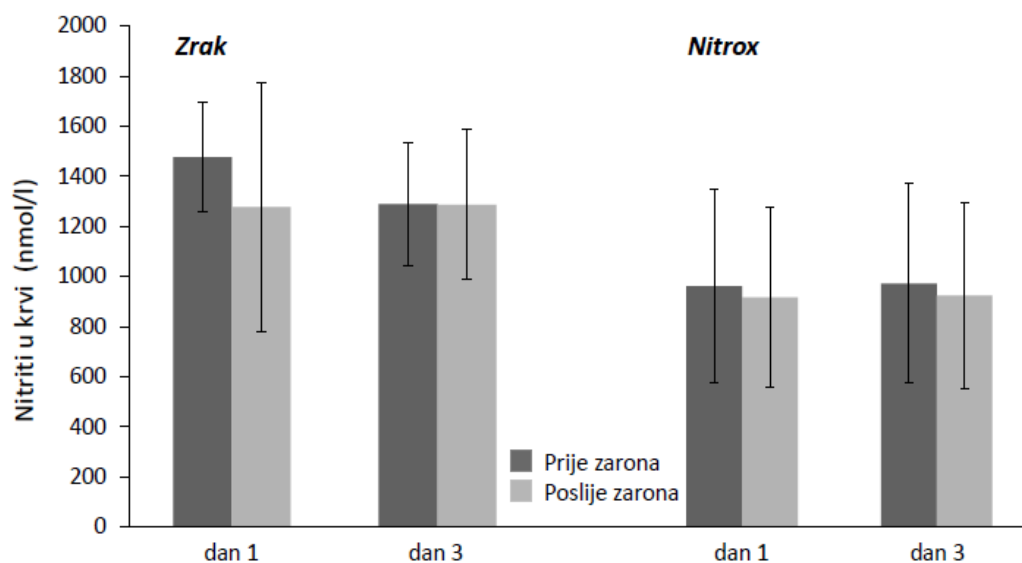
**Slika 12.** Protokom posredovana dilatacija („flow mediated dilation“, FMD). Prikazane su srednje vrijednosti FMD  $\pm$  standardne devijacije prije i poslije zarona s nitrox-om za svaki dan (dan 1, dan 2 i dan 3) (§)

\* statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) prije zarona vs. poslije zarona s nitrox-om dobivena parnim t-testom: dan 1 ( $p = 0,032$ ), dan 2 ( $p < 0,001$ ) i dan 3 ( $p = 0,009$ ).

#### 4.2.4. Nitriti u krvi

Koncentracije nitrita u plazmi prije i poslije zarona u prvom i trećem danu ronjenja sa zrakom i nitrox-om prikazane su na slici (Slika 13).

Statistički značajna razlika u koncentraciji nitrita u krvi prije i poslije zarona prvog i trećeg dana nije nađena u slučaju ronjenja sa zrakom prvi dan ( $p=0,191$ ), ni treći dan ( $p=0,958$ ) kao niti s nitrox-om prvi dan ( $p=0,184$ ) ni treći dan ( $p=0,155$ ).



**Slika 13.** Koncentracija nitrita u krvi prije i poslije zarona mjerena prvog i trećeg dana u seriji zarona sa zrakom i nitrox-om. Prikazane se srednje vrijednosti  $\pm$  standardne devijacije izmjerenih koncentracija nitrita.

Statistički značajne razlike prije vs. poslije zarona testirane parnim t-testom nema.

### 4.3. Studija 3

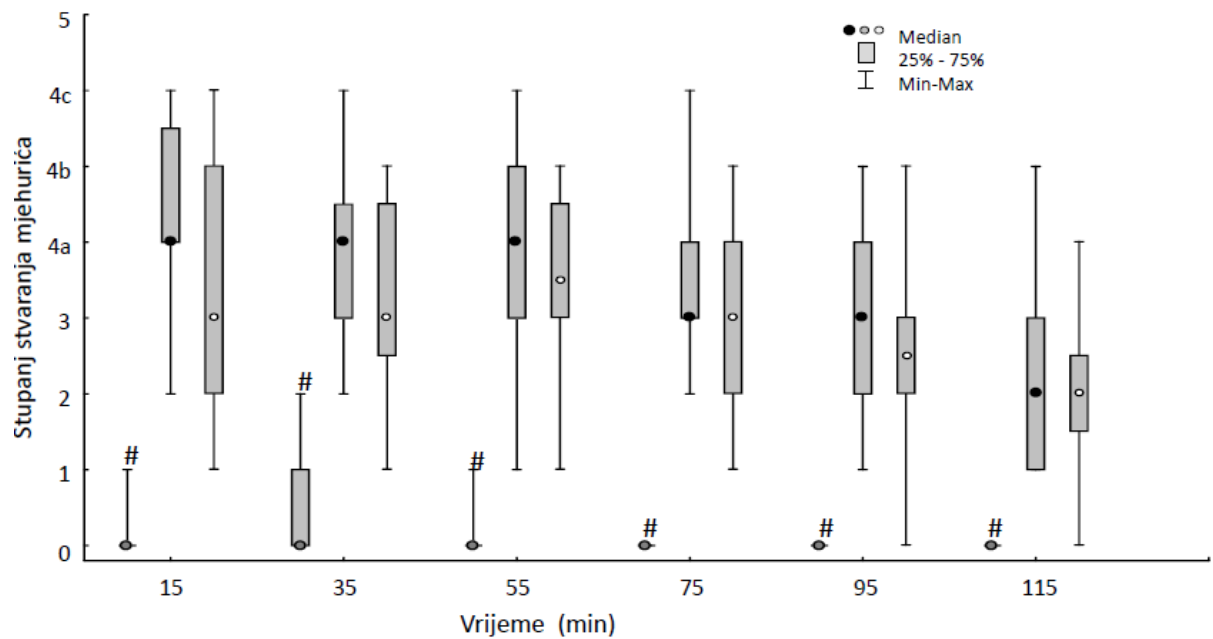
Studija 3 ispitivala je dovodi li arterijalizacija plinskih mjehurića uslijed asimptomatskog ronjenja s komprimiranim zrakom do porasta koncentracije humoralnih biljega koji ukazuju na endotelnu promjenu i oštećenje SŽS-a. Mjerenja su obuhvatila određivanje plinskih mjehurića, te određivanje koncentracije endotelina-1, S100-B, NSE i CK.

Određivanje plinskih mjehurića obavljeno je od strane stručnih suradnika Zavoda za integrativnu fiziologiju Medicinskog fakulteta u Splitu.

#### 4.3.1. Plinski mjehurići (§)

Stupnjevi stvaranja plinskih mjehurića u svim vremenskim točkama praćenja nakon kontrolnog zarona na 5 m, te nakon prvog i četvrtog zarona na 18 m dubine su prikazani na slici (Slika14). Stvaranje plinskih mjehurića se razlikuje u različitim vremenskim točkama praćenja ( $p < 0.001$ ). Nakon zarona prvi dan značajnije je stvaranje plinskih mjehurića u prve tri točke mjerenja (petnaesta, četrdesetpeti i šezdeseta minuta) kad je medijan 4 (odgovara stupnju 4a na Brubakk-ovoj skali) u odnosu na sedamdesetpeti i devedesetu minutu koje su popraćene medijanom 3 (odgovara stupnju 3 na Brubakk-ovoj skali) te stodvadesetu minutu koja se razlikuje od svih ostalih točaka nižim stupnjem stvaranja mjehurića (medijan 2). Slično opažanje otkriva i praćenje stupnja stvaranja mjehurića četvrti dan u kojem su petnaesta, četrdesetpeti, šezdeseta i sedamdesetpeti minuta popraćene medijanom 3, a devedeseta i stodvadeseta medijanom 2 (odgovara stupnju 2 na Brubakk-ovoj skali). Prema tome značajnije stvaranje mjehurića se događa ranije i s vremenom opada. Kontrolni zaron nije rezultirao značajnim stvaranjem mjehurića.

Arterijalizacija plinskih mjehurića se javila kod šest ronilaca nakon zarona prvog dana, te kod četvero ronilaca nakon zarona četvrtog dana. Troje ronilaca s arterijalizacijom plinskih mjehurića nakon zarona prvog dana, imalo je arterijalizaciju i nakon zarona četvrtog dana. Svi slučajevi arterijalizacije su bili praćeni visokim stupnjem stvaranja plinskih mjehurića (stupanj 4b i više) u desnoj klijetki, što je i očekivano s obzirom na dosadašnja opažanja [64].



**Slika 14.** Prikaz stupnjeva stvaranja mjehurića u različitim vremenskim točkama nakon kontrolnog zarona (sivi kružići), nakon zarona prvog (crni kružići) i nakon zarona četvrtog dana (prazni kružići). Prikazani su medijani, te 25–ti do 75-ti kvartilni rangovi. (§) # statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) za kontrolni vs. zaron prvog i zaron četvrtog dana dobivena Friedmanovom analizom varijance.

#### 4.3.2 Humoralni biljezi

Serumske koncentracije endotelina-1, NSE, S100-B i aktivnosti kreatin-kinaze (CK) prikazane su u tablici (Tablica 6). Serumske koncentracije endotelina-1 i NSE se nisu značajnije promijenile nakon zarona stoga nisu mjerene u kontrolnom zaronu. Serumska koncentracija S100-B je značajno porasla nakon svih zarona uključujući i kontrolni što je prikazano na slici (Slika15). Međutim koncentracija S100-B nije dostigla patološku vrijednost od  $0.17 \mu\text{g/l}$  za moždano oštećenje [85]. Također nije nađena značajna razlika u veličini promjene koncentracije (delta = prije - poslije) S100-B ni prvi ( $p=0.865$ ) ni četvrti dan ( $p=0.628$ ) između ronilaca s arterijalizacijom i onih bez arterijalizacije.

Aktivnosti CK nakon svih zarona, uključujući i kontrolni su značajno porasle.

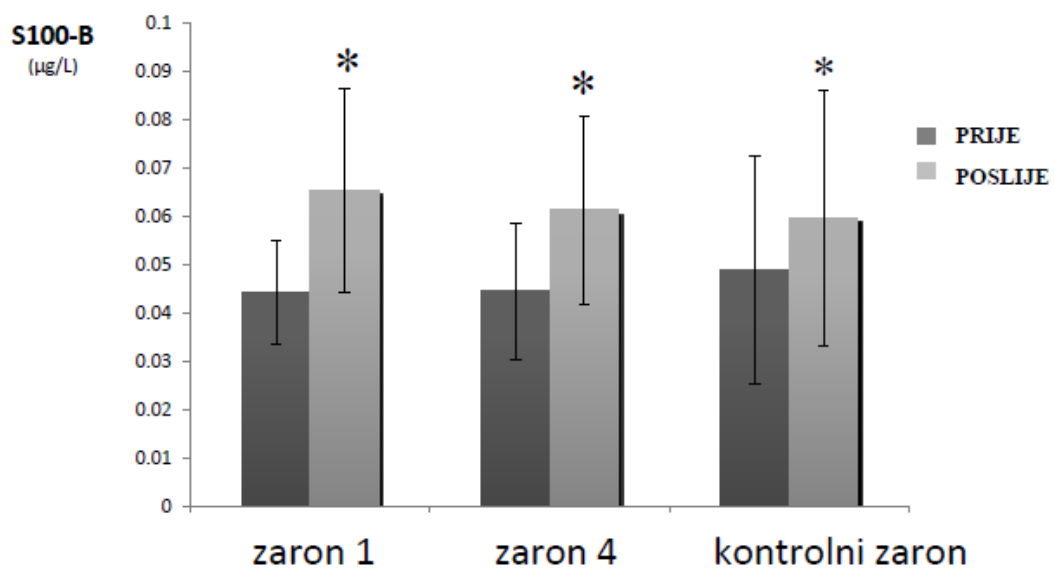
Ispitivanje kumulativnog učinka serije od četiri zarona na promjenu koncentracije S100-B i aktivnosti CK nije pružilo dokaze o postojanju takvog učinka. Koncentracija S100-B prije zarona prvi i četvrti dan se nisu razlikovale ( $p=0,333$ ) kao ni aktivnosti CK prvi i četvrti dan prije zarona ( $p=0,461$ ).

**Tablica 6.** Serumske koncentracije endotelina-1, NSE, S100-B i aktivnosti CK prije i poslije zarona.

| <b>Endothelin-1 (ng/l)</b> | <b>Prije zarona</b> | <b>Poslije zarona</b> | <b>p</b> |
|----------------------------|---------------------|-----------------------|----------|
| Dan 1                      | 3,31 ± 1,53         | 2,83 ± 1,71           | 0,370    |
| Dan 4                      | 3,31 ± 1,72         | 3,31 ± 1,30           | 0,996    |
| <b>NSE (µg/l)</b>          | <b>Prije zarona</b> | <b>Poslije zarona</b> | <b>p</b> |
| Dan 1                      | 9,96 ± 0,90         | 10,20 ± 1,28          | 0,465    |
| Dan 4                      | 10,50 ± 1,11        | 10,83 ± 1,46          | 0,211    |
| <b>S-100B (µg/l)</b>       | <b>Prije zarona</b> | <b>Poslije zarona</b> | <b>p</b> |
| Dan 1                      | 0,044 ± 0,01        | 0,066 ± 0,02          | <0,001*  |
| Dan 4                      | 0,045 ± 0,01        | 0,061 ± 0,02          | <0,001*  |
| Kontrolni zaron            | 0,049 ± 0,02        | 0,060 ± 0,02          | 0,002*   |
| <b>CK (U/l)</b>            | <b>Prije zarona</b> | <b>Poslije zarona</b> | <b>p</b> |
| Dan 1                      | 129,9 ± 74,2        | 152,6 ± 81,2          | <0,001*  |
| Dan 4                      | 135,9 ± 113,2       | 149 ± 101,0           | 0,034*   |
| Kontrolni zaron            | 131,7 ± 59,0        | 173,9 ± 110,3         | 0,044*   |

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija

\*statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) prije vs. poslije zarona dobivena parnim t-testom



**Slika 15.** Koncentracije S100-B prije i poslije prvog, četvrtog i kontrolnog zarona. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  standardne devijacije

\* statistički značajna razlika ( $P < 0,05$ ) prije vs. poslije zarona dobivena parnim t-testom.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Učinak ronjenja s komprimiranim zrakom na biljege endotelnog oštećenja i oksidacijskog stresa

Ispitivanjem učinka ronjenja s komprimiranim zrakom na endotelne biljege nije otkrivena promjena aktivnosti vWf-a kao ni promjena koncentracije hsCRP-a u krvi nakon ronjenja. Plazmatska aktivnost PAI-1 je smanjena nakon ronjenja prvog i trećeg dana, te je nađeno značajno stvaranje plinskih mjehurića unutar prvog sata nakon izranjanja (medijan 4 odgovora stupnju 4a). Mjerenjem TBARS kao pokazatelja oksidacijskog stresa prije i poslije ronjenja s komprimiranim zrakom nije opažena promjena, dok je antioksidacijski kapacitet praćen kao FRAP blago porastao nakon zarona prvi dan.

Iako rezultati brojnih studija upućuju da ronjenje s komprimiranim zrakom potiče endotelnu aktivaciju [18-20], rezultati studije 1 ne pokazuju značajan utjecaj ronjenja na promjene aktivnost vWf-a. Vwf u cirkulaciju dopijeva reguliranom sekrecijom iz endotelnih stanica i u manjoj mjeri trombocita uslijed vaskularne ozljede. Također, pojačano otpuštanje vWf-a iz endotelnih stanica je očekivano kada su one aktivirane ili oštećene [86]. Na otpuštanje vWf-a u cirkulaciju moguće djeluje i superoksidni anion potičući otpuštanje, te NO inhibirajući otpuštanje [41]. Prema tome izostanak porasta aktivnosti vWf-a može značiti izostanak oksidacijskog stresa i stoga primjerenu raspoloživost NO, te izostanak endotelne aktivacije i posljedične disfunkcije.

Točan uzrok do sada opaženih endotelnih promjena uslijed ronjenja s komprimiranim zrakom nije potpuno poznat, iako se nastanak endotelne disfunkcije već dugo povezuje s plinskim mjehurićima i hiperoksijom tijekom ronjenja. Studija koja je uspoređivala protokol ronjenja sa zrakom na 30 m, simuliranog ronjenja s hiperbaričnim kisikom i samom imerzijom pri atmosferskom tlaku, također nije otkrila promjenu u razini vWf-a u krvi ni s jednim protokolom, kao ni razliku u oksidacijskom stresu sugerirajući da učinak dekompresije na mikrovaskularni endotel može biti modificiran na primjer ronilačkom aklimatizacijom i/ili nižim stupanjem stvaranja mjehurića [87]. Aklimatizacija znači adaptivni odgovor na ponovljeno izlaganje ronjenju koje se očituje smanjenjem dekompresijskog stresa pri čemu pozitivna aklimatizacija znači smanjenje broja cirkulirajućih plinskih mjehurića [88]. Usporedbom stupnjeva stvaranja mjehurića prvi i treći dan nije opaženo smanjenje razine plinskih mjehurića izuzev u 90. min u odnosu na 30. i 60. min istog dana što bi isključivalo

aklimatizaciju kroz tri dana ponovljenih zarona. Poznato je da cirkulirajući mjehurići između ostalog mogu aktivirati koagulacijsku i fibrinolitičku kaskadu te agregaciju trombocita uslijed hiperbaričnog izlaganja [23, 89]. Međutim, nepromijenjena aktivnost vWf-a nakon ronjenja u ovoj studiji ne podupire mogućnost aktivacije trombocita, ali snižena aktivnost PAI-1 nakon ronjenja sugerira uključenost koagulacijsko-fibrinolitičkog sustava. PAI-1 kao prokoagulantna molekula čija aktivnost raste uslijed endotelne aktivacije [12], praćen je kao jedan od pokazatelja takve promjene. Međutim u ovoj studiji je izmjeren pad plazmatske aktivnosti PAI-1 što upućuje na aktivaciju fibrinolitičkog sustava kakva je već opažena tijekom i nakon izlaganja hiperbaričnim uvjetima [90] kao i kod ronilaca nakon hiperbaričnog izlaganja i dekompresije, čak i u odsustvu plinske embolije [91]. Opažena je i značajna pozitivna korelacija pada aktivnosti PAI-1 nakon zarona sa stupnjem stvaranja mjehurića u tridesetoj i šezdesetoj minuti trećeg dana što bi dovelo u vezu fibrinolitičku aktivnost s količinom prisutne plinske embolije čemu u prilog ide i izostanak korelacije u devedesetoj minuti u kojoj se očitovalo smanjenje stvaranja plinskih mjehurića u odnosu na tridesetu i šezdesetu minutu. Pad aktivnosti PAI-1 nakon zarona se očitovao i prvi i treći dan ronjenja pri čemu nije bilo razlike u stupnju stvaranja mjehurića prvog i trećeg dana. Međutim korelacija pada aktivnosti PAI-1 i količine plinske embolije se otkrila samo u trećem danu ronjenja što bi moglo značiti da je bilo potrebno ponovljeno izlaganje približno identičnom dekompresijskom stresu da bi veća količina plinske embolije potakla veći pad aktivnosti PAI-1.

VWf je prokoagulantna molekula kao i PAI-1 čiji porast aktivnosti odražava endotelnu aktivaciju. Budući da porast aktivnosti ni u jednom slučaju nije opažen, izostaju dokazi o endotelnoj aktivaciji induciranoj prisutnim plinskim mjehurićima ili u ovom slučaju njihov učinak kao jednog od pridonosećih čimbenika endotelnih promjena nije bio dovoljan. Rezultati praćenja koncentracije hsCRP prije i poslije ronjenja, kao jednog od čimbenika koji sudjeluje u razvoju endotelne disfunkcije [49], također nisu otkrili promjenu odnosno porast koji bi upućivao na endotelne promjene. Izmjerene koncentracije su prelazile referentnu vrijednost za hsCRP u krvi ( $>1\text{mg/l}$ ), ali ne i granične vrijednosti koje indiciraju kardiovaskularni rizik ( $>2\text{mg/l}$  ili  $>3\text{mg/l}$  [48]). U studijama koje su pokazale da CRP moguće ugrožava endotelnu funkciju smanjujući aktivnost eNOS i potičući oksidacijski stres, endotelne stanice su bile izložene koncentracijama CRP koje odgovaraju jakom upalnom stanju [49]. Stoga postoji vjerojatnost da bi dugoročno praćenje hsCRP-a kod zahtjevnijih ronilačkih profila (veća dubina i dulje trajanje) u odnosu na rekreativne zarone sa zrakom na 18 m moglo rezultirati drugačijim ishodom nego u studiji 1. Rezultati iz studije 2 pokazuju

značajno izraženije promjene protokom-uzrokovane dilatacije nakon zarona sa nitrox-om, te u usporedbi sa zaronima sa zrakom, upućuju na veći utjecaj hiperoksije na endotelnu funkciju nego plinskih mjehurića te moguće nude objašnjenje zašto studija 1 sa zrakom, koji ima manji udio kisika od nitrox smjese, nije otkrila endotelne promjene.

Ispitivanje razine oksidacijskog stresa mjerenjem TBARS u studiji 1 nije otkrilo promjenu nakon ronjenja sa zrakom. Taj rezultat može značiti da nije narušena ravnoteža između prooksidansa i antioksidansa tijekom zarona. Iako su ronionci bili izloženi većem parcijalnom tlaku udahnutog kisika, razina stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva nije nadmašila antioksidativni kapacitet. Mogućnost kompenzacije oksidacijskog stresa tijekom ronjenja, koje rezultira izostankom promjene njegove razine nakon ronjenja, potvrđuje i porast antioksidacijskog kapaciteta nakon zarona mjerenog kao FRAP. Porast antioksidacijskog kapaciteta je izmjeren samo nakon prvog zarona i u skladu je s dosadašnjim opažanjem da ronjenje s komprimiranim plinovima inducira plazmatski antioksidacijski sustav [34, 35]. Sureda-ove studije su također provedene na zaronima sa zrakom, ali na značajno većoj dubini (40 i 50 m u usporedbi s 18 m u studiji 1), što znači da su ronionci u tim studijama bili izloženi znatno izraženijoj hiperoksiji. Razlika je također u metodi praćenja antioksidacijskog kapaciteta, jer je Sureda mjerio aktivnost antioksidacijskih enzima, dok je u studiji 1 mjeren FRAP kao pokazatelj učinka antioksidativnog sustava, koji osim enzima uključuje i druge antioksidanse. Nadalje, u studiji kojom se ispitivao učinak sukcesivnih dubokih zarona (55-80 m dubine) na endotelnu funkciju, izmjeren je porast TBARS nakon prvog zarona pri čemu nije došlo do promjene antioksidacijskog kapaciteta mjerenog kao FRAP [19]. Međutim, navedena studija odvijala se na bitno većim dubinama (55-80 m naspram 18 m) i kroz duže vrijeme (65-75 min) što znači da su ronionci duže bili izloženi većoj hiperbariji što je rezultiralo i većim oksidacijskim stresom koji je moguće nadjačao antioksidacijsku obranu. Hiperoksija i pojačana konzumacija kisika zbog fizičke aktivnosti prilikom ronjenja smatraju se mogućim uzrokom povećanog oksidacijskog stresa prilikom ronjenja, koji zbog trošenja NO može potaknuti endotelnu disfunkciju [19, 29]. U studiji 1, porast antioksidacijskog kapaciteta nakon prvog zarona s izostankom promjene treći dan i nepromijenjenom razinom oksidacijskog stresa nakon zarona mjerenom kao TBARS, sugerira da je ronjenjem potaknuta antioksidacijska obrana spriječila porast oksidacijskog stresa nakon ronjenja sa zrakom na 18 m što može biti i razlogom izostanka endotelnih promjena praćenih razinama vWf, PAI-1 i hsCRP. Pad aktivnosti PAI-1 u krvi nakon ronjenja podržava mogućnost da je do porasta oksidacijskog stresa prilikom ronjenja, u ovoj studiji sa zrakom,

moglo doći, jer PAI-1 kao pripadnik obitelji serpinskih proteaza može biti inaktiviran oksidacijom slobodnim radikalima [92].

Endotelna aktivacija također dovodi do ekspresije upalnih citokina i adhezijskih molekula što potiče procese nastanka i progresije vaskularnog oštećenja [44]. Nepromijenjena razina nakon ronjenja sa zrakom hsCRP-a, kao upalnog biljega koji se stvara pod regulacijom upalnog citokina interleukina-6 te sam može stimulirati endotelne stanice [44], a ujedno inhibirati eNOS [49, 51], upotpunjuje opažanje o izostanku endotelne aktivacije kod ronilaca u ovoj studiji. Međutim, endotelni integritet ne ovisi samo o veličini ozljede nego i o kapacitetu popravka. Tako da je zapravo endotelna funkcija odraz ravnoteže između ozljede i popravka endotela. Endotelne stanice se mogu lokalno replicirati i zamijeniti one oštećene stanice, kao što se mogu mobilizirati iz koštane srži endotelne progenitorske stanice koje mogu diferencirati u zrele endotelne stanice [12]. Dakle, podaci studije 1 u smislu nepromijenjenih razina biljega endotelnog oštećenja upućuju na očuvan integritet endotela nakon ronjenja sa zrakom na 18 m, koji je moguće rezultat izostanka endotelne ozljede uslijed zarona ili brzo popravljenog oštećenja unatoč prisutnim plinskim mjehurićima.

## **5.2. Učinak ronjenja s komprimiranim plinskim smjesama na vaskularnu funkciju**

Akutni učinci različitih plinskih smjesa za udisanje (zrak i nitrox) na arterijsku i endotelnu funkciju su detaljno ispitani tijekom višednevnog ronjenja. Otkriveno je da ronjenje s komprimiranim plinskim smjesama uzrokuje blage promjene funkcije velikih krvnih žila u smislu porasta arterijske krutosti u slučaju obje korištene smjese. Međutim, ispitivanje endotelne funkcije je pokazalo da zaroni s nitrox-om, usprkos značajno nižem stupnju stvaranja plinskih mjehurića, uzrokuju izraženije promjene endotelne funkcije nego zaroni sa zrakom. S obzirom da je razina hiperoksije u zaronima s nitrox-om značajno veća nego kod zarona sa zrakom, ovi rezultati upućuju na veći utjecaj hiperoksije nego plinskih mjehurića na promjene endotelne funkcije.

Nitrox je posljednjih godina postao vrlo popularan među ronjocima i rado korišten zbog nižeg unosa dušika, veće koncentracije kisika, i zbog toga, kraće dekompresije. Ova studija u kojoj su korišteni jednaki profili ronjenja bez dekompresije za obje plinske smjese očekivano je pokazala manje stvaranje venskih plinskih mjehurića nakon ronjenja sa nitrox-om nego sa zrakom što upotpunjuje dosadašnja opažanja [80, 93]. Arterijalizacije mjehurića dogodile su se češće sa zrakom nego s nitrox-om (sedam naspram dvije) što je također očekivano s obzirom na veći stupanj stvaranja mjehurića nakon ronjenja sa zrakom nego s nitrox-om.

Međutim ronjenje s nitrox-om je imalo veći utjecaj na endotelnu funkciju u odnosu na zrak što se u ovoj studiji pokazalo značajno smanjenim FMD odgovorom nakon ronjenja s nitrox-om.

Arterijska krutost, kao jedno od makrovaskularnih svojstava arterijskog sustava, praćena je u ovoj studiji mjerenjem brzine karotidno-femoralnog pulsnog vala ( $PWV_{c-f}$ ).  $PWV_{c-f}$  je porastao nakon svih zarona, upućujući na porast arterijske krutosti nakon ronjenja. Porast je bio konzistentan i malen, u prosjeku  $\sim 0.4$  m/s, budući da se klinički relevantnim za porast kardiovaskularnog rizika smatra  $> 1$  m/s [94]. Arterijska krutost ovisi o strukturnim i funkcionalnim obilježjima krvnih žila: o količini kolagena i elastina u arterijskom zidu, masi i tonusu glatkih mišića arterijskog zida, tlaku rastezanja i endotelnoj funkciji [55]. U ovoj studiji je akutni porast centralne arterijske krutosti nakon svih zarona najvjerojatnije posredovan povećanjem tonusa arterijskog glatkog mišićja, budući da se tlak rastezanja nije promijenio, a značajnija promjena endotelne funkcije je opažena samo nakon zarona s nitrox-om. Povišeni aortni mišićni tonus bi mogao biti djelomično posredovan i oksidacijskim stresom tijekom ronjenja s komprimiranim plinovima. Oksidacijski stres, naime, uklanja NO reducirajući mu tako bioraspoloživost [95]. Iako se ronjenje s nitrox-om povezuje s većim oksidacijskim stresom nego ronjenje sa zrakom zbog većeg udjela kisika u smjesi za udisanje, ova studija nije otkrila razliku u učinku ispitivanih plinskih smjesa na  $PWV_{c-f}$ . Ronjenje sa zrakom za razliku od nitrox-a se povezuje sa značajnijim stvaranjem venskih plinskih mjehurića od kojih neki arterijaliziraju. Arterijalizirani mjehurići mogu direktno utjecati na arterijski endotel, a nearterijalizirani svoj učinak na endotel mogu vršiti posredovanjem endotelnih mikročestica za koje se pokazao porast u krvi nakon simuliranog ronjenja sa zrakom [21]. Stoga učinak arterijaliziranih kao i nearterijaliziranih mjehurića može rezultirati porastom tonusa velikih arterija. Promjena arterijske krutosti mogla je uslijediti nakon zarona i kao posljedica učinka imerzije. Boussages je 2009. godine objavio da produžena termoneutralna imerzija značajno povisuje karotidno-pedalni PWV [96]. Izlaganje hladnoći tijekom ronjenja rezultira simpatičkom aktivacijom koja također uzrokuje porast arterijske krutosti [97].

Augmentacijski indeks koji je također praćen u ovoj studiji kao neizravan pokazatelj arterijske krutosti bio je negativniji nakon svakog zarona sugerirajući smanjenu refleksiju aortnog vala i posljedično smanjeno sistoličko opterećenje neposredno nakon zarona. Augmentacijski indeks je složen parametar na kojeg, osim arterijske krutosti, utječu srčana frekvencija i periferni otpor [98]. Porast arterijske krutosti bi se trebao očitovati porastom augmentacijskog indeksa. Tako da bi se opažena nesukladnost između porasta  $PWV_{c-f}$

odnosno arterijske krutosti i negativnijeg Aix odnosno smanjene valne refleksije u ovoj studiji mogla objasniti smanjenjem perifernog otpora nakon zarona. Pad perifernog otpora smanjuje valnu refleksiju, a time i Aix. Mogući utjecaj srčane frekvencije na Aix je eliminiran korekcijom za srčanu frekvenciju  $Aix_{corr}$ . Budući da su ronionci vježbali tijekom zarona intenzitetom od ~30% maksimalne srčane frekvencije, moguće je da je pad perifernog otpora bio uzrokovan vazodilatacijom rezistentnih žila koja je bila uzrokovana tjelovježbom. Na taj način, pad perifernog otpora je smanjio i amplitudu reflektiranog vala i posljedično Aix. Slična opažanja bilježi i studija u kojoj se Aix značajno smanjio kod maratonaca nakon utrke [99].

Mjerenje FMD je otkrilo da je ronjenje s nitrox-om rezultiralo značajnijim smanjenjem FMD poslije zarona za razliku od ronjenja sa zrakom koje je pokazalo samo tendenciju pada FMD nakon zarona. Ovakvo opažanje je donekle iznenađujuće, budući da su prethodne studije pokazale slabljenje FMD nakon ronjenja sa zrakom [18, 19, 29], ali je sukladno rezultatima iz studije 1 koji ukazuju na izostanak porasta biljega endotelnog oštećenja (vWf i PAI-1) u krvi nakon ronjenja sa zrakom. Razlog takvom neslaganju rezultata može biti dubina zarona koja je u ovoj studiji iznosila polovicu dubine zarona sa zrakom iz prethodnih studija [18, 19, 29], što znači da je i razina hiperoksije bila niža. Ako je oksidacijski stres glavni put gubitka NO i posljedično smanjenja FMD, onda je moguće da zaron sa zrakom na 18 m nije bio dovoljan da bi prouzrokovao manjak NO koja će rezultirati značajnom funkcionalnom promjenom FMD-a. Izostanak promjene TBARS nakon zarona na 18 m kao i porast antioksidacijskog kapaciteta nakon zarona prvi dan, mjerenog kao FRAP u prvoj studiji, podržavaju takvu mogućnost.

Koncentracija nitrita ( $NO_2^-$ ) u plazmi je pokazatelj aktivnosti NOS, pa prema tome djelomično reflektira i endotelnu produkciju NO [100]. Mjerenje nitrita u plazmi prije i poslije zarona sa obje plinske smjese u ovoj studiji nije otkrilo značajnu razliku sugerirajući izostanak značajne promjene NO. Takvo opažanje nije sukladno nalazu smanjenja FMD nakon ronjenja s nitrox-om, koje bi trebalo biti popraćeno i smanjenjem NO. Međutim, treba uzeti u obzir da se FMD-om prati vazoaktivni odgovor na pojačano smicanje koje je samo djelomično ovisno o produkciji NO, dok je mjerenje nitrita kao pokazatelja stvaranja NO provedeno u bazalnim uvjetima. Jedna od prijašnjih studija je pokazala dobru korelaciju između nitrita u krvi i reaktivne post-ishemične hiperemije mjerene impendancijskom pletizmografijom, ali je krv uzimana svakih 10 s tijekom hiperemije [84]. Nepromijenjena koncentracija nitrita u plazmi koja ukazuje na izostanak promjene u stvaranju NO bi se mogla objasniti time što je u ovoj studiji kod ispitanika opažen i vazokonstriktorni odgovor velikih

arterija indiciran porastom  $PWV_{c-f}$  kao i vazodilatacijski odgovor malih, rezistentnih arterija indiciran padom Aix nakon zarona. Dva oprečna odgovora sistemskog krvožilja u stvaranju NO su moguće poništila jedan drugoga i rezultirala izostankom promjene koncentracije nitrita nakon zarona. Drugo moguće objašnjenje jest da je mali broj ispitanika bio nedovoljan da se detektiraju vrlo male promjene u koncentraciji nitrita s obzirom na veliku individualnu varijabilnost u njihovim koncentracijama.

### **5.3. Učinak ponovljenih zarona s komprimiranim zrakom na humoralne biljege oštećenja endotela i SŽS-a**

Uzastopno ronjenje sa zrakom na 18 m s umjerenim vježbanjem tijekom zarona nije dovelo do porasta razine endotelina-1 i NSE, usprkos značajnom stvaranju plinskih mjehurića i njihovoj sporadičnoj arterijalizaciji, ali je dovelo do porasta plazmatske koncentracije S100-B biljega. Kako S100-B može biti otpušten u cirkulaciju i u izostanku neuralnog oštećenja, npr. nakon tjelovježbe, napravljen je i kontrolni zaron na 5 m. Kontrolni zaron nije doveo do značajnog stvaranja plinskih mjehurića, ali je također rezultirao porastom koncentracije S100-B u krvi nakon zarona. Istovremeno detektirani porast aktivnosti kreatin-kinaze nakon zarona na 18 m i kontrolnog na 5 m, upućuje da porast koncentracije S100-B u oba slučaja nije uzrokovan učinkom mjehurića na SŽS, već da se tom prilikom S100-B otpušta iz drugih tkiva, a ne SŽS-a.

Mjerenje koncentracije endotelina-1 nakon zarona na 18 m nije otkrilo značajnu promjenu usprkos značajnom stvaranju plinskih mjehurića, te korištenju ronilačkog profila za koji se pokazalo da inducira otpuštanje endotelinih mikročestica u cirkulaciju [22]. Promjena koncentracije endotelina-1 u krvi nije uočena nakon zarona prvog dana kao ni nakon zarona četvrtog dana. Budući da je pojačano stvaranje endotelina-1 indikator poremećene endotelne funkcije [27], izostanak promjene njegove koncentracije nakon zarona sa značajnim stvaranjem plinskih mjehurića sugerira da pretpostavljeno oštećenje endotela uzrokovano plinskim mjehurićima nije dovoljno da bi se moglo reflektirati promjenom razine endotelina-1 u krvi. Ovakvo opažanje upotpunjuje i već navedeni rezultat studije u kojoj zaron sa zrakom na 18 m bez dekompresije nije doveo do značajne promjenu FMD-a za razliku od nitrox-a indicirajući stoga da su promjene endotelne funkcije granične.

Studija u kojoj je osam ronilaca bilo izloženo hiperbaričnom zraku i kisiku na 2,5 atm kroz šezdeset minuta je pokazala porast koncentracije endotelina-1 u krvi porasla za ~ 30% [101]. Slično opažanje objavljeno je i nakon studije s dobrovoljcima koji su također bili podvrgnuti

hiperbaričnom zraku i kisiku na 2,8 atm bez razlike u razini endotelina-1 s obzirom na korišteni plin za udisanje [102]. U objema navedenim studijama razina hiperbarije kojoj su ispitanici bili izloženi slična je kao i u ovoj studiji. Razlozi neslaganja rezultata odnosno promjena koncentracije endotelina-1 u krvi bi mogli biti u duljini trajanja izlaganja povišenom tlaku (60. min naspram 47 min u ovoj studiji) i dužem vremenskom intervalu od izranjanja do uzorkovanja krvi u našoj studiji (20 min naspram 80 min u studiji 3). Plazmatsko poluvrijeme života endotelina-1 od 4-7 minuta je vrlo kratko, pa je također moguće da je u ovoj studiji s jednim uzorkovanjem krvi u 80. min propušten mjerljivi porast endotelina-1 u slučaju njegovog prolaznog porasta uzrokovanog nekim od čimbenika koji utječu na endotel tijekom zarona (npr. hiperoksija). Međutim, postoji i studija sa štakorskim modelom dekompresijske bolesti u kojoj također nije došlo do promjene razine endotelina-1 u krvi nakon dekompresije [103]. Porast endotelina-1 u krvi, osim što je pokazatelj endotelne disfunkcije koja može uključivati i moždano krvožilje, može biti i posljedica akutne moždane ishemije. Hipoksija stimulira sintezu i sekreciju endotelina-1 iz oštećenih endotelnih i živčanih stanica [27], pa stoga izostanak promjene koncentracije endotelina-1 u krvi može značiti i izostanak značajne ishemije mozga.

Mjerenje NSE u krvi također nije otkrilo promjenu nakon ronjenja. NSE je glikolitički enzim koji je u najvećoj mjeri zastupljen u citoplazmi neurona odakle se ne otpušta u tjelesne tekućine dok su neuroni cjeloviti. Tek uslijed ozljede neurona dolazi do porasta koncentracije NSE u krvi [75]. Uzimajući u obzir značajnu produkciju plinskih mjehurića i arterijalizaciju kod nekih ronilaca nakon ronjenja u ovoj studiji, očekivati potencijalno oštećenje SŽS-a i promjenu propusnosti krvno-moždane barijere potaknuto plinskim mjehurićima nije nerealno. Međutim, koncentracija NSE u krvi nakon ronjenja nije porasla indicirajući da se neuronalna ozljeda, koja bi se mogla opaziti porastom koncentracije NSE u krvi, nije dogodila. Vršni porast koncentracije NSE se doseže sporo [104]. Primjerice, koncentracija NSE doseže maksimum u krvi treći dan nakon globalne cerebralne ishemije izazvane srčanim zastojem [105]. Uzimajući u obzir takvu sporu dinamiku rasta u krvi nakon ishemičnog događaja, asimptomatska neuronalna ozljeda uslijed ronjenja u ovoj studiji bi se prije mogla očitovati porastom koncentracije NSE u krvi četvrti, a ne prvi dan ronjenja. Međutim koncentracija NSE u krvi nije porasla nakon zarona ni četvrti dan.

S100-B protein pripada obitelji kalcij-vezujućih proteina kojeg u najvećoj mjeri izražavaju astroglijalne stanice, ali i masno tkivo i skeletni mišići [70]. Koncentracija S100-B u krvi raste nakon različitih vrsta moždanog oštećenja [106]. U zdravih osoba je prisutan u vrlo niskim koncentracijama u krvi u odnosu na cerebrospinalnu tekućinu. Stoga bi otvaranje

krvno-moždane barijere moglo značajno povećati koncentraciju u krvi, a mjerenje S100-B u krvi poslužiti kao pokazatelj takvog događaja [107]. Studija s ronjocima na dah je otkrila mali, ali značajan porast koncentracije S100-B u krvi nakon apneje koji je upravo pripisan privremenom otvaranju krvno-moždane barijere [71].

Ovom studijom je opažen također mali, ali značajan porast koncentracije S100-B u krvi nakon zarona prvog i četvrtog dana. Kumulativni učinak ponovljenih zarona na razinu S100-B u krvi je izostao sugerirajući da je porast nakon zarona mogao biti uzrokovan prolaznim otvaranjem krvno-moždane barijere, a ne moždanom ozljedom. Stavrinou u svojoj studiji koja je ispitala promjenu S100-B u krvi nije opazio promjenu nakon ronjenja, kao ni nakon tri sukcesivna zarona tijekom tri dana provedena s nitrox-om [73]. Budući da se u navedenoj studiji ronilo s nitrox-om, vjerojatno je stvaranje plinskih mjehurića bilo značajno manje nego u ovoj studiji u kojoj se ronilo sa zrakom, a na što i ukazuju usporedbe ronjenja sa zrakom i s nitrox-om iz studije 2. U tom slučaju bi uzrok izostanka promjene koncentracije S100-B u studiji Stavrinou-a mogao biti manji stupanj stvaranja plinskih mjehurića koji bi kontaktom s mikrovaskularnim endotelom krvno-moždane barijere mogli dovesti do njenog oštećenja. Studija provedena sa štakorima koji su bili izloženi hiperbariji u simuliranim zaronima, pokazala je porast S100-B u krvi nakon zarona koji je korelirao sa stupnjem stvaranja mjehurića u desnom srcu sugerirajući neurološku ozljedu uzrokovanu dekompresijom [72]. U studiji 3 koja je rezultirala značajnim stvaranjem mjehurića, njihovom sporadičnom artrializacijom i promjenom S100-B nakon ronjenja proveden je i kontrolni zaron. Kontrolni zaron na 5 m pokazao je zanemarivo stvaranje mjehurića, ali sličan porast koncentracije S100-B u krvi upućujući na to da uzrok porasta vjerojatno nije povezan s učinkom plinskih mjehurića. Budući da specifičnost S100-B kao biljega oštećenja SŽS nije optimalna zbog njegovog mogućeg otpuštanja u krv iz drugih izvora (mišići i masno tkivo), mnoge studije do sada su istakle važnost paralelnog praćenja aktivnosti CK u krvi kao pokazatelja mišićnog oštećenja [70]. Studija s maratonskim trkačima pokazala je porast koncentracije S100-B i porast aktivnosti CK nakon utrke, dok je nešto specifičniji biljeg moždane ozljede glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP) ostao nepromijenjen upućujući na ekstrakranijalni izvor S100-B [70]. Biokemijski dokazi za mišićnu ozljedu su učestali i između ostalog se povezuju s arterijskom plinskom embolijom nakon ronjenja, a aktivnost kreatin-kinaze se predlaže kao pokazatelj ozbiljnosti i jačine arterijske plinske embolizacije [108].

U ovoj studiji porast aktivnosti CK u krvi nakon kontrolnog zarona bez značajnog stvaranja plinskih mjehurića upućuje na to da porast nije uvjetovan plinskom embolijom, kao ni u

slučaju mjerenja S100-B, nego vjerojatnije mišićnom ozljedom uslijed plivanja i imerzije u hladnoj vodi. Tome u prilog ide i izostanak razlike u promjeni koncentracije S100-B nakon zarona između ispitanika s arterijalizacijom i onih bez. Poznato je da se nakon akutne mišićne ozljede, S100-B, izražen u zrelim mišićnim vlaknima, brzo otpušta iz ozlijeđenog mišićnog tkiva da bi regulirao proliferaciju i diferencijaciju mioblasta i tako moguće sudjelovao u procesu skeletne mišićne obnove [109]. Drugi mogući razlog porasta S100-B u krvi bez prisutnosti moždane ozljede je aktivacija adipocita inducirana katekolaminima tijekom intenzivne fizičke vježbe. S100-B se otpušta iz adipocita tretiranih s katekolaminima i difundira u krv [68]. Opaženi porast S100-B nakon zarona na 18 m kao i nakon kontrolnog zarona popraćen porastom aktivnosti CK u ovoj studiji sugerira mišićno porijeklo porasta S100-B.

## 6. ZAKLJUČCI

Asimptomatski zaroni sa zrakom ne uzrokuju promjene biokemijskih pokazatelja endotelnog oštećenja unatoč prisutnosti plinskih mjehurića u cirkulaciji. Antioksidacijska obrana bi mogla biti jedan od mogućih mehanizama zaštite prilikom ronjenja u profilima bez dekompresije.

Asimptomatsko ronjenje s komprimiranim plinskim smjesama dovodi do blagog povećanja arterijske krutosti, bez značajne razlike između utjecaja zraka ili nitrox-a na makrovaskularnu funkciju. Međutim, ronjenje sa smjesom nitrox dovodi do značajnijeg poremećaja endotelne funkcije (mjerene protokom uzrokovanom vazodilatacijom) nego ronjenje sa zrakom, unatoč manjem stvaranju plinskih mjehurića. Bez obzira na izraženiji utjecaj nitrox-a na endotelnu funkciju, nisu nađeni dokazi o razlici u stvaranju NO nakon zarona u slučaju korištenja obje plinske smjese.

Asimptomatski zaroni sa zrakom u prisutnosti arterijalizacije plinskih mjehurića nisu doveli do promjena humoralnih biljega koje bi upućivale na oštećenje integriteta SŽS-a. Uočeni porast S100-B popraćen porastom CK u krvi prilikom ronjenja sa i bez stvaranja plinskih mjehurića govori u prilog mišićnom, a ne neuronalnom porijeklu ovog indikatora u krvi.

## 7. LITERATURA

1. Levett, D.Z. and I.L. Millar, Bubble trouble: a review of diving physiology and disease. *Postgrad Med J*, 2008. 84(997): p. 571-8.
2. Vann, R.D., et al., Decompression illness. *Lancet*, 2011. 377(9760): p. 153-64.
3. Dujic, Z., et al., A single open sea air dive increases pulmonary artery pressure and reduces right ventricular function in professional divers. *Eur J Appl Physiol*, 2006. 97(4): p. 478-85.
4. Hills, B.A. and B.D. Butler, Size distribution of intravascular air emboli produced by decompression. *Undersea Biomed Res*, 1981. 8(3): p. 163-70.
5. Blatteau, J.E., et al., Gas nuclei, their origin, and their role in bubble formation. *Aviat Space Environ Med*, 2006. 77(10): p. 1068-76.
6. Papadopoulou, V., et al., Circulatory bubble dynamics: from physical to biological aspects. *Adv Colloid Interface Sci*, 2014. 206: p. 239-49.
7. Hagen, P.T., D.G. Scholz, and W.D. Edwards, Incidence and size of patent foramen ovale during the first 10 decades of life: an autopsy study of 965 normal hearts. *Mayo Clin Proc*, 1984. 59(1): p. 17-20.
8. Ljubkovic, M., et al., High incidence of venous and arterial gas emboli at rest after trimix diving without protocol violations. *J Appl Physiol* (1985), 2010. 109(6): p. 1670-4.
9. Eckenhoff, R.G., C.S. Olstad, and G. Carrod, Human dose-response relationship for decompression and endogenous bubble formation. *J Appl Physiol* (1985), 1990. 69(3): p. 914-8.
10. Madden, L.A. and G. Laden, Gas bubbles may not be the underlying cause of decompression illness - The at-depth endothelial dysfunction hypothesis. *Med Hypotheses*, 2009. 72(4): p. 389-92.
11. Marinovic, J., et al., Effects of successive air and trimix dives on human cardiovascular function. *Med Sci Sports Exerc*, 2009. 41(12): p. 2207-12.
12. Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink, Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*, 2007. 115(10): p. 1285-95.
13. Brubakk, A.O. and A. Mollerlokken, The role of intra-vascular bubbles and the vascular endothelium in decompression sickness. *Diving Hyperb Med*, 2009. 39(3): p. 162-9.

14. Brodsky, S.V., et al., Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. 286(5): p. H1910-5.
15. Marti, C.N., et al., Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 2012. 60(16): p. 1455-69.
16. Bonetti, P.O., L.O. Lerman, and A. Lerman, Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(2): p. 168-75.
17. Spiel, A.O., J.C. Gilbert, and B. Jilma, von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes. *Circulation*, 2008. 117(11): p. 1449-59.
18. Brubakk, A.O., et al., A single air dive reduces arterial endothelial function in man. *J Physiol*, 2005. 566(Pt 3): p. 901-6.
19. Obad, A., et al., Successive deep dives impair endothelial function and enhance oxidative stress in man. *Clin Physiol Funct Imaging*, 2010. 30(6): p. 432-8.
20. Madden, L.A., et al., Endothelial function and stress response after simulated dives to 18 msw breathing air or oxygen. *Aviat Space Environ Med*, 2010. 81(1): p. 41-5.
21. Vince, R.V., et al., Release of VCAM-1 associated endothelial microparticles following simulated SCUBA dives. *Eur J Appl Physiol*, 2009. 105(4): p. 507-13.
22. Thom, S.R., et al., Microparticle production, neutrophil activation, and intravascular bubbles following open-water SCUBA diving. *J Appl Physiol (1985)*, 2012. 112(8): p. 1268-78.
23. Pontier, J.M., E. Gempp, and M. Ignatescu, Blood platelet-derived microparticles release and bubble formation after an open-sea air dive. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2012. 37(5): p. 888-92.
24. Eftedal, I., et al., Acute and potentially persistent effects of scuba diving on the blood transcriptome of experienced divers. *Physiol Genomics*, 2013. 45(20): p. 965-72.
25. Chatterjee, A., S.M. Black, and J.D. Catravas, Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol*, 2008. 49(4-6): p. 134-40.
26. Esper, R.J., et al., Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol*, 2006. 5: p. 4.
27. Iglarz, M. and M. Clozel, Mechanisms of ET-1-induced endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007. 50(6): p. 621-8.
28. Tousoulis, D., et al., The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol*, 2012. 10(1): p. 4-18.
29. Obad, A., et al., The effects of acute oral antioxidants on diving-induced alterations in human cardiovascular function. *J Physiol*, 2007. 578(Pt 3): p. 859-70.

30. Powers, S.K. and M.J. Jackson, Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*, 2008. 88(4): p. 1243-76.
31. Thom, S.R., Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J Appl Physiol* (1985), 2009. 106(3): p. 988-95.
32. Chrismas, B.C., et al., Acute antioxidant pre-treatment attenuates endothelial microparticle release after decompression. *Diving Hyperb Med*, 2010. 40(4): p. 184-8.
33. Gomez-Cabrera, M.C., et al., Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol*, 2005. 567(Pt 1): p. 113-20.
34. Sureda, A., et al., Scuba diving increases erythrocyte and plasma antioxidant defenses and spares NO without oxidative damage. *Med Sci Sports Exerc*, 2009. 41(6): p. 1271-6.
35. Sureda, A., et al., Scuba diving activates vascular antioxidant system. *Int J Sports Med*, 2012. 33(7): p. 531-6.
36. Dejam, A., et al., Emerging role of nitrite in human biology. *Blood Cells Mol Dis*, 2004. 32(3): p. 423-9.
37. Lauer, T., et al., Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(22): p. 12814-9.
38. Kleinbongard, P., et al., Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med*, 2003. 35(7): p. 790-6.
39. Kleinbongard, P., et al., Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radic Biol Med*, 2006. 40(2): p. 295-302.
40. Vischer, U.M., et al., Reactive oxygen intermediates induce regulated secretion of von Willebrand factor from cultured human vascular endothelial cells. *Blood*, 1995. 85(11): p. 3164-72.
41. Vischer, U.M., von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. *J Thromb Haemost*, 2006. 4(6): p. 1186-93.
42. Paulus, P., C. Jennewein, and K. Zacharowski, Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomarkers*, 2011. 16 Suppl 1: p. S11-21.

43. Strandberg, L., et al., The oxidative inactivation of plasminogen activator inhibitor type 1 results from a conformational change in the molecule and does not require the involvement of the P1' methionine. *J Biol Chem*, 1991. 266(21): p. 13852-8.
44. Tousoulis, D., et al., Diabetes mellitus-associated vascular impairment: novel circulating biomarkers and therapeutic approaches. *J Am Coll Cardiol*, 2013. 62(8): p. 667-76.
45. Hamsten, A., et al., Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med*, 1985. 313(25): p. 1557-63.
46. Yoshimoto, S., et al., Cerebral microvessel endothelium is producing endothelin. *Brain Res*, 1990. 508(2): p. 283-5.
47. Ziv, I., et al., Increased plasma endothelin-1 in acute ischemic stroke. *Stroke*, 1992. 23(7): p. 1014-6.
48. Yousuf, O., et al., High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular disease: a resolute belief or an elusive link? *J Am Coll Cardiol*, 2013. 62(5): p. 397-408.
49. Hein, T.W., et al., Human C-reactive protein induces endothelial dysfunction and uncoupling of eNOS in vivo. *Atherosclerosis*, 2009. 206(1): p. 61-8.
50. Kampoli, A.M., et al., Potential pathogenic inflammatory mechanisms of endothelial dysfunction induced by type 2 diabetes mellitus. *Curr Pharm Des*, 2011. 17(37): p. 4147-58.
51. Singh, U., et al., C-reactive protein decreases endothelial nitric oxide synthase activity via uncoupling. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. 43(6): p. 780-91.
52. Qamirani, E., et al., C-reactive protein inhibits endothelium-dependent NO-mediated dilation in coronary arterioles by activating p38 kinase and NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(5): p. 995-1001.
53. Joulia, F., et al., Plasma adenosine release is associated with bradycardia and transient loss of consciousness during experimental breath-hold diving. *Int J Cardiol*, 2013. 168(5): p. e138-41.
54. Lu, J., et al., Protective mechanism of adenosine to the rat arterial endothelial dysfunction induced by hydrogen peroxide. *Biol Pharm Bull*, 2007. 30(7): p. 1206-11.
55. Oliver, J.J. and D.J. Webb, Noninvasive assessment of arterial stiffness and risk of atherosclerotic events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(4): p. 554-66.
56. Corretti, M.C., et al., Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the

- International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*, 2002. 39(2): p. 257-65.
57. Laurent, S., et al., Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*, 2006. 27(21): p. 2588-605.
  58. Baulmann, J., et al., A new oscillometric method for assessment of arterial stiffness: comparison with tonometric and piezo-electronic methods. *J Hypertens*, 2008. 26(3): p. 523-8.
  59. Gerriets, T., et al., Association between right-to-left shunts and brain lesions in sport divers. *Aviat Space Environ Med*, 2003. 74(10): p. 1058-60.
  60. Tripodi, D., et al., Brain magnetic resonance imaging, aerobic power, and metabolic parameters among 30 asymptomatic scuba divers. *Int J Sports Med*, 2004. 25(8): p. 575-81.
  61. Erdem, I., et al., Cerebral white-matter lesions in asymptomatic military divers. *Aviat Space Environ Med*, 2009. 80(1): p. 2-4.
  62. Knauth, M., et al., Cohort study of multiple brain lesions in sport divers: role of a patent foramen ovale. *BMJ*, 1997. 314(7082): p. 701-5.
  63. Reul, J., et al., Central nervous system lesions and cervical disc herniations in amateur divers. *Lancet*, 1995. 345(8962): p. 1403-5.
  64. Ljubkovic, M., et al., Determinants of arterial gas embolism after scuba diving. *J Appl Physiol* (1985), 2012. 112(1): p. 91-5.
  65. Madden, D., M. Ljubkovic, and Z. Dujic, Intrapulmonary shunt and SCUBA diving: another risk factor? *Echocardiography*, 2015. 32 Suppl 3: p. S205-10.
  66. Marchi, N., et al., Peripheral markers of blood-brain barrier damage. *Clin Chim Acta*, 2004. 342(1-2): p. 1-12.
  67. Papa, L., D. Edwards, and M. Ramia, Exploring Serum Biomarkers for Mild Traumatic Brain Injury, in *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*, F.H. Kobeissy, Editor 2015: Boca Raton (FL).
  68. Donato, R., F. Riuzzi, and G. Sorci, Causes of elevated serum levels of S100B protein in athletes. *Eur J Appl Physiol*, 2013. 113(3): p. 819-20.
  69. Ingebrigtsen, T. and B. Romner, Biochemical serum markers for brain damage: a short review with emphasis on clinical utility in mild head injury. *Restor Neurol Neurosci*, 2003. 21(3-4): p. 171-6.
  70. Hasselblatt, M., et al., Serum S100beta increases in marathon runners reflect extracranial release rather than glial damage. *Neurology*, 2004. 62(9): p. 1634-6.

71. Andersson, J.P., M.H. Liner, and H. Jonsson, Increased serum levels of the brain damage marker S100B after apnea in trained breath-hold divers: a study including respiratory and cardiovascular observations. *J Appl Physiol* (1985), 2009. 107(3): p. 809-15.
72. Havnes, M.B., et al., S100B and its relation to intravascular bubbles following decompression. *Diving Hyperb Med*, 2010. 40(4): p. 210-2.
73. Stavrinou, L.C., et al., Serum levels of S-100B after recreational scuba diving. *Int J Sports Med*, 2011. 32(12): p. 912-5.
74. Pelinka, L.E., et al., Nonspecific increase of systemic neuron-specific enolase after trauma: clinical and experimental findings. *Shock*, 2005. 24(2): p. 119-23.
75. Herrmann, M., et al., Neurobehavioral outcome prediction after cardiac surgery: role of neurobiochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue. *Stroke*, 2000. 31(3): p. 645-50.
76. Oliveira, C.O., N. Ikuta, and A. Regner, Outcome biomarkers following severe traumatic brain injury. *Rev Bras Ter Intensiva*, 2008. 20(4): p. 411-421.
77. Herrmann, M., et al., Release of biochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue is associated with short and long term neuropsychological outcome after traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2001. 70(1): p. 95-100.
78. Planche, V., et al., [Importance of hemolysis on neuron-specific enolase measurement]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2010. 68(2): p. 239-42.
79. Eftedal, O.S., H. Tjelmeland, and A.O. Brubakk, Validation of decompression procedures based on detection of venous gas bubbles: A Bayesian approach. *Aviat Space Environ Med*, 2007. 78(2): p. 94-9.
80. Ljubkovic, M., et al., Venous and arterial bubbles at rest after no-decompression air dives. *Med Sci Sports Exerc*, 2011. 43(6): p. 990-5.
81. Lapenna, D., et al., Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Radic Biol Med*, 2001. 31(3): p. 331-5.
82. Benzie, I.F. and J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 1996. 239(1): p. 70-6.
83. Woodman, R.J., et al., Improved analysis of brachial artery ultrasound using a novel edge-detection software system. *J Appl Physiol* (1985), 2001. 91(2): p. 929-37.
84. Schwarz, A., et al., Stable-isotope dilution GC-MS approach for nitrite quantification in human whole blood, erythrocytes, and plasma using pentafluorobenzyl bromide

- derivatization: nitrite distribution in human blood. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2011. 879(17-18): p. 1485-95.
85. Savola, O., et al., Effects of head and extracranial injuries on serum protein S100B levels in trauma patients. *J Trauma*, 2004. 56(6): p. 1229-34; discussion 1234.
  86. Lip, G.Y. and A. Blann, von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? *Cardiovasc Res*, 1997. 34(2): p. 255-65.
  87. Lambrechts, K., et al., Effect of decompression-induced bubble formation on highly trained divers microvascular function. *Physiol Rep*, 2013. 1(6): p. e00142.
  88. Zanchi, J., et al., Influence of repeated daily diving on decompression stress. *Int J Sports Med*, 2014. 35(6): p. 465-8.
  89. Pontier, J.M., N. Vallee, and L. Bourdon, Bubble-induced platelet aggregation in a rat model of decompression sickness. *J Appl Physiol* (1985), 2009. 107(6): p. 1825-9.
  90. Yamami, N., et al., Alterations of fibrinolytic activity in human during and after hyperbaric oxygen exposure. *Appl Human Sci*, 1996. 15(5): p. 239-42.
  91. Radziwon, P., et al., Decreased levels of PAI-1 and alpha 2-antiplasmin contribute to enhanced fibrinolytic activity in divers. *Thromb Res*, 2007. 121(2): p. 235-40.
  92. Narkowicz, C.K., J.H. Vial, and P.W. McCartney, Hyperbaric oxygen therapy increases free radical levels in the blood of humans. *Free Radic Res Commun*, 1993. 19(2): p. 71-80.
  93. Ljubkovic, M., et al., Ultrasonic evidence of acute interstitial lung edema after SCUBA diving is resolved within 2-3h. *Respir Physiol Neurobiol*, 2010. 171(2): p. 165-70.
  94. Lantelme, P., et al., Heart rate: an important confounder of pulse wave velocity assessment. *Hypertension*, 2002. 39(6): p. 1083-7.
  95. Landmesser, U., et al., Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*, 2003. 111(8): p. 1201-9.
  96. Boussuges, A., et al., Haemodynamic changes after prolonged water immersion. *J Sports Sci*, 2009. 27(6): p. 641-9.
  97. Boutouyrie, P., et al., Sympathetic activation decreases medium-sized arterial compliance in humans. *Am J Physiol*, 1994. 267(4 Pt 2): p. H1368-76.
  98. Kelly, R.P., et al., Vasoactive drugs influence aortic augmentation index independently of pulse-wave velocity in healthy men. *Hypertension*, 2001. 37(6): p. 1429-33.

99. Vlachopoulos, C., et al., Arterial stiffness and wave reflections in marathon runners. *Am J Hypertens*, 2010. 23(9): p. 974-9.
100. Grau, M., et al., Recent methodological advances in the analysis of nitrite in the human circulation: nitrite as a biochemical parameter of the L-arginine/NO pathway. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007. 851(1-2): p. 106-23.
101. Lund, V., et al., Effect of hyperbaric conditions on plasma stress hormone levels and endothelin-1. *Undersea Hyperb Med*, 1999. 26(2): p. 87-92.
102. Rocco, M., et al., Lipid peroxidation, circulating cytokine and endothelin 1 levels in healthy volunteers undergoing hyperbaric oxygenation. *Minerva Anesthesiol*, 2001. 67(5): p. 393-400.
103. Montcalm-Smith, E., et al., Stress biomarkers in a rat model of decompression sickness. *Aviat Space Environ Med*, 2007. 78(2): p. 87-93.
104. Schoerhuber, W., et al., Time course of serum neuron-specific enolase. A predictor of neurological outcome in patients resuscitated from cardiac arrest. *Stroke*, 1999. 30(8): p. 1598-603.
105. Rosen, H., et al., Serum levels of the brain-derived proteins S-100 and NSE predict long-term outcome after cardiac arrest. *Resuscitation*, 2001. 49(2): p. 183-91.
106. Bottiger, B.W., et al., Astroglial protein S-100 is an early and sensitive marker of hypoxic brain damage and outcome after cardiac arrest in humans. *Circulation*, 2001. 103(22): p. 2694-8.
107. Kapural, M., et al., Serum S-100beta as a possible marker of blood-brain barrier disruption. *Brain Res*, 2002. 940(1-2): p. 102-4.
108. Smith, R.M. and T.S. Neuman, Elevation of serum creatine kinase in divers with arterial gas embolization. *N Engl J Med*, 1994. 330(1): p. 19-24.
109. Riuzzi, F., et al., S100B engages RAGE or bFGF/FGFR1 in myoblasts depending on its own concentration and myoblast density. Implications for muscle regeneration. *PLoS One*, 2012. 7(1): p. e28700.

## 8. POPIS KRATICA

|                           |                                                   |
|---------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>Aix</b>                | augmentacijski indeks                             |
| <b>Aix<sub>corr</sub></b> | korigirani augmentacijski indeks                  |
| <b>CK</b>                 | kreatin-kinaza                                    |
| <b>cGMP</b>               | ciklični gvanozin-monofosfat                      |
| <b>CRP</b>                | C reaktivni protein                               |
| <b>deoksiHb</b>           | deoksihemoglobin                                  |
| <b>ECLIA</b>              | elektrokemiluminiscencijska imunoanaliza          |
| <b>EKG</b>                | elektrokardiograf                                 |
| <b>ELISA</b>              | imunoenzimski test                                |
| <b>ET-1</b>               | endotelin-1                                       |
| <b>ET<sub>A</sub></b>     | endotelinski receptor A                           |
| <b>ET<sub>B</sub></b>     | endotelinski receptor B                           |
| <b>eNOS</b>               | endotelna sintaza dušikovog oksida                |
| <b>FMD</b>                | protokom posredovana dilatacija                   |
| <b>FRAP</b>               | plazmatska sposobnost redukcije željezo(III)-iona |
| <b>GPIIb/Ia</b>           | glikoprotein IIb/Ia                               |
| <b>GFAP</b>               | glijalni fibrilarni kiseli protein                |
| <b>HsCRP</b>              | visoko osjetljivi C reaktivni protein             |
| <b>ICAM-1</b>             | intercelularna adhezijska molekula 1              |
| <b>Il-6</b>               | interleukin 6                                     |
| <b>MDA</b>                | malondialdehid                                    |
| <b>metHb</b>              | methemoglobin                                     |

|                          |                                             |
|--------------------------|---------------------------------------------|
| <b>NADPH</b>             | nikotinamid adenin dinukleotid fosfat       |
| <b>nitrozilHb</b>        | nitrozilhemoglobin                          |
| <b>NSE</b>               | neuron specifična enolaza                   |
| <b>oxLDL</b>             | oksidirani lipoproteini niske gustoće       |
| <b>PAI-1</b>             | inhibitor aktivatora plazminogena 1         |
| <b>PFO</b>               | patent foramen ovale                        |
| <b>PWV</b>               | brzina pulsnog vala                         |
| <b>PWV<sub>c-f</sub></b> | brzina karotidno-femoralnog pulsnog vala    |
| <b>ROS</b>               | reaktivni kisikovi spojevi                  |
| <b>SERPINS</b>           | inhibitori serinskih proteaza               |
| <b>SŽS</b>               | središnji živčani sustav                    |
| <b>TBA</b>               | tio-barbiturna kiselina                     |
| <b>TBARS</b>             | reaktivne supstance tio-barbiturne kiseline |
| <b>tPA</b>               | tkivni aktivator plazminogena               |
| <b>TPTZ</b>              | 2,4,6-tri-(2-piridil)-S-triazin             |
| <b>uPA</b>               | urokinazni aktivator plazminogena           |
| <b>VCAM-1</b>            | adhezijska molekula vaskularne stanice 1    |
| <b>VEGF</b>              | vaskularni endotelni faktor rasta           |
| <b>vWf</b>               | von Willebrandov faktor                     |

## 9. ŽIVOTOPIS

Nada Bilopavlović je rođena 28.10.1975. u Splitu gdje je završila osnovnu školu i gimnaziju općeg smjera. Maturirala je 1994., te iste godine upisala Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studiranja dobila je CEPUS stipendiju za boravak u Sveučilišnoj bolnici u Pečuhu gdje je zajedno s kolegicom Antonijom Begonjom izradila rad pod vodstvom prof.dr.sc. Jozsefa Petrika. Rad je nagrađen Rektorovom nagradom 1999. Diplomirala je 1999. stekavši zvanje diplomiranog inženjera medicinske biokemije.

Obavila je pripravnički staž na Odjelu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku u KBC Split gdje se 2001. i zaposlila.

Poslijediplomski studij iz Medicinske biokemije upisuje 2003. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

U KBC-u Split obavlja specijalistički staž od 2004-2007. te polaže specijalistički ispit 2007.

Od 2007. zaposlena je na mjesto specijalista medicinske biokemije u Zavodu za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split.

Sudjeluje u nastavi na Medicinskom fakultetu Splitu kao vanjski suradnik te na Katedri za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Zdravstvenog studija Sveučilišta u Splitu u zvanju predavača.

Aktivni je član Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu i Hrvatske komore medicinskih biokemičara.

Aktivno je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova i kongresa. Autor je i koautor više znanstvenih i stručnih radova.

### **Popis znanstveni i stručnih članaka:**

1. Petrik J, Koszegi T, Begonja A, Bilopavlovic N, Juretic D, Kellermayer M, Čepelak I, Žanić Grubisic T, Pepeljnjak S. Učinak okratoksina A na apoptozu, nekrozu i razinu

- staničnog ATP-A u RK13 i LLC-PK1 bubrežnim stanicama. Treći Hrvatski kongres medicinskih biokemičara, sažeci, *Biochemia Medica* 1999;9
2. Salamunić I, Bilopavlović N, Juretić D. Effect of hemodialysis on serum bilirubin in patients with chronic renal failure. 7th International Alps-Adria Congress for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; abstracts. Regensburg, 2002. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
  3. Baković D, Eterović D, Saratlija-Novaković Z, Palada I, Valić Z, Bilopavlović N, Dujic Z. Effects of human splenic contraction on variation in circulating blood cell count. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005 Nov;32(11):944-51.
  4. Ljubkovic M, Gaustad SE, Marinovic J, Obad A, Ivancev V, Bilopavlovic N, Breskovic T, Wisloff U, Brubakk A, Dujic Z. Ultrasonic evidence of acute interstitial lung edema after SCUBA diving is resolved within 2-3h. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010 Apr 30;171(2):165-70. doi: 10.1016/j.resp.2010.02.008. Epub 2010 Feb 24.
  5. Marinovic J, Ljubkovic M, Breskovic T, Gunjaca G, Obad A, Modun D, Bilopavlovic N, Tsikas D, Dujic Z. Effects of successive air and nitrox dives on human vascular function. *Eur J Appl Physiol*. 2012 Jun;112(6):2131-7. doi: 10.1007/s00421-011-2187-6. Epub 2011 Oct 1.
  6. Bilopavlovic N, Marinovic J, Ljubkovic M, Obad A, Zanchi J, Pollock NW, Denoble P, Dujic Z. Effects of repetitive SCUBA diving on humoral markers of endothelial and central nervous system integrity. *Eur J Appl Physiol*. 2013 Jul;113(7):1737-43. doi: 10.1007/s00421-013-2600-4. Epub 2013 Feb 12.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko – biokemijski fakultet

Doktorski rad

## UTJECAJ RONJENJA S KOMPRIMIRANIM PLINSKIM SMJESAMA NA VASKULARNU FUNKCIJU I HUMORALNE BILJEGE INTEGRITETA ENDOTELA I SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA

Nada Bilopavlović

**Uvod:** Ronjenje s komprimiranim plinovima je često praćeno stvaranjem plinskih mjehurića u krvi i hiperoksijom, što se smatra mogućim uzrocima endotelne disfunkcije nakon ronjenja. Endotelna disfunkcija se povezuje s asimptomatskim kardiovaskularnim i neurološkim promjenama nakon ronjenja s komprimiranim plinovima.

Cilj ove disertacije je istražiti fiziološke i biokemijske promjene vaskularne i endotelne funkcije, te ispitati ima li znakova narušenog integriteta SŽS-a nakon ronjenja s komprimiranim plinskim smjesama. Pritom su testirane sljedeće hipoteze: asimptomatski zaroni s komprimiranim zrakom će uzrokovati promjene biokemijskih parametara endotelne funkcije i oksidacijskog stresa; asimptomatski zaroni će imati različiti utjecaj na vaskularnu funkciju s obzirom na vrstu korištene plinske smjese za disanje; asimptomatski zaroni će u prisutnosti arterijalizacije plinskih mjehurića uzrokovati porast koncentracije humoralnih biljega oštećenja endotela i središnjeg živčanog sustava.

**Metode i ispitanici:** Istraživanje je obuhvatilo tri studije. U prvoj studiji na 15 ispitanika istražene su promjene sljedećih parametara nakon ronjenja s komprimiranim zrakom: vWf-a, PAI-1-a, hsCRP-a kao pokazatelja endotelne funkcije, te adenzina, TBARS i FRAP kao pokazatelja oksidacijskog statusa uz istovremeno praćenje stupnja stvaranja mjehurića. U drugoj studiji na 10 ispitanika uspoređivan je utjecaj ronjenja sa zrakom i ronjenja s nitrox-om na vaskularnu funkciju ispitivanjem promjena pokazatelja arterijske elastičnosti: brzine pulsog vala i augmentacijskog indeksa; pokazatelja endotelne funkcije mjerenjem protokom posredovane dilatacije (FMD); te koncentracije nitrita u plazmi. Usporedba je uključivala i stupanj stvaranja mjehurića nakon zarona. U trećoj studiji na 16 ispitanika istraženo je dovodi li arterijalizacija mjehurića do promjene koncentracije endotelina-1, S100-B i NSE u krvi odnosno do pojave znakova narušenog integriteta endotela i središnjeg živčanog sustava.

**Rezultati:** Ronjenje je uzrokovalo značajno stvaranje plinskih mjehurića u sve tri studije. Arterijalizacije su zabilježene u sve tri studije i bile su praćene visokim stupnjem stvaranja mjehurića. Značajno veći stupanj stvaranja mjehurića i češće arterijalizacije uslijedili su nakon ronjenja sa zrakom u odnosu na nitrox. Indikatori arterijske elastičnosti pokazali su oprečne promjene nakon ronjenja s obje plinske smjese. Brzina pulsog vala je porasla sugerirajući porast krutosti arterija, dok se augmentacijski indeks smanjio nakon ronjenja. Ronjenje s nitrox-om pokazuje veći učinak na protokom posredovanu dilataciju u odnosu na ronjenje sa zrakom upućujući na veći utjecaj hiperoksije na endotelnu funkciju od plinskih mjehurića. Ronjenje sa zrakom u prvoj studiji nije polučilo promjenu oksidacijskog statusa izuzev blagog porasta antioksidacijskog kapaciteta nakon ronjenja. Mjerenje endotelnih parametara nije otkrilo promjene izuzev PAI-1 u prvoj studiji koji pokazuje pad aktivnosti nakon ronjenja. Promjenu humoralnih biljega oštećenja SŽS-a u vidu porasta nakon ronjenja otkriva samo S-100B, ali bez dokaza o oštećenju integriteta SŽS-a budući se sličan porast očitovao i nakon kontrolnog zarona bez stvaranja plinskih mjehurića i arterijalizacije.

**Zaključak:** Ovim istraživanjem je pokazano da asimptomatski zaroni sa zrakom ne uzrokuju promjene biokemijskih pokazatelja endotelnog oštećenja unatoč prisutnosti plinskih mjehurića u krvi, te da je potaknuta antioksidacijska obrana mogućim mehanizama zaštite od endotelne disfunkcije. Značajniji negativni učinak nitrox-a na endotel u odnosu na zrak, unatoč manjem stvaranju plinskih mjehurića i njihovoj rjeđoj arterijalizaciji, upućuje na endotelno oštećenje uzrokovano hiperoksijom i na potrebu za dodatnim istraživanjima mehanizama endotelnih promjena.

Broj stranica:85; broj slika:15; broj tablica: 6; broj literaturnih navoda:109; izvornih je na hrvatskom jeziku

**Rad je pohranjen:** u centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

**Ključne riječi:** plinski mjehurići, hiperoksija, endotelna disfunkcija, oštećenje SŽS-a

**Mentorica:** Izv.prof.dr.sc. Jasna Marinović Ljubković

**Ocjenjivači:** Prof.dr.sc. Tihana Žanić Grubišić

Izv. prof.dr.sc. Nada Vrkić

Doc.dr.sc. Boris Starčević

**Rad je prihvaćen:** 23.11.2016

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral thesis

### EFFECT OF SCUBA DIVING ON VASCULAR FUNCTION AND HUMORAL MARKERS OF ENDOTHELIAL AND CENTRAL NERVOUS SYSTEM INTEGRITY

**Background:** Diving with compressed gases (SCUBA diving) is often associated with occurrence of gas bubbles in the blood and hyperoxia, which are possible causes of endothelial dysfunction after diving. Endothelial dysfunction is associated with asymptomatic cardiovascular and neurological changes caused by SCUBA diving.

The aim of this study is to explore the physiological and biochemical changes of vascular and endothelial function, as well as to examine the signs of impaired CNS integrity after diving with compressed gas mixtures. The following hypotheses were tested: asymptomatic dives with compressed air will change the biochemical parameters of endothelial function and oxidative stress after dive; asymptomatic dives will have different effects on vascular function considering different types of breathing gases; and, finally, asymptomatic dives will cause increased levels of humoral markers of endothelial damage and CNS integrity due to arterializations of gas bubbles.

**Methods:** Three studies were performed. The first study including 15 participants examined changes of vWf, PAI-1 and hsCRP which served as indicators of endothelial function, as well as adenosine, TBARS and FRAP as indicators of oxidative state while the bubble grades were also monitored after dives with compressed air. In the second study that included 10 divers, the effects of diving with air and nitrox on vascular function were compared by examining the indicators of arterial elasticity: pulse wave velocity and augmentation index; indicators of endothelial function through assessment of flow-mediated dilation (FMD) and nitrite concentrations in plasma; and assessment of bubble production. Third study which included 16 subjects examined whether bubble arterializations lead to increase in blood levels of endothelin-1, S-100B and NSE, which would suggest an impaired endothelium and CNS integrity.

**Results:** Diving resulted in significant production of bubbles in all three studies. Arterializations were recorded in all three studies and were accompanied by high bubble grade. Diving with air in the first study did not change the oxidative status with the exception of a slight increase in antioxidant capacity after diving. Assessment of endothelial parameters did not reveal any changes, except PAI-1, activity of which declined after diving. Air dives resulted in significantly greater degree of bubble formation as compared to nitrox and with more frequent arterializations. The indicators of arterial stiffness showed opposite changes after diving with both gas mixtures: pulse wave velocity has increased, suggesting an increase in arterial stiffness, while the augmentation index decreased after each dive. Diving with nitrox resulted in significantly more decreased flow-mediated dilation as compared to diving with air, thus indicating a greater effect of hyperoxia on the endothelial function *versus* gas bubbles. Measurement of humoral markers of CNS integrity revealed an increase in blood levels of S100-B, but without evidence of impaired CNS integrity due to similar increases after a control dive (without significant bubble formation and arterializations).

**Conclusions:** It was found that asymptomatic dives with air do not affect levels of biochemical indicators of endothelial function despite significant degree of gas bubbles in the blood. The triggered antioxidant defense could be the potential mechanism of protection against endothelial dysfunction. Significantly greater negative effect on endothelial function of nitrox as compared to air diving, that occurred despite lower bubble grade and less frequent arterializations, suggests hyperoxia-induced damage and points to necessity of further investigations on the mechanisms of endothelial changes after asymptomatic dives.

**Keywords:** gas bubbles, hyperoxia, endothelial dysfunction, diving, CNS integrity

Number of pages: 85; number of figures: 15; number of tables: 6; number of references: 109; the original is written in Croatian

**Supervisor:** Associate Professor Jasna Marinović Ljubković, PhD.

**Reviewers:** Full Professor Tihana Žanić Grubišić, PhD

Associate Professor Nada Vrkić, PhD

Assistant professor Boris Starčević, PhD

**Accepted :** 23<sup>rd</sup> November 2016.