

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Magdalena Kelčić

**PROMJENA SERUMSKE KONCENTRACIJE OKSIDIRANIH
LIPOPROTEINA NISKE GUSTOĆE I NAPREDNIH
OKSIDIRANIH PROTEINSKIH PROIZVODA POD
UTJECAJEM VISOKOG UNOSA SOLI KOD
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Magdalena Kelčić

**PROMJENA SERUMSKE KONCENTRACIJE OKSIDIRANIH
LIPOPROTEINA NISKE GUSTOĆE I NAPREDNIH
OKSIDIRANIH PROTEINSKIH PROIZVODA POD
UTJECAJEM VISOKOG UNOSA SOLI KOD
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu u Osijeku, Katedra za fiziologiju i imunologiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Anita Matić, dipl. ing., Katedra za fiziologiju i imunologiju

Rad ima 27 listova, 2 tablice i 3 slike.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Aniti Matić na velikoj pomoći, savjetima i ugodnoj suradnji tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem obitelji, dečku i kolegama na razumijevanju, strpljenju i podršci tijekom ovih 5 godina studija.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Sol.....	1
1.2. Oksidativni stres i markeri oksidativnog stresa	2
1.2.1. Oksidativni stres i sol.....	4
1.2.2. Uloga angiotenzina II kod prekomjernog unosa soli	4
1.3. Oksidirani lipoproteini niske molekularne gustoće (oxLDL).....	5
1.4. Napredni oksidirani proteinski proizvodi (AOPP)	6
2. HIPOTEZA	9
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	10
4. MATERIJALI I METODE	11
4.1. Ustroj istraživanja.....	11
4.2. Materijali	11
4.3. Metode	12
4.4. Statistička analiza	13
5. REZULTATI.....	14
5.1. Serumska koncentracija oksidiranih lipoproteina niske molekularne gustoće	15
5.2. Serumska koncentracija naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda (AOPP)	16
6. RASPRAVA.....	17
7. ZAKLJUČAK	20
8. SAŽETAK.....	21
9. SUMMARY	22
10. LITERATURA.....	23
11. ŽIVOTOPIS	27

POPIS KRATICA

AAPH - azobis amidinopropan dihidroklorid

ANG II - ANGIotenzin II

AOPP - napredni oksidirani proteinski proizvodi (engl. *Advanced Oxidation Protein Products*)

Apo B - apoprotein B

BSA - goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*)

cGMP - ciklički gvanozin monofosfat

CRP - C-reaktivni protein

CVI - cerebrovaskularni inzult

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

ELISA - engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FRAP - antioksidativni kapacitet plazme (engl. *Ferric Reducing Ability of Plasma*)

GPx4 - glutation peroksidaza 4

GSH/GSSG - reducirani/oksidirani glutation

4-HNE - 4-hidroksinonenal

H₂O₂ - vodikov peroksid

HOCl - hipoklorna kiselina

IBS - ishemična bolest srca

MDA - malondialdehid

MPO - mijeloperoksidaza

NaCl - natrijev klorid

NADPH - nikotinamid dinukleotid fosfat

NO - dušikov oksid

O²⁻ - kisikov ion

oxLDL - oksidirani lipoprotein niske gustoće (engl. *Oxidized Low-density Lipoprotein*)

PMA - forbol 12-miristat 13-acetat

RAS - renin-ANGiotenzin sustav

ROS - reaktivni kisikovi spojevi

SOD - superoksid dismutaza

SZO - Svjetska zdravstvena organizacija

TAC - ukupni antioksidacijski kapacitet

TBARS - reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (engl. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)

TNF - faktor nekroze tumora

1. UVOD

1.1. Sol

Sol je zadnjih nekoliko tisuća godina smatrana isključivo zdravom, korisnom i potrebnom za život. Tada je bila potrebna za konzerviranje hrane, a danas, kako imamo bolju tehnologiju i druge načine čuvanja hrane, prekomjerno dodavanje soli postaje višak (1). Veliki broj istraživanja potvrđuje kuhinjsku sol kao bitan čimbenik koji određuje visinu arterijskog tlaka. Postoji povezanost s koronarnom bolesti, hipertrofijom lijeve klijetke, CVI-em, mikroalbuminurijom te sudjeluje i u procesu aterotrombogeneze. Dokazano je da prekomjeren unos kuhinjske soli predstavlja čimbenik rizika za osteoporozu, nefrolitijazu, karcinom želuca, nazofarinksa i dr. (2). Trenutno se u Europi dnevno unosi 10 - 12 g/dan, dok je preporuka SZO-a 5 - 6 g/dan (1). Takvo smanjenje ima veliki učinak na krvni tlak, ali nije idealno. Daljnje smanjenje na 3 g/dan imalo bi jači učinak te bi trebalo postati dugoročni cilj za unos soli u svijetu (3). Kada bi se smanjio unos soli za samo 1 g/dan, spriječilo bi se 6 700 smrti na godinu od cerebrovaskularnih inzulta i ishemične bolesti srca. Gledajući ukupno svjetsko stanovništvo, smanjenjem unosa kuhinjske soli na 6 g/dan, spriječilo bi se oko 2,5 milijuna smrti na godinu od CVI-a i IBS-a. 5 % soli unosimo prirodnim izvorima, 15 % dodajemo sami, a najveći dio (75 - 80 %) unosimo bez znanja, najvećim dijelom iz gotovih i polugotovih prehrambenih proizvoda. Zbog takve situacije u raznim državama svijeta pokrenuti su nacionalni programi koji se promiču i na svjetskoj razini. Tako je i u Hrvatskoj oživjela Hrvatska inicijativa za smanjenje prekomjernog unosa kuhinjske soli "Manje soli-više zdravlja". Smanjenje unosa bitno je provoditi u starijih osoba i djece. Kod starijih jer je hipertenzija osjetljiva na sol, a kod djece jer je lakše mijenjati loše navike u ranijoj dobi (1). Cilj je radi prevencije pučanstvo upoznati s rizicima, organizirati putem vladinih institucija i u suradnji s proizvođačima hrane deklaraciju količine NaCl-a u namirnicama (2). Postoji niz znanstvenih dokaza o pozitivnoj povezanosti između smanjenja unosa soli i sniženja arterijskog tlaka te smanjenja svih komplikacija i nepovoljnih zdravstvenih ishoda (1).

1.2. Oksidativni stres i markeri oksidativnog stresa

Koncept oksidativnog stresa iznesen je 1985. godine (4). Oksidativni stres je normalan fenomen u ljudskom tijelu (5). Predstavlja ga neravnoteža između oksidansa i antioksidansa (5, 6), u korist oksidansima, koja vodi do oštećenja (6, 7). Oksidansi su normalni produkti aerobnog metabolizma, ali njihova proizvodnja može biti povišena u patofiziološkim stanjima. Relativnu ravnotežu održavaju antioksidansi (6). Do poremećaja ravnoteže između nastajanja radikala i antioksidacijske obrane može doći zbog mehaničkih oštećenja, bakterija, virusa, toksina, a kao posljedica dolazi do gubitka antioksidansa, povećanja količine oksidansa ili akumulacije oštećenih i promijenjenih molekula (8).

Slobodni radikali su kemijske vrste koje imaju jedan nesporen elektron u vanjskoj orbitali i zbog toga su visoko reaktivne elektrofilne vrste. Reagiraju s anorganskim i organskim spojevima, kao što su proteini, lipidi, ugljikohidrati i nukleinske kiseline. Mogu se povezati s gotovo svim atomima, ali su od najvećeg značaja atomi kisika, dušika i ugljika (8). Slobodni radikali sudjeluju u velikom broju reakcija u kojima se stvaraju reaktivni metaboliti. To su, na primjer, superoksidni, hidroksilni, hidroperoksidni radikal, vodikov peroksid, peroksid radikal, singlet kisik, dušikov oksid, peroksinitrit i hipoklorna kiselina (8, 9).

Antioksidansi mogu biti velike molekularne mase, kao i male, također mogu biti endogeni i egzogeni. U antioksidanse velike molekularne mase spadaju superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza, a od proteina albumin, transferin i metalotioneini. Endogeni antioksidansi male molekularne mase su urična kiselina, lipoična kiselina, glutation i ubikinol. Od egzogenih razlikujemo vitamin C i E i flavonoide (9). Zaštita od oksidativnog stresa je organizirana na 3 razine. Na prvoj se sprječava stvaranje slobodnih radikala. To je moguće postići održavanjem niskog tlaka kisika u tkivima, "zatvaranjem" enzima koji stvaraju radikale u peroksisome, lizosome, mitohondrije te vezanjem iona željeza, bakra, hemoglobina i hema u komplekse s proteinima (transferin, feritin, ceruloplazmin, albumin, haptoglobin, hemopeksin). Ako sprječavanje stvaranja radikala ne uspije, na sljedećoj razini, već stvorene slobodne radikale hvataju i neutraliziraju antioksidansi. Na trećoj se razini odvija popravak, ako zaštita na prve dvije razine ne uspije (8, 9).

Mitohondriji su najvažniji izvor staničnih reaktivnih kisikovih spojeva. U njima se odvija kontinuirana produkcija reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) jer je u njima smješten transportni lanac elektrona, koji je odgovoran za produkciju energije u stanici. Osim

mitohondrija, poznato je da i neki enzimi citokroma P450 proizvode ROS, kao i da nastaju u reakcijama koje uključuju peroksisomalnu oksidazu, NAD(P)H oksidazu ili ksantin oksidazu (5). Oksidativni stres je fenomen povezan s patogenim mehanizmima različitih bolesti uključujući aterosklerozu, neurodegenerativne bolesti, rak, šećernu bolest, autoimune bolesti, upalne bolesti, fiziološke bolesti ili procese starenja (9). Biljezi oksidativnog stresa se obično mjere u plazmi koja je stabilno okruženje za biljege (10). Indikatori *in vivo* redoks statusa su omjer GSH/GSSG, NADPH/NADP⁺, NADH/NAD⁺ (9), TBARS, AOPP, fruktozamin, TAC i FRAP (10). Neki drugi biljezi oksidativnog stresa navedeni su u Tablici 1.

Tablica 1. Biomarkeri oksidativnog stresa (7)

MODIFIKACIJE UZROKOVANE ROS-om	MARKERI ROS GENERACIJE	MARKERI ANTIOKSIDACIJSKE OBRANE	NIZVODNI FUNKCIONALNI MARKERI OŠTEĆENJA UZROKOVANIH ROS-om
1) Proteinski karbonili i krajnji proizvodi napredne glikacije	1) Ksantin oksidaza	1) Protein tiol-disulfid oksidoreduktaza	1) Asimetrični dimetil L-arginin
2) oxLDL	2) Mijeloperoksidaza	2) Nuklearni faktor 2	2) Fosforilirani fosfoprotein stimuliran vazodilatatorom
3) Produkti lipidne oksidacije			
4) F-2 izoprostani			
5) Izolevuglandini			
6) 3-nitrotirozin			
7) Tioli			
8) Glutation			
9) Cistein			
10) Proteinski tioli i miješani disulfidi			
11) Površinski tioli			
12) Metionin sulfoksid			
13) DNA/RNA oksidacija			

1.2.1. Oksidativni stres i sol

Dijeta s visokim udjelom soli ima štetne učinke na organske sustave u ljudskom organizmu (11). Visoke doze soli dovode do oštećenja mikrocirkulacije, značajnog porasta arterijskog tlaka te porasta ROS-a (11, 12). Takva dijeta potiskuje renin-angiotenzinski sustav (RAS) i poznat je čimbenik rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. U dosadašnjim istraživanjima može se vidjeti, na različite načine, povezanost visokog unosa soli i promjene krvnog tlaka, ovisno o modelu (ljudski ili životinjski) te o duljini trajanja visokoslane dijeta. Brojne studije pokazale su da 3 - 7 dana visokoslane dijeta ne mijenja značajno vrijednost krvnog tlaka i ne izaziva pojavu hipertenzije (13), ali dovodi do endotelne disfunkcije i oštećene vaskularne reaktivnosti kod životinjskih i ljudskih modela zbog povećanog oksidativnog stresa (14).

Kod štakora hranjenih visokoslanom dijetom dolazi do endotelne stanične apoptoze i indukcije ROS-a. U prijašnjim istraživanjima uočeno je da supresija RAS-a slanom hranom dovodi do poremećene o endotelu ovisne dilatacije zbog povećanog oksidativnog stresa i promjene u stvaranju vazoaktivnih metabolita arahidonske kiseline (11). Unosom visokoslane hrane povećava se razina bazalnog unutarstaničnog ROS-a u limfocitima izoliranim iz mezenteričnih limfnih čvorova i slezene. Također se povećava i unutarstanična proizvodnja ROS-a u perifernim limfnim čvorovima nakon PMA stimulacije. Istovremeno, ne dolazi do značajne promjene arterijskog tlaka. To dokazuje da NaCl narušava oksidativnu ravnotežu i uzrokuje poremećaj funkcije krvnih žila neovisno o arterijskom tlaku i prije njegovih promjena (13, 15).

1.2.2. Uloga angiotenzina II kod prekomjernog unosa soli

Renin-angiotenzinski sustav (RAS) jedna je od najvažnijih karika u patofiziologiji vaskularnih bolesti. ANG II (ANG II) je glavni peptid RAS-a (16, 17, 18). Smatrao se vazoaktivnim hormonom pa čimbenikom rasta koji regulira proliferaciju stanica, apoptozu i fibrozu (19), a u novije se vrijeme smatra i proinflammatornim medijatorom zbog toga što proizvodi kemokine, citokine i adhezijske molekule koje potiču migraciju upalnih stanica na mjesto ozljede. Također je i kemotaktični i mitogeni faktor za mononuklearne stanice (18). Promicanjem proliferacije, upale i fibroze, ANG II doprinosi razvoju kroničnih bolesti. Neke od njih su hipertenzija, ateroskleroza, srčana hipertrofija i ozljeda bubrega.

Receptori ANG-a su AT1 i AT2 (16). AT1 regulira većinu patofiziološke aktivnosti ANG-a, kao što su regulacija krvnog tlaka i homeostaze elektrolita (20). Uloga AT2 još nije sasvim razjašnjena (16). Stimulacija tih receptora inhibira rast i promiče apoptozu (bitno za razvoj i remodeliranje tkiva). Druga je uloga otpuštanje NO/cGMP u aorti, srcu i bubrezima, što je protektivna uloga (21).

Istraživanja na animalnim modelima hipertenzije, gdje životinje imaju sniženu razinu ANG II zbog povećanog unosa soli, pokazala su povećani oksidativni stres i oštećenje vaskularne reaktivnosti. Time se povećava stvaranje ROS-a u stijenkama krvnih žila, a oni opet imaju učinak na razvoj hipertenzije (22). Studije su pokazale da je ključna poveznica između visokog unosa soli i razvoja endotelne disfunkcije ANG II. Osobe na visokoslanjoj dijeti imaju snižene razine ANG II u plazmi, ali ako im se intravenski primjene subpresorske doze ANG II tijekom visokoslane dijeta, dolazi do uspostavljanja normalne vaskularne relaksacije i smanjivanja povišenih vrijednosti ROS-a na normalne razine (13). ANG II stimulira aktivaciju NAD(P)H oksidaze, povećava ekspresiju njezinih podjedinica i inducira stvaranje ROS-a u glatkim mišićnim stanicama krvnih žila, endotelnim stanicama, adventicijskim fibroblastima i nedirnutim arterijama. Te učinke vrši preko AT1 receptora (23). Muraya i sur. tretirali su miševe s ANG II i soli, a nakon dva tjedna zabilježili su povišen krvni tlak, povećano izlučivanje proteina u urinu i povišene razine AOPP-a u plazmi (24).

1.3. Oksidirani lipoproteini niske molekularne gustoće (oxLDL)

Oksidacija LDL-a je kompleksan proces tijekom kojeg se i protein i lipidi oksidiraju i tvore kompleksne produkte. Proteini se mogu podvrći oksidativnim promjenama proteolizom i križnim vezama apoproteina B. Peroksidirani lipidi se razgrađuju generirajući slobodne i jezgrene aldehide i ketone, koji kovalentno modificiraju ϵ -amino skupine lizinskih ostataka proteinske skupine. To generira Schiffove baze tako modificirajući naboje na aminokiselinama, ali i rezultira stvaranjem intramolekularnih i intermolekularnih križnih veza između proteoliziranih apo B. Tako oštećene LDL-ove skupljaju i razgrađuju makrofazi. OxLDL može se definirati kao čestica dobivena iz cirkulirajućeg LDL-a koji ima u sebi perokside ili njihove razgradne produkte. Pretpostavljeni modeli oksidacije LDL-a su reakcija s lipooksigenazom, oksidacija posredovana bakrom i ceruloplazminom, željezom,

peroksidazom (uključujući mijeloperoksidazu i hem), peroksinitritom, oksidacija ovisna o tiolu, oksidacija ksantin-oksidadom i NADPH-oksidadom i oksidacija pomoću AAPH ili drugih sredstava radikalne generacije uključujući citokrome. OxLDL može sadržavati specifični oksidirajući produkt. Najjednostavniji primjer je lipoksigenazom tretiran LDL. Lipoprotein koji je podvrgnut takvom djelovanju može sadržavati različite količine fosfolipida i kolesterolestera hidroperoksida. OxLDL može sadržavati ograničene količine raznih degradiranih oksidiranih lipidnih proizvoda ("minimalno modificirani LDL"). Oksidacije posredovane peroksidazom zahtijevaju kooksidante (H_2O_2 ili lipidne perokside). Neki mehanizmi oštećuju proteine više nego drugi. Takvi su tretiranje LDL-a s 2, 2'-azobis (2-amidinopropan) dihidrokloridom (AAPH) ili peroksinitritom. Iako su te reakcije oksidativne, nisu jednako podložne inhibiciji tradicionalnim antioksidantima. Vitamin E, tirozin, estradiol i tioli čak pojačavaju oksidaciju LDL-a (25). U istraživanjima kroz zadnjih 30 godina pronađeno je kako oksidacija LDL-a pogoduje endotelnoj disfunkciji, starenju žila i vaskularnoj bolesti (26). Oksidirana forma LDL-a ima veću ulogu u aterogenezi nego njegova nativna forma (27). OxLDL je biljeg oksidativnog stresa, ali i pro-aterogeni biljeg za koronarnu bolest srca (26). Molekula koja je zaslužna za unos oxLDL-a u endotelne stanice je LOX-1 receptor (27). Subendotena retencija LDL-a i njegove oksidirane modifikacije predstavlja početni događaj u aterogenezi, što je praćeno infiltracijom i aktivacijom upalnih krvnih stanica (28). Aterogenezi pomaže leukocitagenezom, agregacijom trombocita, proliferacijom i migracijom stanica vaskularnih glatkih mišića, ekspresijom adhezijskih molekula, formacijom pjenušavih stanica i tromba (26, 29). Visoke razine oksidiranog LDL-a povezane su i s povećanom incidencijom metaboličkog sindroma, abdominalne pretilosti, hiperglikemije i hipertrigliceridemije (26).

1.4. Napredni oksidirani proteinski proizvodi (AOPP)

Napredni oksidirani proteinski proizvodi (AOPP) su novi biljezi oksidativnog oštećenja proteina (30, 31) i nova klasa upalnih medijatora, koji mogu potaknuti oksidativni stres i upalu. Zbog tog poticanja oksidativnog stresa i upale, mogu ubrzati progresiju ateroskleroze. Neke studije navode da su razine AOPP-a u plazmi pozitivno povezane s krvnim tlakom te da su neovisni čimbenici rizika za kardiovaskularne bolesti. AOPP mogu izazvati oksidativna izbijanja neutrofila, monocita i fagocita, povećati stvaranje ROS-a i poticati izlučivanje citokina i tako ubrzati ozljedu endotelnih stanica (31).

Witko-Sarsat i sur. prvi su opisali AOPP kao nove biljege oksidativnog stresa u plazmi bolesnika s kroničnom uremijom. Mogu nastati u mnogo stanja, u neravnoteži između oksidansa i antioksidansa, procesima glikolne oksidacije i upalama, ipak većina AOPP-a nastaje u oksidativnom stresu posredovanjem mijeloperoksidaze (MPO) (31, 32). Primarno podrijetlo AOPP-a je oksidacijski promijenjen albumin, ali može nastati i iz fibrinogena i kolagena.

Točna struktura tih proteina nije još poznata, ali se zna da su sastavljeni od proteinskih produkata koji sadrže ditirozin, pentozidin i karbonil, koji nastaju u reakcijama proteina plazme s hipoklornom kiselinom (HOCl) i kloraminima u oksidativnom stresu. Ditirozin je znak terminalne faze oštećenja proteina kao i znak prisutnosti AOPP-a (31). *In vivo*, razine AOPP-a u plazmi usko koreliraju s razinama ditirozina i pentozidina, koji su oboje markeri oksidativnog stresa (33).

Postoje dvije vrste AOPP-a, AOPP niske molekularne mase i AOPP visoke molekularne mase, a plazmom ih nose oksidirani proteini, naročito albumin. AOPP male molekularne mase sadrže monomerni oblik albumina, dok ovi visoke molekularne mase nastaju zbog sklonosti albumina da stvara agregate preko disulfidnih mostova i/ili ditirozinskog umrežavanja. Formacija AOPP-a je nepovratna i ne može biti lako hidrolizirana proteolitičkim enzimima ili reducirana antioksidansima, kao što su vitamin C i glutation. Za eliminaciju iz organizma su uglavnom odgovorne jetra i slezena. *In vivo*, AOPP može se proizvesti oksidacijom albumina pomoću HOCl formiranog kroz MPO-katalizirajuće reakcije u cirkulirajućim neutrofilima. *In vitro*, AOPP su sposobni izazvati respiratorne eksplozije iz neutrofila i monocita kako bi inducirali sustavnu upalu i povećali cirkulaciju TNF-a, C-reaktivnog proteina (CRP) i drugih medijatora upale. Spektrofotometrijski se mogu odrediti na 340 nm valne duljine.

Akumulacija AOPP-a povezana je s mnogo patoloških stanja, uključujući osteoartritis, uremiju, hipertrigliceridemiju, bolest koronarne arterije i aterosklerozu. Razina AOPP-a povećava se s ozbiljnosti bolesti te se može koristiti za praćenje napredovanja i prognoze bolesti, tako da se za terapiju može koristiti inhibicija njihovog stvaranja (31).

Oksidativni metabolizam AOPP-a može rezultirati stvaranjem slobodnih kisikovih radikala (superoksidni, peroksidni, hidroksidni) te uzrokovati endotelnu disfunkciju. Endotelnu disfunkciju povećavaju i smanjivanjem NO-a i smanjivanjem aktivnosti endotelnih stanica zbog poticanja stvaranja ROS-a, a ROS nazad omogućuje oksidaciju albumina u AOPP. Također, povećavaju i akumulaciju lipida u aterosklerotskim plakovima. Napredni oksidirani proteinski proizvodi predstavljaju novu molekularnu osnovu za štetne aktivnosti

oksidansa. Razine AOPP-a su osjetljivije od oxLDL-a za procjenu oksidativnog stresa zbog svoje procjene stupnja i varijacije u proteinskim oštećenjima koja su izazvana oksidansima. U oksidativnom stresu zabilježeno je više AOPP-a, a manje antioksidansa (SOD, glutathion peroksidaza), što samo povećava štetu koju oni uzrokuju (31).

2. HIPOTEZA

Povećani unos soli dovodi do narušavanja antioksidativnog statusa i povećanog oksidativnog stresa. Subpresorske doze angiotenzina II smanjuju povećanu razinu oksidativnog stresa nastalu kao posljedica visokog unosa soli.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je ispitati promjenu serumske koncentracije oksidiranih lipoproteina niske gustoće i naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda u uzorcima seruma Sprague-Dawley štakora pod utjecajem visokog unosa soli te primjenom subpresorske doze angiotenzina II.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj istraživanja

Eksperimentalna studija na pokusnim laboratorijskim životinjama (Sprague-Dawley štakorima).

4.2. Materijali

Istraživanje se provelo na zdravim muškim Sprague-Dawley štakorima starosti 10 tjedana. Životinje su bile podijeljene u 3 skupine (N – broj životinja):

- 1) Niskoslana (NS) skupina (N = 7) - životinje su konzumirale standardnu hranu za štakore i običnu pitku vodu)
- 2) Visokoslana (VS) skupina (N = 7) - životinje su konzumirale hranu s visokim udjelom soli (4 % NaCl-a) i običnu pitku vodu 7 dana)
- 3) Visokoslana ANG II skupina (VS + ANG II) (N = 7) - životinje su konzumirale hranu s visokim udjelom soli (4 % NaCl-a) i običnu vodu te im je četvrti dan od početka dijetnog protokola bila ugrađena osmotska minipumpa preko koje su dobivali subpresorske doze ANG II u količini 100 ng/kg/min/3 dana).

Nakon 7 dana dijetnog protokola, štakori su izvagani, izmjeren im je krvni tlak te su eutanazirani kombinacijom anestetika ketamina (75 mg/kg) i midazolama (2,5 mg/kg) nakon čega je dekapitacijom prikupljen uzorak krvi za dobivanje seruma. Uzorci seruma su pohranjeni u hladnjaku na -80 °C do provedbe pokusa.

Pomoću Sigma Plot v. 11.0 programa izračunata je veličina uzorka te ona za snagu testa od 0,6 p vrijednost manju od 0,05 i uz minimalnu očekivanu razliku od 0,25 iznosi 6 uzoraka (životinja) po grupi.

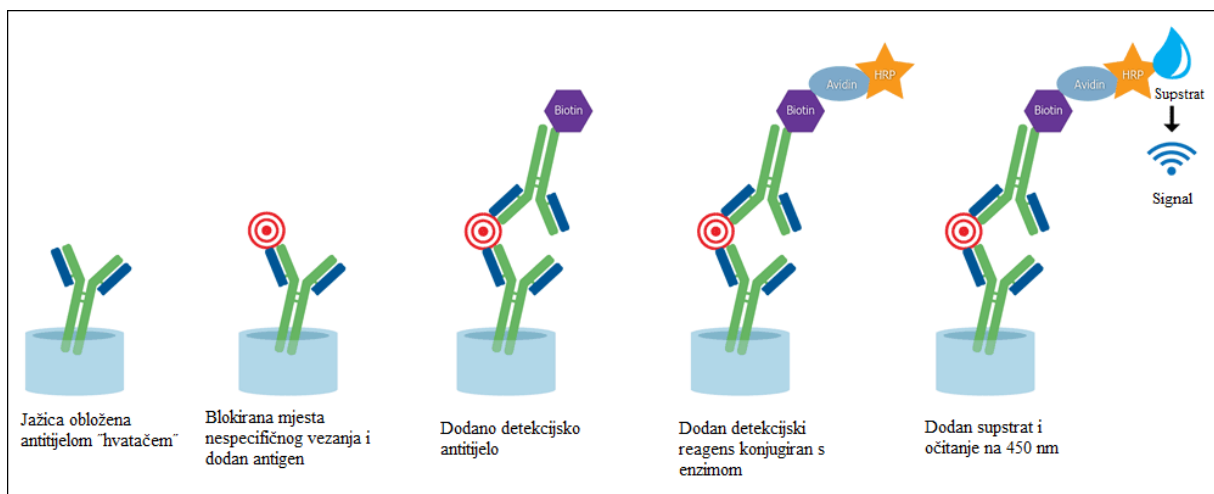
Svi eksperimentalni postupci usklađeni su s europskim smjernicama za skrb i primjenu laboratorijskih životinja (direktiva 86/609). Poduzete su sve mjere kako bi se spriječila patnja životinja. Navedena istraživanja za provedbu odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/14-08/06, Broj: 2158-61-07-14-119) te Ministarstvo

poljoprivrede Republike Hrvatske te su dio HRZZ-ovog 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.

4.3. Metode

U ovom istraživanju korišten je komercijalni kit za određivanje razine oxLDL-a (Wuhan USCN Business Co., Ltd, Kat. br.SEA527Ra, Kina) i AOPP-a (CUSABIO. Kat. Br. CSB-EQ027429RA, USA) u uzorcima štakorskih seruma.

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) se široko primjenjuje za detekciju i kvantifikaciju specifičnih antigena ili antitijela u uzorku. Temelji se na vezanju antigena na njegovo specifično antitijelo, što omogućuje detekciju vrlo malih količina antigena, kao što su proteini, peptidi, hormoni ili antitijela. Jedna od inačica ELISA testa je i *sandwich* ELISA. Koristi se za identifikaciju specifičnog antigena. Jažice su obložene poznatom količinom antitijela kako bi se željeni antigen vezao. Nakon što su mjesta nespecifičnog vezanja blokirana koristeći BSA (albumin iz govedeg seruma), dodaje se uzorak koji sadrži antigen. Zatim se dodaje primarno protutijelo koje antigen stavlja u "sendvič". Na to primarno protutijelo veže se sekundarno koje je vezano s enzimom. Nevezani se konjugati ispiru, a kada se doda supstrat, dolazi do pojave obojenja koje se kasnije može kvantificirati (slika 1). Za povećanje specifičnosti i osjetljivosti koriste se pročišćena specifična antitijela koja eliminiraju potrebu za pročišćavanjem antigena (34).



Slika 1. Shematski prikaz principa *sandwich* ELISA testa

Prilagođeno prema: <https://rockland-inc.com/ELISA-Kits.aspx>; pristup: 8. 6. 2019.

4.4. Statistička analiza

Za statističku analizu korišten je Sigma Plot v.12 (Systat Software, Inc, Chicago,USA). Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli među svim ispitivanim grupama (3 eksperimentalne grupe) nezavisnih skupina testirane su analizom varijance (ANOVA), a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Kruskal-Wallisovim testom. Razina statističke značajnosti određena je sa $p < 0,05$.

5. REZULTATI

U istraživanje je uključen 21 zdravi, muški Sprague-Dawley štakor, starosti 10 tjedana. Životinje su slučajnim odabirom podijeljene u 3 skupine s jednakim brojem životinja (7 po skupini). Štakorima nije izmjerena tjelesna masa na početku studije jer su jednake dobi pa prema tome i podjednake tjelesne mase, no mjerenjem tjelesne mase na završetku protokola nije utvrđena značajna razlika ($p = 0,890$; analiza varijance (ANOVA)) (Tablica 2.)

S obzirom da se studija provodi uz uvođenje visokih koncentracija soli, važno je bilo izmjeriti krvni tlak. Srednji arterijski tlak jest vrijednost koja se dobije zbrajanjem dvostrukog dijastoličkog tlaka i sistoličkog tlaka te se dobivena vrijednost podijeli s tri. Možebitan značajan porast tlaka govorio bi u prilog kako su životinje sol osjetljive i podložne nastanku hipertenzije, a to nije poželjno.

U našem istraživanju, nismo uočili razliku u srednjem arterijskom tlaku između ispitivanih skupina ($p = 0,181$; analiza varijance (ANOVA)) (Tablica 2.) što govori u prilog kako su navedene životinje normotenzivne i u uvjetima unosa visokih koncentracija soli.

Tablica 2. Izmjerene vrijednosti tjelesne mase i srednjeg arterijskog tlaka

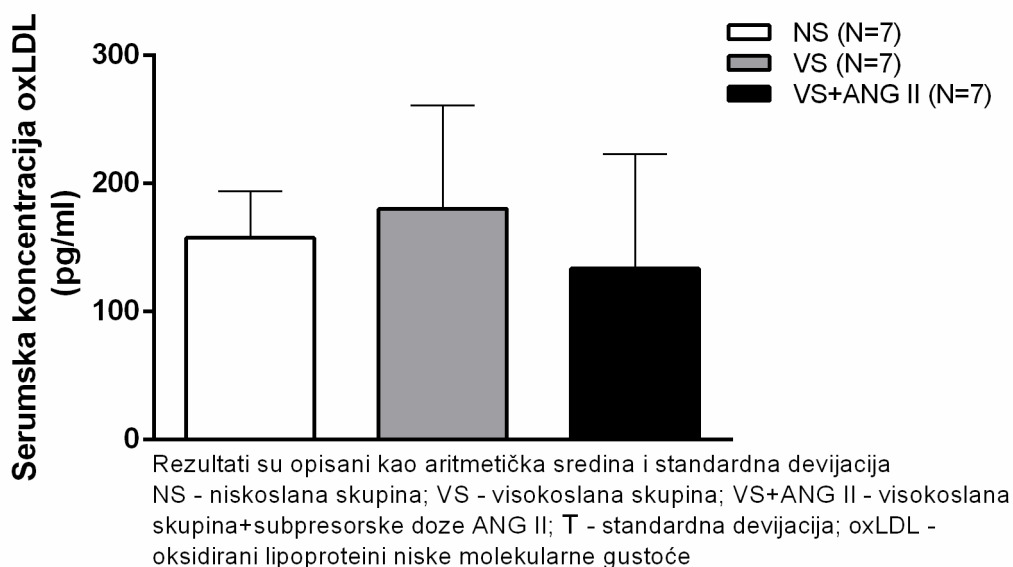
Pokusna skupina (N; broj životinja)	Aritmetička sredina (standardna devijacija)	
	Tjelesna masa (g)	Srednji arterijski tlak (mmHg)
NS (N = 7)	370 (25)	113 (3)
VS (N = 7)	372 (17)	108 (5)
VS + ANG II (N = 7)	375 (15)	112 (6)

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija

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

5.1. Serumska koncentracija oksidiranih lipoproteina niske molekularne gustoće

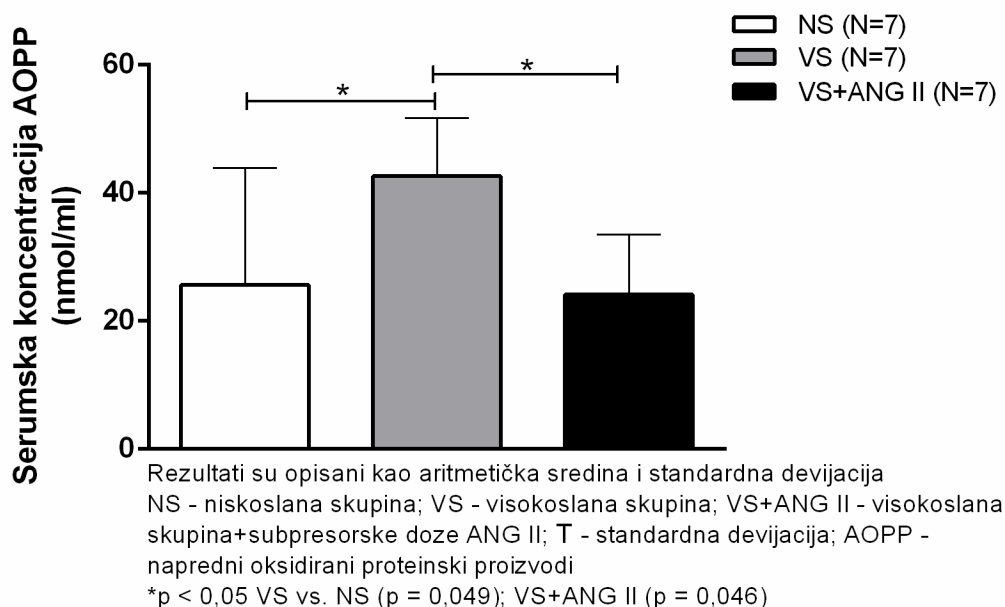
Slika 2. prikazuje aritmetičku sredinu serumske koncentracije oxLDL te pripadajuću vrijednost standardne devijacije za sve ispitivane skupine. Iz izmjerenih vrijednosti serumske koncentracije oxLDL vidljiva je najviša razina u VS skupini 180 (80) u odnosu na preostale skupine (NS - 157 (36); VS + ANG II - 133 (89)) no nije utvrđena statistički značajna razlika između ispitivanih skupina ($p = 0,498$; analiza varijance (ANOVA)). Povećanje broja uzoraka možda bi pokazalo postojanje razlike u izmjerenoj koncentraciji oxLDL.



Slika 2. Izmjerena serumska koncentracija oksidiranih lipoproteina niske molekularne gustoće (oxLDL; pg/ml) u ispitivanim skupinama (rezultati su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom (SD), $p < 0,05$ razina je statističke značajnosti)

5.2. Serumska koncentracija naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda (AOPP)

Slika 3. prikazuje aritmetičku sredinu izmjerenih vrijednosti serumskih koncentracija AOPP u svim pokusnim skupinama te pripadajuće standardne devijacije. Statističkom metodom analize varijance (ANOVA) utvrđena je statistički značajno povećana serumska koncentracija AOPP u visokoslanjoj skupini (42,61 (9,08) u odnosu na niskoslanu skupinu (25,6 (18,30), $p = 0,049$; analiza varijance (ANOVA)) i visokoslanu skupinu s ANG II (24,1 (9,37), $p = 0,046$; analiza varijance (ANOVA)), dok između niskoslane i visokoslane skupine sa subpresorskim dozama ANG II nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji AOPP ($p = 0,831$).



Slika 3. Izmjerena serumska koncentracija AOPP-a (nmol/ml) u ispitivanim skupinama. (rezultati su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom (SD), $p < 0,05$ razina je statističke značajnosti)

6. RASPRAVA

Štetno djelovanje slobodnih reaktivnih kisikovih radikala (prekomjerna proizvodnja ROS-a i/ili nedostatak enzimskih i neenzimskih antioksidanata) uzrokuju potencijalno biološko narušavanje sustava nazvano oksidativni stres (35). Njegov utjecaj na organizam ovisi o vrsti oksidansa, o mjestu i intenzitetu stvaranja, o sastavu i djelovanju različitih antioksidanata te o sposobnosti oporavka sustava (36).

Proces oksidacije lipida i proteina rezultat je suviška slobodnih radikala i drugih oksidacijskih vrsta dobivenih iz kisika, dušika i drugih kemijskih elemenata u tijelu. Kemijski, oksidativni stres povezan je s povećanom produkcijom oksidirajućih vrsta ili značajnim smanjenjem učinkovitosti antioksidacijske obrane kao što je reducirani glutation, katalaza, peroksidaze i drugi. Proliferacija stanica i smrt ključni su procesi u progresiji ateroskleroze, a teški oksidativni stres može uzrokovati staničnu smrt, a čak i blaga oksidacija može izazvati stanični stres i apoptozu, dok intenzivniji stres može izazvati nekrozu (37).

Oksidativne molekule mogu imati pozitivne ili negativne učinke na stanice i tkiva, ovisno o njihovoj koncentraciji. ROS ima važnu ulogu u nekoliko fizioloških staničnih procesa, kao što su signalne i regulacijske kaskade, međutim pojedina stanja mogu inducirati kemijske i strukturne modifikacije koje su dokazale da mijenjaju funkciju staničnih komponenti, inhibiraju funkciju proteina, izazivaju oštećenje DNA, virusnu aktivaciju i lipid peroksidaciju što može potaknuti staničnu smrt (39). Važne regulatorne interakcije odvijaju se između RAS-a, dušikovog oksida (NO) i O^{2-} u bubrezima, gdje O^{2-} djeluje kao vazokonstriktor i unapređuje reapsorpciju natrija u tubulima dok NO pokazuje suprotne učinke. O^{2-} brzo stvara interakciju s NO, a na taj način, kada O^{2-} proizvodnja raste, to smanjuje biološku raspoloživost NO-a što dovodi do oštećenja funkcije organa. Aktiviranje RAS-a može izazvati proizvodnju O^{2-} i NO-a što sugerira da uravnotežena interakcija između RAS-a, NO-a i O^{2-} omogućuje regulaciju funkcije bubrega, dok je neravnoteža povezana s poremećajima osjetljivosti na sol i hipertenzije (39).

Poznato je da dijeta s visokim udjelom soli (NaCl) ima štetne učinke na organske sustave u ljudskom organizmu (11). Visoke koncentracije soli dovode do značajnog porasta arterijskog tlaka te porasta ROS-a (11, 12). U studijama je pokazano kako 3 - 7 dana

visokoslane dijete ne mijenja značajno vrijednost krvnog tlaka i ne izaziva pojavu hipertenzije (13), ali dovodi do endotelne disfunkcije i oštećene vaskularne reaktivnosti kod životinjskih i ljudskih modela zbog povećanog oksidativnog stresa (14). Navedeno govori u prilog nastanku endotelne disfunkcije puno prije karakterističnih znakova hipertenzije. Istraživanje koje su proveli Ćosić i suradnici (14) pokazalo je kako visoki unos soli kroz tjedan dana dovodi do značajnog povećanja oksidativnog stresa izmjerenog preko razine nastalog produkta lipidne peroksidacije, malondialdehida (MDA), dok se razina antioksidativnog kapaciteta nije značajno promijenila. Isto tako, dokazano je kako je značajno snižen genski izražaj antioksidativnog enzima glutation peroksidaze 4 (GPx4) te se dalo zaključiti da upravo taj enzim ima najveću ulogu kod nastanka oksidativnog stresa u modelu visokog unosa soli.

Pri provođenju pokusa očekivali smo, zbog navedenih rezultata, da će razina oxLDL-a biti značajno povećana, no u našem istraživanju to nije slučaj i serumska razina oxLDL-a nije se značajno promijenila među ispitivanim skupinama, ali postoji tendencija povećanja te je pretpostavka kako bi produženje dijete dovelo do statistički značajne razlike u serumskoj razini ispitivanog biljega.

Za razliku od oxLDL-a, serumska koncentracija AOPP-a u visokoslanjoj skupini statistički je značajno povećana u odnosu na niskoslanu skupinu i visokoslanu skupinu s ANG II. Razlog tomu mogao bi biti što je AOPP senzitivniji na promjene oksidativnog stresa od oxLDL-a, činjenica da je formacija AOPP-a nepovratna i ne može lako biti hidrolizirana proteolitičkim enzimima te poticanje AOPP-a na stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva i njihovo ponovno oksidiranje albumina u AOPP (31).

Studije su pokazale da povećana koncentracija soli u svakodnevnoj prehrani štetno djeluje i na strukturu i na funkciju krvnih žila neovisno o patogenezi hipertenzije. U normotenzivnih životinja hranjenih dijetom s visokim udjelom soli uočeno je oštećenje i prorjeđenje mikrocirkulacije, disocijacija medije i intime krvnih žila, remodeliranje vaskulature, potenciranje vazokonstriktivnih odgovora, smanjeno endotelno signaliziranje kalcijevim ionima i smanjenje relaksacijskih odgovora krvnih žila (40). Istraživanja kod kojih je utvrđena snižena razina ANG II, kao kod animalnih modela hipertenzije, pokazala su značajno povišenu produkciju ROS-a u stijenkama krvnih žila te njihov izravni učinak na razvoj hipertenzije što za posljedicu ima oštećenu funkciju krvne žile i povećanu produkciju ROS-a (22). Vaskularna disfunkcija je posredovana supresijom cirkulirajućeg ANG II, budući

da normaliziranje razine ANG II u plazmi putem intravenske infuzije niske (subpresorske) doze ANG II obnavlja vaskularnu relaksaciju kao odgovor na vazodilatatorne stimulanse kod štakora koji su hranjeni visokoslanom hranom (41). ANG II receptori imaju brojne utjecaje na kontrolu krvožilja u cjelini, a posebno na mikrocirkulaciju. Do sada su poznata najmanje dva ANG receptora: AT1 i AT2. Vaskularni učinak ANG II posredovanje je i AT1 i AT2 receptora (42). Nekoliko drugih vrsta receptora mogu odgovoriti na ANG II ili fragmente peptida koji se odnose na ANG I ili ANG II, iako ti odgovori nisu tako dobro karakterizirani kao odgovori na AT1 i AT2 receptore za aktivaciju. Brojne kliničke i laboratorijske studije podupiru hipotezu da je renin-angiotenzinski sustav (RAS) relevantan u patogenezi kardiovaskularnih bolesti te je promijenilo tradicionalni pogled na ulogu ANG II. Povijesno gledano, na ANG II se gledalo samo kao na regulator hormona koji regulira krvni tlak, otpuštanje aldosterona i reapsorpciju natrija. Sada je općenito prihvaćeno da ANG II može aktivirati stanice koje reguliraju izražaj mnogih tvari, uključujući faktore rasta, citokine, kemokine i adhezijske molekule koji su uključeni u rast stanica/apoptozu, fibrozu i upalu. Proizvodnja ANG II u arterijskoj stijenci važna je za normalnu regulaciju arterijskog tonusa te je uključena u patogenezi ateroskleroze (17, 20).

Treba napomenuti da akutna vaskularna izloženost ANG II *in vitro* ne obnavlja vazodilataciju, već taj učinak ANG II zahtijeva kroničnu i.v. infuziju peptida kako bi se ostvarili njegovi učinci (41). Kronična infuzija subpresorskih doza ANG II vraća vaskularnu relaksaciju, otpuštanje NO-a, endotelno signaliziranje kalcijevim ionima i vraća povišene razine superoksida na normalne vrijednosti (43).

7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Kratkotrajni visoki unos soli ne dovodi do značajne promjene u tjelesnoj masi i krvnom tlaku životinja
- Tjedan dana visokog unosa soli ne mijenja značajno serumsku razinu oxLDL-a, no pokazuje tendenciju porasta u visokoslanj skupini, što daje naslutiti kako bi duži period visokog unosa soli izazvao promjenu koncentracije oksidiranog LDL-a zbog izraženijeg oksidativnog stresa
- Povećani oksidativni stres u visokoslanj skupini dokazan je povećanom serumskom koncentracijom naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda (AOPP) te to dokazuje veću senzitivnost AOPP-a na promjene oksidativnog stresa od oxLDL-a
- ANG II u uvjetima visokog unosa soli snižava razinu AOPP-a do vrijednosti u kontrolnoj skupini u odnosu na visokoslanu skupinu, čime je dodatno potvrđena važnost i značaj ANG II u povećanoj razini oksidativnog stresa u uvjetima visokih koncentracija soli.

8. SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA: Cilj ovog istraživanja bio je ispitati promjenu serumske koncentracije oksidiranih lipoproteina niske gustoće (oxLDL) i naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda (AOPP) u uzorcima seruma Sprague-Dawley štakora pod utjecajem visokog unosa soli te primjenom subpresorske doze angiotenzina II.

USTROJ STUDIJE: Eksperimentalna studija na laboratorijskim životinjama.

MATERIJALI I METODE: Zdravi muški Sprague-Dawley štakori, starosti 10 tjedana, nasumično su podijeljeni u tri eksperimentalne skupine (N = 7): niskoslana skupina (NS skupina, koja je konzumirala 0,4 % NaCl-a u hrani za štakore) te dvije visokoslane skupine (VS) koje su konzumirale specijalnu hranu s 4 % NaCl-a tijekom 7 dana. Jednoj je od slanijih skupina zadnja tri dana protokola ugrađena pumpa subpresorske doze angiotenzina II (100 ng/kg/min/3 dana). Prikupljena je miješana venska i arterijska krv iz koje je izdvojen serum za utvrđivanje koncentracije oxLDL i AOPP ELISA metodom.

REZULTATI: Tjedan dana visokog unosa soli nije doveo do značajne promjene u tjelesnoj masi među ispitivanim skupinama. Serumska koncentracija AOPP-a značajno je povećana u visokoslanu skupinu u odnosu na niskoslani skupinu te visokoslani skupinu uz primjenu subpresorske doze angiotenzina II. Koncentracija oxLDL-a nije se značajno promijenila među ispitivanim skupinama.

ZAKLJUČAK: Značajna promjena u serumskoj koncentraciji naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda još je jedan parametar koji potvrđuje nastanak povećanog oksidativnog stresa pri kratkotrajnom visokom unosu soli, a za posljedicu ima povećanu razinu oksidativnog stresa korigiranu primjenom subpresorskih doza ANG II do kontrole razine. Takav rezultat pokazuje važnost prisutnosti ANG II u stanjima sniženog antioksidativnog kapaciteta koji posljedično ima ulogu u održavanju normalne vaskularne funkcije.

KLJUČNE RIJEČI: AOPP, oxLDL, subpresorske doze angiotenzina II, visokoslana dijeta

9. SUMMARY

Changes in serum concentrations of oxidized low-density lipoproteins and advanced oxidized protein products under the influence of high salt intake in Sprague-Dawley rats

OBJECTIVES: The aim of this study was to research changes of oxidized low-density lipoproteins (oxLDL) and advanced oxidized protein products (AOPP) serum concentrations in Sprague-Dawley rats under high salt intake and subpressor dose angiotensin II administration.

STUDY DESIGN: Experimental study.

MATERIALS AND METHODS: Healthy male Sprague-Dawley rats, aged 10 weeks, were randomly divided into three experimental groups (N = 7): low-salt group (LS group, which consumed 0.4 % NaCl in rat food) and two high-salt group (HS), which consumed special food with 4 % NaCl for 7 days. In the last three days of the protocols subpressor dose of angiotensin II (100 ng/kg/min/3 days) was introduced to one of the high-salt groups. A mixed venous and arterial blood was collected, from which the serum was separated to determine the concentration of oxLDL and AOPP with ELISA method.

RESULTS: A week of high salt intake did not lead to significant changes in body mass in the examined groups. The serum AOPP concentration was significantly increased in the high-salt group compared to the low-salt group and the high-salt group with the subpressor dose of angiotensin II. The concentration of oxLDL did not change significantly among the tested groups.

CONCLUSION: Significantly increased serum concentration of advanced oxidized protein products is another parameter which confirms the occurrence of increased oxidative stress during a brief high salt intake resulting in an increased level of oxidative stress corrected by subpressor dose of ANG II to control level. Such a result shows the importance of the presence of ANG II in states of reduced antioxidative capacity, which consequently plays a role in maintaining normal vascular function.

KEY WORDS: AOPP; high-salt diet; oxLDL; subpressor angiotensin II dose

10. LITERATURA

1. Jelaković B, Kaić-Rak A, Miličić D, Premužić V, Skupnjak B, Reiner Z. Manje soli – više zdravlja. Hrvatska inicijativa za smanjenje prekomjernog unosa kuhinjske soli (CRASH). *Lijec Vjesn.* 2009;131(3-4):87-92.
2. Jelaković B, Premužić V, Skupnjak B, Reiner Z. Kuhinjska sol - skriveni otrov u svakodnevnoj hrani. *Lijec Vjesn.* 2009;131(5-6):146-154.
3. He FJ, MacGregor GA. How far should salt intake be reduced?. *Hypertension.* 2003;42(6):1093-9.
4. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180-3.
5. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, i sur. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int.* 2014;1-19.
6. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997;82:291-5.
7. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, i sur. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2015;23(14):1144-70.
8. Čepelak I. Slobodni radikali i antioksidansi. U: Čvorišćec D, Čepelak I, urednice. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. str. 638-648.
9. Duracková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res.* 2010;59(4):459-69.
10. Gyurászová M, Kovalčíková A, Janšáková K, Šebeková K, Celec P, Tóthová L. Markers of oxidative stress and antioxidant status in the plasma, urine and saliva of healthy mice. *Physiol Res.* 2018;67(6):921-934.
11. Planinac J. Utjecaj kratkotrajnog visokog unosa soli na razinu staničnog oksidativnog stresa kod mononuklearnih stanica periferne krvi Sprague Dawley štakora. Završni rad. 2015.
12. Milković M. Povezanost unosa soli hranom i razine superoksid dismutaze u krvi ljudi. Diplomski rad. 2017.
13. Čosić A. Uloga oksidativnog stresa u razvoju poremećenog vaskularnog odgovora pod utjecajem visokog unosa natrijeva klorida kod Sprague Dawley štakora. Doktorska disertacija. 2016.

14. Ćosić A, Jukić I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljević Z, Novak S, i sur. 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*. 2016;594(17):4917-31.
15. Ćosić A, Novak S, Jukić I, Stupin A, Mihaljević Z, Rasić, i sur. Primjena laboratorijskih metoda u dijagnosticiranju oksidativnog stresa na primjeru animalnog modela prekomjernog unosa soli. *Cardiol Croat*. 2017;12(3):78.
16. Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V, Rodríguez-Vita J, Sánchez-López E, Carvajal G, i sur. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(1):16-20.
17. Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension*. 2001;38(2):635-8.
18. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Esteban V, Suzuki Y, Mezzano S, i sur. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension*. 2001;38:1382-7.
19. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, i sur. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int*. 2002; 62(82):12-22.
20. Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res*. 1998;83:1182-91.
21. Jöhren O, Dendorfer A, Dominiak P. Cardiovascular and renal function of angiotensin II type-2 receptors. *Cardiovasc Res*. 2004;62:460-7.
22. Drenjančević-Perić I, Lombard JH. Reduced angiotensin II and oxidative stress contribute to impaired vasodilation in Dahl salt-sensitive rats on low-salt diet. *Hypertension*. 2005;45(4):687-91.
23. Virđis A, Duranti E, Taddei S. Oxidative stress and vascular damage in hypertension: role of angiotensin II. *Int J Hypertens*. 2011.
24. Muraya N, Kadowaki D, Miyamura S, Kitamura K, Uchimura K, Narita Y, i sur. Benzbromarone attenuates oxidative stress in angiotensin II- and salt-induced hypertensive model rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2018.
25. Parthasarathy S, Raghavamenon A, Garelnabi MO, Santanam N. Oxidized low-density lipoprotein. *Methods Mol Biol*. 2010;610:403-17.
26. Gradinaru D, Borsa C, Ionescu C, Prada GI. Oxidized LDL and NO synthesis- biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. *Mech Ageing Dev*. 2015;151:101-13.

27. Li D, Mehta JL. Oxidized LDL, a critical factor in atherogenesis. *Cardiovasc Res.* 2005;68(3):353-4.
28. Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. Lox-1, oxLDL, and atherosclerosis. *Hindawi Publishing Corporation. Mediators Inflamm.* 2013:1-12.
29. Meisinger C, Baumert J, Khuseyinova N, Loewel H, Koenig W. Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation.* 2005;112(5):651-7.
30. Mihaljević Z. Utjecaj akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na reaktivnost krvnih žila kod zdravih Sprague-Dawley štakora. *Doktorska disertacija.* 2018.
31. Ou H, Huang Z, Mo Z, Xiao J. The characteristics and roles of advanced oxidation protein products in atherosclerosis. *Cardiovasc Toxicol.* 2017;17(1):1-12.
32. Erdogan HK, Bulur I, Kocaturk E, Saracoglu ZN, Alatas O, Bilgin M. Advanced oxidation protein products and serum total oxidant/antioxidant status levels in rosacea. *Postepy Dermatol Alergol.* 2018;35(3):304-8.
33. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, i sur. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996;49(5):1304-13.
34. Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol.* 2013;133(9):12.
35. Kovačić P, Jacintho JD. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem.* 2001;8(7):773-96.
36. Duracková Z. Oxidants, antioxidants and redox stress. U: Knasmüller S, urednik. *The activity of natural compounds and diseases prevention and therapy.* Bratislava: SAP; 2007. str. 11-59.
37. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(6):749-62.
38. Zhang Y, Chen N, Zhang J, Tong Y. Hsa-let-7g miRNA targets caspase-3 and inhibits the apoptosis induced by ox-LDL in endothelial cells. *Int J Mol Sci.* 2013;14(11):22708-20.
39. Kopkan L, Cervenka L. Renal interactions of renin-angiotensin system, nitric oxide and superoxide anion: implications in the pathophysiology of salt-sensitivity and hypertension. *Physiol Res.* 2009;58(2):55-67.

40. Čavka A. Utjecaj dijete s visokim udjelom soli na mikrovaskularnu reaktivnost u populaciji zdravih mladih žena. Doktorska disertacija. 2013.
41. McEwen ST, Schmidt JR, Somberg L, Cruz LL, Lombard JH. Time-course and mechanisms of restored vascular relaxation by reduced salt intake and angiotensin II infusion in rats fed a high-salt diet. *Microcirculation*. 2009;16(3):220-34.
42. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, i sur. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;165(1):196-203.
43. Durand MJ, Raffai G, Weinberg BD, Lombard JH. Angiotensin (1-7) and low-dose angiotensin II infusion reverse salt-induced endothelial dysfunction via different mechanisms in rat middle cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(4):1024-33.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Ime i prezime: Magdalena Kelčić

Datum i mjesto rođenja: 21. 1. 1996. godine, Vinkovci

Adresa: Kolodvorska 79, 32245 Nijemci

e-mail: magdalena.kelcic@gmail.com

Obrazovanje:

2017. - 2019. Sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Osijek

2014. - 2017. Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Osijek

2010. - 2014. Gimnazija Matije Antuna Reljkovića u Vinkovcima (opći smjer)

2002. - 2010. Osnovna škola „Ivan Kozarac“ Nijemci