

# Utjecaj subpresorskih doza angiotenzina II na promjenu genskog izražaja antioksidativnih enzima pri unosu visokih koncentracija soli kod Sprague-Dawley štakora

---

Vuković, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:752236>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Sveučilišni diplomski studij medicinsko-laboratorijske  
dijagnostike**

**Martina Vuković**

**Utjecaj subpresorskih doza angiotenzina II  
na promjenu genskog izražaja  
antioksidativnih enzima pri unosu visokih  
koncentracija soli kod Sprague-Dawley  
štakora**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Sveučilišni diplomski studij medicinsko-laboratorijske  
dijagnostike**

**Martina Vuković**

**Utjecaj subpresorskih doza angiotenzina II  
na promjenu genskog izražaja  
antioksidativnih enzima pri unosu visokih  
koncentracija soli kod Sprague-Dawley  
štakora**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Odsjek za fiziologiju i imunologiju

Mentorica rada: doc. dr. sc. Anita Matić, dipl. ing.

Rad ima 28 listova, 1 tablicu i 6 slika.

## **ZAHVALA**

*Veliku zahvalnost, prije svega, dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Aniti Matić na iskazanom povjerenju, vodstvu i korisnim raspravama tijekom izrade ovoga rada. Isto tako zahvaljujem i na svim potrebnim materijalima i savjetima.*

*Zahvaljujem svim prijateljima koji su mi ovo razdoblje života učinili ljepšim i zabavnijim.*

*Posebnu i najveću zahvalnost upućujem svojoj obitelji, roditeljima i dečku koji su najzaslužniji za to gdje sam sada i koji su bili sa mnom u svim mojim usponima i padovima, uspjesima i neuspjesima.*

*Velika HVALA svima!*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Natrijev klorid .....	1
1.1.1. Unos visokih koncentracija soli u organizam .....	1
1.1.2. Utjecaj soli na kardiovaskularni sustav .....	2
1.1.3. Utjecaj soli na endotelnu funkciju.....	3
1.2. Oksidativni stres i slobodni radikali.....	3
1.3. Antioksidansi.....	4
1.3.1. Enzimski antioksidansi.....	4
1.3.2. Neenzimski antioksidansi.....	6
1.4. Unos kuhinjske soli i oksidativni stres.....	7
1.5. Renin-angiotenzin-aldosteronski sustav i angiotenzin II .....	7
2. HIPOTEZA.....	8
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	9
4. MATERIJALI I METODE.....	10
4.1. Materijali .....	10
4.2. Metode.....	10
4.2.1. Izolacija RNA.....	11
4.2.2. PCR u realnome vremenu (eng. Real-Time Polymerase Chain Reaction) .....	12
4.3. Statističke metode .....	13
5. REZULTATI .....	14
5.1. Izmjerene vrijednosti tjelesne mase i srednjeg arterijskog tlaka životinja.....	14
5.2. Relativan genski izražaj antioksidativnih enzima u moždanim krvnim žilama .....	15
5.2.1. Genski izražaj SOD izoformi .....	15
5.2.2. Genski izražaj glutacion peroksidaza 1 i 4 (GPx1 i GPx4) .....	17
5.2.3. Genski izražaj katalaze u krvnim žilama mozga.....	18
6. RASPRAVA.....	19
7. ZAKLJUČCI .....	21
8. SAŽETAK .....	22
9. SUMMARY.....	23
10. LITERATURA .....	24
11. ŽIVOTOPIS.....	28

## **POPIS KRATICA**

ANG II – angiotenzin II

AT1 – angiotenzin II receptor tipa I

AT2 – angiotenzin II receptor tipa II

CAT – katalaza

Cl – klor

CRASH – Croatian Action on Salt and Health

Cu/Zn SOD – bakar/cink superoksidna dismutaza

EC-SOD/SOD3 – izvanstanična bakar-cinkova superoksidna dismutaza

FAD – flavin adenin dinukleotid

FeSOD – željezova superoksidna dismutaza

GPX – glutation peroksidaza

GR – glutation reduktaza

GSH – glutation

KVB – kardiovaskularne bolesti

MnSOD – manganova superoksidna dismutaza

NaCl – natrijev klorid

NiSOD – niklova superoksidna dismutaza

OS – oksidativni stres

PMA – farbol 12-miristat 13-acetat

ROS – slobodni kisikovi radikali

SOD – superoksid dismutaze

SOD1 – unutarstanični bakar-cinkova superoksidna dismutaza

SOD2 – mitohondrijska manganova superoksidna dismutaza

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija



## 1. UVOD

### 1.1. Natrijev klorid

Mineral NaCl (natrijev klorid) dolazi u obliku prozirnih kristala, dobro topljivih u vodi, relativne molekulske mase 58,4 Da, tališta 801 °C i vrelišta 1465 °C (1). Osim toga što je dobro topljiv u vodi, NaCl je topljiv i u metanolu, etanolu i tekućem amonijaku. U prirodi je ovaj anorganski spoj vrlo rasprostranjen i može se naći u moru, slanim jezerima i kao kamena sol u velikim naslagama. Natrijev klorid ima široku uporabu u industriji, ali i kao glavni sastojak kuhinjske soli. Hranom se unosi oko 8 do 15 g NaCl na dan, a time se unosi oko 140 – 260 mmola Cl<sup>-</sup>, što zadovoljava potrebe organizma (2).

#### 1.1.1. Unos visokih koncentracija soli u organizam

Kuhinjska je sol u umjerenim količinama nužna i važna za ljudsko zdravlje jer ima ključnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima u organizmu. Ona ima važnu ulogu u formiranju okusa i teksture hrane. Upotreba kuhinjske soli u pripremi jela kao začina, ali i kao konzervansa u raznim proizvodima premašuje dnevnu potrebu ljudskog organizma. Takav prekomjerni unos soli rezultat je nesvjesnog zasoljavanja namirnica koje već u sebi sadržavaju dovoljnu količinu soli. Zbog neznanja, loših prehrambenih navika i pretjerane uporabe, kuhinjska sol danas uzrokuje više štete nego dobrobiti za ljudski organizam (3). Istraživanjima se potvrđuje da je kuhinjska sol bitan čimbenik za nastanak povišenoga krvnog tlaka i arterijske hipertenzije. Opažena je povezanost s koronarnom bolesti, hipertrofijom lijeve klijetke, moždanim udarom te mikroalbuminurijom (4). Uz navedene bolesti postoji dokaz da prekomjerni unos soli može uzrokovati i pojedine oblika karcinoma probavnog sustava, primjerice karcinom želudca i nazofaringealni karcinom. Najviše soli unosimo jedući gotovu i polugotovu hranu, hraneći se u restoranima. Samo neki od primjera polugotove i gotove hrane koja je značajan izvor skrivene soli jesu grickalice, kruh i pekarski proizvodi, suhomesnati proizvodi, tvrdi sirevi, sirni namazi, kukuruzne pahuljice, gotovi umaci, senf, majoneza i dr. Količina soli koju unosimo u organizam uvelike ovisi o prehrambenim navikama svakog čovjeka. Najčešće do 20 % ukupnoga dnevnog unosa soli potječe od hrane koja prirodno sadržava sol. Naknadnim dosoljavanjem hrane kuhinjskom solju unesemo oko 15 % ukupno unesene soli (5). Ostatak od 75 % ukupno unesene soli, potječe od procesiranih namirnica koje najčešće i ne percipiramo kao slane jer sol prisutna u tim namirnicama oku

nije vidljiva (5). Preporuka za dnevni unos soli u organizam razlikuje se ovisno o dobnim skupinama i zdravstvenom statusu pojedinca. Prema navodima strateškoga plana za smanjenje prekomjernog unosa kuhinje soli u Republici Hrvatskoj 2015. – 2019., koju provodi Croatian Action on Salt and Health (CRASH), suvremenim prehrambenim navikama na dan unosimo čak od pet do deset grama kuhinjske soli više nego što je organizmu potrebno. Prema preporukama Svjetske zdravstvene organizacije, preporučena količina kuhinjske soli iznosi 5 grama/dan (2 g natrija), dok se u Republici Hrvatskoj, prema posljednjim istraživanjima, u prosjeku na dan unese približno dvostruka količina s obzirom na preporučenu dnevnu količinu (11,6 g/dan približno dvostruka količina) (6). Količina soli u proizvodima može se ocijeniti kao visoka, srednja ili niska. Visoka količina soli smatra se udjelom natrijeva klorida između 1,5 g na 100 g proizvoda, srednja razina udjela kuhinjske soli iznosi 0,3 – 1,5 g na 100 g proizvoda, dok je niska količina < 0,3 g soli na 100 g proizvoda (7). Kada bi se u Hrvatskoj dnevni unos soli smanjio za 1,2 g, broj osoba s hipertenzijom smanjio bi se za 150 000, a godišnje bi bilo 2500 manje infarkta srca i 3500 manje moždanih udara, a time bi postigla i ušteda na lijekovima i troškovima liječenja.

### **1.1.2. Utjecaj soli na kardiovaskularni sustav**

Glavni uzrok povišenoga krvnog tlaka, koji je i u najvećoj mjeri odgovoran za porast krvnog tlaka koji se događa gotovo svim osobama kad odrastu, naša je sadašnja visoka potrošnja soli. KVB su vodeći uzrok smrti i invaliditeta u svijetu: više od 17,5 milijuna ljudi svake godine umre od kardiovaskularnih bolesti (8). Ishemijska srčana bolest (npr. srčani udar) odgovorna je za 7,3 milijuna od ukupnoga broja kardiovaskularnih smrti, a cerebrovaskularne bolesti (npr. moždani udar) odgovorne su za 6,2 milijuna smrti (9). KVB negativno utječu na kvalitetu života jer bolesnici često izbjivaju sa svojih radnih mjesta, što za posljedicu ima smanjenu efikasnost u radu i poslovnom životu. Ako tijekom određenog razdoblja osoba ima krvni tlak viši od granične vrijednosti, 140/90 mmHg, smatra se da boluje od hipertenzije. Neliječena hipertenzija može uzrokovati razvoj drugih bolesti kao što su bolesti miokarda, moždani udar, oštećeje bubrega, angina pectoris i ateroskleroza. Postoje brojni rizični čimbenici za nastanak hipertenzije i mogu se podijeliti na čimbenike na koje se može utjecati i čimbenike na koje se ne može utjecati (dob, spol). U čimbenike na koje se može utjecati ubrajamo pušenje, prekomjerna tjelesna masa, nedovoljno tjelesne aktivnosti i nepravilna prehrana, odnosno svi čimbenici koji ovise o stilu života. Kuhinjska je sol ključan čimbenik rizika za pojavu arterijske hipertenzije. Povećani unos kuhinjske soli u ljudskom

organizmu uzrokuje povećani arterijski tlak kao fiziološki odgovor kojemu je svrha održati homeostazu (1).

### **1.1.3. Utjecaj soli na endotelnu funkciju**

Krvne žile obavijene su s unutrašnje strane tankim slojem zvanim endotel. Njegove su najvažnije funkcije: kontrola vaskularnoga tonusa, inhibicija agregacije trombocita, modulacija migracije leukocita, regulacija proliferacije glatkih mišićnih stanica i moduliranje propusnosti vaskularne stijenke (10). Endotelne stanice imaju ulogu u autokrinom, parakrinom i endokrinom lučenju i na takav način djeluju na stanične linije kao što su trombociti, leukociti i glatke mišićne stanice. U uvjetima bolesti nastaje gubitak normalne funkcije endotela, „disfunkcija endotela“, koju karakterizira smanjena bioraspodjelivost dušikova oksida ili povećanje slobodnih kisikovih radikala. Kada se pojavi disfunkcija endotela, dolazi do smanjene vazodilatacije, proupalnih stanja i protrombičkih svojstava. Disfunkcija endotela neovisni je prediktor kardiovaskularnog rizika (11). Nastaje starenjem, ali i zbog drugih bolesti povezanih s kardiovaskularnim rizikom. U istraživanjima je dokazano da unošenje soli u većoj količini može smanjiti endotelnu funkciju i protok u krvnim žilama, što za posljedicu ima povećanje razine superoksida i drugih reaktivnih kisikovih radikala zbog smanjena serumskog angiotenzina II, a to pak uvjetuje nastanak povećanoga oksidativnog stresa. Povećani oksidativni stres u stijenci krvnih žila uzrokuje aktivaciju endotela i razvoj upale, što rezultira aterogenim procesima i razvojem kardiovaskularnih bolesti.

## **1.2. Oksidativni stres i slobodni radikali**

Oksidativni stres posljedica je prekomjerne produkcije reaktivnih spojeva kisika (oksidansi, radikali) zbog poremećaja u ravnoteži oksidacijsko-redukcijskih procesa u biološkim sustavima (12). Pomaka ravnoteže nastaje kada je smanjena antioksidativna obrana organizma ili ako je povećano stvaranje slobodnih kisikovih radikala (ROS), pri čemu dolazi do gubitka ravnoteže stvaranja slobodnih radikala i mogućnosti neke stanice da ih razgradi, a rezultira promjenama vezanim za oštećenje stanica, odnosno oksidativni stres uzrokuje oštećenje strukture i funkcije brojnih biomolekula, što se očituje promjenama u stanicama, tkivima i organima. Tako nastala oštećenja mogu narušiti homeostazu iona, prijenos signala u stanici, gensku transkripciju i uzrokovati druge poremećaje (13). Oksidativni stres pridonosi mnogim patološkim stanjima i bolestima, uključujući rak, neurološke poremećaje,

aterosklerozu, hipertenziju, ishemiju/perfuziju, dijabetes, sindrom akutnoga respiratornog distresa, idiopatsku plućnu fibrozu, kroničnu opstruktivnu plućnu bolest i astmu (14). ROS proizvode živi organizmi kao rezultat normalnoga staničnog metabolizma i okolišnih čimbenika u koje ubrajamo onečišćivače zraka ili dim cigareta. Slobodni su radikali definirani kao vrste koje sadržavaju jedan ili više nesparenih elektrona, a upravo takva, nepotpuna elektronska ljuska daje visoku reaktivnost (15). Slobodni radikali mogu se generirati iz mnogih elemenata, ali u biološkim sustavima najvažniji su oni koji uključuju kisik i dušik (15). U slobodne kisikove radikale ubrajamo superoksidni radikal, hidroksilni radikal, peroksidni radikal, hipokloritnu kiselinu, vodikov peroksid, ozon i singlet kisik. Hidroksilni je radikal najreaktivniji, odnosno odlikuje se niskom specifičnošću prema supstratu i kratkim vremenom poluživota (16).

### **1.3. Antioksidansi**

Ljudsko tijelo sadržava antioksidanse koji u maloj količini i u kratkome vremenu neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i drugih oksidansa. Oni nastaju u stanici ili se u organizam unose hranom, a u slučaju nedovoljne produkcije u tijelu ili nedostatnih količina u hrani, potrebno je uzimati dodatke prehrani. Antioksidansi onemogućuju stvaranje slobodnih radikala u organizmu, uništavaju stvorene slobodne radikale ili popravljaju oštećenja u stanici nastala djelovanjem slobodnih radikala. Svaki antioksidans na određen način pridonosi očuvanju ljudskoga zdravlja. Najbolji su izvori oni prirodni poput voća i povrća, zbog čega je upravo njihov redoviti unos u organizam od velike važnosti. Antioksidativna zaštita organizma, koja uključuje enzimske i neenzimske tvari, održava ravnotežu stvaranjem slobodnih radikala u granicama homeostaze te sprječava širenje reakcije slobodnih radikala koja može prouzročiti oštećenje tkiva (17).

#### **1.3.1. Enzimski antioksidansi**

Ključni enzimski antioksidansi koji sudjeluju pri neutralizaciji ROS-a jesu superoksidna dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza i glutation reduktaza. Osim tih, glavnih enzima, u ovu skupinu ubrajaju se još i hem oksigenaza i redoks-proteini (tioredoksini, peroksiredoksini i glutaredoksini). Antioksidativni su enzimi najvažniji „borci“ protiv viška reaktivnih vrsta na staničnoj razini, bilo da djeluju izravno na njihovu degradaciju ili regeneracijom neenzimskih antioksidansa (18). Superoksidna dismutaza (SOD) jedna je od osnovnih unutarstaničnih

antioksidativnih obrana u tijelu, a katalizira dismutaciju superoksida u kisik i vodikov peroksid, što je čini vrlo važnim antioksidativnim čimbenikom koji služi u obrani svih stanica koje sudjeluju u procesu aerobnog metabolizma. Superoksidne su dismutaze metaloenzimi koji kataliziraju disproporcioniranje superoksidnog aniona na molekularni kisik i vodikov peroksid (19). Oni mogu sadržavati željezo, mangan, nikal te bakar i cink koji promjenom svojega oksidacijskog stanja daju funkciju enzimu (19). Željezova superoksidna dismutaza (FeSOD) smatraju se najstarijim oblikom SOD-a jer su prisutne u svim domenama. FeSOD posjeduje dimernu strukturu i svaki od monomera sadržava aktivno mjesto. Prisutna je u mnogim primitivnim organizmima, ali za sada nisu pronađeni u životinjama i gljivama, a u biljkama su prisutni u kloroplastima. Sličnu proteinsku strukturu posjeduje manganova superoksidna dismutaza (MnSOD). MnSOD je zamijenio FeSOD tijekom evolucije, a prvi oblik ovog enzima u dimernom obliku otkriven je u *E. coli*. MnSOD se u prokariota nalazi u citosolu dok se u eukariotskim stanicama nalazi većinom u mitohondrijskom matriksu (SOD2), a u biljkama u kloroplastima. SOD2 iz stanica čovjekove jetre jest homotetramer, a masa jedne monomerne jedinice iznosi 23 kDa (19). Niklove superoksidne dismutaze (NiSOD) prisutne su u bakterijama i u nekim cijanobakterijama. NiSOD se razlikuje od MnSOD, FeSOD i CuSOD po slijedu aminokiselina. Analizom kristalne strukture iz *Streptomyces seoulensis* otkriveno je da je NiSOD homoheksamer mase 80 kDa sastavljen od monomera mase 13,4 kDa (19). Bakar-cinkova superoksidne dismutaze u sisavcima se nalaze u dvama oblicima. Unutarstanični oblik naziva se SOD1, a izvanstanični EC-SOD (SOD3). SOD 3 smješten je u stijenci krvne žile, pretežito između endotela i vaskularnih mišića, a njegova se aktivnost može mijenjati kao odgovor na različite podražaje kao što su hipertenzija, ateroskleroza i dijabetes. Katalaza je široko rasprostranjen enzim i nalazi se u prokariota i eukariota. Ona je tetramer sastavljen od četiriju polipeptidnih lanaca (svaki sadržava više od 500 aminokiselina). CAT katalizira disproporcionaciju vodikova peroksida u kisik i vodu. Najčešće se nalaze u peroksisomima, smatraju se mjestom najveće produkcije vodikova peroksida, a, osim peroksisoma može se naći i u mitohondrijima, kloroplastu, citosolu te izvan stanice kao slobodni ili enzimi vezani za membranu. Glutation-peroksidaza uključena je u zaštitu od oksidativnog stresa, pri čemu glutacion služi kao supstrat (20). GPX su grupe enzima koji kataliziraju redukciju vodikova peroksida u vodu i kisik, pri čemu dolazi do oksidacije glutaciona. Razlikuje se od CAT-a po tome što može reducirati i organske perokside nastale oštećenjem membrana u alkohole i kisik. Glutacion u sebi sadržava sposobnost vraćanja najvažnijih vitamina u njihov aktivni oblik (vitamini C i E). Također se smatra i glavnim izvorom zaštite od blagoga oksidativnog stresa s obzirom na katalazu koja je

važnija u zaštiti od teškoga oksidativnog stresa. GPX je tetramer i sadržava cistein u aktivnome mjestu, dok je GR dimer i sadržava flavinsku skupinu u obliku flavin adenin dinukleotida (FAD). GR se nalazi u citosolu, mitohondrijima, kloroplastima i peroksisomima.

### 1.3.2. Neenzimski antioksidansi

Uz enzimске antioksidanse, veliku ulogu u održavanju oksidativnog stresa imaju i neenzimski antioksidansi. Glutation je tripeptid koji sadržava reduciranu SH skupinu i djelotvoran je u uklanjanju vodikova peroksida, hidroksilnih radikala i kloriranih oksidansa. Najvažniji je sustav za održavanje redoks-ravnoteže u stanicama svih eukariota i u nekih prokariota. Osim toga, ima važnu ulogu u regulaciji proliferacije limfocita, produkciji imunoglobulina te u sintezi citokina. U citosolu se nalazi u milimolarnim koncentracijama, a u izvanstaničnim tekućinama ima ga mnogo manje. GSH se smatra neprikladnim biomarkerom oksidativnog stresa jer stopa njegove sinteze ovisi o dostupnosti cisteina pa se zbog toga za praćenje nastanka OS-a primjenjuje mjerenje aktivnosti o GSH-u ovisnih enzima: GPX i GR.  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E) važan je za zaštitu strukture stanične membrane od lipidne peroksidacije i prekida kaskadu kojom nastaju načelno toksičniji radikali. Koncentracije vitamina E u serumu ovise o jetri koja uzima hranjivu tvar nakon što se razni oblici apsorbiraju iz tankoga crijeva (21). Apsorpcija vitamina E u tankome crijevu obavlja se uz prisutnost želučanih kiselina. Može se naći prirodno u nekim namirnicama poput ulja pšeničnih i kukuruznih klica, maslinovu ulju, bademima, kikirikiju, jajima i u nekim mliječnim proizvodima. Čovjekova je dnevna potreba oko 15 mg (2). Askorbinska kiselina (vitamin C) prisutna je unutar i izvan stanice, a ima važnu ulogu u uklanjanju superoksidnog i hidroksilnog radikala, pri čemu nastaje semihidroaskorbinska kiselina. Snažan je antioksidans kojem je funkcija borba protiv bakterijskih infekcija, detoksikacija te stvaranje kolagena u fibroznom tkivu, koži i kapilarama (22). Topljiv je u vodi i vitaminima s koenzimskim djelovanjem. Čovjekova dnevna potreba za vitaminom C dvostruko je veća nego za ostalim vitaminima, a iznosi oko 70 mg.

#### 1.4. Unos kuhinjske soli i oksidativni stres

Brojna su istraživanja na pokusnim životinjama pokazala da je unos visokih koncentracija soli povezan s oksidativnim stresom. Velike doze soli uzrokuju oštećenja mikrocirkulacije, kao i porast arterijskoga tlaka i slobodnih kisikovih radikala. U štakora hranjenih visokoslanom dijetom došlo je do endotelne stanične apoptoze i indukcije ROS-a (23). Unosom prekomjerne količine soli povećava se razina bazalnoga unutarstaničnog ROS-a u limfocitima koji su izolirani iz mezenteričnih limfnih čvorova i slezene. Uz ovo povećanje povećava se unutarstanična proizvodnja ROS-a u perifernim limfnim čvorovima nakon PMA stimulacije. Tim se unosom neće doći bitno promijeniti arterijski tlak jer natrijev klorid narušava oksidativnu ravnotežu te uzrokuje poremećaj funkcije krvnih žila.

#### 1.5. Renin-angiotenzin-aldosteronski sustav i angiotenzin II

Renin-angiotenzin-aldosteronski sustav sudjeluje u regulaciji krvnoga tlaka, regulaciji tkivne perfuzije i u homeostazi elektrolita. Smatra se ključnim čimbenikom u raznim slučajevima prirodne hipertenzije kao što je uspješno liječenje s pomoću inhibitora angiotenzin-konvertirajućeg enzima i blokatorima ANG II receptora. Najvažniji hormon toga sustava jest angiotenzin II, oktapeptidni hormon, koji ima važnu ulogu u kardiovaskularnoj homeostazi. Angiotenzin II djeluje vazokonstriktorno na venule povećavajući volumno opterećenje (preload) i udarni volumen, odnosno sistolički tlak (24). Istodobno djeluje vazokonstriktorno na arteriole, povećavajući tlačno opterećenje (*afterload*) i podižući dijastolički tlak (24). Poznata su dva angiotenzinska receptora: angiotenzin II receptor tipa 1 (AT1) i angiotenzin II receptor tipa 2 (AT2). AT1 receptori imaju ulogu u vazokonstrukciji te potiču otpuštanje aldosterona, endotelina i vazopresina. Uz sve navedeno još potiču i aktivaciju simpatikusa, reapsorpciju natrija u tubulima, fibrozu u stijenci krvne žile i miokardu, povećavaju kontraktilnost miokarda i mogućnost nastajanja srčanih aritmija. Učinci stimulacije AT2 slabije su poznati. Smatra se da se njihovom stimulacijom postiže antiproliferativni učinak te se potiče diferencijacija stanica i regeneracija tkiva.

## **2. HIPOTEZA**

Subpresorske doze angiotenzina II povećat će izražaj antioksidativnih enzima u moždanim krvnim žilama u muških Sprague-Dawley štakora na prehrani s visokih udjelom kuhinjske soli.



### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je ispitati promjenu genskog izražaja antioksidativnih enzima u moždanim krvnim žilama primjenom subpresorskih doza ANG II pri visokom unosu soli.

### 4. MATERIJALI I METODE

#### 4.1. Materijali

Istraživanje se provodilo na zdravim, muškim Sprague-Dawley štakorima starosti 10 tjedana (N = 6 – 8). Veličina je uzorka je određena s pomoću programa Sigma Plot v11.0. Za snagu testa od 0,8, p vrijednost manju od 0,05 i uz minimalnu očekivanu razliku od 0,25 iznosi 4 uzorka (životinje) po grupi.

Životinje su bile podijeljene u 3 skupine (N - broj životinja):

- 1) NISKOSLANA (NS) skupina (N = 6) - životinje su konzumirale standardnu hranu za laboratorijske štakore koja sadržava 0,4 % NaCl;
- 2) VISOKOSLANA (VS) skupina (N = 7) - životinje su tijekom sedam dana konzumirale specijalnu hranu s visokim udjelom soli od 4 %;
- 3) VISOKOSLANA + ANG II (VS + ANG II) skupina (N = 8) - životinje su tijekom 7 dana konzumirale specijalnu hranu s visokim udjelom soli od 4 %, a četvrtog dana takve prehrane bila joj je ugrađena angiotenzinska osmotska minipumpa koja je otpuštala 100 ng/kg/min angiotenzina tijekom 3 dana.

Navedena su istraživanja za provedbu odobrili Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa:602-04/14-08/06, Broj: 2158-61-07-14-119) te Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske i dio su HRZZ-ova projekta „Poremećena vazorelaksacija i endotelno- leukocitna interakcija u razvoju aterosklerotskih lezija“ – HRZZ IP-09-2014-6380 (V-ELI Athero), voditeljica prof. dr. sc. Ines Drenjančević.

#### 4.2. Metode

Uzorci su prikupljeni u Vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku i u Laboratoriju za mikrocirkulaciju. Pokusi genskog izražaja antioksidativnih enzima provodili su se u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju u sklopu Medicinskog fakulteta Osijek.

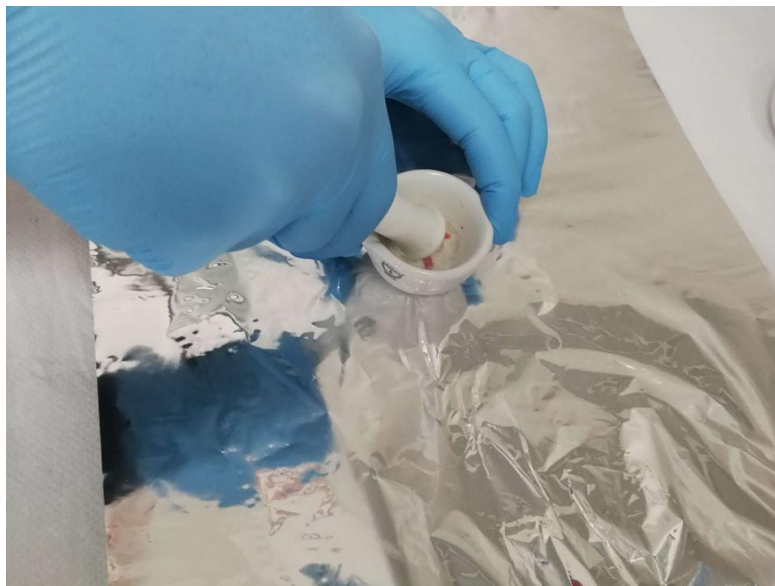
Nakon 7 dana dijetnog protokola životinje su bile izvagane, potom anestetizirane kombinacijom ketamina (75 mg/kg) i midazolama (2,5 mg/kg) te žrtvovane dekapitacijom. Uzorci izoliranih moždanih žila bili su prikupljeni i skladišteni do provođenja pokusa.

Za navedeno je istraživanje primijenjena molekularna metoda PCR u realnome vremenu. Utvrđivao se genski izražaj antioksidativnih enzima iz uzoraka štakorskih moždanih krvnih žila. Geni čiji je izražaj izmjeren u uzorcima jesu: izoforme superoksidne dizmutacije (Cu/Zn SOD, MnSOD, EC-SOD), katalaza te glutation peroksidaze 1 i 4 (GPx1 i GPx4). Izražaj gena obavljen je metodom PCR u realnome vremenu na uređaju Bio Rad CFX96.

Homogenizacija uzoraka provodila se po protokolu koji je preuzet iz znanstvenog rada: „Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction“. Chomczynski P, Sacchi N., Anal Biochem. 1987 Apr;162(1):156-9., a pročišćavanje uzoraka i dobivanje cDNA provodili su se prema uputama proizvođača Sigma-Aldrich i Applied Biosystems.

### 4.2.1. Izolacija RNA

Temeljni uvjet za analizu ekspresije gena i veličine transkripta jesu izolacija i priprema RNA visoke čistoće i integriteta. Homogenizacija uzoraka provedena je prema protokolu koji je preuzet iz znanstvenog rada „Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction“ (25). Izolacija uzoraka (moždane krvne žile) provedena je s pomoću tekućeg dušika u tarioniku i uzorak je usitnjen tučkom što je više bilo moguće. Nakon toga uzorku je dodan 1 mL trizola. Trizol je monofazna otopina fenola i gvanidinijeva izotiocijanata. Smatra se toksičnom tvari tekućeg stanja za odjeljivanje tkiva od RNA i DNA kako bi se dobio supernatant. Nakon trizola, dodano je 100 µL 1-brom-3-klorpropana da bi se svi slojevi odvojili. Zatim se uzorci naglim pokretima promućkaju oko 15 sekundi i ostave se na sobnoj temperaturi da bi se inkubirali 8 minuta. Uzorci se potom centrifugiraju na 9121 RPM-a 15 minuta. Nakon završetka postupka, supernatant se odvoji u nove, sterilne Eppendorf tubice, a u svaku takvu tubicu dodano je 500 µL izopropanola kako bi se RNA odvojila od staničnog sadržaja (DNA, proteini, lipidi i dr.). Potom su uzorci lagano promućkani 15 do 20 sekundi i inkubirani na sobnoj temperaturi 8 minuta. Uzorci su ponovno centrifugirani na 9121 RPM-a 8 minuta. Nakon centrifugiranja slijedilo je ispiranje s 1 mL 75 %-tnog etanola bez mućkanja uzoraka i centrifugiranje na 7211 RPM-a 5 minuta, a postupak s etanolom ponavljao se dva puta. Nakon čišćenja etanolom i sušenja uzoraka dodano je 30 µL čiste vode te je uslijedilo mjerenje koncentracije RNA i njezine čistoće.



**Slika 1.** Izolacija uzorka u tarioniku (izvor: original autorice rada)

#### 4.2.2. PCR u realnome vremenu (eng. Real-Time Polymerase Chain Reaction)

U ovom je istraživanju ekspresija gena metoda PCR u realnome vremenu provedena na uređaju Bio Rad CFX93, a uzorci su bili štakorske moždane krvne žile. PCR (lančana reakcija polimeraze) metoda je koja se primjenjuje u različitim područjima znanosti. Omogućuje brzu i uspješnu amplifikaciju DNA molekule te tako daje dovoljnu količinu željenoga produkta koji onda služi za daljnja istraživanja. Lančana reakcija polimeraze upotrebljuje se od 1984. godine, kada ju je američki znanstvenik Kary Mullis opisao za umnažanje DNA bez kloniranja u *in vitro* uvjetima. Ova se metoda primjenjuje u području molekularne dijagnostike, gdje su prepoznate sve njezine prednosti u razvoju dijagnostičkih testova u mikrobiologiji, dijagnostici nasljednih bolesti, dijagnostici neoplastičnih i malignih bolesti, u praćenju terapija i odgovora na terapiju, u forenzičkim i identifikacijskim dokazivanjima. Metoda je u osnovi vrlo jednostavna. *Real-time* PCR sustav metoda je koja se temelji na kombinaciji standardnog PCR-a i mjerenju fluorescencije. PCR amplificira i analizira rezultat u samo 30-ak minuta. RT-PCR je precizna i brža metoda u usporedbi sa standardnim PCR-om. Kvantitativna je metoda, što znači da su podatci o rastu količine produkata dostupni već tijekom reakcije i direktno su proporcionalni količini kalupa. Nedostatak te metode u odnosu prema standardnoj PCR metodi jest u tome što su skuplji reagensi i oprema. Primjenjuje se za kvantifikaciju ekspresije gena, detekciju patogena, SNP genotipizacije i sl. Reakcijska smjesa sadržava kalup (DNA, cDNA, RNA), oligonukleotidne

početnice, četiri deoksiribonukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Taq DNA polimerazu (ako je kalup RNA, enzim je reverzna transkriptaza), ione  $Mg^{2+}$ , PCR pufer i fluorescentnu boju (SYBR Green I) ili fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe. SYBR Green I je boja koja se veže u mali utor dvolančane DNA. Veže se nespecifično, neovisno o slijedu baza u DNA. Vezanjem za dvolančanu DNA jako fluorescira, a na jednolančanu se DNA ne veže. Nukleinske se kiseline eksponencijalno umnažaju ciklusima koji se ponavljaju. U svakom ciklusu prvo dolazi do razdvajanja roditeljske DNA, denaturacije, pri 95 °C, 15 s, zatim hlađenje na 55 do 60 °C koje omogućuje hibridizaciju, tj. sljepljivanje početnica s komplementarnim sljedovima. Optimalna duljina početnica jest 20 – 25 nukleotida. Zadnji je korak elongacija, sinteza novonastale DNA. Optimalna temperatura Taq DNA polimeraze za obavljanje elongacije iznosi 72 °C. U svakom se ciklusu broj DNA molekula udvostruči i novi lanac DNA u svakome idućem ciklusu kalup je za vezanje početnica i sintezu nove DNA.

### 4.3. Statističke metode

Numerički podatci su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između svih ispitivanih grupa (3 eksperimentalne grupe) neovisnih skupina su testirane analizom varijance (ANOVA), a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele, Kruskal-Wallisovim testom. Razina statističke značajnosti odredila se s  $p < 0,05$ . Primijenio se statistički program SigmaPlot verzija 11.2, Systat Software, Inc., Chicago, SAD.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Izmjerene vrijednosti tjelesne mase i srednjeg arterijskog tlaka životinja

U studiju je uključen 21 muški Sprague-Dawley štakor koji su slučajnim odabirom podijeljeni u 3 skupine (6 - 8 po skupini). Svakoj životinji je po završetku protokola izmjerena tjelesna masa i srednji arterijski tlak (vrijednost koja se dobije zbrajanjem dvostrukog dijastoličkog tlaka i sistoličkog tlaka te se dobivena vrijednost podijeli s tri).

**Tablica 1.** Aritmetička sredina izmjerenih vrijednosti tjelesne mase i srednjeg arterijskog tlaka

Pokusna skupina (N; broj životinja)	Aritmetička sredina (standardna devijacija)	
	Tjelesna masa (g)	Srednji arterijski tlak (mmHg)
NS (N = 6)	320 (10)	112 (3)
VS (N = 7)	340 (20)	114 (3)
VS+ANG II (N = 8)	345 (25)	114 (5)

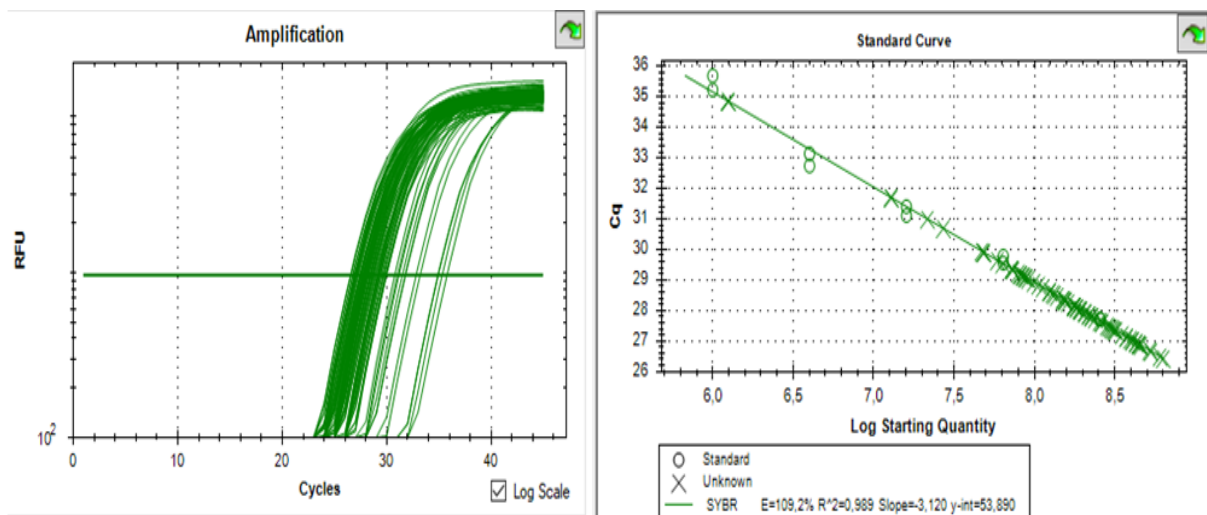
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija

NS - niskoslana skupina; VS - visokoslana skupina; VS + ANG II - visokoslana skupina + subpresorske doze ANG II

Nije utvrđena statistički značajna razlika u tjelesnoj masi između ispitivanih skupina ( $p = 0,085$ ; analiza varijance (ANOVA)) kao ni razlika u srednjem arterijskom tlaku ( $p = 0,579$ ; analiza varijance (ANOVA)) (Tablica 1.)

## 5.2. Relativan genski izražaj antioksidativnih enzima u moždanim krvnim žilama

Po završetku samog postupka određivanja izražaja svakog od ispitivanih gena, na samom pcr uređaju Bio Rad CFX96 dobije se ispis krivulja koje predstavljaju vrijednost relativnog izražaja gena te standardnu krivulju iz koje su izračunate navedene vrijednosti (Slika 2.).



**Slika 2.** Reprezentativni ispis rezultata izražaja gena te pripadajuće standardne krivulje (izvor: originalni ispis s uređaja Bio Rad CFX93 koji se nalazi u sklopu laboratorija za molekularnu i kliničku imunologiju)

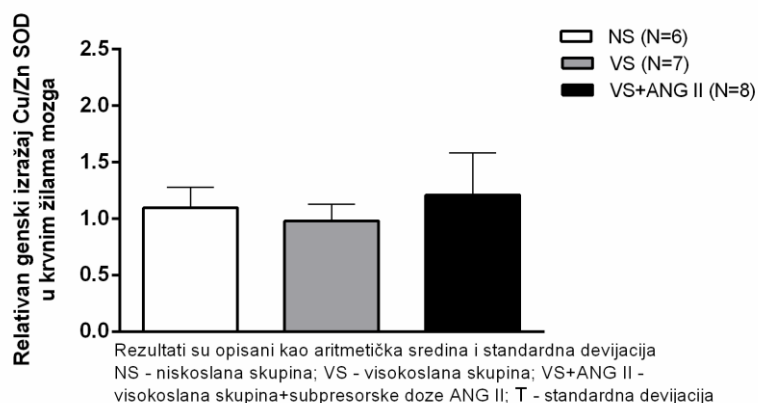
### 5.2.1. Genski izražaj SOD izoformi

Slika 3A. prikazuje relativan genski izražaj Cu/Zn SOD izoforme u krvnim žilama mozga za sve ispitivane skupine. Nije utvrđena statistički značajna razlika u genskom izražaju između ispitivanih skupina [NS 1,09 (0,18); VS 0,97 (0,14); VS+ANG II 1,20 (0,37),  $p = 0,272$ ; analiza varijance (ANOVA)].

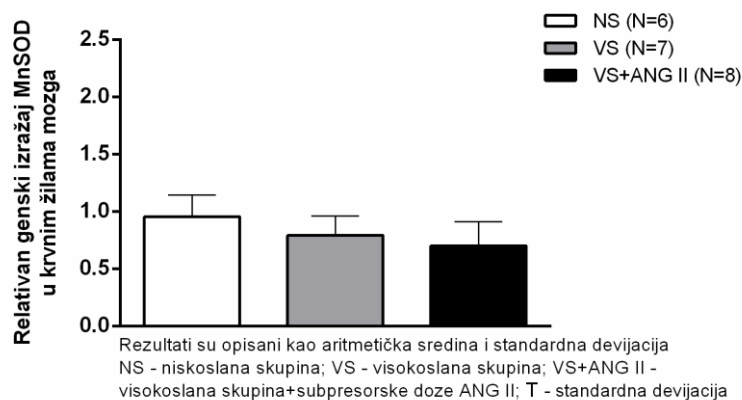
Relativan izražaj MnSOD također se nije značajno mijenjao između ispitivanih skupina, prikazano na Slici 3B. [NS 0,95 (0,19); VS 0,79 (0,17); VS+ANG II 0,70 (0,20),  $p = 0,077$ ; analiza varijance (ANOVA)].

Genski izražaj EC-SOD (Slika 3C.) značajno je povećan u skupini VS + ANG II 1,75 (0,43) u usporedbi s ostalim eksperimentalnim skupinama [NS 0,60 (0,20); VS 0,51 (0,11);  $p < 0,001$ ; analiza varijance (ANOVA)] dok između NS i VS skupine nije utvrđena razlika ( $p = 0,544$ ).

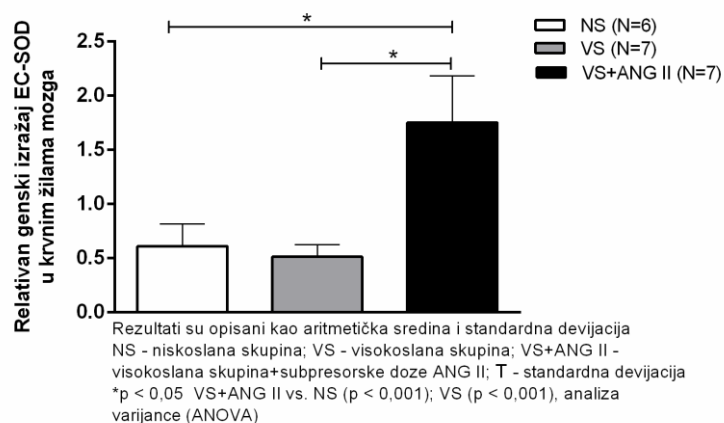
A



B



C



**Slika 3.** Relativan genski izražaj Cu/Zn SOD (A), MnSOD (B) i EC-SOD (C) antioksidativnih enzima u moždanim krvnim žilama

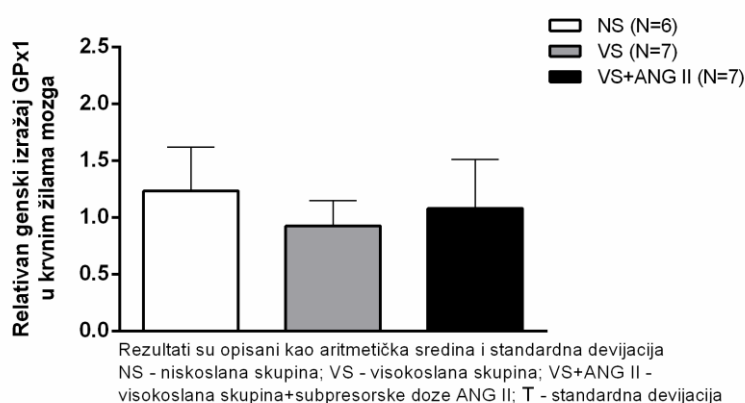


### 5.2.2. Genski izražaj glutation peroksidaza 1 i 4 (GPx1 i GPx4)

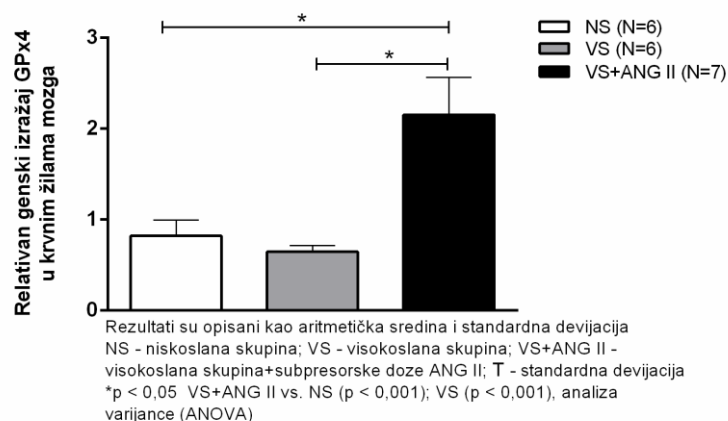
Relativan genski izražaj GPx1 izoforme u krvnim žilama mozga nije se značajno promijenio između ispitivanih skupina [NS 1,23 (0,38); VS 0,92 (0,22); VS+ANG II 1,07 (0,43),  $p = 0,316$ ; analiza varijance (ANOVA)] (Slika 4A).

Slika 4B. prikazuje genski izražaj GPx4 za sve ispitivane skupine. Izražaj GPx4 značajno je povećan u skupini VS + ANG II 2,12 (0,44) u usporedbi s ostalim eksperimentalnim skupinama [NS 0,81 (0,17); VS 0,64 (0,06);  $p < 0,001$ ; analiza varijance (ANOVA)].

A



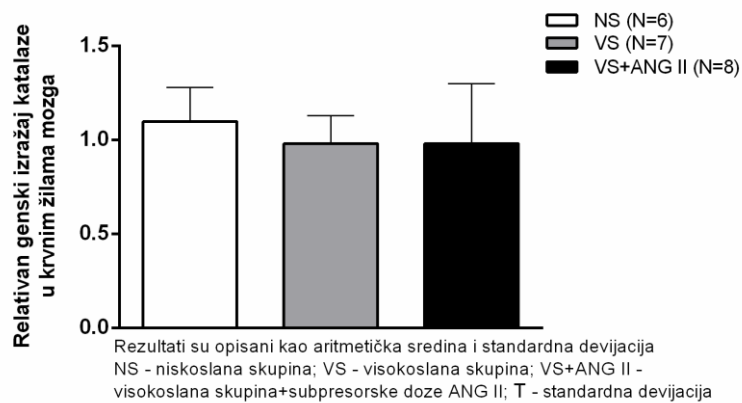
B



**Slika 4.** Relativan izražaj glutation peroksidaze 1 (A) i 4 (B) u moždanim krvnim žilama

### 5.2.3. Genski izražaj katalaze u krvnim žilama mozga

Slika 5. prikazuje relativan genski izražaj katalaze u krvnim žilama mozga za sve ispitivane skupine. Nije utvrđena statistički značajna razlika u genskom izražaju između ispitivanih skupina [NS 1,09 (0,18); VS 0,97 (0,14); VS+ANG II 0,99 (0,34),  $p = 0,601$ ; analiza varijance (ANOVA)].



**Slika 5.** Relativan izražaj katalaze u moždanim krvnim žilama

## 6. RASPRAVA

Iz provedenog istraživanja možemo zaključiti kako antioksidativni enzimi GPx4 i EC-SOD imaju najvažniju ulogu u snižavanju oksidativnog stresa primjenom ANG II u uvjetima visokog unosa soli. Navedeni sustav tada zajedno održava endotelnu funkciju normalnom. Brojna dosadašnja istraživanja na životinjskim modelima donijela su dokaze o štetnim i nepovoljnim učincima prekomjernog unosa soli. Dokazano je da je jedan od najranijih štetnih učinaka soli na ljudski organizam nastanak i razvoj endotelne disfunkcije. Takav poremećaj endotela obuhvaća razna patofiziološka stanja, a osnovu nastanka endotelne disfunkcije čini neprimjerena aktivacija endotela. Gubitak normalne funkcije endotela karakteriziran je smanjenom bioraspoloživošću dušikova oksida koji za posljedicu ima povećanje kisikovih radikala zbog smanjene razine serumskog ANG II. Posljedično tomu povećava se oksidativni stres. Povećani oksidativni stres vodi do upale koja može pogodovati razvoju kardiovaskularnih bolesti. Upravo zbog navedenih razloga endotelna se disfunkcija smatra neovisnim prediktorom kardiovaskularnih bolesti.

Visokosлана dijeta jedan je od glavnih čimbenika rizika u razvoju hipertenzije. Unos VS-a mijenja reninsko-angiotenzinski sustav (RAS) i potiskuje plazmatsku razinu angiotenzina II (ANG II). Fiziološke razine ANG II imaju ključnu ulogu u održavanju normalnoga krvnog tlaka i u održavanju vazodilatacije kao odgovora na različite podražaje (26). Znatno sniženje razine ANG II kod visokoslane prehrane dovodi do reduciranog izražaja antioksidativnog enzima superoksida dismutaze, smanjenja izražaja glutation peroksidaze 4 i inducibilne NO sintetaze (iNOS), povećanoga oksidativnog stresa i oslabljene vazodilatacije, čak i u normotenzivnih ljudi te u životinjskim modelima (27, 28, 29).

Dobro je poznato da povećana aktivnost RAS-a uzrokuje razvoj različitih kardiovaskularnih bolesti i da visoke koncentracije ANG II imaju negativne posljedice na kardiovaskularni sustav, uključujući povišeni krvni tlak, vazokonstrikciju, vaskularnu hipertrofiju, srčani udar, hipertrofiju i progresiju ateroskleroze (30, 31). Visoka razina ANG II također uzrokuje infiltraciju upalnih stanica, povećanu ekspresiju VCAM-a i kemokina u stanicama vaskularnih glatkih mišića u štakora, povećanu razinu oksidativnoga stresa i endotelnu disfunkciju (30, 32). Međutim, sada se zna da niske razine ANG II zbog unosa VS-a u životinjskim modelima koji nisu osjetljivi na sol (Sprague-Dawley štakori ili hrčci) ili imaju smanjenu regulaciju renina (Dahl na sol osjetljivi štakori) dovode do povećanoga oksidativnog stresa, endotelne disfunkcije i oslabljene vazodilatacije u različitom krvožilju

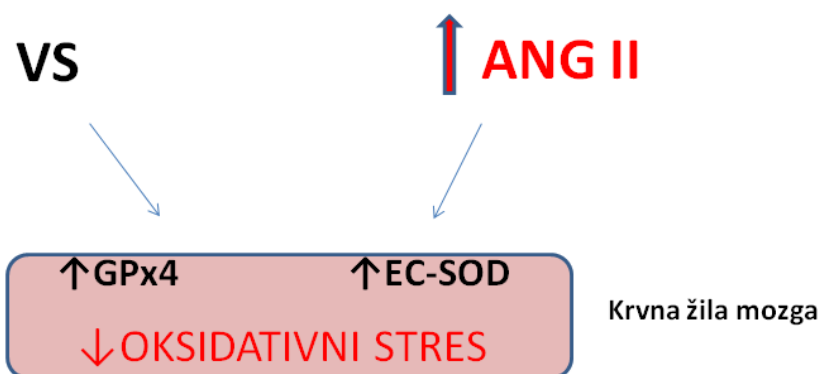
(34). Navedeni je zaključak podržan istraživanjima niske doze infuzije ANG II u različitim genetskim modelima štakora na VS prehrani, npr. SS.BN-(D13hmgc41– 13hmgc23)/Mcwi (Ren1-BN) kongenični štakori, SS.13BN konzomični štakori i Sprague-Dawley štakori na VS prehrani, obnavljanje normalnih razina ANG II u plazmi preko niskih doza ANG II infuzija povećava izražaj Cu/Zn SOD-a i štiti vaskularnu relaksaciju cerebralne arterije ovisne o razini dušikova oksida (27, 33, 34, 35).

Nastanak oksidativnog stresa negativno djeluje na aktivnost endotela, razvoj ateroskleroze i hipertenzije koje vode progresiji strukturnih i funkcionalnih kardiovaskularnih oštećenja (36). Vaskularni endotel koji regulira prolazak makromolekula i cirkulirajućih stanica iz krvi do tkiva glavni je cilj oksidativnog stresa te ima ključnu ulogu u patofiziologiji nekoliko vaskularnih bolesti i poremećaja. ROS može djelovati dvojako. Pri niskim koncentracijama čini signalnu molekulu koja sudjeluje u reguliranju temeljnih staničnih aktivnosti (rast stanica i stanične prilagodbe), dok pri višim koncentracijama može prouzročiti stanične ozljede i smrt. ROS možemo promatrati kao fiziološki i patološki. Fiziološki ROS održava vaskularni integritet i regulira funkciju endotela i normalnu vaskularnu reaktivnost. U patološkim uvjetima povećane koncentracije ROS-a uzrokuju disfunkciju endotela i dovode do aktivacije patoloških mehanizama koji sudjeluju u razvoju hipertenzije, kao što su promicanje rasta vaskularnih glatkih mišićnih stanica, povećana kontraktilnost te invazija monocita i upala. U takvim se uvjetima pospješuje prijanjanje leukocita, što je povezano s promjenama u endotelnom prijenosu signala i redoks-reguliranim transkripcijskim čimbenicima (37).

Naši rezultati podržavaju navedene pozitivne činjenice o ANG II i oksidativnom stresu kroz genski izražaj antioksidativnih enzima koje smo mjerili. Čosić i suradnici pokazali su kako visokoslana dijeta dovodi do znatnog snižavanja izražaja GPx4 enzima te da upravo on ima najvažniju ulogu u nastanku oksidativnog stresa, posredno zbog sniženja ANG II i razine dušikova oksida (28). Ovim je istraživanjem pokazano kako subpresorske doze ANG II dovode do značajnog povećanja izražaja GPx4 i EC-SOD i posljedičnog snižavanja oksidativnog stresa (Slika 6.). Navedeni rezultati definitivno govore u prilog važne uloge GPx4 u razini antioksidativnog kapaciteta, regulaciji pojave oksidativnog stresa te utjecaju na endotelnu funkciju.

## 7. ZAKLJUČCI

- 1) Primjena subpresorskih doza ANG II u uvjetima visokog unosa soli značajno povećava genski izražaj EC-SOD i GPx4 antioksidativnih enzima u usporedbi sa skupinama i kojih je primijenjena visokoslana i niskoslana prehrana.
- 2) Navedeni rezultati govore u prilog njihove bitne uloge u snižavanju nastaloga oksidativnog stresa pod utjecajem unosa visokih koncentracija soli.
- 3) Primjena subpresorskih doza ANG II, posredno povećavanjem antioksidativnog kapaciteta u moždanim krvnim žilama smanjuje razinu endotelne disfunkcije koja nastaje kao posljedica povećanoga oksidativnog stresa pri visokoslanjoj dijeti.



Slika 6. Shematski prikaz rezultata

## 8. SAŽETAK

**CILJ:** Cilj ovog istraživanja je ispitati promjenu genskog izražaja antioksidativnih enzima u moždanim krvnim žilama primjenom subpresorskih doza ANG II pri visokom unosu soli.

**NACRT STUDIJE:** eksperimentalna studija na pokusnim laboratorijskim životinjama

**MATERIJALI I METODE:** 10 tjedana stari, zdravi muški Sprague-Dawley štakori nasumično su podijeljeni u tri eksperimentalne skupine (N = 6 – 8): niskoslana skupina (NS skupina, koja je konzumirala 0,4 % NaCl u hrani za štakore) te dvije visokoslane skupine (VS) koje su konzumirale specijalnu hranu s 4 % NaCl-a u sastavu hrane tijekom 7 dana. Jednoj od visokoslanih skupina posljednja tri dana protokola ugrađena je pumpa subpresorske doze angiotenzina II (100 ng/kg/min/3 dana). Nakon dijetnoga protokola životinjama su bile izvagane, anestezirane te žrtvovane dekapitacijom. Iz uzoraka štakorskih moždanih krvnih žila utvrđivao se genski izražaj antioksidativnih enzima (Cu/Zn SOD, MnSOD, EC-SOD, GPx1, GPx4 i katalaza) PCR metodom u realnome vremenu.

**REZULTATI:** Genski izražaj GPx4 i EC-SOD značajno je povećan primjenom subpresorskih doza ANG II kod visokoslane prehrane s obzirom na niskoslanu i visokoslanu skupinu ( $p < 0,001$ ). Izražaj drugih antioksidativnih enzima nije se značajno mijenjao ( $p > 0,05$ ).

**ZAKLJUČAK:** primjena subpresorskih doza ANG II značajno povećava genski izražaj EC-SOD i GPx4 antioksidativnih enzima u uvjetima unosa visokih koncentracija soli te na taj način smanjuje negativan utjecaj visokoslane dijeta na pojavu povećane razine oksidativnoga stresa.

**KLJUČNE RIJEČI:** angiotenzin II, antioksidativni enzimi, genski izražaj, moždane krvne žile, visokoslana dijeta

**9. SUMMARY****THE EFFECT OF SUPPRESSOR DOSES OF ANGIOTENSIN II ON THE GENE EXPRESSION OF ANTIOXIDANT ENZYMES INDUCED WITH HIGH SALT DIET IN SPRAGUE-DAWLEY RATS**

**RESEARCH OBJECTIVES:** The aim of the study was to assess changes in gene expression of antioxidant enzymes in brain blood vessels using suppressor doses of ANGII at high salt intake.

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

**METHODS:** 10 weeks old, healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three experimental groups (N = 6 - 8): low salt group (LS group, which consumed 0,4 % NaCl in rat feed) and two high salt groups (HS) that consumed special foods with 4 % NaCl in its composition for 7 days. In the last three days of the protocol a suppressor dose of angiotensin II (100 ng / kg / min / 3 days) was included to one of the high salt groups. After dietary protocol, the animals were weighed, anesthetized and sacrificed by decapitation. From the samples of brain blood vessels, the gene expression of the antioxidant enzymes (Cu / Zn SOD, MnSOD, EC-SOD, GPx1, GPx4 and catalase) was determined by PCR in real time.

**RESULTS:** Gene expression of GPx4 and EC-SOD was significantly increased by the suppressor dose of ANG II compared with the low salt and high salt group ( $p < 0,001$ ). Expression of other antioxidant enzymes did not change significantly ( $p > 0,05$ ).

**DISCUSSION:** Suppressor doses of ANGII significantly increases the gene expression of EC-SOD and GPx4 antioxidative enzymes in the conditions of high salt concentration, thus reducing the negative impact of high salt diet on the occurrence of increased oxidative stress level.

**KEYWORDS:** angiotensin II, antioxidative enzymes, brain blood vessels, gene expression, high salt diet

**10. LITERATURA**

1. Đurić J, Vitale K, Paradinović S, Jelaković B. Unos kuhinjske soli i arterijski tlak u općoj populaciji. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam. 2011; 6: 141-147.
2. Čvorišćec D, Čepelak I. Strausova medicinska biokemija. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
3. Drenjančević I, Jelaković B, Kusić Z, Reiner Ž, Ugarčić Ž. Manje soli – više zdravlja. 1. izd. Osijek: Hrvatska agencija za hranu; 2014.
4. Jelaković B, Reiner Ž, Kusić Z, Ugarčić Ž, Drenjančević I. Znanstveno mišljenje o učinku samnjenog unosa kuhinjske soli u prehrani ljudi. Hrvatska agencija za hranu; 2014.
5. Vitamini.hr. Sol. Dostupno na adresi: <https://vitamini.hr/hrana-i-zivot/hrana/sol-2830/>. Datum pristupa: 13.5.2019.
6. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Strateški plan za smanjenje prekomjernog unosa kuhinjske soli u Republici Hrvatskoj 2015. – 2019. Dostupno na adresi: <https://www.hzjz.hr>. Datum pristupa: 13.5.2019.
7. Delaš Aždajić M. Udio kuhinjske soli u kruhu. Acta Medica Croatica 2018; 72 (2): 133-138.
8. MacGregor GA. Sol – od dokaza do primjene. Acta Medica Croatica. 2010; 64: 75-77.
9. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Kardiovaskularne bolesti. Dostupno na adresi: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/kardiovaskularne-bolesti/>. Datum pristupa: 16.5.2019.
10. Čavka A, Tadžić R, Grizelj I, Unfirer T, Mihaljević Z, Mihalj M i sur. Endotelna funkcija-funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. Medicinski Vjesnik. 2012; 44: 135-146.
11. Ćosić A. Uloga oksidativnog stresa u razvoju poremećenog vaskularnog odgovora pod utjecajem visokog unosa natrijeva klorida kod Sprague-Dawley štakora (doktorska disertacija). Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera, Medicinski fakultet Osijek; 2016.



12. Puljak A, Perko G, Mihok D, Radašević H. Antioksidansi i oligoelementi u starijih ljudi. *Medix: Specijalizirani medicinski dvomjesečnik*; 2004; 98-102.
13. Belupo. Oksidacijski stres, slobodni radikali i antioksidansi. Dostupno na adresi: <http://www.belupo.ba/Default.aspx?sid=4763>. Datum pristupa: 10.5.2019.
14. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defence. *World Allergy Organ J.* 2012 Jan; 5 (1): 9-19.
15. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011 Jun; 25(3): 287–299.
16. Lončar V. Nastajanje i izlučivanje slobodnih radikala kod životinja pri stresnim uvjetima (završni rad). Osijek: Sveučilište J.J. Strossmayera, Poljoprivredni fakultet; 2015. Dostupno na stranici: <https://zir.nsk.hr>. Datum pristupa: 14.5.2019.
17. Čolak E, Dimitrijević-Srećković V, Djordjević PB, Stanković S, Glišić B, Srećković B i sur. Biološki biljezi enzimske i neenzimske antioksidacijske zaštite u šećernoj bolesti tipa 2 – usporedna analiza. *Biochemia Medica.* 2008; 18 (1): 42-51.
18. Šurina M. Antioksidacijski enzimi kao biomarkeri oksidacijskog stresa (seminarski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek; 2018. Dostupno na stranici: <https://repositorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf:4942/preview>. Datum pristupa: 14.5.2019.
19. Mihalinec J. Superoksid-dismutaze (završni rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odsjek; 2017. Dostupno na stranici: <https://zir.nsk.hr>. Datum pristupa: 15.5.2019.
20. Jurković S, Osredkar J, Marc J. Molekularni utjecaj glutathion-peroksidaza u antioksidacijskim procesima. *Biochemia Medica.* 2008; 18 (2): 162-74.
21. National Institutes of Health. Vitamin E. Dostupno na stranici: <https://ods.od.nih.gov>. Datum pristupa: 15.5.2019.
22. Pubchem. Ascorbic acid. Dostupno na stranici: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Datum pristupa: 15.5.2019.

23. Planinac J. Utjecaj kratkotrajnog visokog unosa soli na razinu staničnog oksidativnog stresa kod mononuklearnih stanica periferne krvi kod Sprague-Dawley štakora (završni rad). Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera, Medicinski fakultet Osijek; 2015. Dostupno na adresi: <https://repozitorij.mefos.hr/islandora/object/mefos:55/preview>. Datum pristupa: 15.5.2019.
24. Ljutić D, Jeličić I. Lijekovi koji djeluju na renin-angiotenzin-aldosteronski sustav. *Medicus*. 2010; Vol. 19, No. 2: 139-146.
25. Chomczynski P, Sacchi N, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.
26. Fyhrquist F, Metsärinne K, Tikkanen I. Role of angiotensin II in blood pressure regulation and in the pathophysiology of cardiovascular disorders. *J Hum Hypertens* 9, Suppl 5: S19 – S24, 1995.
27. Durand MJ, Lombard JH. Low-dose angiotensin II infusion restores vascular function in cerebral arteries of high salt-fed rats by increasing copper/zinc superoxide dimutase expression. *Am J Hypertens* 26: 739 – 747, 2013.
28. Cosic A, Jukic I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljevic Z, Novak S, Vukovic R, Drenjancevic I. Attenuated flow-induced dilatation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet. *J Physiol* 594: 4917–4931, 2016
29. Cavka A, Cosic A, Jukic I, Jelakovic B, Lombard JH, Phillips SA, Seric V, Mihaljevic I, Drenjancevic I. The role of cyclo-oxygenase-1 in high-salt diet-induced microvascular dysfunction in humans. *J Physiol* 593: 5313–5324, 2015
30. Ferrario CM, Strawn WB. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 98: 121–128, 2006.
31. Tobian L, Tomboulian A, Janecek J. The effect of high perfusion pressures on the granulation of juxtaglomerular cells in an isolated kidney. *J Clin Invest* 38: 605–610, 1959.
32. Chen X-L, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 83: 952–959, 1998.

33. Drenjancevic-Peric I, Lombard JH. Reduced angiotensin II and oxidative stress contribute to impaired vasodilation in Dahl salt-sensitive rats on low-salt diet. *Hypertension* 45: 687–691, 2005.
34. Drenjancevic-Peric I, Frisbee JC, Lombard JH. Skeletal muscle arteriolar reactivity in SS.BN13 consomic rats and Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 41: 1012–1015, 2003.
35. Durand MJ, Lombard JH. Introgression of the Brown Norway renin allele onto the Dahl salt-sensitive genetic background increases Cu/Zn SOD expression in cerebral arteries. *Am J Hypertens* 24: 563–568, 2011
36. Viridis A, Duranti E, Taddei S. Review Article Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of Angiotensin II. *Int J Hypertens*. 2011;2011:916310.
37. Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280:C719–41

## 11. ŽIVOTOPIS

Martina Vuković

Datum rođenja: 6. studenoga 1995.

Adresa: Sjenjak 10, 31000 Osijek, Hrvatska

Adresa e-pošte: martina.vukoviic@gmail.com

JMBAG: 0113140567

### Obrazovanje

2002. – 2010.: Osnovna škola „Mladost“, Osijek

2010. – 2014.: Zdravstveno laboratorijski tehničar, Medicinska škola Osijek

2014. - 2017.: Preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2017. do danas: Diplomski studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku