

# Stvaranje dušikovog oksida u krvnim žilama Spragu-Dawley štakora na terapiji Losartanom

---

Poštić, Mirna

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:823094>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2022-07-04**

*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Mirna Poštić**

**STVARANJE DUŠIKOVOG OKSIDA U  
KRVNIM ŽILAMA SPRAGUE-DAWLEY  
ŠTAKORA NA TERAPIJI  
LOSARTANOM**

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Mirna Poštić**

**STVARANJE DUŠIKOVOG OKSIDA U  
KRVNIM ŽILAMA SPRAGUE-DAWLEY  
ŠTAKORA NA TERAPIJI  
LOSARTANOM**

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**

Rad je ostvaren na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek.

Mentor: doc.dr.sc. Ivana Jukić, dr.med.

Rad sadrži: 24 stranice i 3 fotografije

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Mikrocirkulacija, moždana cirkulacija i otporničke krvne žile .....	1
1.2. Endotel i važnost dušikovog oksida (NO) u mehanizmu vazodilatacije .....	1
1.3. Slobodni kisikovi radikali i oksidativni stres .....	2
1.4. Renin-angiotenzin sustav (RAS) .....	3
2. HIPOTEZA .....	5
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	6
4. MATERIJALI I METODE .....	7
4.1. Eksperimentalni životinjski model.....	7
4.2. Postupak izolacije središnje moždane arterije.....	7
4.3. Određivanje razine dušikovog oksida metodom fluorescencije .....	8
4.4. Statističke metode.....	8
5. REZULTATI.....	9
5.1. Mjerenje razine dušikovog oksida metodom fluorescencije <i>in situ</i> .....	9
6. RASPRAVA.....	13
7. ZAKLJUČAK .....	14
8. SADRŽAJ .....	15
9. SUMMARY .....	16
10. LITERATURA .....	17
11. ŽIVOTOPIS .....	19

## **POPIS KRATICA**

**ACE**- angiotenzin-konvertaza (engl. angiotensin-convertingenzyme)

**AngII** - angiotenzin II

**AT1** - angiotenzinski receptor 1

**CO<sub>2</sub>**- ugljikov dioksid (engl. carbon dioxide)

**CTRL** - kontrolna skupina

**ED** - endotelna disfunkcija

**eNOS** - endotelna dušik-oksida sintaza (engl. endothelial nitric-oxide synthase)

**FID** - protokom potaknuta dilatacija (eng. flow-induced dilation)

**iNOS** - inducibilnudušik-oksida sintaza (engl. inducible nitric-oxide synthase)

**L-NAME**- N( $\omega$ )-nitro-L-arginin metil ester

**nNOS** - neuronska dušik-oksida sintaza (engl. neuronal nitric-oxide synthase)

**NO** - dušikov oksid (engl. nitricoxide)

**NOS** - dušik-oksida sintaza (engl. nitric-oxide synthase)

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>** - nitrit

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** - nitrat

**O<sup>2-</sup>** -superoksidni anion

**RAS** - renin-angiotenzin sustav

**ROS** - slobodni kisikovi radikali (engl. reactiveoxygenspecies)

**SD štakori** - Sprague-Dawley štakori

## 1. UVOD

### 1.1. Mikrocirkulacija, moždana cirkulacija i otporničke krvne žile

Najvažnije funkcije cirkulacijskog sustava se odvijaju upravo u mikrocirkulaciji. Mikrocirkulacija je primarno mjesto izmjene kisika i hranjivih tvari, a također ima važnu ulogu u regulaciji krvnog tlaka, termoregulaciji te proizvodnji limfe.

Kao organ, mozak zauzima relativno mali dio našeg tijela, no potrebne su mu velike količine energije za normalno funkcioniranje. Koristi više energije od svih drugih organa i ovisi o konstantnoj opskrbi krvlju, odnosno kisikom i glukozom iz krvi. Mozak dobiva 15-20% srčane aktivnosti, a to ga čini jednim od najbolje prokrvljenih organa u tijelu. Visoke metaboličke potrebe mozga oslanjaju se snažno na oksidativni metabolizam pa tako mozak ne zahtijeva samo visok udio srčanog učinka, već i relativno konstantan protok krvi (1). Sposobnost mozga da održava relativno konstantan protok krvi, unatoč promjenama u tlaku, naziva se autoregulacija. Kako bi prokrvljenost bila dostatna, autoregulacija ovisi o simpatičkoj živčanoj aktivnosti, vaskularnom renin-angiotenzin sustavu ili čimbenicima poput promjena tlaka ugljikovog dioksida ( $\text{CO}_2$ ) u arterijskoj krvi (2). Postoji i barijera koja odvaja izvanstaničnu tekućinu mozga od krvi i selektivno propušta tvari. Putem krvno-moždane barijere izmjenjuju se hranjive tvari, izbacuju štetni produkti, a istovremeno se i ometa transport lijekova u mozak. Postoje li oštećenja u krvno-moždanoj barijeri izmjena tvari nije pravilna pa može doći do raznih neuroloških problema, oštećenja mozga, a i smrti (1).

Kontrola protoka krvi je vrlo važna uloga kardiovaskularnog sustava, a nju vrše otporničke (rezistentne) krvne žile. Otporničke arterije imaju glavnu ulogu u kontroli otpornosti na protok krvi, a samim time i krvnog tlaka pa i održavanje konstantne opskrbe tkiva krvlju kao što su srce, bubreg i mozak (3). Zadebljanja i sužavanja otporničkih arterija su ključni elementi u kontroli kardiovaskularnog sustava (4). Protokom potaknuta dilatacija (eng. *flow-induced dilation*, FID) je metoda kojom se ispituje vaskularna endotelna funkcija, a samim time i funkcija rezistentnih krvnih žila (5).

### 1.2. Endotel i važnost dušikovog oksida (NO) u mehanizmu vazodilatacije

Endotelje endokrini organ koji oblaže čitav vaskularni sustav. Postoji više patoloških i fizioloških uloga endotela uključujući regulaciju glatkog mišićja, kontrolu tromboze, inhibiciju leukocita, adheziju stanica trombocita, moduliranje propusnosti vaskularne stijenke i

sl. Osim toga, postoje brojne tvari koje se oslobađaju iz endotela, a među njima je i jedan od najvažnijih posrednika vazodilatacije – dušikov oksid (NO) (6). Dušikov oksid je mali kratkoživi slobodni radikal s velikim brojem različitih uloga. Jedan je od glavnih faktora relaksacije endotela, a ima i važnu ulogu u brojnim prijenosnim signalnim putevima. Iako postoje prekursori za proizvodnju NO, koji su izvedeni iz prehrambenih izvora kao što su nitrati i nitriti ( $\text{NO}_3^-$  i  $\text{iNO}_2^-$ ), prvenstveno se sintetizira enzimski iz NO-sintetaze (NOS). NOS sintetizira dušikov oksid iz kisika i arginina, a postoje tri izoforme NOS-a: neuronska (nNOS), inducibilna (iNOS) i endotelna (eNOS) (7). Dušikov oksid se stvara i otpušta iz stanica endotela kao odgovor na stres krvnih žila i na djelovanje spojeva poput acetilkolina i bradikina. Vazodilatacija krvnih žila, uslijed povećanja protoka krvi, izazvana FID-om za posljedicu ima povećan stres endotela krvne žile što podražuje endotelne stanice i dovodi do otpuštanja dušikova oksida (NO) (5). Otpuštanje dušikova oksida vodi do relaksacije vaskularnog glatkog mišićja.

Oštećenje endotela je okarakterizirano smanjenom biodostupnošću NO-a i to se naziva endotelna disfunkcija (ED). Patofiziološki čimbenici, zbog kojih dolazi do endotelne disfunkcije, su važni rizični čimbenici za nastanak, razvoj i daljnju progresiju kardiovaskularnih bolesti (8). NO ne djeluje samo kao vazodilatator, već također sprječava adheziju i migraciju leukocita u arterijsku stjenku i inhibira proliferaciju u vaskularno glatko mišićje što su ključni događaji u razvoju ateroskleroze (5).

### 1.3. Slobodni kisikovi radikali i oksidativni stres

Slobodni radikali su atomi ili molekule koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona; mogu biti električki neutralni ili u obliku iona. Kisik ima svojstvo stvaranja slobodnih radikala pa tako, kada ima jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj vanjskoj ljusci, oduzima elektrone drugim spojevima kako bi se što prije vratio u stabilno stanje. Bjelančevine, masti i ugljikohidrati su osnovne jedinice koje izgrađuju naše tijelo, a baš od njih kisik uzima prijeko potrebne elektrone čime se stvara niz reakcija koje dovode do oksidativnog stresa. Vežu li se slobodni radikali na genetski materijal, odnosno na DNA, dolazi do oštećenja stanica. Fiziološki se u ljudskom tijelu stalno stvaraju slobodni radikali, ali kako se stvaraju, tako se i neutraliziraju. Do problema dolazi kada se stvaraju toliko velikom brzinom da organizam to ne stigne kompenzirati i tada dolazi do apoptoze. Stanice se protiv slobodnih radikala brane antioksidansima koji ih uklanjaju i inhibiraju oksidaciju.



Neravnoteža između endogenih oksidansa i antioksidansa rezultira oksidativnim stresom, uvjetom koji pridonosi vaskularnoj disfunkciji i aterogenezi. (9)

Reaktivni kisikovi oblici napadaju moždane stanice koje su posebno osjetljive na oksidativna oštećenja. Mozak je najpogodniji za stvaranje, a s druge strane i najosjetljiviji na djelovanje reaktivnih kisikovih oblika - ima sposobnost stvaranja velikih količina slobodnih radikala, ali ipak njegovi su antioksidativni kapaciteti vrlo skromni (10). Oksidativni stres stanje je neravnoteže između produkcije slobodnih kisikovih radikala te njihova uklanjanja putem antioksidanata i enzima. U fiziološkim uvjetima oni se neprestano stvaraju u tijelu te su jedan od glavnih oštećenja nukleinskih kiselina, lipida u membranama i proteina u tijelu. Nakon mnogih eksperimenata u laboratorijskim uvjetima (*in vitro*) i eksperimenata na životinjama (*in vivo*), klasična medicina prihvatila je činjenicu da se oksidativni stres dovodi u vezu s nastankom mnogih bolesti. Oksidativni stres je povezan sa smanjenom biodostupnosti dušikova oksida (NO) jer prekomjerno stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), a posebno superoksidnog aniona ( $O_2^-$ ) mijenja funkciju endotela krvnih žila (11).

#### 1.4. Renin-angiotenzin sustav (RAS)

RAS je glavni homeostatski sustav koji za zadaću ima kontrolu volumena tjelesnih tekućina, ravnotežu elektrolita, krvni tlak kao i inervaciju i endokrine funkcije vezane uz kardiovaskularnu kontrolu te je bitan za održavanje arterioralne strukture i vaskularne reaktivnosti. RAS pokazuje svoje učinke kroz glavnu efektorsku molekulu - angiotenzin II (Ang II) koja se veže na specifične membranske angiotenzinske receptore (AT1) smještene u brojnim tkivima, uključujući i vaskularno (8).

Renin je bubrežni hormon koji sudjeluje u regulaciji krvnog tlaka; djelovanjem raznih enzima na renin, on postaje angiotenzin II (8). Peptidni hormon koji regulira kontrakciju krvnih žila i dio je renin-angiotenzin sustava naziva se angiotenzin II. RAS je jedna od bitnih stavki u patofiziologiji vaskularnih bolesti, a angiotenzin II (Ang II) je njegov glavni peptid (12). Angiotenzinogen, stvoren u jetri, djelovanjem renina iz jukstaglomerularnih stanica bubrega, pretvara se u angiotenzin I. Na Angiotenzin I djeluje enzim – angiotenzin-konvertaza (ACE) koja ga u endotelu plućnih kapilara pretvara u angiotenzin II. Svoju svrhu angiotenzin II ostvaruje preko AT1 i AT2 receptora (13). Svi klasični fiziološki učinci Ang II, kao što su vazokonstrikcija, otpuštanje aldosterona i vazopresina, zadržavanje natrija i vode, posredovani su AT1 receptorom. Ang II, preko svog

receptora AT1 također je uključen u proliferaciju stanica, hipertrofiju lijeve klijetke, nefrosklerozu, hipertrofiju vaskularne medije, endotelnu disfunkciju i događaje koji dovode do ateroskleroze. Nedavna istraživanja pokazala su ulogu AT2 receptora u kardiovaskularnoj, moždanoj i bubrežnoj funkciji kao i u modulaciji različitih bioloških procesa uključenih u razvoj, diferencijaciju stanica, popravak tkiva i apoptozu. (14)

Blokator angiotenzinskih receptora, tj. blokator AT1 receptora je Losartan. Izravnim vezanjem na AT1 receptore on smanjuje koncentraciju Ang II, a samim tim smanjuje i njegovu fiziološku funkciju (15). Povećana razina oksidativnog stresa i proizvodnja slobodnih kisikovih radikala dovodi do smanjenja biodostupnosti NO-a, te time uzrokuje smanjenu vaskularnu funkciju (16).

Ranija istraživanja iz našeg laboratorija pokazale su da je supresija RAS-a (slanom hranom) uzrokovala oslabljenu o endotelu ovisnu dilatacije zbog promjene u sintezi vazoaktivnih metabolita arahidonske kiseline te povećanog oksidativnog stresa (20). Stoga smo željeli istražiti kakav će utjecaj na proizvodnju NO-a imati smanjena dostupnost angiotenzina II i povećan oksidativni stres, koji će nastati djelovanjem Losartana.

## 2. HIPOTEZA

Terapija Losartanom će izmijeniti vazodilacijski odgovor rezistentnih žila te povećavajući razinu oksidativnog stresa dovesti do smanjenja stvaranja dušikovog oksida u krvnim žilama štakora.

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je:

- 1) izmjeriti stvaranje NO-a u samim krvnim žilama kod životinja na terapiji Losartanom pomoću direktne fluorescencije NO, mjerene bojom DAF-2DA (2,3-diaminofluorescein) koja s NO stvara fluorescirajući spoj DAF-2T.

### 4. MATERIJALI I METODE

#### 4.1. Eksperimentalni životinjski model

Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije Medicinskog fakulteta u Osijeku. Korišteno je 10 zdravih Sprague-Dawley (SD) muških štakora u dobi od 9 do 11 tjedana starosti. Svi su štakori iz vlastitog uzgoja Vivarija pri Medicinskom fakultetu u Osijeku.

Štakori su bili podijeljeni u dvije skupine:

- 1) Kontrolna skupina (CTRL) - zdravi netretirani štakori (N=5)
- 2) CTRL+Losartan skupina - štakori koji su primali Losartan kroz vodu za piće (N=5).

Cijelo vrijeme trajanja protokola životinje iz obje skupine su imale dostupnu standardnu hranu za laboratorijske glodavce (Mucedola, Italija) sa 0,4% udjelom natrijevog klorida. Skupina CTRL+Losartan je u vodi za piće primala 40mg Losartana (dnevna doza) kroz 7 danate su životinje žrtvovane 8.dan.

#### 4.2. Postupak izolacije središnje moždane arterije

Pokusne životinje se važu i potom anesteziraju kombinacijom ketamina 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2ml, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma) nakon čega slijedi dekapitacija giljotinom. Pomoću mikrokirurškog pribora i operacijskog mikroskopa iz mozga je izolirana središnja moždana arterija te je potom postavljena između staklenih mikropipeta (vanjskog promjera ~ 100-200  $\mu$ m) smještenih u komorici koja je ispunjena toplom (37 $^{\circ}$  C) fiziološkom slanom otopinom (PSS, pH = 7.4  $\pm$  0.05; sastava (u mM / l): 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.17 MgSO<sub>4</sub>, 1.6CaCl<sub>2</sub>, 1.18 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 0.026 EDTA i 5.5 glukoze). Sustav je kontinuirano oksigeniran smjesom plinova 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> i balans N<sub>2</sub>. Nakon postavljanja u komoricu arterija je inkubirana 30 minuta pri tlaku od  $\Delta$ 0 mmHg (ulazni tlak 80 mmHg, izlazni tlak 80 mmHg) kako bi se odredilo stvaranje NO-a u uvjetima bez protoka (*no flow*), odnosno pri  $\Delta$ 80 mmHg (ulazni tlak 80 mmHg, izlazni tlak 0mmHg) kako bi se odredilo stvaranje NO-a potaknuto protokom (*flow*). Ovaj dio protokola odrađen je na uređaju DMT Pressure Myograph System (Model 110P). Protokol je odrađen u odsutnosti/prisutnosti L-NAME-a koji je inhibitor NO sintetaze.

Svi eksperimentalni postupci su usklađeni s europskim smjernicama za skrb i primjenu laboratorijskih životinja (direktiva 86/609) te su poduzete sve mjere kako bi se spriječila patnja životinja. Navedena istraživanja su odobrena za provedbu od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek.

### 4.3. Određivanje razine dušikovog oksida metodom fluorescencije

Razina stvaranja dušikovog oksida bit će procijenjena pomoću DAF-2DA (4,5-diaminofluorescein) boje. Ovaj spoj je nefluorescentan, ali reagira s NO i u prisutnosti kisika dolazi do stvaranja vrlo fluorescirajućeg spoja triazolofluorescein (DAF-2T) čiji je intenzitet proporcionalan razini NO.

Nakon 30 min. bazične inkubacije slijedi inkubacija žile s fluorescentnom bojom DAF-2DA (5  $\mu$ M), 45 min. pri 37°C u HEPES otopini (pH = 7.4; sastav: 137mM NaCl; 5,4mM KCl; 4,2mM NaHCO<sub>3</sub>; 3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0,8mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 10 mM glukoza; 20mM HEPES i 1,2mM CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O). Tubice su zaštićene od djelovanja svjetlosti aluminijskom folijom i držane su u CO<sub>2</sub> inkubatoru na konstantnoj temperaturi 37 °C. Nakon 45 minuta inkubacije, žile su isprane svježim HEPES puferom tri puta te nakon toga fotografirane na ZeissAxioskop MOT2 mikroskopu pomoću Olympus DP70 kamere. DAF-2T pobuđen je na 490nm i mjerene kroz 530nm emisijski filter. Slike su procesuirane i analizirane ImageJ softverom. Intenzitet boje određen je pomoću ImageJ programa (National Institute of Health).

### 4.4. Statističke metode

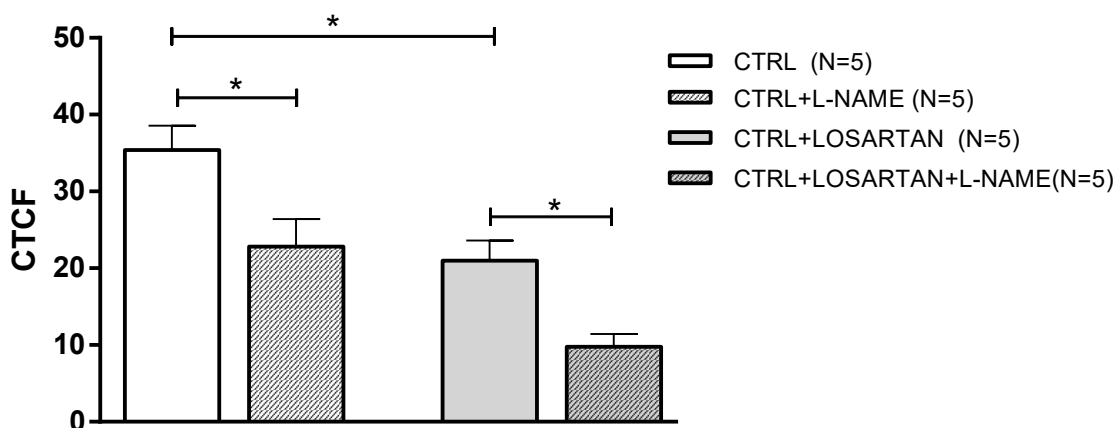
Za utvrđivanje međusobne razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju skupina koristio se Studentov t-test, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitney U test. Za statističku je analizu uporabljen SigmaPlot v.12 (Systat Software, Inc, Chicago, USA) i GraphPad InStat i GraphPad Prism, verzija 5.00 za Windows, GrafPad Software (San Diego, CA, USA). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna pogreška aritmetičke sredine (engl. Mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM)). Razina značajnosti određena je na P<0,05.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Mjerenje razine dušikovog oksida metodom fluorescencije *in situ*

Bazalne razine dušikovog oksida u uvjetima bez protoka (*no flow*) određene *in situ* metodom fluorescencije u tkivu središnje moždane arterije pokazuju značajno sniženu razinu dušikovog oksida kod štakora koji su bili podvrgnuti terapiji Losartanom (CTRL+Losartan skupina) u odnosu na kontrolnu (CTRL) skupinu netretiranih životinja (*Slika 1. i 3.a*).

Nakon primjene L-NAME-a, u obje ispitivane skupine, došlo je do statistički značajno snižene razine stvorenog NO-a u odnosu na bazalne vrijednosti (*Slika 1. i 3.a*).



\*P<0.05

CTCF- korigirana ukupna stanična fluorescencija

N - broj štakora

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±SEM

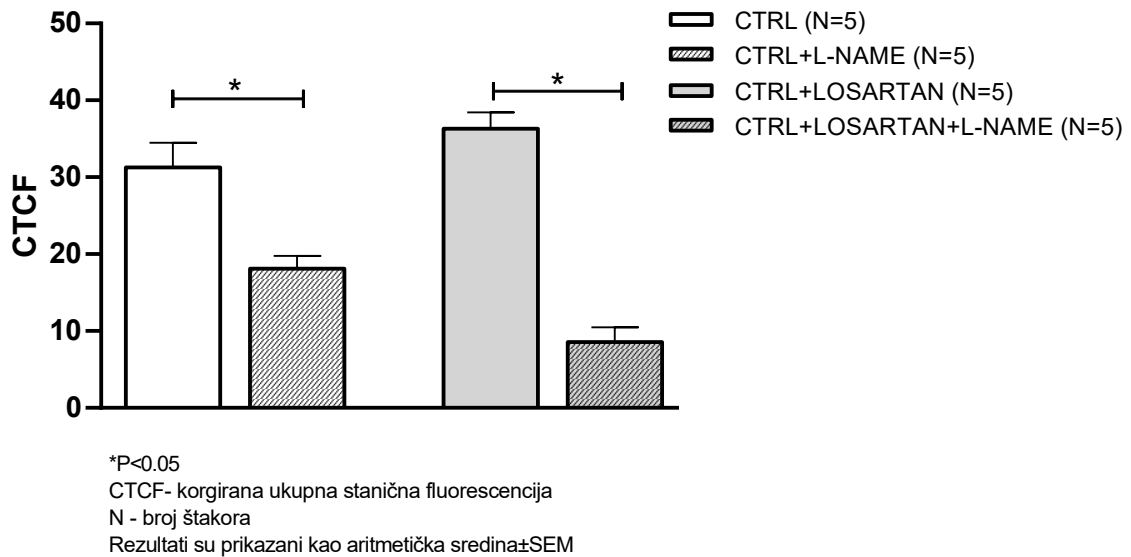
**Slika 1.** Grafički prikaz *in situ* određivanja razine dušikova oksida metodom fluorescencije koristeći DAF-2DA specifičnu boju za dušikov oksid u testiranim grupama, u bazičnim uvjetima (*no flow*). Prikazane su bazalne vrijednosti tenakon primjene L-NAME-a u CTRL i CTRL+Losartan grupi. P vrijednosti iznose:

**CTRL vs. CTRL + L-NAME = 0,0363**

**CTRL vs. CTRL + LOSARTAN = 0,0167**

**CTRL vs. CTRL + LOSARTAN + L-NAME < 0,0001**

Protokom potaknuto stvaranje dušikovog oksida u srednjoj cerebralnoj arteriji ne uzrokuje statistički značajnu razliku između ispitivanih skupina (*Slika 2. i 3.b*). Nakon primjene L-NAME-a, u obje ispitivane skupine, došlo je do statistički značajno snižene razine stvorenog NO-a u odnosu na bazalne vrijednosti (*Slika 2. i 3.b*).



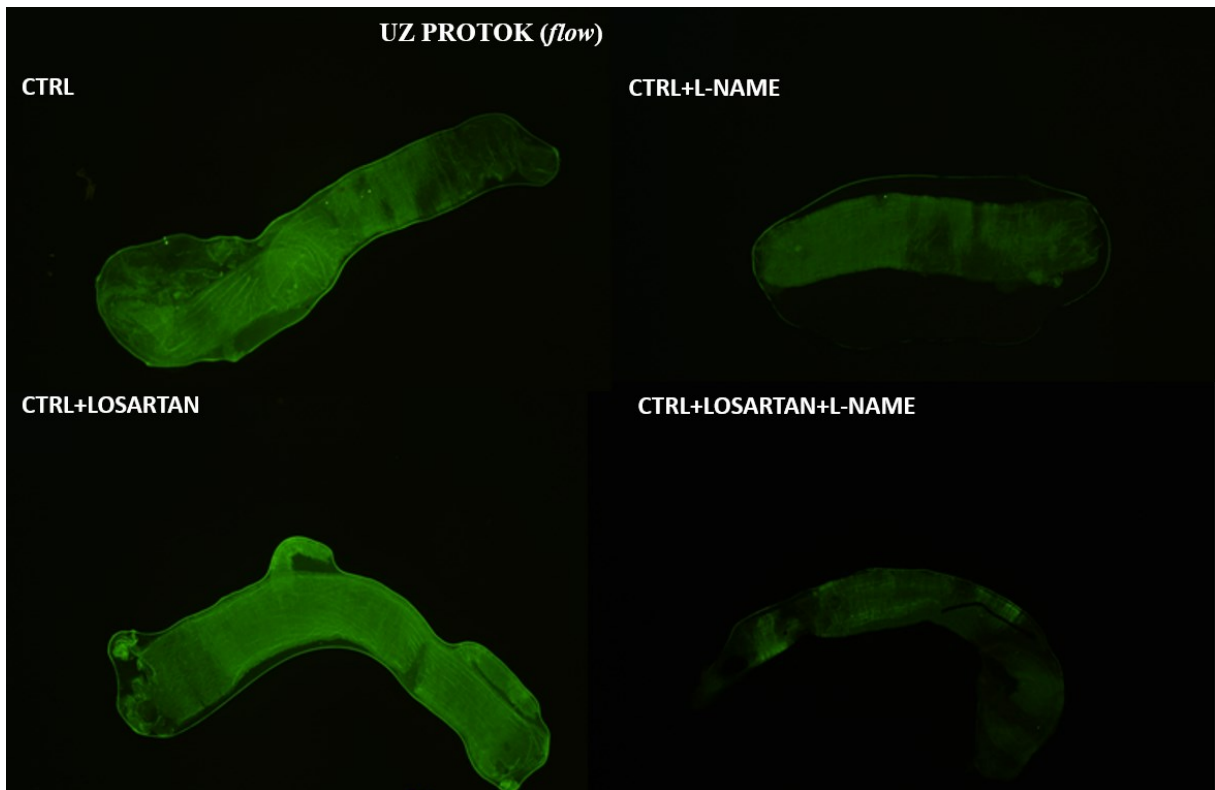
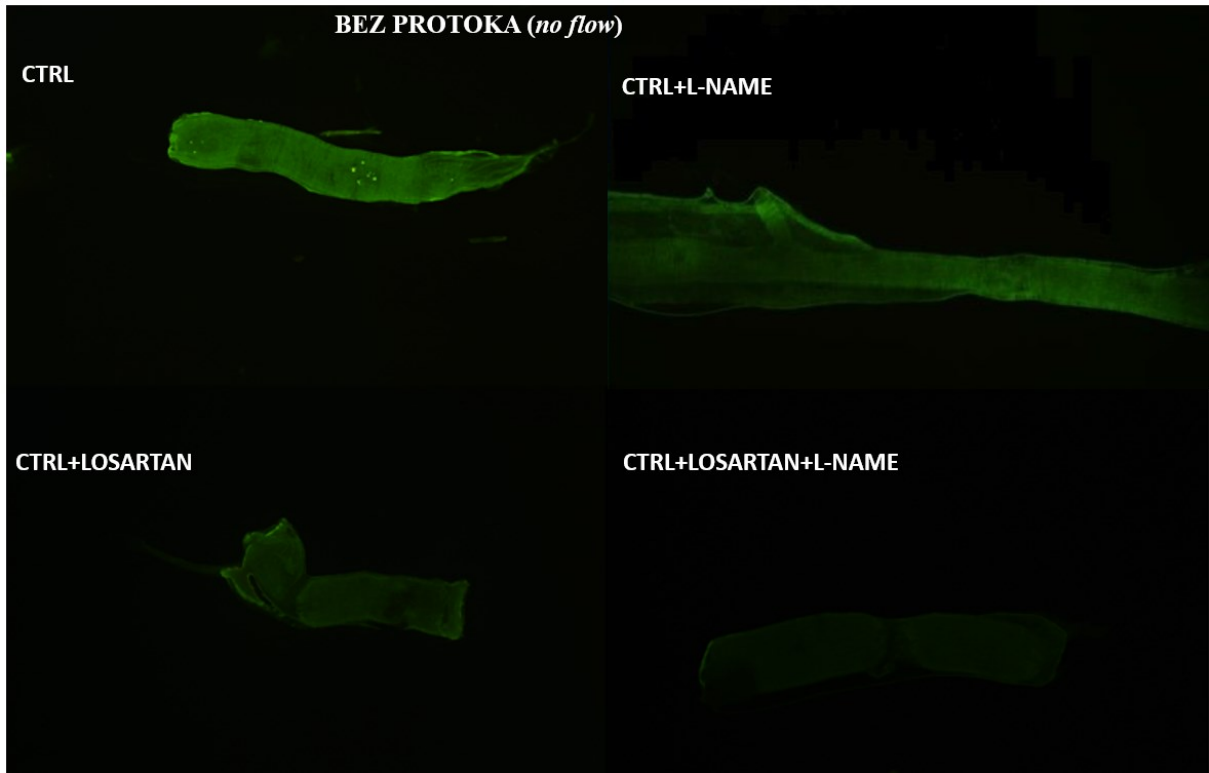
**Slika 2.** Grafički prikaz in situ određivanja protokom potaknute proizvodnje (flow) dušikova oksida metodom fluorescencije koristeći DAF-2DA specifičnu boju za dušikov oksid u testiranim grupama. Prikazane su bazalne vrijednosti tenakon primjene L-NAME-a u CTRL i CTRL+Losartan grupi. P vrijednosti iznose:

**CTRL vs. CTRL + L-NAME = 0,0370**

**CTRL vs. CTRL + LOSARTAN = 0,4560**

**CTRL vs. CTRL + LOSARTAN + L-NAME = 0,0003**





***Slika 3.a i 3.b*** *In situ* fluorescencija bazičnog (*no flow*) te protokom potaknutog (*flow*) stvaranja NO-a nakon bojanja srednjih moždanih arterija DAF-2DA bojom prije i nakon inkubacije s L-NAME-om. Intenzitet boje proporcionalan je količini dušikovog oksida. Slike su napravljene na Zeiss Axioskop MOT2 mikroskopu pomoću Olympus DP70 kamere.

## 6. RASPRAVA

U ovom istraživanju određivano je stvaranje NO-a u samim krvnim žilama, točnije u srednjim cerebralnim arterijama, zdravih netretiranih Sprague-Dawley štakora te štakora koji su kroz sedam dana bili na terapiji Losartanom pomoću metode direktne fluorescencije NO. Glavna saznanja provedene studije ukazuju kako Losartan ima značajan utjecaj na proizvodnju NO-a, budući da je razina stvorenog NO-a snižena kod životinja koje su bile na terapiji Losartanom u usporedbi s kontrolnim netretiranim životinjama, u uvjetima stvaranja NO-a bez prisutnog protoka. Za fiziološki učinak angiotenzina II, koji je ključna sastavnica RAS sustava, bitna je upravo njena fiziološka razina jer je pokazano kako značajno smanjena ili značajno povišena razina Ang II ima nepovoljan utjecaj na organizam te u uvjetima supresije RAS sustava (npr. visokim unosom soli) infuzija Ang II oporavlja narušenu vaskularnu funkciju (17). S obzirom da je ranije navedeno kako je Losartan blokator angiotenzinskih receptora (AT1) i on svojim vezanjem za AT1 receptore snižava količinu dostupnog angiotenzina II i na taj način smanjuje fiziološku funkciju istoga, pretpostavka ovog istraživanja je bila kako će se i razina raspoloživog NO-a smanjiti djelovanjem Losartana budući da je NO ključan vazodilatator. Rezultati našeg istraživanja u skladu s time jer je u uvjetima bez protoka proizvodnja NO-a značajno veća kod kontrolnih netretiranih štakora u odnosu na one koji su bili na terapiji Losartanom. I nadalje, L-NAME je u obje ispitivane skupine značajno smanjio razinu proizvodnje NO-a.

Protokom potaknuto stvaranje NO-a (*flow*) bilo je podjednako u obje ispitivane skupine, dok je L-NAME i kod zdravih netretiranih štakora i kod onih na terapiji Losartanom značajno smanjio proizvodnju NO-a u odnosu na bazalne vrijednosti. Međutim, postavlja se pitanje zašto Losartan i u uvjetima prisutnog protoka značajno ne smanjuje proizvodnju NO-a kada su i ranija istraživanja iz našeg laboratorija pokazala kako u uvjetima povećanog oksidativnog stresa (npr. nakon akutnog izlaganja hiperbaričnom kisiku), dolazi do smanjene bioraspoloživosti NO-a (16), a već je ranije rečeno kako Losartan uzrokuje povećanu razinu oksidativnog stresa. S obzirom na to da je kod povećane razine oksidativnog stresa povećana i proizvodnja slobodnih radikala, istraživanja u našem laboratoriju su se usmjerila i na određivanje njihove razine pa je protokom potaknuta proizvodnja superoksida u srednjim cerebralnim arterijama štakora koji su bili na terapiji Losartanom bila značajno veća u odnosu na razinu kod zdravih netretiranih štakora (18), što potvrđuje povećan oksidativni stres.

## 7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti zaključci:

- 1.) Terapija Losartanom ima značajan utjecaj na proizvodnju NO-a u uvjetima bez protoka (*no flow*), odnosno smanjuje ju;
- 2.) L-NAME značajno snižava proizvodnju NO-a u skupini zdravih netretiranih štakora (kontrolna skupina) kao i u skupini koja je bila na terapiji Losartanom, u uvjetima bez protoka kao i uz prisutni protok;
- 3.) Protokom potaknuta proizvodnja (*flow* uvjeti) NO-a podjednaka je u obje ispitivane skupine.

## 8. SADRŽAJ

**Cilj:** Odrediti stvaranje NO-a u srednjoj moždanoj arteriji kod zdravih Sprague-Dawley (SD) štakora te odrediti utjecaj Losartana na stvaranje NO-a.

**Materijali i metode:** U istraživanje su bili uključeni muški SD štakori koji su bili podijeljeni u dvije skupine: 1. skupina (CTRL) su bili zdravi netretirani štakori, a 2. skupina je (CTRL+Losartan) primala Losartan u vodi za piće kroz sedam dana. Prije dekapitacije štakori su anestetizirani kombinacijom ketamina (75 mg/kg) i midazolama (0,5 mg/kg). Srednja cerebralna arterijaje izolirane postavljena u sustav za izolirane žile u uvjetima bez ( $\Delta$ mmHg) / sa ( $\Delta$ 80mmHg) protokom te uz prisutnost L-NAME-a. Proizvodnja NO-a je određena pomoću fluorescentne boje DAF-2DA i fluorescentnog mikroskopa. Svi eksperimentalni postupci su usklađeni s europskim smjernicama za skrb i primjenu laboratorijskih životinja (direktiva 86/609) te su poduzete sve mjere kako bi se spriječila patnja životinja. Navedena istraživanja su odobrena za provedbu od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek.

**Rezultati:** Rezultati pokazuju da je stvaranje NO-a značajno smanjeno u CTRL+Losartan skupini u uvjetima bez protoka (*no flow*) uspoređujući s kontrolnom skupinom. U uvjetima prisutnog protoka (*flow*) nema značajne razlike u količini stvorenog NO-a između skupina. L-NAME značajno smanjuje razinu NO-a u obje ispitivane skupine i u uvjetima bez protoka te uz prisutan protok.

**Zaključak:** Losartan značajno smanjuje proizvodnju NO-a u uvjetima bez protoka (*no flow* uvjeti) dok je uz prisutan protok (*flow* uvjeti) stvaranje NO-a podjednako kod kontrolnih štakora i kod onih na terapiji Losartanom. U oba uvjeta, bez i u prisutnosti protoka, L-NAME značajno snižava razinu stvorenog NO-a u obje skupine.

**Ključne riječi:** Dušikov oksid; Losartan; Sprague-Dawley štakori, srednja cerebralna arterija.

## 9. SUMMARY

### **Production of nitric oxide in blood vessels of Sprague-Dawley rats on Losartan therapy**

**Aim:** Present study aimed to determine the effects of Losartan therapy on flow/no flow-induced endothelial NO production, in healthy Sprague-Dawley (SD) rats.

**Materials and methods:** Healthy male 11 weeks old Sprague-Dawley rats were divided in: CTRL (control group) and CTRL+Losartan group (received Losartan in drinking water for 7 days). Prior to decapitation, rats were anesthetized by ketamine (75 mg/kg) and midazolam (0.5 mg/kg). Middle cerebral arteries were isolated and cannulated and pressurized at  $\Delta 0$ mmHg or  $\Delta 80$  (*no flow/flow* conditions), in the absence/presence of TEMPOL *in vitro*. NO production was determined by DAF-2DA to DAF-2T conversion fluorescence assay. All experimental procedures conformed to the European Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (directive 86/609) and were approved by institutional Ethical Committee.

**Results:** *No flow* NO production was significantly reduced in the CTRL+Losartan group comparing with the CTRL group, while *flow*-induced NO production was similar between CTRL and CTRL+Losartan group. L-NAME significantly reduces the level of NO production in both groups, and with/without flow conditions.

**Conclusion:** Losartan significantly reduces the NO production in conditions without flow, while in flow conditions the NO production were similar between control rats and rats on Losartan therapy. In both conditions, with/without flow, L-NAME significantly reduces the level of produced NO in both groups.

**Key words:** Nitric oxide; Losartan; middle cerebral artery; Sprague-Dawley rats.

**10. LITERATURA**

1. Cipolla MJ. *The Cerebral Circulation*, 1. izd. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2009. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53081/>. Datum pristupa: 21.8.2018.
2. Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1990; 2: pp. 161–192.
3. Mulvany MJ, Aalkjaer C, Heagerty AM. *Resistance Arteries, Structure and Function: Proceedings (International Congress Series)*, Excerpta Medica. 1991; ISBN 10: 0444891935.
4. Christensen KL, Mulvany MJ. Location of resistance arteries. *J Vasc Res*. 2001;38:1-12.
5. Ana Čavka i suradnici. Endotelna funkcija - funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. *Med Vjesn* 2012; 44(1-4): 135-146.
6. Harris RA, Nishiyama SK, Wray DW, Richardson RS. Ultrasound assessment of flow-mediated dilation: a tutorial, *Hypertension*. 2010 May; 55(5): 1075–1085.
7. Vasudevan D, Thomas DD. Chapter Eleven – Insights into the Diverse Effects of Nitric Oxide on Tumor Biology. Edited by Litwack G. *Vitamins and Hormones*, Volume 96, 2014;265-298. Dostupno na adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128002544000118>. Datum pristupa: 24.8.2018.
8. Ana Čavka i suradnici. Effects of AT1 Receptor Blockade on Plasma Thromboxane A2 (TXA2) Level and Skin Microcirculation in Young Healthy Women on Low Salt Diet. *Kidney Blood Press Res* 2013; 37: 432-442.
9. Lubos E, Handy DE, Loscalzo J. Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis, *Front Biosci*, PubMed. 2008 May 1; 13: 5323–5344.
10. Jovanović Z, i sar. Oksidativna oštećenja neurona, *Med Pregl* 2011; LXIV (7-8): 386-391.
11. Petlevski R, Juretić D, Hadžija M, Slijepčević M, Lukač-Bajalo J. Koncentracija malondialdehida u NOD miševa tretiranih akarbozom. *Biochemia Medica* 2006;16(1): 43-9.

12. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Suzuki Y, Mezzano S i sur. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension*. 2001; 38: 1382–1387.
13. Petrović D, Nikolić A, Stojimirović B. Uloga renin-angiotenzin-aldosteron sistema u progresiji hronične slabosti bubrega. *Medicinski Časopis, Pregledni rad*. 2008; 2: 13-21.
14. Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press*. 2003;12(2):70-88.
15. MA, Ganafa AA, Socci RR, Eatman D, Silvestrov N, Abukhalaf IK. Effect of losartan on oxidative stress-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *American Journal of Hypertension*. 2003; 16 (5): 387-392.
16. Mihaljević Z, Matić A, Stupin A, Rašić L, Jukić I, Drenjančević I. Acute Hyperbaric Oxygenation, Contrary to Intermittent Hyperbaric Oxygenation, Adversely Affects Vasorelaxation in Healthy Sprague-Dawley Rats due to Increased Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2018 Apr 29;2018:7406027.
17. Drenjancevic-Peric I, Lombard JH. Reduced angiotensin II and oxidative stress contribute to impaired vasodilation in Dahl salt-sensitive rats on low-salt diet. *Hypertension*. 2005 Apr;45(4):687-91.
18. Jukic I, Mihaljevic Z, Matić A, Kozina N, Drenjancevic I. Angiotensin II type 1 receptor antagonist losartan enhances endothelial reactive oxygen species production in middle cerebral arteries of Sprague-Dawley male rats. *Accepted for poster presentation, Europhysiology 2018, September 2018, London, UK*.



## 11. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Mirna Poštić

**Datum i mjesto rođenja:** 5.7.1996., Osijek, Hrvatska

**Adresa:** Ulica J.J. Strossmayera 2, 31208 Petrijevci

**Telefon:** 099/693 1835

**E-mail:** [mirna.postic@gmail.com](mailto:mirna.postic@gmail.com)

### **Obrazovanje:**

2003. – 2011. Osnovna škola Petrijevci, Petrijevci

2011.-2015. Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku

2015-2019. Medicinski fakultet Osijek