

Utjecaj prehrane s visokim udjelom soli i oralnog nadomjestka karnozina na izražaj gena enzima uključenih u mehanizme dilatacije krvnih žila i transkripcijskog faktora NRF2 kod Sprague-Dawley štakora

Hrastinski, Eva

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:152:662173>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Eva Hrastinski

**UTJECAJ PREHRANE S VISOKIM
UDJELOM SOLI I ORALNOG
NADOMJESTKA KARNOZINA NA
IZRAŽAJ GENA ENZIMA UKLJUČENIH
U MEHANIZME DILATACIJE KRVNIH
ŽILA I TRANSKRIPCISKOG FAKTORA
NRF2 KOD SPRAGUE-DAWLEY
ŠTAKORA**

Završni rad

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Eva Hrastinski

**UTJECAJ PREHRANE S VISOKIM
UDJELOM SOLI I ORALNOG
NADOMJESTKA KARNOZINA NA
IZRAŽAJ GENA ENZIMA UKLJUČENIH
U MEHANIZME DILATACIJE KRVNIH
ŽILA I TRANSKRIPCIOJSKOG FAKTORA
NRF2 KOD SPRAGUE-DAWLEY
ŠTAKORA**

Završni rad

Osijek, 2024.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet u Osijeku

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

Neposredni voditelj: doc.dr.sc. Petar Šušnjara, mag. med. lab. diag.

Rad ima 27 stranica, 3 slike i 1 tablicu

Sadržaj

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Prehrana s visokim udjelom soli..... | 1 |
| 1.2. Endotel..... | 1 |
| 1.3. Utjecaj prekomjernog unosa soli na endotel..... | 2 |
| 1.4. Sinteza i funkcija dušikovog oksida (NO)..... | 2 |
| 1.5. Oksidativni stres | 3 |
| 1.6. Karnozin | 4 |
| 1.7. Karnozin i funkcija krvnih žila | 5 |
| 1.8. Transkripcijski faktor NRF2 | 5 |
| 2. HIPOTEZA | 7 |
| 3. CILJEVI | 8 |
| 4. MATERIJALI I METODE | 9 |
| 4.1. Ustroj studije..... | 9 |
| 4.2. Materijali | 9 |
| 4.3. Metode | 9 |
| 4.4. Izolacija RNA | 10 |
| 4.5. Pročišćavanje i provjera koncentracije uzorka | 10 |
| 4.6. RTqPCR..... | 11 |
| 4.7. Statističke metode..... | 13 |
| 5. REZULTATI | 14 |
| 5.1. Genski izražaj gena enzima uključenih u mehanizme dilatacije u aortama Sprague-Dawley štakora | 14 |
| 5.2. Genski izražaj HIF-1 alfa, NOQ i transkripcijskog faktora NRF2 u aortama Sprague-Dawley štakora | 16 |
| 6. RASPRAVA | 18 |
| 7. ZAKLJUČAK | 20 |

| | |
|-----------------------------|-----------|
| 8. SAŽETAK..... | 21 |
| 9. SUMMARY | 22 |
| 10. LITERATURA | 23 |
| 11. ŽIVOTOPIS..... | 27 |

POPIS KRATICA

CAR- karnozin (engl. *Carnosine*)

cDNA- komplementarna deoksiribonukleinska kiselina (engl. *complementary Deoxyribonucleic acid*)

cGMP- ciklički gvanozin monofosfat (engl. *Cyclic guanosine monophosphate*)

CoQ10- koenzim Q10 (engl. *Coenzyme Q10*)

COX-1- ciklooksigenaza 1 (engl. *Cyclooxygenase -1*)

COX-2- ciklooksigenaza 2 (engl. *Cyclooxygenase -2*)

DNA- deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic acid*)

dATP- deoksiadenozin trifosfat (engl. *Deoxyadenosine triphosphate*)

dCTP- deoksicitozin trifosfat (engl. *Deoxycytidine triphosphate*)

dGTP- deoksigvanozin trifosfat (engl. *Deoxyguanosine triphosphate*)

d-ROMs - engl. *Reactive Oxygen Metabolites*

dTTP- deoksitimidin trifosfat (engl. *Deoxythymidine triphosphate*)

eNOS- endotelna dušik-oksidi sintaza (engl. *Endothelial nitric-oxide synthase*)

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

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

Keap1- engl. *Kelch – like ECH- associated protein 1*

NaCl- natrijev klorid (engl. *Sodium chloride*)

NADPH- nikotinamid dinukleotid fosfat (engl. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)

NFW- voda bez nukleaza (engl. *Nuclease free water*)

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

NO- dušikov oksid (engl. *Nitrogen oxide*)

NOS- dušik-oksidi sintaza (engl. *Nitric-oxide synthase*)

NOQ- NADPH kinon oksidoreduktaza (engl. *NADPH quinone oxidoreductase*)

NRF2- nuklearni eritroidni faktor povezan s faktorom 2 (engl. *Nuclear factor E2-related factor 2*)

PEpT1- peptidni transporter (engl. *Peptide transporter*)

PTH1- peptid/histidin transporter 1 (engl. *Peptide/histidine transporter 1*)

PTH2- peptid/histidin transporter 2 (engl. *Peptide/histidine transporter 2*)

RNA- ribonukleinska kiselina (engl. *Ribonucleic acid*)

ROS- slobodni kisikovi radikali (engl. *Reactive Oxygen Species*)

RTqPCR- engl. *Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction*

TGF- β - transformirajući faktor rasta beta (engl. *Transforming growth factor beta*)

1. UVOD

1.1. Prehrana s visokim udjelom soli

Natrijev klorid (engl. *Sodium chloride*, NaCl) je važan spoj ljudskom organizmu jer održava osmolalnost i volumen plazme. Nalazi se u većini prehrambenih proizvoda, aromatizira hranu i djeluje kao stabilizator. Također služi kao konzervans za hranu jer većina bakterija ne može rasti u prisustvu velike količine soli. Ljudskom tijelu je potrebna mala količina natrija za kontrakciju i opuštanje mišića, provođenje živčanih impulsa i održavanje ravnoteže minerala i vode (1). Kuhinjska sol u prošlosti je služila kao konzervans hrane, ali izumom hladnjaka smanjila se potreba za korištenjem kuhinjske soli (2). Svjetska zdravstvena organizacija preporučuje da dnevni unos soli, po osobi, bude 5g dnevno, no prema istraživanjima, većina populacije konzumira dvostruko veće količine (3). Velike količine kuhinjske soli prisutne su u pekarskim proizvodima, gotovoj ili industrijski prerađenom hranom (2). U sastavu kuhinjske soli najviše prevladava NaCl. Prekomjerman unos soli, odnosno natrija povezan je s povećanim rizikom za nastajanje hipertenzije, autoimunih bolesti, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa i bolesti koje uzrokuju oštećenje bubrega. Prema istraživanjima Svjetske zdravstvene organizacije ove bolesti su uzrok za 86% prijevremenih smrti u Europi, a prekomjerno konzumiranje soli je neizravni i/ili izravni čimbenik za njihovo nastajanje (4). Istraživanja su pokazala da umjereno smanjenje unosa soli tijekom tri ili više tjedana značajno smanjuje krvni tlak i kod ljudi koji imaju hipertenziju i kod ljudi s normalnim vrijednostima krvnog tlaka bez obzira na spol (5). Odnos između tlaka i količine natrija u urinu reguliran je negativnom povratnom spregom (6).

1.2. Endotel

Vaskularni endotel sastoji se od jednoslojnih specijaliziranih stanica koje oblažu unutrašnji sloj krvnih žila. Najvažnije funkcije endotela su inhibicija agregacije trombocita, regulacija proliferacije glatkih mišićnih stanica, kontrola vaskularnog tonusa, modulacija migracije leukocita i moduliranje propusnosti vaskularne stijenke (7). Jedna od glavnih karakteristika pravilnog rada endotela je njegova sposobnost poticanja vazodilatacije kao odgovor kada se dogodi nagla promjena protoka. Endotelne stanice su sposobne pretvarati mehaničke sile u biološke reakcije na način da se rastežu žilne stijenke koje onda bilježe mehanoreceptori (7). Endotelni čimbenici relaksacije se otpuštaju kao odgovor na povećanu koncentraciju unutarstaničnog kalcija.

1.3. Utjecaj prekomjernog unosa soli na endotel

Kada endotel izgubi svoju zaštitnu ulogu povećava se razina reaktivnih kisikovih radikala (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i smanjuje se biodostupnost dušikova oksida (engl. *Nitrogen oxide*, NO). Tada dolazi do endotelne disfunkcije (8). Endotelna disfunkcija karakterizirana je protrombinskim, proupalnim i vazokonstriksijskim djelovanjem endotela što posljedično ima utjecaj na nastanak ateroskleroze i drugih kardiovaskularnih bolesti. Glavni razlog nastanka endotelne disfunkcije je nedovoljna biodostupnost NO. Ostali razlozi su povećana endotelna proizvodnja vazokonstriksijskih spojeva, poremećen odgovor glatkih mišićnih stanica na spojeve s vazodilatacijskim učinkom i povećana osjetljivost endotelnih stanica na vazokonstriktore. Promjene u dušik – oksid sintaza (engl. *Nitric-oxide synthase*, NOS) posredovanim procesima djelom ovise i o posttranslacijskim modifikacijama enzima, genetskim razlikama u izražaju endotelne dušik – oksid sintaze (engl. *Endothelial nitric-oxide synthase*, eNOS) i blokiranju NO kemijskim reakcijama prije nego što on djeluje na ciljnu molekulu (7). Prema provedenim istraživanjima, prekomjerno konzumiranje kuhinjske soli posljedično dovodi do porasta krvnog tlaka, poremećaja mikrocirkulacije i nastajanje slobodnih kisikovih radikala. ROS su nestabilni jer sadržavaju nesporeni elektorn u vanjskoj orbitali i reagiraju s tkivima te ih oštećuju. Povećana izloženost slobodnim kisikovim radikalima dovodi do aktivacije upalnog odgovora koji pojačava izražaj promotora adhezijskih molekula i oksidativnog stresa (9).

1.4. Sinteza i funkcija dušikovog oksida (NO)

Endotelni čimbenici relaksacije se otpuštaju kao odgovor na povećanu koncentraciju unutarstaničnog kalcija. Jedan od najvažnijih među njima je NO. Dušikov oksid je topljivi plin sa snažnim vazodilatacijskim, protuupalnim i antioksidativnim svojstvima. Ima zaštitnu ulogu u regulaciji vazodilatacije (9). NO je reaktivna molekula i proizvodi se na različitim mjestima u tijelu te zbog toga postoje različite izoforme enzima i različite uloge NO u organizmu (10). U endotelnim stanicama najviše je izražena eNOS dok se u neuronima najviše nalazi neuronska dušik-oksida sintaza (engl. *Neuronal nitric-oxide synthase*, nNOS). Postoji još i inducibilna dušik-oksida sintaza (engl. *Inducible nitric-oxide synthase*, iNOS) koja se može naći u različitim stanicama (11). Ovi enzimi kataliziraju proizvodnju dušikova oksida i L-citrulina iz L-arginina i O₂ koristeći elektrone donirane iz nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (engl. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*, NADPH). Funkcija eNOS- a je važna za održavanje vaskularne homeostaze. Signalizacija NO-a dovodi do dilatacije krvnih žila

stimulacijom gvanilil ciklaze što dovodi do povećanja cikličkog gvanozin monofosfata (engl. *Cyclic guanosine monophosphate*, cGMP) (12). Kao odgovor na žilni stres i djelovanje nekih spojeva poput bradikinina, acetilkolina, trombina. iz endotelnih stanica se stvara i otpušta NO. On djeluje kao vazodilatator – omogućava relaksaciju vaskularnih mišićnih stanica (7). Prostaciklin je također važan endotelni čimbenik relaksacije jer se on djelomično otpušta kao odgovor na žilni stres. Stvara se iz arahidonske kiseline pomoću enzima ciklooksigenaze 1 (engl. *Cyclooxygenase*, COX-1).

1.5. Oksidativni stres

Oksidativni stres nastaje kao produkt štetnog djelovanja ROS-a. Helmut Sies prvi definira pojam oksidativni stres kao neravnotežu između antioksidativne obrane i proizvodnje oksidansa što može dovesti do oštećenja bioloških sustava (13). Kada se ROS-i održavaju na homeostatskoj razini tada sudjeluju u različitim fiziološkim reakcijama, imaju ulogu sekundarnog glasnika i sudjeluju u urođenom i adaptivnom imunološkom odgovoru. U patofiziološkim uvjetima, koncentracija ROS-a je veća nego što je kapacitet puferiranja antioksidativnog obrambenog sustava što posljedično dovodi do oštećenja i smrti stanice. Oksidativni stres može uzrokovati oštećenja koja se odnose na homeostazu iona, gensku transkripciju, prijenos signala u stanicama i sudjeluju u nastanku niza bolesti poput ateroskleroze, Alzheimerove bolesti, kronične opstruktivne plućne bolesti i tumora (4). Za nastanak oksidativnog stresa poseban rizik imaju starije osobe, osobe koje boluju od šećerne bolesti, srčani ili moždani infarkt, kronični bolesnici npr. reumatski bolesnici ili žene koje uzimaju hormonsku nadomjesnu terapiju (4). Kod sportaša se također može javiti oksidativni stres jer su oni uglavnom pod fizičkim opterećenjem i troše više kisika pa imaju i veću potrebu za antioksidansima (4). U stanju poput hipertenzije također može doći do oksidativnog stresa jer dolazi do povećanja ROS-a koji nisu u ravnoteži s antioksidansima (4). Ukupna razina oksidativnog stresa može se mjeriti i laboratorijskim metodama. Uzorak je krv a mjeri se razina ROS-a u organizmu i njegova sposobnost da se brani od njih. Takvi testovi su u svijetu rutinski i rade se svakih 6 mjeseci kako bi se kontrolirala učinkovitost uzimanja antioksidansa. U Hrvatskoj se najčešće koristi d-ROMs (engl. *Reactive Oxygen Metabolites*) test. On mjeri koncentraciju hidroperoksida (engl. *Hydroperoxides*, ROOH) u krvi iz čega se spektrofotometrijskim metodama dobije visina oksidativnog stresa (4). COX-1, ciklooksigenaza 2 (engl. *Cyclooxygenase 2*, COX-2), ksantin oksidaza, nefunkcionalna dušikova sintaza i NAD(P)H oksidaza su izvori kisikovih radikala u hipertenziji i bolesti krvnih žila. Prema novijim istraživanjima NAD(P)H ima važnu ulogu kao izvor ROS-a. Naime, kako bi se

aktivirala NAD(P)H oksidaza potrebni su brojni transformirajući faktori rasta beta (engl. *Transforming growth factor beta*, TGF- β), vazoaktivni hormoni i mehanička poticanja koja uključuju rastezanje krvne žile. Istraživanja su pokazala kako i angiotenzin II utječe na nastanak ROS-a (14). Uloga angiotenzina II je induciranje kontrakcije krvnih žila te se smatra da je vazodilatacija mehanizam hipotenzivnog učinka nakon inhibicije aktivnosti angiotenzina II (9).

1.6. Karnozin

Karnozin je prvi put izoliran tijekom ranih 1990-ih, a postao je poznat kada se otkrila njegova uloga kao unutarstaničnog pH pufera (8). On je dipeptidna molekula građena od aminokiseline β -alanina i aminokiseline L-histidina. U ljudi, najviše se nalazi u skeletnim mišićima i mozgu a u manjim koncentracijama može se naći i u gastrointestinalnom traktu, bubrezima, jetri, srcu i masnom tkivu. Karnozin ima protuupalna i neuroprotektivna svojstva, djeluje kao prirodni antioksidans i neenzimski „čistač“ ROS-a (15). Ograničavajući čimbenik karnozina je β -alanin, koji s obzirom na svoju bioraspoloživost ograničava sintezu i količinu karnozina (16). Prema provedenim istraživanjima, dokazano je da karnozin snižava razinu lipoproteina niske gustoće u serumu starih štakora i peroksidaciju lipida (9). Karnozin se sintetizira vezanjem aminokiselina β -alanina koji ima regulatornu funkciju i L-histidina koji daje biološku aktivnost. Ovaj proces katalizira karnozin sintaza. β -alanin se sintetizira u jetri odakle se prenosi do mišića i mozga gdje se koristi za sintezu karnozina (16). β -alanin i karnozin se apsorbiraju u tankom crijevu na apikalnoj strani pomoću specifičnih nosača: β -alanin nosačem za β aminokiseline, a karnozin peptidnim nosačem (16). Na staničnoj razini, karnozin reagira sa ROS-om i produktima oksidativnog oštećenja čime štiti druge biomolekule od oštećenja. Karnozin iz hrane apsorbiraju enterociti tankog crijeva putem peptidnog transportera 1 (engl. *Peptide transporter*, PEPT-1), dok intracelularni karnozin dopijeva u krvotok pomoću peptid/histidin transportera 1 (PTH1) i 2 (PTH2) (engl. *Peptide/histidine transporter*) (17). Karnozin također utječe i na razinu kalcija u mišićnim stanicama, a može i izravno reagirati s protonima čime pomaže u održavanju pH ravnoteže. On također i smanjuje umor nakon intenzivne mišićne aktivnosti zbog čega se sportašima preporučuje njegovo korištenje kao nadomjestak prehrani. Nadalje, povezan je i sa aktiviranjem signalnog puta koji je kontroliran nuklearnim eritroidnim faktorom povezanim s faktorom 2 (engl. *Nuclear factor E2-related factor 2*, NRF2) koji uklanja produkte oksidativne modifikacije (16). Karnozin se razgrađuje u tkivima i serumu procesom hidrolize koji je kataliziran enzimom karnozinaza. Tijekom posljednjih 30 godina istražuje se mogući terapijski potencijal karnozina u različitim patološkim stanjima poput dijabetesa, shizofrenije, neurodegenerativnih bolesti ili

kardiovaskularnih bolesti. Iako još uvijek nije dovoljno istraženo, pretpostavlja se da bi fiziološka uloga karnozina u tkivu miokarda mogla uključivati uklanjanje slobodnih kisikovih radikala, regulaciju kalcija i detoksikaciju aldehida. (18).

1.7. Karnozin i funkcija krvnih žila

Karnozinom iz hrane proizvodi se NO koji može lokalno proširi krvne žile, ali ne i smanjiti krvni tlak (15). Sniženi krvni tlak kod štakora se događa tek nakon intravenske primjene karnozina u visokim dozama (33,3 mg/kg) (15). Karnozin uzrokuje vazodilataciju, u izoliranoj aorti štakora, koja je neovisna o endotelu (15). Karnozin može biti i stimulator i inhibitor proizvodnje i metabolizma NO ovisno u kojem se vaskularnom sloju nalazi. Zbog navedenih njegovih fizioloških karakteristika suplementacija karnozina mogla bi imati učinak u smanjenju krvnog tlaka kod liječenja hipertenzije (15).

1.8. Transkripcijski faktor NRF2

NRF2 je transkripcijski faktor koji regulira staničnu obranu putem izražaja gena koji sudjeluju u odgovoru na oksidativni stres i detoksikaciju lijekova (19). Ima visoko očuvanu strukturu bazičnog leucinskog zatvarača, a regulira ga Keap1 (engl. *Kelch – like ECH-associated protein 1*). U normalnim uvjetima NRF2 i Keap1 tvore kompleks na niskoj razini izražaja. Kada dođe do oksidativnog stresa, ROS-i i elektrofilni reagiraju s cisteinima Keap1-a kako bi omogućili da NRF2 ne bude razgrađen od strane Keap1-a. Takav nosivostetizirani NRF2 se nakuplja u jezgri i aktivira izražaj citoprotektivnih gena (19). Sekvenciranje jednostanične ribonukleinske kiseline (engl. *Ribonucleic acid*, RNA) pokazuje da NRF2 ima ulogu u dediferenciranju vaskularnih glatkih mišićnih stanica (20). Prema istraživanjima, neki sintetski lijekovi poput koenzima Q10 (engl. *Coenzyme CoQ10*) potiču izražaj NRF2 i tako smanjuje oksidativni stres u vaskularnim glatkim mišićnim stanicama (21). Iako aktivacija NRF2 ne mora uvijek imati pozitivan učinak kod vaskularnih bolesti jer istraživanja pokazuju da ako u srcu postoji autofagija tada NRF2 djeluje zaštitno, ali ako je oštećena, zaštita se gubi i dolazi do oštećenja miokarda. Postoje istraživanja koja dokazuju kako bi NRF2 mogao imati terapijski učinak na razne bolesti uključujući i kardiovaskularne zbog svoje zaštitne uloge u patološkim stanjima.

Prijašnja istraživanja endotelne funkcije nakon prehrane s visokim unosom soli sa ili bez nadomjestka karnozina pokazala su oporavljenu vaskularnu funkciju oštećenu visokim unosom soli (8). Stoga je cilj ovog istraživanja bio utvrditi utjecaj prehrane s visokim udjelom

solu i nadomjestka karnozina na izražaj gena enzima uključenih u mehanizme dilatacije krvnih žila Sprague-Dawley štakora te NRF2 transkripcijskog faktora.

2. HIPOTEZA

Prehrana s visokim udjelom soli i nadomjestkom karnozina utjecat će na izražaj gena enzima uključenih u mehanizme dilatacije krvnih žila i transkripcijskog faktora NRF2 kod Sprague-Dawley štakora.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je:

- Odrediti utjecaj prehrane s visokim udjelom soli i nadomjeska karnozina na izražaj gena enzima uključenih u mehanizme dilatacije krvnih žila Sprague-Dawley štakora te NRF2 transkripcijskog faktora.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Provedeno istraživanje eksperimentalna je studija na izoliranim krvnim žilama pokusnih laboratorijskih životinja (Sprague-Dawley štakora). Ovo istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva za istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku (641-01/24-01/04). Provedeni eksperimentalni postupci usklađeni su sa europskim smjericama za primjeni i skrb laboratorijskih životinja (direktiva 86/609). Poduzeti su svi postupci kako bi se spriječila patnja životinja. Sva istraživanja odobrena su od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (2158-61-46-24-88) te Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (525-09/566-22-3)

4.2. Materijali

Kao materijali u ovom istraživanju korištene su aorte Sprague-Dawley štakora oba spola, starosti 8-10 tjedana koji su nasumično podijeljeni u 4 skupine:

- 1) KONTROLNA SKUPINA (CTRL)- zdravi netretirani štakori
- 2) HSD- štakori koji su tijekom 7 dana konzumirali hranu s visokim udjelom kuhinjske soli (4% NaCl-a)
- 3) CTRL+CAR- štakori koji su tijekom 7 dana konzumirali uobičajenu hranu s niskim udjelom kuhinjske soli (0,4% NaCl-a) i kroz oralnu sondu dobivali 150 mg/kg suplementacije karnozina
- 4) HSD+CAR- štakori koji su tijekom 7 dana konzumirali hranu s visokim udjelom kuhinjske soli (4% NaCl-a) i kroz oralnu sondu (kanilu) dobivali 150 mg/kg tjelesne mase suplementacije karnozina

4.3. Metode

Uzgoj životinja provodio se u Vivariju Medicinskog fakulteta Osijek. Nakon 7 dana dijetnog protokola štakori su bili izvagani i anestetizirani kombinacijom midazolama (0,5ml/kg) i ketamin-klorida (3ml/kg). Nakon toga štakori su bili dekapitirani te je provedeno uzorkovanje tkiva i organa potrebnih za daljnje analize. Nakon izoliranja aorte su smrznute u tekućem dušiku i pohranjene na -80°C do izvođenja pokusa.

4.4. Izolacija RNA

Prije svega bilo je potrebno izolirati RNA iz pohranjenih krvnih žila. Ovaj postupak se radio u autoklaviranim epicama. Uzorke koji su bili smrznuti u tekućem dušiku bilo je potrebno mehanički usitniti u tarioniku pomoću tučka na najsitnije moguće. Kako bi se dobio supernatant u uzorak je dodano 1ml trizola, toksične tvari za odjeljivanje tkiva deoksiribonukleinske kiseline (engl. *Deoxyribonucleic acid*, DNA) i RNA. Da se svi slojevi odvoje dodano je i 100 μ l 1-brom-3-klor-propana, uzorak je zatim naglim pokretima promućkan 15 sekundi i ostavljen da se inkubira na sobnoj temperaturi tijekom osam minuta. Uzorci su zatim centrifugirani na 12 000 okretaja 15 minuta. Supernatant koji se odvojio se zatim prebacuje u nove sterilne Eppendorf tubice. U svaku tubicu dodano je 500 μ l izopropanola što je omogućilo da se RNA odvoji od ostalog staničnog sadržaja kao što su proteini, DNA, lipidi. Uzorci su zatim laganim pokretima promućkani 15 do 20 sekundi te ponovno ostavljeni da se inkubiraju na sobnoj temperaturi tijekom osam minuta. Nakon inkubacije uzorci su ponovno centrifugirani na 12 000 okretaja osam minuta. Po završetku centrifugiranja isprani su s 1ml 75%-og etanola bez mućkanja uzorka i stavljeni su na centrifugiranje pri 7 500 okretaja 5 minuta. Postupak ispiranja etanolom ponovljen je dva puta. Po završetku čišćenja etanolom, sav etanol je odliven, a uzorak je ostavljen jednu minutu na zraku kako bi preostali etanol ispario. Nakon sušenja dodano je 30 μ l čiste vode bez nukleaza (engl. *Nuclease -Free Water*, NFW) i izmjerena je koncentracija i čistoća RNA. Koncentracija i čistoća RNA provjerit će se i odrediti spektrofotometrijski.

4.5. Pročišćavanje i provjera koncentracije uzorka

Čistoća i koncentracija izolirane RNA se provjeri tako da se na spektrofotometar kapne jedna kap uzorka i očita koncentracija. U svakom uzorku je očitana koncentracija te se prema najmanjoj koncentraciji radilo ujednačavanje. U svakom uzorku početna koncentracija ukupne RNA mora biti jednaka zato što je udio RNA koji kodira gene različit za svaki uzorak stoga ukupna RNA mora biti jednake koncentracije da se prati razlika u brzini kojom se traženi gen umnožio. Što je udio traženog gena veći on će se brže umnožiti.

Prije pretvorbe RNA u cDNA (engl. *complementary DNA*) provodi se pročišćavanje uzorka (DNA-zni tretman) prema uputama proizvođača Sigma Aldrich. Kit za pročišćavanje sadržava reakcijski pufer, amplifikacijski pufer i STOP otopinu koja zaustavlja reakciju. U uzorak RNA se doda 1 μ l reakcijskog i amplifikacijskog pufera te se inkubira na 25°C 15 minuta. Reakcija se zaustavlja s 1 μ l STOP otopine po uzorku na temperaturi 70°C kroz 10 minuta.

Sinteza cDNA se provodi prema uputama dostupnog kita visokog kapaciteta (engl. *High Capacity cDNA kit*) s inhibitorom RNase tvrtke Applied Biosystems, SAD. Sve kemikalije iz kita su dodane u uzorak prema definiranim volumenima te se postavljaju u uređaju Bio Rad CFX96. Protokol transkripcije se vrši tijekom 3 sata (25°C/10min; 37°C/2 h; 85°C/5min; 4°/1h). Sintetizirana cDNA je razrijeđena 5x s NFW vodom (Sigma Aldrich, Njemačka) i takva se koristila za utvrđivanje genskog izražaja RTqPCR (engl. *Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*) metodom.



Slika 1: PCR uređaj (izvor: original autorice rada)

4.6. RTqPCR

U ovom istraživanju korištena je metoda RTqPCR na uređaju Bio Rad CFX96. Genski izražaj enzima uključenih u mehanizme dilatacije krvnih žila (*eNOS*, *iNOS*, *COX-1*, *COX-2*, *HIF-1 alfa* (engl. *Hypoxia – inducible factor 1-alpha*) i *NOQ* (engl. *NADPH quinone oxidoreductase*)) i transkripcijskog faktora *NRF2* utvrđen je iz uzoraka aorti Sprague-Dawley štakora i normaliziran u odnosu na rezultate referentnog gena β -aktina. Lančana reakcija

polimeraze je molekularna metoda kojom se kratki fragmenti RNA ili DNA molekule umnožavaju u velik broj identičnih kopija. PCR je jedna od najvrjednijih tehnika koje se koriste u dijagnostici. Na osnovi ove metode razvili su se razni postupci koji su prilagođeni osjetljivosti, specifičnosti i potrebama eksperimentalnih istraživanja. Jedna od njih je i RTqPCR. U reakcijsku smjesu (engl. *Master mix*) idu četiri deoksiribonukleotida (deoksigvanozin trifosfat (engl. *Deoxyguanosine triphosphate*, dGTP), deoksicitidin trifosfat (engl. *Deoxycytidine triphosphate*, dCTP), deoksiadenozin trifosfat (engl. *Deoxyadenosine triphosphate* dATP), deoksitimidin trifosfat (engl. *Deoxythymidine triphosphate*, dTTP)), cDNA, enzim Taq DNA polimeraza, ioni magnezija (Mg^{2+}), oligonukleotidne početnice, PCR pufer i fluorescentne boje (SYBER Green I) ili fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe. SYBER Green je boja koja emitira fluorescenciju i na taj način omogućuje praćenje nastanka umnažanja u stvarnom vremenu. Ona se veže između nukleotida dvolančane DNA i emitira fluorescenciju, a na jednolančanu DNA se ne veže. Nukleinske kiseline se umnažaju eksponencijalno kako se ciklusi ponavljaju. U svakom ciklusu broj DNA se udvostruči, a novosintetizirani DNA lanac služi kao kalup za vezanje početnica. Svaki ciklus se sastoji od denaturacije pri 95°C tijekom 15-30s, zatim hlađenja na 40 do 60°C što omogućuje hibridizaciju početnica s komplementarnim sljedovima. Novonastala DNA se elongira pri 68 - 72°C. Nakon PCR reakcije produkti se detektiraju. Nukleotidni slijed upotrijebljenih početnica prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1: Nukleotidni slijed primijenjenih početnica

| | |
|------------|----------------------------------|
| COX-1 | F 5' TCCTGTTGCGAGCCCAGTT 3' |
| | R 5'GCCAGTGATAGAGGTGGTTGAAT 3' |
| COX-2 | F 5' GAAAGAAATGGCTGCAGAGTTGA3' |
| | R 5' GCAGGGCGGGATACAGTTC 3' |
| HIF-1 alfa | F 5' GCCCAGTGAGAAAGGGGA 3' |
| | R 5' CGGCTGGTTACTGCTGGT 3' |
| NOQ | F 5' AGTGGAAACCCACGAAGCCTACAA 3' |
| | R 5' TGAACCACTACAGCGGGAAGTAA 3' |
| NRF2 | F 5' AAGCCATTCCTCTCTGAACTTCT 3' |
| | R 5' CTGGGACTTGTGTTTAGTGAAATG 3' |
| eNOS | F 5'CGAACAGCAGGAGCTAGAGG3' |
| | R 5'GAGGTGGATCTCTCCTGGT3' |
| iNOS | F 5'TGGTGAGGGGACTGGACTTT 3' |
| | R 5'CCAACCTCTGCTGTTCTCCGT3' |
| β-aktin | F 5'TCTGTGTGGATTGGTGGCTCTA3' |
| | R 5'CTGCTTGCTGATCCACATCTG3' |

4.7. Statističke metode

Nakon analize podataka dobiveni rezultati prikazani su kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Test za jednosmjernu analizu varijanci za nezavisne uzorke (One-Way ANOVA) bio je korišten za statističku analizu i usporedbu rezultata relativnog izražaja gena. Statističke analize provedene su korištenjem Graph Pad Prism6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) i Microsoft Excel 2016 (Microsoft Office 365, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Za izračun veličine uzorka korišten je softver GPower v3.1.9.7 (Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Njemačka). Za grafički prikaz i analizu rezultata korišten je program GraphPad Prism6 (San Diego, CA, USA). Razina statističke značajnosti određena je sa $P < 0,05$. Veličina Cohenovog d (Δ/SD) učinka određeno je prema primarnom ishodu studije.

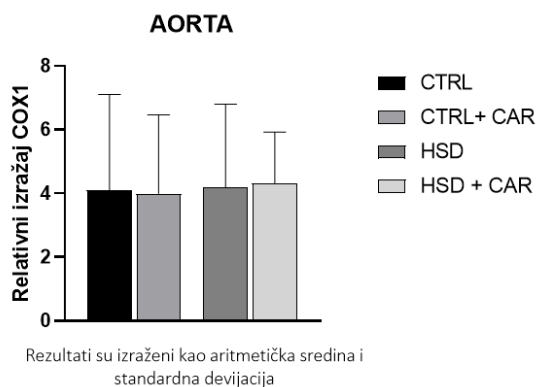
5. REZULTATI

5.1. Genski izražaj gena enzima uključenih u mehanizme dilatacije u aortama Sprague-Dawley štakora

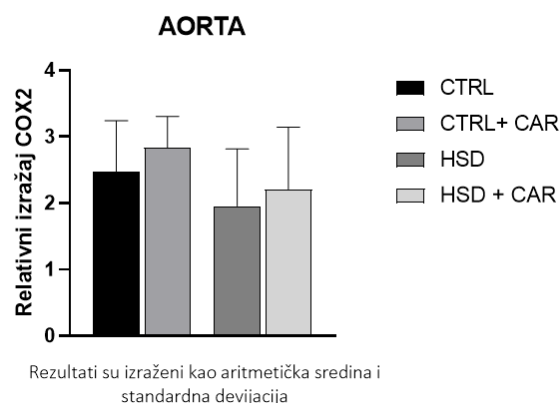
Nakon 7 dana prehrane s visokim i niskim unosom soli te nadomjestkom karnozina određen je genski izražaj enzima uključenih u mehanizme dilatacije: *COX-1*, *COX-2*, *eNOS* i *iNOS* te su rezultati normalizirani u odnosu na referentni gen β -*aktin*.

Rezultati su pokazali kako nema značajne statističke razlike u izražaju gena enzima *COX-1* (Slika 2A), *COX-2* (Slika 2B) i *iNOS* (Slika 2D). Kod genskog izražaja eNOS-a (Slika 2C) je utvrđena značajna statistička razlika. Genski izražaj eNOS značajno je povećan u HSD + CAR skupini u usporedbi s HSD skupinom ($P = 0,003$) i u usporedbi s CTRL skupinom ($P = 0,023$).

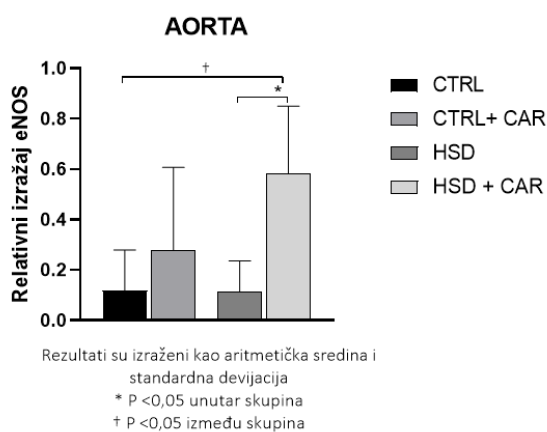
A



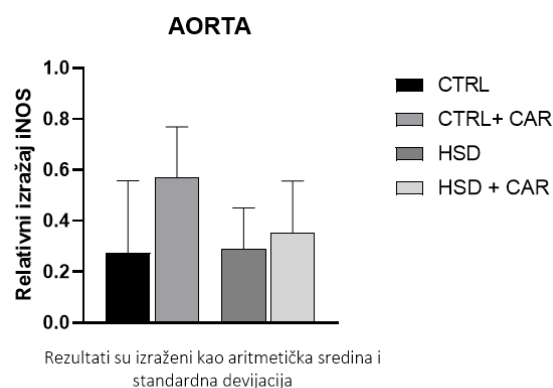
B



C



D



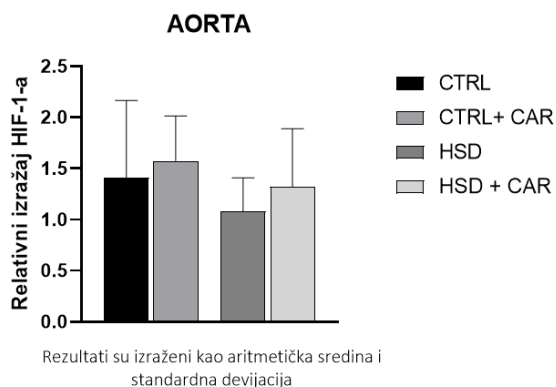
Slika 2: Relativni izražaj gena; *COX-1* (A), *COX-2* (B), *eNOS* (C), *iNOS* (D) određen je u uzorcima aorti Sprague-Dawley štakora RTqPCR metodom. Uzorci su podijeljeni u četiri skupine: kontrolna skupina koja nije izložena prehrani s visokim unosom soli niti nadomjestku karnozina (CTRL, N = 5), skupina koja je kroz tjedan dana konzumirala oralni nadomjestak karnozina (CTRL + CAR, N = 4), skupina koja je kroz tjedan dana konzumirala prehranu s visokim unosom soli (HSD, N = 6), skupina koja je kroz tjedan dana konzumirala prehranu s visokim unosom soli i oralni nadomjestak karnozina (HSD + CAR, N = 6), N predstavlja broj uzoraka. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija; *P < 0,05 usporedno s CTRL i HSD skupinom unutar skupine, †P < 0,05 usporedno s CTRL skupinom između skupina. Normalizacija izražaja je provedena prema izražaju gena za β -aktin.

5.2. Genski izražaj HIF-1 alfa, NOQ i transkripcijskog faktora NRF2 u aortama Sprague-Dawley štakora

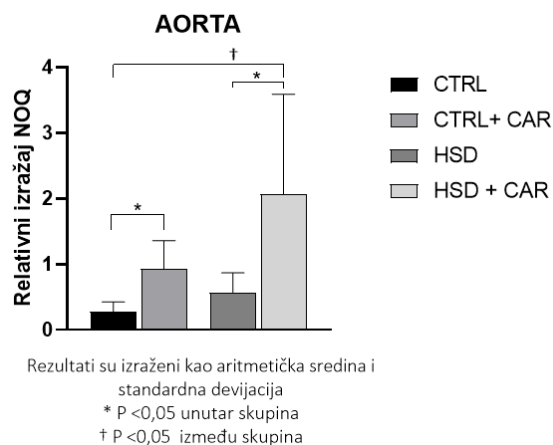
Izmjeren je genski izražaj *HIF-1 alfa* (Slika 3A), *NOQ* (Slika 3B) i transkripcijskog faktora *NRF2* (Slika 3C) u aortama Sprague-Dawley štakora te su rezultati normalizirani u odnosu na referentni gen β -aktin.

U genskom izražaju *HIF-1 alfa* nije uočena statistički značajna razlika između ispitivanih skupina, dok kod genskog izražaja *NOQ* i transkripcijskog faktora *NRF2* je utvrđena značajna statistička razlika. Genski izražaj *NOQ* značajno je povišen u CTRL + CAR skupini u odnosu na CTRL skupinu ($P = 0,0158$), zatim u HSD + CAR skupini u odnosu na HSD skupinu ($P = 0,0406$) i u HSD + CAR skupini u odnosu na CTRL ($P = 0,0294$). Izmjerene vrijednosti genskog izražaja transkripcijskog faktora *NRF2* pokazuju značajnu statističku razliku, povećan je izražaj u CTRL + CAR skupini u odnosu na CTRL ($P = 0,0144$) i u HSD + CAR skupini u odnosu na HSD skupinu ($P = 0,0405$).

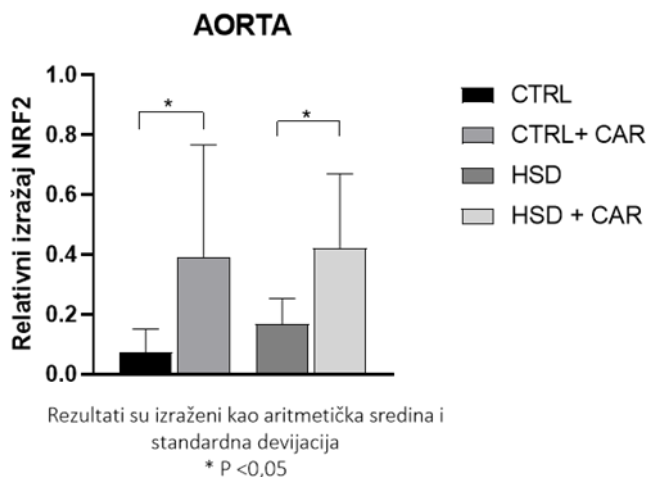
A



B



C



Slika 3: Relativni izražaj gena; *HIF-1 alfa* (A), *NOQ* (B) i transkripcijskog faktora *NRF2* (C) određen je u aortama Sprague-Dawley štakora RTqPCR metodom. Uzorci su podijeljeni u četiri skupine: kontrolna skupina koja nije izložena prehrani s visokim unosom soli niti nadomjestku karnozina (CTRL, N = 5), skupina koja je kroz tjedan dana konzumirala oralni nadomjestak karnozina (CTRL + CAR, N = 4), skupina koja je kroz tjedan dana konzumirala prehranu s visokim unosom soli (HSD, N = 6), skupina koja je kroz tjedan dana konzumirala prehranu s visokim unosom soli i oralni nadomjestak karnozina (HSD + CAR, N = 6), N predstavlja broj uzoraka. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija; *P < 0,05 usporedno s CTRL i HSD skupinom unutar skupine, †P < 0,05 usporedno s CTRL skupinom između skupina. Normalizacija izražaja je provedena prema izražaju gena za β -aktin.

6. RASPRAVA

Do danas su objavljena brojna istraživanja koja proučavaju utjecaj soli na povećavanje razine oksidativnog stresa i vaskularnu funkciju (2,6,22). Povećana konzumacija soli značajno utječe na povećanje rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti i hipertenzije (9). U pozadini kardiovaskularnih bolesti koje su povezane s visokim unosom soli je endotelna disfunkcija (8). Endotelnu disfunkciju karakterizira nastanak upale, protrombotičke promjene i smanjena vazodilatacija. Prekomjeren unos soli, na genskoj razini, dovodi do povećanog stvaranja ROS-a, a posljedično tome nastaju oštećenja staničnih struktura i oksidativni stres. Dosadašnja istraživanja su pokazala kako prehrana s visokim unosom soli koja traje 3-7 dana, neće značajno promijeniti vrijednosti krvnog tlaka (22). NO ima glavnu ulogu u vazodilataciji, a glavni faktor koji stvara NO je sila smicanja koja potiče stimulaciju receptora endotelnih stanica i fosforilaciju eNOS-a (22). Osim NO i produkti enzima COX-1 i COX-2, prostaglandini i prostaciklini utječu na razinu relaksacije krvne žile, a mogu utjecati i na promjenu dilatacije. Prema istraživanjima, povećana razina oksidativnog stresa može dovesti do razvoja endotelne disfunkcije tako što aktivira endotelne stanice, a može i narušiti homeostazu iona, prijenos signala u stanicama i gensku transkripciju (23). U našem istraživanju, doza karnozina koja je suplementirana Sprague-Dawley štakorima je podešena s obzirom na tjelesnu masu životinja jer prevelika doza može biti toksična (23). Provedena su istraživanja koja su proučavala utjecaj prehrane s visokim unosom soli na izražaj gena eNOS i iNOS. Štakori su konzumirali visokoslanu prehranu tijekom 3 tjedna te je uočen smanjeni izražaj eNOS-a u aorti i bubrežnom korteksu. Također, uočen je smanjeni izražaj iNOS-a u aorti (24). U našem istraživanju značajna statistička razlika uočena je u genskom izražaju eNOS-a posebno u 4. skupini koja je bila izložena prehrani s visokim unosom soli i karnozinom u odnosu na kontrolnu skupinu. Dodatkom karnozina na takvu prehranu povećao se genski izražaj zbog toga što je karnozin na sebe vezao dio ROS-a. U genskom izražaju iNOS enzima nije došlo do značajne statističke razlike što bi se moglo objasniti time da je potrebna dugotrajnija prehrana s visokim unosom soli da izazove značajnu statističku razliku. COX su enzimi koji stvaraju prostaglandin H₂ koji se zatim djelovanjem enzima pretvara u druge prostaglandine i tromboksane. Oni su bitni za održavanje ravnoteže između vazodilatacije i vazokonstrukcije (11). COX-1 sudjeluje u sintezi tromboksana koji je vazokonstriktor dok COX-2 sudjeluje u sintezi prostaciklina koji je vazodilatator (25). Matarogui i sur. su u svom istraživanju pokazali da visoke koncentracije soli zajedno sa inhibicijom COX-2 smanjuju dilataciju arterija (26). Prema njihovom istraživanju eliminacija oksidativnog stresa ne utječe na izražaj gena COX-1 i COX-2 što se poklapa sa

rezultatima u ovom istraživanju gdje nije došlo do značajne promjene u izražaju navedenih gena. U dosadašnjim istraživanjima nema puno podataka o ulozi HIF-1 alfa u stanjima oksidativnog stresa i prehrani s visokim unosom soli. Ono što je poznato je da je HIF-1 alfa značajno izražen u bubrežnoj srži i dokazano je da je njegova razina povišena tijekom prehrane s visokim unosom soli (22). Pretpostavlja se da regulacija gena posredovana transkripcijskim faktorom HIF-1 alfa predstavlja važan mehanizam na povećan unos soli i regulaciju natrija u bubrezima (27). Prema nedavnim istraživanjima u kojima je proučavan oksidativni stres na žilama mozga Sprague-Dawley štakora, genski izražaj HIF-1alfa nije povećan te je pretpostavljeno da HIF-1-alfa reagira nakon dužeg izlaganja prehrani s visokim unosom soli (22). Kako ni u ovom istraživanju HIF-1-alfa nije pokazala povećan izražaj može se pretpostaviti da je razlog tomu isti. U enzimu *NOQ* i transkripcijskom faktoru *NRF2* uočava se značajna statistička razlika kod skupina koje su izložene nadomjestku karnozina u odnosu na kontrolnu skupinu a to se može objasniti time da je *NRF2* značajan transkripcijski faktor koji sudjeluje u mehanizmima obrane od oksidativnog stresa. U prethodnim istraživanjima pokazano je da prehrana s visokim unosom soli povećava razinu oksidativnog stresa (8) što je moguće potaknulo transkripcijski faktor *NRF2* da se translocira iz citoplazme u jezgru gdje aktivira izražaj niza gena, a među njima i *NOQ*. Može se pretpostaviti da se u skupini koja je izložena prehrani s visokim unosom soli povisio oksidativni stres što otežava normalno stanično funkcioniranje i stanica se ne može obraniti transkripcijom gena koji se inače koriste u obrani od oksidativnog stresa. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem poklapaju se sa prethodnim istraživanjima utjecaja nadomjestka karnozina na smanjenje razine oksidativnog stresa koji je uzrokovan prehranom s visokim unosom soli provedenim u Laboratoriju za kliničku i molekularnu imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek, tijekom kojih je uočen pojačani genski izražaj gena antioksidativnih enzima i poboljšana relaksacija aortalnih prstenova kod Sprague-Dawley štakora (9,8). Dobiveni rezultati ukazuju da karnozin ima ulogu u obrani organizma od oksidativnog stresa uzrokovanog prehranom s visokim unosom soli te da utječe na mehanizme vaskularne reaktivnosti i na genskoj razini (9,8). Za daljnje proučavanje i potvrdu utjecaja na vaskularnu funkciju potrebno je provesti funkcionalno ispitivanje korištenjem *NRF2* inhibitora i inhibitora *NOS* enzima.

7. ZAKLJUČAK

Nakon provedenog istraživanja može se zaključiti da nadomjestak karnozina i prehrana s visokim unosom soli utječu na izražaj gena dok antioksidativni učinak karnozina najvjerojatnije uključuje aktivaciju transkripcijskog faktora NRF2. Za daljnje proučavanje utjecaja na vaskularnu funkciju potrebno je provesti funkcionalno ispitivanje korištenjem specifičnih agonista i antagonista.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Odrediti utjecaj prehrane s visokim unosom soli i nadomjestkom karnozina na izražaj gena enzima uključenih u mehanizme dilatacije krvnih žila i transkripcijskog faktora NRF2 kod Sprague-Dawley štakora.

Materijali i metode: Zdravi Sprague-Dawley štakori starosti 8-10 tjedana koji su podijeljeni u četiri skupine: CTRL (kontrolna skupina koja nije izložena niti prehrani s visokim unosom soli niti nadomjestku karnozina, HSD (skupina koja je izložena prehrani s visokim unosom soli), CTRL + CAR (skupina koja je tijekom 7 dana primala oralni nadomjestak karnozina 150mg/kg), HSD + CAR (skupina koja je tijekom 7 dana bila izložena prehrani s visokim unosom soli i kojoj je jednom dnevno dan nadomjestak karnozina). Relativni izražaj gena određen je RTqPCR metodom na Bio-Rad Real Time PCR CFX96 uređaju.

Rezultati: Tijekom tjedan dana prehrane rezultati su pokazali kako skupina koja je konzumirala hranu s visokim unosom soli i jednom dnevno primala nadomjestak karnozina (HSD + CAR) pokazuje povećan izražaj gena eNOS, NOQ i NRF2 u odnosu na HSD i kontrolnu skupinu koja nije bila izložena prehrani s visokim unosom soli i nadomjestkom karnozina

Zaključak: Karnozin i prehrana s visokim unosom soli utječu na izražaj gena dok antioksidativni učinak najvjerojatnije uključuje aktivaciju transkripcijskog faktora NRF2.

Ključne riječi: karnozin, Sprague-Dawley štakori, prehrana s visokim unosom soli

9. SUMMARY

The influence of a high salt diet and oral carnosine supplementation on the expression of genes of enzymes involved in the mechanisms of blood vessel dilatation and the transcription factor NRF2 in Sprague-Dawley rats

Objectives: To investigate the influence of a high salt diet and carnosine supplementation on gene expression of enzymes involved in the mechanisms of blood vessel dilatation and the transcription factor NRF2 in Sprague-Dawley rats

Materials and Methods: Healthy Sprague-Dawley rats aged 8-10 weeks that were divided into four groups: CTRL (control group exposed to neither high salt diet nor carnosine supplement. HSD (group exposed to high salt diet), CTRL + CAR (group that received 150mg/kg oral carnosine supplement for 7 days), HSD + CAR (group that was exposed to a high salt diet for 7 days and was given carnosine supplement once a day). Relative gene expression was determined by the RTqPCR method on a Bio-Rad Real Time PCR CFX96 device

Results: During the week of the diet, the results showed that the group that consumed food with a high salt intake and received a carnosine supplement once a day showed an increased gene expression of enzymes eNOS, NOQ and NRF2 compared to the HSD and control group that was not exposed to a diet with high salt intake and carnosine supplementation

Conclusion: Carnosine and high-salt diet affect gene expression while the antioxidant effect most likely involves the activation of the NRF2 transcription factor.

Key words: carnosine, high salt diet; Sprague-Dawley rats

10. LITERATURA

1. The Nutrition Source, Salt and Sodium [Internet]. 2023 [citirano 14. svibanj 2024.] Dostupno na: <https://nutritionsource.hsph.harvard.edu/salt-and-sodium/>
2. Ivković M. Utjecaj različitih koncentracija NaCl-a na razinu oksidativnog stresa u humanim aortalnim endotelnim stanicama (HAEC) [Završni rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2023 [pristupljeno 26.06.2024.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:774360>
3. Perić L. Učinak 7-dnevne dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli na o dušikovom-oksidu ovisnu endotelnu dilataciju mikrocirkulacije kože u zdravih pojedinaca [Diplomski rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2022 [pristupljeno 24.06.2024.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:731202>
4. Milković M. Povezanost unosa soli hranom i razine superoksid dismutase u krvi ljudi [Diplomski rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2017 [pristupljeno 27.06.2024.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:138616>
5. Grillo A, Salvi L, Coruzzi P, Salvi P, Parati G. Sodium Intake and Hypertension. *Nutrients*. 2019 Aug 21;11(9):1970. doi: 10.3390/nu11091970. PMID: 31438636; PMCID: PMC6770596.
6. 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* [Internet]. 2011 [pristupljeno 27.06.2024.];6(3-4):141-147. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/76265>
7. Čavka A, Tadžić R, Grizelj I, Unfirer S, Mihaljević Z, Mihalj M i sur. Endotelna funkcija - funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. *Medicinski vjesnik* [Internet]. 2012 [pristupljeno 27.06.2024.];44((1-4)):135-146. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/187756>
8. Zidar A. Učinak nadomjestka karnozina na razinu oksidativnog stresa kod Sprague-Dawley štakora na visokoslanjoj dijeti [Diplomski rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2023 [pristupljeno 22.06.2024.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:432624>
9. Zidar M. Učinak nadomjestka karnozina na vaskularnu funkciju izoliranih aortalnih prstenova Sprague-Dawley štakora na visokoslanjoj dijeti [Diplomski rad]. Osijek: Sveučilište

- Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2023 [pristupljeno 24.06.2024.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:462668>
10. Grinžek T. Izražaj mRNA enzima COX1, COX2, eNOS i iNOS kod sportaša koji konzumiraju kokošja jaja obogaćena n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, luteinom, selenom i vitaminom E [Završni rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2022 [pristupljeno 25.06.2024.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:707532>
 11. Omičević A. Utjecaj akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na izražaj proteina enzima uključenih u mehanizme dilatacije krvnih žila te transkripcijskog faktora HIF-1 alfa kod Sprague-Dawley štakora [Završni rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2022 [pristupljeno 27.06.2024.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:644774>
 12. Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, Zuckerbraun BS. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin.* 2020 Apr;36(2):307-321. doi: 10.1016/j.ccc.2019.12.009. PMID: 32172815; PMCID: PMC9015729.
 13. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2021 Sep;20(9):689-709. doi: 10.1038/s41573-021-00233-1. Epub 2021 Jun 30. Erratum in: *Nat Rev Drug Discov.* 2021 Aug;20(8):652. doi: 10.1038/s41573-021-00267-5. PMID: 34194012; PMCID: PMC8243062.
 14. Teodosić A. Utjecaj arterijskog krvnog tlaka na biljege oksidativnog stresa u novootkrivenih hipertenzivnih bolesnika [Diplomski rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2016 [pristupljeno 23.06.2024.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:849654>
 15. Jukić I, Kolobarić N, Stupin A, Matić A, Kozina N, Mihaljević Z, Mihalj M, Šušnjara P, Stupin M, Ćurić ŽB, Selthofer-Relatić K, Kibel A, Lukinac A, Kolar L, Kralik G, Kralik Z, Széchenyi A, Jozanović M, Galović O, Medvidović-Kosanović M, Drenjančević I. Carnosine, Small but Mighty-Prospect of Use as Functional Ingredient for Functional Food Formulation. *Antioxidants (Basel).* 2021 Jun 28;10(7):1037. doi: 10.3390/antiox10071037. PMID: 34203479; PMCID: PMC8300828.
 16. Cesak O, Vostalova J, Vidlar A, Bastlova P, Student V Jr. Carnosine and Beta-Alanine Supplementation in Human Medicine: Narrative Review and Critical Assessment. *Nutrients.* 2023 Apr 5;15(7):1770. doi: 10.3390/nu15071770. PMID: 37049610; PMCID: PMC10096773.

17. Wu G. Important roles of dietary taurine, creatine, carnosine, anserine and 4-hydroxyproline in human nutrition and health. *Amino Acids*. 2020 Mar;52(3):329-360. doi: 10.1007/s00726-020-02823-6. Epub 2020 Feb 18. PMID: 32072297; PMCID: PMC7088015.
18. Creighton JV, de Souza Gonçalves L, Artioli GG, Tan D, Elliott-Sale KJ, Turner MD, Doig CL, Sale C. Physiological Roles of Carnosine in Myocardial Function and Health. *Adv Nutr*. 2022 Oct 2;13(5):1914-1929. doi: 10.1093/advances/nmac059. PMID: 35689661; PMCID: PMC9526863.
19. He F, Ru X, Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 6;21(13):4777. doi: 10.3390/ijms21134777. PMID: 32640524; PMCID: PMC7369905.
20. He X, Deng J, Yu XJ, Yang S, Yang Y, Zang WJ. Activation of M3AChR (Type 3 Muscarinic Acetylcholine Receptor) and Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2) Signaling by Choline Alleviates Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Vascular Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020 Nov;40(11):2649-2664. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.315146. Epub 2020 Sep 17. PMID: 32938216.
21. Huang J, Zhang H, You L, Zhang J, Jiang Z. Coenzyme Q10 inhibits intracranial aneurysm formation and progression in a mouse model. *Pediatr Res*. 2022 Mar;91(4):839-845. doi: 10.1038/s41390-021-01512-8. Epub 2021 Apr 15. PMID: 33859365.
22. Ćosić A. ULOGA OKSIDATIVNOG STRESA U RAZVOJU POREMEĆENOG VASKULARNOG ODGOVORA POD UTJECAJEM VISOKOG UNOSA NATRIJEVA KLORIDA KOD SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA [Disertacija]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2016 [pristupljeno 27.06.2024.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:300285>
23. Agrawal A, Rathor R, Kumar R, Singh SN, Kumar B, Suryakumar G. Endogenous dipeptide-carnosine supplementation ameliorates hypobaric hypoxia-induced skeletal muscle loss via attenuating endoplasmic reticulum stress response and maintaining proteostasis. *IUBMB Life*. 2022 Jan;74(1):101-116. doi: 10.1002/iub.2539. Epub 2021 Aug 29. PMID: 34455667.
24. Ni Z, Vaziri ND. Effect of salt loading on nitric oxide synthase expression in normotensive rats. *Am J Hypertens*. 2001 Feb;14(2):155-63. doi: 10.1016/s0895-7061(00)01234-6. PMID: 11243307.
25. Papak Z. Utjecaj primjene blokatora angiotenzin II AT-1 receptora (losartana) na izražaj proteina ciklooksigenaze I i II u krvnim žilama Sprague-Dawley štakora [Završni rad].

Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2018 [pristupljeno 23.06.2024.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:546576>

26. Matrougui K, Loufrani L, Lévy BI, Henrion D. High NaCl intake decreases both flow-induced dilation and pressure-induced myogenic tone in resistance arteries from normotensive rats: involvement of cyclooxygenase-2. *Pharmacol Toxicol.* 2001 Oct;89(4):183-7. doi: 10.1111/j.0901-9928.2001.890407.x. PMID: 11881968.

27. Grgić K. Utjecaj kratkotrajne slane dijeta na izražajnost HIF1 alfa u krvnim žilama štakora [Završni rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2017 [pristupljeno 26.06.2024.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:936893>

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Eva Hrastinski

Datum i mjesto rođenja: 08. kolovoza 2001., Osijek, Republika Hrvatska

Adresa stanovanja: Ivana Mažuranića 29, 31221 Josipovac

E-mail: hrastinskieva@gmail.com

Obrazovanje:

2016-2020 Tehnička škola i prirodoslovna gimnazija Ruđera Boškovića u Osijeku

2020- danas sveučilišni prijediplomski studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika,
Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku