

Izražaj gena antioksidativnih enzima u krvnim žilama Sprague-Dawley štakora na visokoslanjoj i karnozinskoj prehrani

Ćirić, Filip

Undergraduate thesis / Završni 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:152:557036>

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

Filip Ćirić

IZRAŽAJ GENA ANTIOKSIDATIVNIH

ENZIMA U KRVNIM ŽILAMA

SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA NA

VISOKOSLANOJ I KARNOZINSKOJ

PREHRANI

Završni rad

Osijek, 2024

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Filip Ćirić

IZRAŽAJ GENA ANTIOKSIDATIVNIH

ENZIMA U KRVNIM ŽILAMA

SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA NA

VISOKOSLANOJ I KARNOZINSKOJ

PREHRANI

Završni rad

Osijek, 2024.

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

Mentor rada: prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med.

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

Ovaj rad ima 29 listova, 1 tablicu i 7 slika.

1.	UVOD	1
1.1	Visokoslana prehrana	1
1.2	Oksidativni stres	2
1.3	Antioksidativni enzimi	3
1.4	Karnozin	5
2	HIPOTEZA	8
3	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	9
4	MATERIJALI I METODE	10
4.1	Ustroj studije.....	10
4.2	Materijali	10
4.3	Izolacija RNA	11
4.4	RTqPCR protokol.....	12
4.5	Statističke metode.....	13
5	REZULTATI.....	14
5.1	Relativan izražaj superoksid dismutaze (<i>SOD</i>)	14
5.2	Relativan izražaj glutation peroksidaze (<i>GPx</i>)	16
5.3	Relativan izražaj katalaze (<i>CAT</i>)	18
6	RASPRAVA	19
7	ZAKLJUČAK	22
8	SAŽETAK	23
9	SUMMARY	24
10	LITERATURA.....	25
11	ŽIVOTOPIS	29

POPIS KRATICA I AKRONIMA

AGE - završni produkt uznapredovale glikacije (engl. *advanced glycation end-products*)

ANG II - angiotenzin II

CAR - karnozin (engl. *carnosine*)

CAT – katalaza

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

GPx – glutation peroksidaza

GSH – glutation

GSSG – glutation disulfid

LOX – lipooksigenaze

NaCl- natrijev klorid

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

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

OS – oksidativni stres

RAS – renin-angiotenzinski sustav

RNS – slobodni dušikovi spojevi (engl. *reactive nitrogen species*)

ROS – slobodni dušikovi spojevi (engl. *reactive oxygen species*)

RTqPCR – kvantitativna reverzna transkriptaza lančana reakcija polimeraze (engl. *quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction*)

SOD – superoksid dismutaza

1. UVOD

1.1 Visokoslana prehrana

Zdrava prehrana podrazumijeva uravnoteženu konzumaciju različitih namirnica koje osiguravaju optimalan unos svih potrebnih nutrijenata. Natrijev klorid (NaCl), poznat i kao kuhinjska sol, ključan je spoj za ljudski organizam jer igra važnu ulogu u regulaciji osmotskog tlaka, što omogućava pravilnu distribuciju vode između stanica i krvi. Također pomaže u održavanju volumena krvi, što je ključno za normalno funkcioniranje kardiovaskularnog sustava te je potreban i za prijenos živčanih impulsa i kontrakciju mišića, uključujući i srce. Osim što se koristi za aromatiziranje hrane i kao stabilizator u većini prehrambenih proizvoda, NaCl koristi se kao konzervans, sprječavajući rast većine bakterija u uvjetima visoke koncentracije soli (1 - 3). Usprkos važnoj ulozi koju sol igra u organizmu, porast korištenja kuhinjske soli, ne samo u konzerviranju i industrijski prerađenoj hrani, već i u pekarskim proizvodima i gotovim jelima, zadnjih desetljeća rezultirao je prekomjernim razinama unosa. Za normalnu funkciju organizma odrasle osobe, Svjetska Zdravstvena Organizacija preporučuje do 2 g natrija, odnosno 5 g kuhinjske soli, no prema istraživanjima veći dio populacije konzumira dvostruko više od preporučenog unosa (2, 3). Prekomjerni unos soli, uz tjelesnu neaktivnost negativno utječe na kardiovaskularni sustav, smanjujući elastičnost arterija i povećavajući rizik od hipertenzije. Visok unos natrija uzrokuje zadržavanje tekućine u tijelu, što povećava volumen krvi i pritisak na arterije, te uz hipertenziju, stanje koje prisiljava srce da ubrzano kontraktira kako bi pumpalo krv kroz sužene arterije, može dovesti do srčanih bolesti, uključujući srčani udar i zatajenje srca (4 - 6). Renin-angiotenzinski sustav (RAS) ima ključnu ulogu u održavanju normalnog krvnog tlaka. Ova funkcija se posreduje putem peptidnog hormona angiotenzina II (ANG II), koji održava normalan volumen krvi reguliranjem izlučivanja Na⁺. Međutim, povišenje razine ANG II iznad normalnih vrijednosti povećava proizvodnju O₂^{•-}, potiče oksidativni stres i disfunkciju endotela te ima važnu ulogu u razvoju brojnih bolesti. Istraživanja pokazuju da povišeni unos soli narušava endotelno ovisnu relaksaciju smanjenjem razine NO i povećanom proizvodnjom superoksida te uzrokuje oksidativni stres i disfunkciju endotela, te se to događa dovodeći do smanjenja ANG II i nižih razina cirkulirajućeg ANG II. Isto tako, istraživanja pokazuju da uz snižavanja razine ANG II, pod dugotrajnim utjecajem visokoslane prehrane dolazi do povećanog oksidativnog stresa (7 - 9).

1.2 Oksidativni stres

Oksidativni stres je fenomen koji nastaje zbog neravnoteže između proizvodnje i nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u stanicama i tkivima te sposobnosti biološkog sustava da detoksificira te reaktivne proizvode. ROS se prirodno stvaraju tijekom aerobnog metabolizma u svim našim stanicama. Većina tih molekula nastaje tijekom biokemijskih redoks reakcija koje uključuju kisik. ROS se također generiraju od strane fagocita u tijeku različitih upalnih procesa, kao što su virusne infekcije. Kod zdravih osoba, tijelo tijekom normalnog imunološkog odgovora pojačano proizvodi antioksidanse, čime se održava ravnoteža i sprječava oštećenje stanica (10, 11, 15). Izvori ROS-a mogu se kategorizirati kao endogeni, poput mitohondrija, NADPH-a, ksantin oksidaze (XO) i Fentonove reakcije, ili egzogeni, poput pušenja, zračenja, lijekova i zagađenja. Ovi izvori proizvode različite vrste ROS-a, uključujući superoksidne radikale, vodikov peroksid, hidroksilne radikale, peroksilne radikale, hipoklorastu kiselinu i peroksinitrit (11, 15, 17). Molekularni kisik može se reducirati do vode kroz niz međukoraka. Ovi koraci uključuju stvaranje superoksidnog anion radikala, vodikovog peroksida i hidroksilnog radikala, koji odgovaraju redukciji za jedan, dva i tri elektrona, redom. Također, molekularni kisik u svom osnovnom stanju (tripletni kisik), koji je diradikal, može se elektronski pobuditi da formira singletni molekularni kisik. Kisikovi radikali mogu također postojati kao alkilni ili peroksilni radikali, posebno u lipidima. Osim toga, dušikov oksid je značajan plinoviti radikal biološke važnosti. Peroksinitrit, reaktivna vrsta koja nije radikal, nastaje reakcijom dušikovog oksida sa superoksidnim anion radikalom (13). U kontekstu prehrane s prekomjernim unosom soli, oksidativni stres igra ključnu ulogu u razvoju zdravstvenih problema. Visok unos natrija može izazvati nekoliko mehanizama koji povećavaju oksidativni stres u tijelu. Prvo, natrij može potaknuti proizvodnju slobodnih radikala, povećavajući količinu ROS-a u tijelu. Drugo, visok unos soli može uzrokovati zadržavanje tekućine, što povećava volumen krvi i pritisak na arterije. Ovo stanje dodatno stimulira proizvodnju slobodnih radikala i pridonosi oksidativnom stresu. Treće, natrij može izravno oštetiti endotelne stanice krvnih žila, smanjujući njihovu sposobnost proizvodnje dušikovog oksida, molekule koja je ključna za održavanje elastičnosti i zdravlja krvnih žila. Slobodni radikali su visoko reaktivne molekule koje mogu uzrokovati oštećenje stanica, proteina i DNA, pridonoseći razvoju brojnih kroničnih bolesti poput kardiovaskularnih bolesti, respiratornih bolesti, bubrežnih bolesti, reumatoidnog artritisa, dijabetesa, raka i neurodegenerativnih poremećaja (11, 12).

Dokazano je da kada slobodni radikali u živom organizmu nisu neutralizirani biokemijskim obrambenim sustavima, može doći do razvoja brojnih patoloških stanja. Jasno je da su se živi organizmi ne samo prilagodili suživotu sa slobodnim radikalima, već su razvili načine kako iskoristiti ove toksične tvari u svoju korist, koristeći ih u ključnim fiziološkim procesima. Slobodni radikali tako igraju dvostruku ulogu u živim sustavima: s jedne strane, oni su toksični nusproizvodi aerobnog metabolizma koji uzrokuju oksidativna oštećenja i disfunkciju tkiva, dok s druge strane služe kao molekularni signali koji aktiviraju korisne stresne odgovore. Ovo otkriće također je promijenilo pogled na antioksidanse (11, 14). Glavna uloga antioksidansa u biološkim sustavima je sprječavanje ili odgađanje oksidacije bioloških molekula. Antioksidansi smanjuju razinu oksidativnog stresa, čime ublažavaju oštećenja bioloških molekula uzrokovanih oksidacijom. U živim sustavima razvijen je složen sustav antioksidativne zaštite koji uključuje i antioksidativne enzime i neenzimatske male molekulske antioksidanse (17). U posljednjih nekoliko godina, različiti antioksidansi poput vitamina E, flavonoida i polifenola istraženi su zbog svojih mogućih blagotvornih učinaka u borbi protiv oksidativnog stresa. Iako se oksidativni stres obično smatra štetnim za ljudsko tijelo, također se koristi kao terapijska strategija za liječenje stanja poput raka, s određenim uspjehom u kliničkoj primjeni (11, 13). Osim oštećenja krvnih žila, oksidativni stres uzrokovan visokim unosom soli može utjecati direktno na srce. Slobodni radikali mogu oštetiti srčane mišićne stanice, smanjujući njihovu funkcionalnost i povećavajući rizik od srčanih bolesti. Povećani oksidativni stres također može utjecati na druge organe i tkiva, pridonoseći razvoju sistemskih upalnih stanja koja dodatno opterećuju kardiovaskularni sustav. Suplementacija antioksidansima, poput vitamina C i E te karnozina, može pružiti zaštitu od štetnih učinaka oksidativnog stresa uzrokovanog prekomjernim unosom soli (34). Karnozin, zbog svojih snažnih antioksidativnih svojstava, može neutralizirati slobodne radikale i smanjiti oksidativni stres. Njegova sposobnost da zaštiti endotelne stanice i poboljša funkciju endotela može pomoći u održavanju zdrave proizvodnje dušikovog oksida, čime se smanjuje rizik od ateroskleroze i povezanih kardiovaskularnih bolesti (16, 18).

1.3 Antioksidativni enzimi

Antioksidativni enzimi su ključni za održavanje ravnoteže između slobodnih radikala i antioksidansa u tijelu, igrajući središnju ulogu u zaštiti stanica. Organizmi su zaštićeni od oksidativnog stresa uzrokovanog ROS-om zahvaljujući različitim razinama antioksidativnih obrambenih mehanizama.

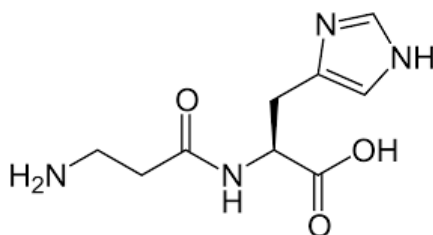
Prva linija obrane je najefikasnija i uključuje antioksidativne enzime poput superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx). Ova linija obrane igra neprocjenjivu ulogu u dismutaciji superoksidnih radikala ($O_2^{\cdot-}$) i vodikovog peroksida (H_2O_2). Uklanjanjem superoksidnih radikala SOD sprječava formiranje mnogo štetnijeg peroksinitrita ($ONOO^-$) ($O_2^{\cdot-} + NO\cdot \rightarrow ONOO^-$) i održava fiziološki bitnu razinu dušikovog oksida ($NO\cdot$), važne molekule u neurotransmisiji, upalama i vazodilataciji. Druga linija antioksidativne obrane uključuje egzogene male molekule antioksidansa koje potiču iz prehrane. Treća linija antioksidativne obrane osigurana je popravkom ili uklanjanjem oksidiranih proteina i drugih biomolekula pomoću enzimskih sustava (17). Tri glavna antioksidativna enzima su SOD, CAT i GPx. Prekomjerni unos soli može značajno utjecati na funkciju ovih antioksidativnih enzima. Kada su enzimi poput SOD, CAT i GPx izloženi prekomjernom oksidativnom stresu, njihova učinkovitost će biti smanjena. Na primjer, ako se proizvodnja slobodnih radikala poveća, može doći do iscrpljivanja dostupnih antioksidansa i smanjenja aktivnosti antioksidativnih enzima. Antioksidativni enzimi također mogu biti podložni oštećenju zbog povišenih razina slobodnih radikala. Primjerice, SOD može biti deaktivirana zbog visoke koncentracije superoksidnih radikala, dok prekomjerna proizvodnja vodikovog peroksida može oštetiti CAT i GPx. Kada su ovi enzimi oslabljeni, njihova sposobnost neutralizacije slobodnih radikala je smanjena, što dovodi do dodatnog oštećenja stanica i tkiva. SOD je enzim koji katalizira dismutaciju superoksidnih radikala, jedne od najštetnijih vrsta slobodnih radikala, u vodikov peroksid i molekularni kisik. Postoje tri forme SOD-a u ljudskom tijelu. SOD1 koji se nalazi u citoplazmi, SOD2 u mitohondrijima i SOD3 u izvanstaničnom prostoru. SOD1 i SOD3 sadrže Cu i Zn, a SOD2 ima Mn na aktivnom mjestu. SOD1 je dimer ukupne mase 32 kDa dok su SOD2 i SOD3 tetrameri ukupne mase 89 kDa i 135 kDa (19 - 22).

CAT s druge strane, razgrađuje vodikov peroksid, nusproizvod reakcije SOD-a, na vodu i kisik. CAT je ključni enzim u obrani stanica od oksidativnog stresa. Njena glavna uloga je neutralizacija vodikovog peroksida (H_2O_2), jednog od ROS, koji se može akumulirati u stanicama kao nusprodukt različitih metaboličkih procesa, poput respiracije u mitohondrijima. Ako se ne ukloni na vrijeme, vodikov peroksid može uzrokovati štetne reakcije koje dovode do oštećenja DNA, proteina i lipida. Na ovaj način, CAT smanjuje koncentraciju vodikovog peroksida i time sprječava nastanak drugih, još reaktivnijih i opasnijih spojeva, kao što je hidroksilni radikal ($\cdot OH$). Time CAT smanjuje oksidativni stres i štiti stanice od oksidativnih oštećenja, održavajući tako staničnu funkcionalnost i zdravlje organizma (23). GPx koristi glutation, ključni antioksidans u tijelu, za neutralizaciju vodikovog peroksida i drugih

reaktivnih kisikovih vrsta. Ova suradnja između enzima omogućuje učinkovitu kontrolu slobodnih radikala i minimiziranje oksidativnog stresa. GPx su skupina ključnih antioksidativnih enzima čija je primarna funkcija smanjenje vodikovog peroksida i raznih hidroperoksida, uključujući i složene lipidne hidroperokside. GPx1 specijalizirana je za neutralizaciju vodikovog peroksida i niskomolekularnih hidroperoksida, pružajući tako zaštitu stanica od oksidativnog stresa. S druge strane, GPx4 ima specifičnu ulogu u uklanjanju kompleksnih lipidnih peroksida, čime štiti stanične membrane od peroksidacijskih oštećenja i doprinosi očuvanju staničnog integriteta u uvjetima oksidativnog stresa. Ovi enzimi igraju ključnu ulogu u održavanju ravnoteže oksidativnih procesa u tijelu, osiguravajući tako zaštitu od štetnih učinaka ROS-a (24). Suplementacija antioksidativnim tvarima, poput karnozina, može pomoći u održavanju ravnoteže između slobodnih radikala i antioksidansa, pružajući tako dodatnu zaštitu. Na taj način, karnozin može pomoći u očuvanju aktivnosti SOD-a, CAT i GPx, omogućujući im da učinkovitije obavljaju svoju funkciju i smanjuju oksidativni stres uz ulogu u očuvanju funkcije antioksidativnih enzima i poboljšanju općeg zdravlja kardiovaskularnog sustava (26, 27).

1.4 Karnozin

Karnozin je prvi put otkriven početkom 20. stoljeća kada je bio izoliran iz mišićnog tkiva konja. Ovo otkriće je značilo početak razumijevanja fizioloških uloga dipeptida u organizmu (25). Karnozin (β -alanil-L-histidin) je dipeptid koji se sastoji od neesencijalne aminokiseline beta-alanina i esencijalne aminokiseline histidina.



Slika 1. Struktura karnozina (Izvor: original autora rada)

Karnozin je izuzetno važan u očuvanju staničnog zdravlja zbog svoje antioksidativne aktivnosti. Ovaj prirodni dipeptid nalazi se u visokim koncentracijama u mišićnom tkivu,

mozgu i srcu, no najveće količine karnozina nalaze se u poprečno-prugastim mišićima (26 - 29). Posjeduje sposobnost neutraliziranja reaktivnih kisikovih spojeva i slobodnih radikala, čime značajno smanjuje oksidativni stres. Kao slobodni radikal "hvatač", karnozin sprječava oksidativnu štetu na lipidima, proteinima i DNA, što pomaže u očuvanju integriteta stanica i prevenciji bolesti povezanih s oksidativnim stresom. Osim toga, karnozin ima važnu ulogu u keliranju metalnih iona, poput željeza i bakra. Ovi metali mogu katalizirati stvaranje slobodnih radikala putem Fentonove reakcije, što doprinosi oksidativnom stresu. Karnozinovo kelirajuće djelovanje pomaže u smanjenju metalno-induciranog stresa, čime se dodatno smanjuje rizik od oksidativnih oštećenja. Djelovanje karnozina kao pufera pH vrijednosti također je ključno, osobito u mišićima. Tijekom intenzivnih fizičkih aktivnosti, karnozin pomaže u održavanju optimalne kiselinsko-bazne ravnoteže, sprječavajući prekomjerno zakiseljavanje mišića. Ovo smanjuje umor i poboljšava fizičku izdržljivost, što čini karnozin korisnim za sportaše i fizički aktivne osobe. Konačno, karnozin inhibira proces glikacije proteina, koji vodi do stvaranja štetnih krajnjih produkata glikacije (engl. *advanced glycation end-products*, AGEs). Ovi spojevi povezani su s ubrzanim starenjem, razvojem kroničnih bolesti, uključujući dijabetes i kardiovaskularne bolesti. Smanjenje glikacije putem karnozina pomaže u usporavanju procesa starenja i očuvanju općeg zdravlja (16 - 29). Karnozin se apsorbira u organizam kroz probavni sustav nakon oralne primjene. Proces apsorpcije karnozina započinje u tankom crijevu, gdje se on razgrađuje na njegove sastavne dijelove, beta-alanin i histidin, putem enzima karnozinaze. Ovaj enzim, prisutan u crijevnim stanicama i krvotoku, brzo hidrolizira karnozin na njegove sastavne aminokiseline. Nakon hidrolize, beta-alanin i histidin se apsorbiraju u krvotok putem specifičnih transportera u crijevnim stanicama. Ove aminokiseline tada cirkuliraju u krvi i mogu se ponovno sintetizirati u karnozin unutar stanica tkiva gdje je prisutan enzim karnozin sintetaza, poput mišićnog i moždanog tkiva. Zbog brzog razlaganja karnozina u probavnom sustavu, razina netaknutog karnozina u krvi nakon oralne primjene je relativno niska (26, 27). Međutim, značajna količina karnozina se ponovno sintetizira unutar stanica iz apsorbiranog beta-alanina i histidina. Ova sinteza je važna jer karnozin u tkivima igra ključnu ulogu u zaštiti stanica od oksidativnog stresa, regulaciji pH i drugim fiziološkim procesima. Za povećanje razine karnozina u mišićima, često se koristi suplementacija beta-alaninom, jer on ograničava brzinu sinteze karnozina.

Suplementacija beta-alaninom može značajno povećati koncentraciju karnozina u mišićima, što je posebno korisno za sportaše i osobe koje se bave intenzivnim fizičkim aktivnostima. Suplementacija karnozinom donosi značajne prednosti kako za fizičku

izdržljivost, tako i za neuroprotektivne funkcije. Karnozin je poznat po svojoj sposobnosti da djeluje kao pH pufer u mišićima, što znači da pomaže neutralizirati nakupljanje mliječne kiseline tijekom intenzivnih fizičkih aktivnosti. To rezultira smanjenjem mišićnog umora i povećanjem izdržljivosti, što omogućava sportašima i rekreativcima da duže održavaju visoku razinu performansi. Osim toga, karnozin potiče oporavak mišića nakon napora, smanjujući vrijeme potrebno za regeneraciju i omogućavajući brži povratak na trening. Na neuroprotektivnoj razini, karnozin ima sposobnost zaštite neurona od oksidativnog stresa i ekscitotoksičnosti, što su ključni faktori u razvoju neurodegenerativnih bolesti. Kao snažan antioksidans, karnozin neutralizira ROS koje mogu oštetiti moždane stanice, a također inhibira procese koji dovode do glikacije i stvaranja toksičnih proteina povezanih sa starenjem mozga. Zbog svojih antioksidativnih svojstava i sposobnosti inhibicije glikacije, karnozin je također popularan u „anti-aging“ tretmanima. Redovita suplementacija karnozinom stoga uz pružanje zaštite u održavanju kognitivne funkcije može pomoći i u očuvanju mladenačke kože i smanjenju znakova starenja (26 - 29).

2 HIPOTEZA

Nadomjestak karnozina utjecat će na izražaj gena antioksidativnih enzima u krvnim žilama Sprague-Dawley štakora izloženih visokoslanjoj prehrani suplementiranoj karnozinom.

3 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj završnog rada je odrediti učinak nadomjestka karnozina na izražaj gena antioksidativnih enzima u uzorcima krvnih žila Sprague-Dawley štakora izloženih visokoslanjoj prehrani u odnosu na skupinu koja nije izložena visokoslanjoj prehrani niti karnozinu.

4 MATERIJALI I METODE

4.1 Ustroj studije

Provedeno istraživanje eksperimentalna je studija na izoliranim krvnim žilama pokusnih laboratorijskih životinja (Sprague/Dawley štakora). 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 smjernicama za primjenu i skrb laboratorijskih životinja (direktiva 86/609) . Poduzeti su svi postupci kako bi se spriječila patnja životinja u skladu s etičkim standardima Direktive 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe.

Sva istraživanja odobrena su od strane Etičkog Povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (2158-61-46-24-87) te Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (525-09/566-22-3).

4.2 Materijali

Za istraživanje izražaja gena korištene su pohranjene krvne žile mozga zdravih pokusnih Sprague-Dawley štakora oba spola, u dobi od 8 do 10 tjedana starosti, koji su uzgojeni u Vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku. Ukupno 24 štakora uključenih u istraživanje, nasumično su podijeljeni u četiri eksperimentalne skupine. Nakon završetka jednodnevnog protokola, štakori su podvrgnuti postupku anestezije i analgezije primjenom kombinacije midazolama u dozi od 0,5 ml/kg i ketamin-klorida u dozi od 3 ml/kg. Nakon što je anestetik postigao adekvatno djelovanje, životinje su žrtvovane metodom dekapitacije. Izolirane su im krvne žile, koje su odmah zamrznute u tekućem dušiku kako bi se spriječila degradacija tkiva. Pohranjene su na temperaturi od -80 °C sve do trenutka kada je provedena izolacija RNA za daljnje analize. Ovakav protokol omogućio je visokokvalitetno očuvanje uzoraka za precizno ispitivanje izražaja gena.

Tablica 1. Eksperimentalne skupine

Naziv skupine	Opis
CTRL	Kontrolna skupina na standardnoj prehrani (0,4 % NaCl) koja nije konzumirala nadomjestak karnozina (N = 6).
CTRL + CAR	Skupina koja je kroz sedam dana konzumirala oralni nadomjestak karnozina (150 mg/kg) (N = 6).
HSD	Skupina koja je kroz sedam dana izložena visokoslanjoj prehrani (4 % NaCl) (N = 6).
HSD + CAR	Skupina koja je izložena visokoslanjoj prehrani i konzumirala je nadomjestak karnozina (N = 6).
N označava broj štakora u skupini	

4.3 Izolacija RNA

Prvo je bilo potrebno izolirati RNA iz pohranjenih krvnih žila. Ovaj postupak se provodio u autoklaviranim Eppendorfovima. Uzorci, smrznuti u tekućem dušiku, mehanički su usitnjeni u tarioniku pomoću tučka što je više moguće. Kako bi se dobio supernatant, uzorku je dodano 1 ml trizola, toksične tvari za odvajanje RNA i DNA iz tkiva. Zatim je dodano 100 µl 1-brom-3-klor-propana kako bi se svi slojevi odvojili. Uzorak je naglo promućkan 15 sekundi i ostavljen da se inkubira na sobnoj temperaturi osam minuta. Uzorci su zatim centrifugirani pri 12 000 okretaja u trajanju od 15 minuta. Supernatant je prebačen u nove sterilne Eppendorfove tubice, a svakoj tubici dodano je 500 µl izopropanola kako bi se RNA odvojila od ostalog staničnog sadržaja poput DNA, lipida i proteina. Uzorci su lagano promućkani 15 do 20 sekundi i ponovno ostavljeni da se inkubiraju na sobnoj temperaturi osam minuta. Nakon inkubacije, uzorci su ponovno centrifugirani pri 12 000 okretaja u trajanju od osam minuta. Nakon centrifugiranja, isprani su s 1 ml 75%-tnog etanola bez mućkanja uzorka i stavljeni na centrifugiranje pri 7 500 okretaja u trajanju od pet minuta. Postupak ispiranja etanolom ponovljen je dva puta. Nakon 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 (NFW, Nuclease-Free Water) i izmjerena je koncentracija i čistoća RNA. Koncentracija i čistoća RNA provjeravaju se i određuju spektrofotometrijski.

4.4 RTqPCR protokol

Za procjenu relativnog izražaja gena koristila se kvantitativna RT-PCR (reverzna transkriptaza lančana reakcija polimeraze) metoda na uređaju Bio-Rad Real Time PCR CFX96. Nakon usklađivanja koncentracija, dobivena RNA će se pretvoriti u komplementarnu DNA (cDNA) primjenom reverzne transkripcije. Uz to, u reakciju se dodaje SYBR Green boja koja se veže za dvolančanu DNA tijekom amplifikacije, omogućujući praćenje reakcije u stvarnom vremenu. Kada se potvrdi kvaliteta i koncentracija RNA, provodi se reverzna transkripcija (RT), proces pretvaranja RNA u cDNA. Za ovaj korak koristi se enzim reverzna transkriptaza, koji transkribira mRNA u cDNA. Ova faza je ključna jer omogućuje konverziju informacija sadržanih u mRNA u format koji je stabilniji i pogodniji za PCR analizu. Konačni cDNA proizvod, zajedno s početnicama za ciljane gene i SYBR Green bojom za označavanje, bit će podvrgnut PCR reakciji i umnožen. Uređaj prati reakciju u stvarnom vremenu, omogućujući praćenje formiranja dvolančane DNA tijekom svakog ciklusa zahvaljujući dodanoj SYBR Green boji. Geni antioksidativnih enzima koji su bili analizirani uključuju SOD2, SOD3, GpX1, GpX4 i CAT. Osim toga, za određivanje izražaja gena bili su korišteni "housekeeping" geni, konstitutivni geni izraženi neovisno o razvojnom stadiju i vrsti stanice. Kao "housekeeping" gen poslužio je β -aktin, a izražaj gena bio je izražen kao relativni u odnosu na ove gene.

Uređaj Bio-Rad Real Time PCR CFX96 omogućuje praćenje reakcije u stvarnom vremenu (Slika 1). Tijekom svakog ciklusa PCR-a, uređaj bilježi količinu fluorescentnog signala koji se oslobađa, što omogućuje kvantitativnu analizu razine gena u uzorcima. Na kraju, analiza rezultata omogućuje određivanje relativnog izražaja gena antioksidativnih enzima u uzorcima krvnih žila u odnosu na referentni gen β -actin. Ovaj proces pruža detaljne uvide u ekspresiju gena u kontekstu kardiovaskularnog zdravlja te identificira potencijalne terapijske ciljeve za liječenje kardiovaskularnih bolesti.



Slika 2. Bio-Rad Real Time PCR CFX96 uređaj, Laboratorij za kliničku i molekularnu imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku (izvor: original autora rada).

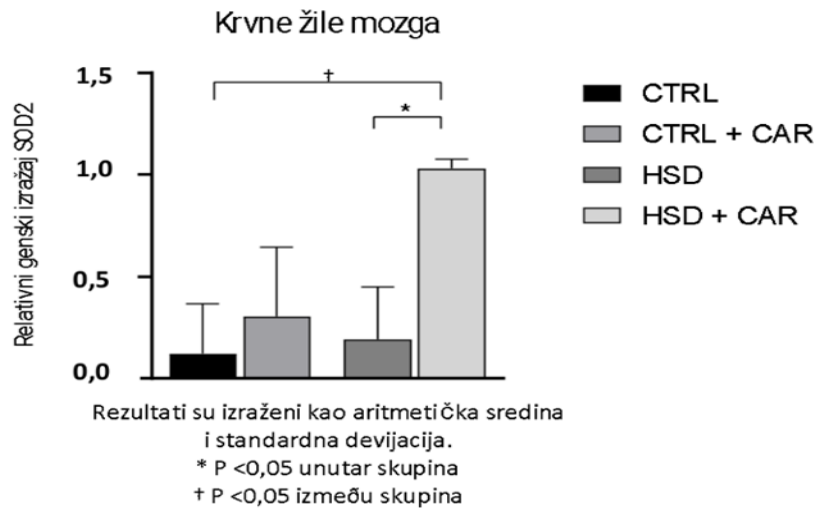
4.5 Statističke metode

Statističke analize provedene su korištenjem Graph Pad Prism v6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) i Microsoft Excel 2016 (Microsoft Office 365, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Za grafički prikaz i analizu rezultata korišten je GraphPad (San Diego, CA, SAD). Za izračun veličine uzorka korišten je softver GPower v3.1.9.7. (Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Njemacka. Kada su varijable normalno raspoređene, razlike između vrijednosti testirane su Studentovim t-testovima. Kada su varijable nenormalno raspoređene, korišten je Mann-Whitneyev test. $P < 0,05$ je razina značajnosti.

5 REZULTATI

5.1 Relativan izražaj superoksid dismutaze (SOD)

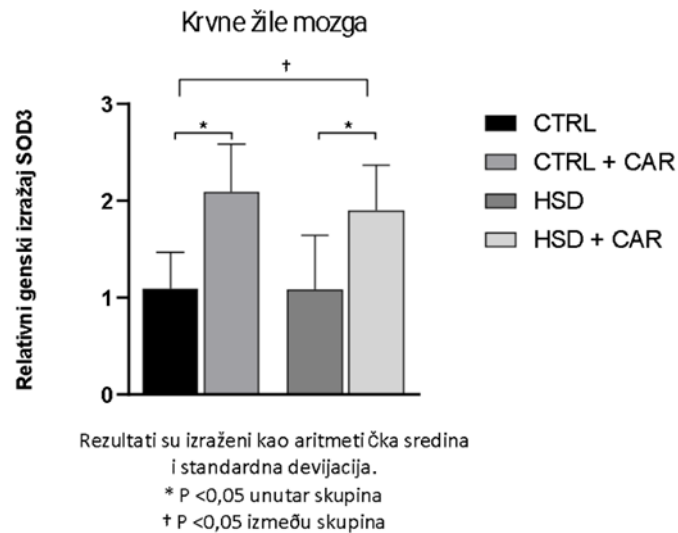
Relativan izražaj *SOD2* značajno je povišen u HSD + CAR u odnosu na CTRL ($P = 0,01$) i u odnosu na HSD skupinu ($P = 0,01$) (Slika 3).



Slika 3. Relativan izražaj gena SOD2 u uzorcima krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora

Uzorci su bili podijeljeni u četiri eksperimentalne skupine: prva je bila kontrolna skupina koja nije bila izložena ni visokoslanjoj prehrani niti oralnom nadomjesku karnozina (CTRL, $N = 6$). Druga skupina sastojala se od štakora koji su sedam dana primali oralni nadomjestak karnozina (CTRL + CAR, $N = 6$). Treća skupina bila je izložena visokoslanjoj prehrani tijekom sedam dana (HSD, $N = 6$), dok je četvrta skupina kombinirala sedmodnevnu visokoslanu prehranu s konzumacijom oralnog nadomjestka karnozina (HSD + CAR, $N = 6$). Izražaj gena normaliziran je prema izražaju gena za β -aktin, kako bi se osigurala točnost i pouzdanost rezultata. Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička analiza pokazala je da su razlike unutar skupina bile značajne, pri čemu je $*P < 0,05$ ukazivalo na značajnu razliku u usporedbi s kontrolnom (CTRL) i visokoslanom (HSD) skupinom unutar iste skupine. Također, $+P < 0,05$ označavalo je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine (CTRL) i ostalih eksperimentalnih skupina. N u svakom slučaju predstavlja broj uzoraka korištenih u analizi.

Relativan izražaj SOD3 značajno je povišen u CTRL + CAR skupini u odnosu na CTRL (P = 0,02) te u HSD + CAR skupini u odnosu na CTRL (P = 0,02) (Slika 4).

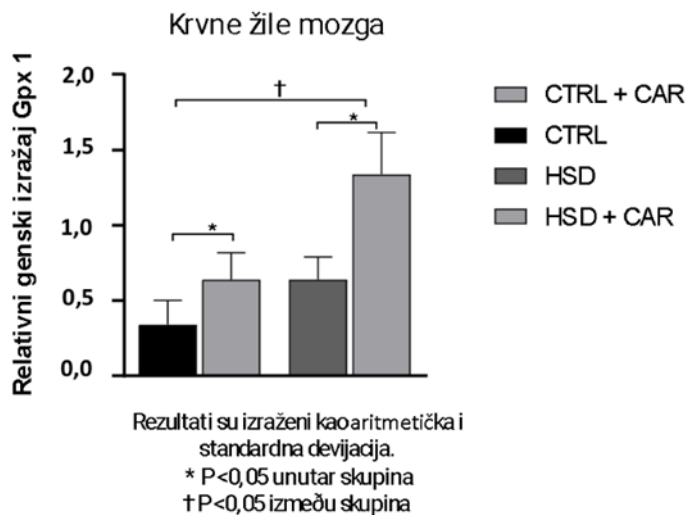


Slika 4. Relativan izražaj gena SOD3 u uzorcima krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora

Uzorci su bili podijeljeni u četiri različite skupine. Prva skupina, kontrolna (CTRL, N = 6), nije bila izložena niti visokoslanjoj prehrani niti oralnom nadomjesku karnozina. Druga skupina (CTRL + CAR, N = 6) primala je oralni nadomjestak karnozina tijekom sedam dana, dok je treća skupina (HSD, N = 6) bila izložena samo visokoslanjoj prehrani kroz isto razdoblje. Četvrta skupina (HSD + CAR, N = 6) kombinirala je visokoslanu prehranu sa sedmodnevnom konzumacijom oralnog nadomjestka karnozina. Za normalizaciju izražaja SOD3 gena korišten je izražaj gena za β -aktin, što je omogućilo precizno kvantificiranje promjena u izražaju SOD3. Rezultati su prezentirani kao aritmetičke sredine s pripadajućim standardnim devijacijama. Statistička značajnost razlika između skupina utvrđena je s razinom značajnosti od $P < 0,05$. N označava broj uzoraka u svakoj skupini koji su korišteni za analizu.

5.2 Relativan izražaj glutation peroksidaze (GPx)

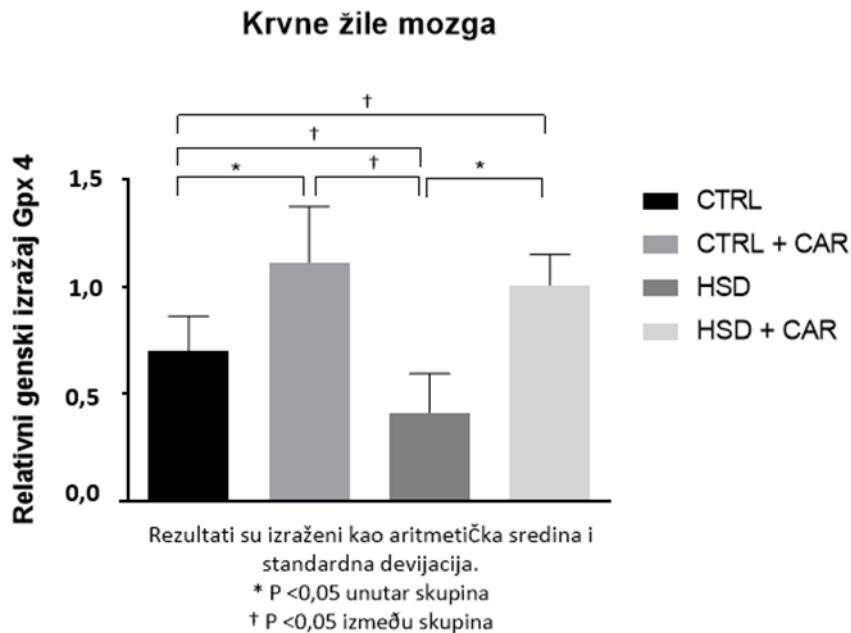
Relativan izražaj GPx1 značajno je povišen u CTRL + CAR skupini u odnosu na CTRL (P = 0,01) te u HSD + CAR skupini u odnosu na CTRL (P = 0,02) i HSD (P = 0,02) skupine (Slika 5).



Slika 5. Relativan izražaj gena GPx1 u uzorcima krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora

Uzorci su bili raspoređeni u četiri eksperimentalne skupine kako bi se istražili učinci različitih uvjeta. Prva skupina (CTRL, N = 6) služila je kao kontrola i nije bila izložena ni visokoslanjoj prehrani niti oralnom nadomjesku karnozina. Druga skupina (CTRL + CAR, N = 6) dobivala je oralni nadomjestak karnozina tijekom sedam dana. Treća skupina (HSD, N = 6) bila je podvrgnuta visokoslanjoj prehrani kroz sedam dana, dok je četvrta skupina (HSD + CAR, N = 6) kombinirala visokoslanu prehranu s konzumacijom oralnog nadomjestka karnozina u istom vremenskom razdoblju. Za normalizaciju izražaja GPx1 gena korišten je izražaj gena za β -aktin, čime je osigurana točnost u kvantifikaciji relativnog izražaja. Rezultati su predstavljani kao aritmetičke sredine s pripadajućim standardnim devijacijama. Statistička analiza je pokazala da postoji značajna razlika (*P < 0,05) u izražaju između HSD skupine i ostalih eksperimentalnih skupina. N u svakom slučaju označava broj uzoraka korištenih u analizi.

Relativni izražaj GPx4 značajno je povišen u CTRL + CAR skupini u odnosu na CTRL skupinu ($P = 0,01$) te u HSD + CAR skupini u odnosu na CTRL ($P = 0,01$) i HSD ($P = 0,01$) skupine (Slika 6).

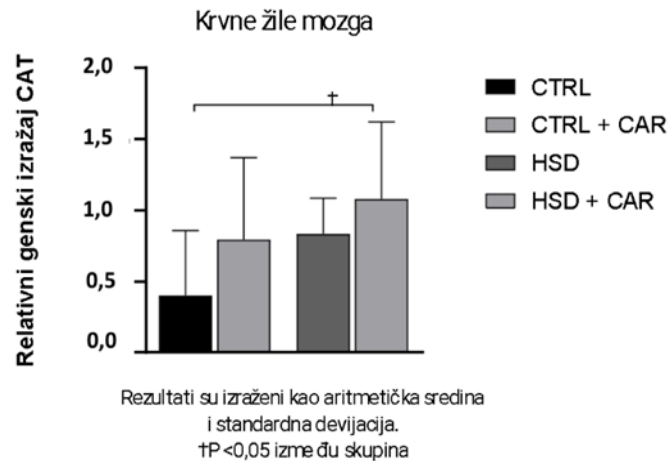


Slika 6. Relativan izražaj gena GPx4 u uzorcima krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora

Uzorci su bili raspoređeni u četiri eksperimentalne skupine radi procjene utjecaja različitih uvjeta. Prva skupina (CTRL, $N = 6$) bila je kontrolna i nije bila izložena ni visokoslanjoj prehrani ni oralnom nadomjestku karnozina. Druga skupina (CTRL + CAR, $N = 6$) primala je oralni nadomjestak karnozina tijekom sedam dana. Treća skupina (HSD, $N = 6$) bila je izložena visokoslanjoj prehrani kroz sedmodnevno razdoblje, dok je četvrta skupina (HSD + CAR, $N = 6$) istovremeno konzumirala visokoslanu prehranu i oralni nadomjestak karnozina. Za normalizaciju izražaja GPx4 gena korišten je izražaj gena za β -aktin, čime je osigurana pouzdanost i preciznost u mjerenju relativnog izražaja. Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine uz standardne devijacije. Statistička analiza je pokazala značajne razlike u izražaju između skupina, pri čemu je $*P < 0,05$ označavalo značajnu razliku u usporedbi s HSD skupinom. Broj uzoraka unutar svake skupine označen je s N.

5.3 Relativan izražaj katalaze (CAT)

Relativan izražaj CAT je značajno povišen u HSD + CAR skupini u odnosu na CTRL (Slika 7).



Slika 7. Relativan izražaj gena CAT u uzorcima krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora.

Uzorci su bili raspoređeni u četiri skupine kako bi se istražili učinci različitih tretmana. Prva skupina bila je kontrolna (CTRL) i nije bila izložena ni visokoslanjoj prehrani ni oralnom nadomjestku karnozina. Druga skupina (CTRL + CAR) primala je oralni nadomjestak karnozina tijekom sedam dana. Treća skupina bila je izložena visokoslanjoj prehrani kroz isto razdoblje, dok je četvrta skupina (HSD + CAR) kombinirala visokoslanu prehranu s konzumacijom oralnog nadomjestka karnozina. Za normalizaciju izražaja CAT gena korišten je izražaj gena za β -aktin, osiguravajući preciznu kvantifikaciju promjena u izražaju. Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine uz pripadajuće standardne devijacije. Statistička značajnost razlika između skupina određena je s razinom značajnosti $P < 0,05$, što ukazuje na značajne promjene u izražaju gena u različitim uvjetima.

6 RASPRAVA

Većina provedenih istraživanja nudi pozitivnu perspektivu na karnozin, ističući njegova potencijalna antioksidativna, anti-glikacijska, neuroprotektivna i protuupalna svojstva. Studije upućuju na to da karnozin može pružiti značajne zdravstvene prednosti, uključujući zaštitu od oksidativnog stresa, poboljšanje fizičke izdržljivosti, usporavanje procesa starenja, te potencijalno igra ključnu ulogu u prevenciji ili ublažavanju neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove (26, 29). Iako većina istraživanja ukazuje na pozitivne učinke karnozina, postoje određena područja gdje konsenzus još uvijek nije postignut. Jedno od glavnih pitanja odnosi se na njegovu biodostupnost, odnosno koliko učinkovito karnozin tijelo apsorbira i zadržava nakon oralne primjene. Također, postoje različiti stavovi o optimalnim dozama za suplementaciju te o mogućim dugoročnim učincima uzimanja visokih doza karnozina. Ipak, postoji dovoljan broj istraživanja koja su u suglasju i potvrđuju pozitivan utjecaj karnozina na izražaj i aktivnost antioksidativnih enzima. Jukić i sur. navode da kao endogena tvar u tijelu, karnozin se lako apsorbira kroz probavni sustav i ima sposobnost prelaska krvno-moždane barijere. Također, ravnoteža između karnozina i njegovih aminokiselinskih komponenti u vaskularnom tkivu mogla bi predstavljati novi mehanizam za regulaciju vaskularnog tonusa i funkcija povezanih s kardiovaskularnim bolestima. S obzirom na to da povećani oksidativni stres, kao i upala i aktivacija endotela (posebno interakcija između endotela i leukocita) igraju ključnu ulogu u nastanku disfunkcije endotela kod raznih kardiovaskularnih bolesti, postoji opravdana pretpostavka da bi suplementacija karnozinom mogla imati pozitivan učinak na funkciju endotela. Naglašavaju mogućnosti poboljšanja reaktivnosti krvnih žila, kako u makrocirkulaciji, tako i u mikrocirkulaciji te zaključuju da se istraživanje karnozinovitih antioksidativnih svojstava u kardiometaboličkim bolestima čini glavnim smjerom buduće istraživačke aktivnosti, posebno u obliku prehranbenog unosa, kao što je u funkcionalnoj hrani (26). Özdoğan i sur. proučili su učinak karnozina na oksidativni stres uzrokovan doksorubicinom. U srčanom tkivu ženki Sprague-Dawley štakora koje su primale karnozin, zabilježena je očuvana aktivnost SOD i GPx, dok je inaktivacija CAT bila spriječena (30). Rezzani i sur. istraživali su učinke karnozinola, novog analoga karnozina, u borbi protiv oksidativnog stresa i upale izazvanih vodikovim peroksidom (H_2O_2) u L6 mišićnim stanicama. Dok su karnozin i karnozinol pokazali značajne antioksidativne i protuupalne učinke, karnozinol je bio učinkovitiji u očuvanju mitohondrijskih funkcija i smanjenju oksidativnog stresa, apoptoze i upale. Anserin je, iako poznat kao antioksidans, bio manje učinkovit u ovom kontekstu. Izražaj SOD i CAT u skupini koja je prije izlaganja peroksidu primila tretman

karnozinom nije bio snižen za razliku od netretirane skupine (31). Kitiyakara i sur. otkrivaju kako visok unos soli može značajno povećati oksidativni stres u bubrezima normalnih štakora. Ustanovili su da sol uzrokuje porast u izlučivanju 8-Isoprostaglandina i MDA u urinu, što ukazuje na povećanu proizvodnju ROS. Ovu promjenu su povezali s povećanom aktivnošću NADPH i NADH oksidaza u bubrezima te povećanjem ekspresije mRNA za enzime gp91phox i p47phox, dok se istovremeno smanjuje ekspresija mRNA za IC- i Mn-SOD. Usprkos smanjenju aktivnosti RAS-a uslijed visoke soli u prehrani, u bubrezima su i dalje bilježili povećanu proizvodnju ROS te smanjenje ekspresije Mn-SOD, te navode da prehrana bogata soli može dovesti do značajnih promjena u izražaju ključnih enzima i pogoršati zdravlje bubrega, ukazujući na potrebu za daljnjim istraživanjima kako bi se razumjeli svi potencijalni zdravstveni rizici povezani s visokim unosom soli (32). Aydin i sur. proučavali su učinke tretmana karnozinom na lipidnu peroksidaciju i antioksidativni status u jetri, srcu i mozgu mladih i starih mužjaka štakora. U jetri starih štakora uočena su značajna smanjenja u razinama GSH i vitamina C, kao i u aktivnosti SOD-a, dok su razine vitamina E i aktivnosti GSH-Px ostale iste. U srcu i mozgu starih štakora, razine ne-enzimatskih i enzimatskih antioksidansa nisu se promijenile. Tretman karnozinom rezultirao je smanjenjem povišenih razina malondialdehida, diene konjugata i proteina karbonil te je značajno povećao razinu vitamina E i aktivnost SOD-a u jetri starih štakora (33).

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi izražaj gena antioksidativnih enzima u krvnim žilama Sprague-Dawley štakora izloženih visokoslanom režimu prehrane uz nadomjestak karnozina. Značajno povećanje izražaja *SOD2*, *SOD3*, *GPx1*, *GPx4* i *CAT* primijećeno je u skupini koja je bila izložena visokoslanjoj i karnozinskoj prehrani, u usporedbi sa skupinom koja je bila izložena samo visokoslanjoj prehrani, te je također značajno povišenje izražaja primijećeno kod *SOD3*, *GPx1* i *GPx4* u skupinama koje su bile izložene samo nadomjestku karnozina u usporedbi na kontrolnu skupinu. Rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima provedenim na Medicinskom fakultetu u Osijeku, koja su istraživala učinak nadomjestka karnozina na oksidativni stres izazvan visokim unosom soli. Utvrđeno je da oralna suplementacija karnozinom doprinosi obnovi vaskularne reaktivnosti narušene visokoslanom prehranom, igra ključnu ulogu u održavanju oksidativne ravnoteže i poboljšava mikrovaskularnu vazodilataciju, istovremeno povećavajući antioksidativni kapacitet i smanjujući oksidativni stres u serumu i tkivima štakora (16, 18, 33).

Na temelju svih dosadašnjih saznanja, može se zaključiti da karnozin ima potencijalno važnu ulogu kao snažan vaskularni antioksidans, a njegov učinak na smanjenje oksidativnog

stresa usmjerava na bitnu poveznicu s promjenama u izražaju antioksidativnih gena. Međutim, potrebno je provesti dodatna opsežna istraživanja kako bi se preciznije utvrdili njegovi točni učinci i mehanizmi djelovanja.

7 ZAKLJUČAK

Na temelju prikupljenih podataka može se zaključiti da nadomjestak karnozina značajno utječe na izražaj gena za antioksidativne enzime, posebno u uvjetima povećanog unosa soli.

- Karnozin može posredovati svoje antioksidativno djelovanje povećanjem ekspresije gena koji kodiraju antioksidativne enzime.
- Karnozin ne samo da direktno neutralizira slobodne radikale, već i potiče aktivnost gena odgovornih za proizvodnju enzima koji štite stanice od oksidativnog stresa.
- Ovaj mehanizam omogućuje dodatnu zaštitu od oksidativnih oštećenja uzrokovanih visokim unosom soli.

8 SAŽETAK

Cilj istraživanja: Odrediti utjecaj prehrane s visokim unosom soli i nadomjestkom karnozina na izražaj gena antioksidativnih enzima u krvnim žilama kod Sprague-Dawley štakora.

Materijal 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 150 mg/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: Nakon provođenja istraživanja rezultati su pokazali da je razina genskog izražaja *SOD2*, *SOD3*, *GPx1*, *i GPx4* i *CAT* povišena u HSD + CAR skupini. Izražaj gena *SOD3*, *GPx1*, *i GPx4* također je povišen u CTRL + CAR skupini u odnosu na CTRL skupinu.

Zaključak: Na temelju prikupljenih podataka može se zaključiti da karnozin značajno povećava izražaj gena za antioksidativne enzime, osobito u uvjetima visokog unosa soli. Ovo sugerira da karnozin ne samo da neutralizira slobodne radikale, već i potiče aktivnost gena odgovornih za proizvodnju enzima koji štite stanice od oksidativnog stresa, pružajući dodatnu zaštitu u takvim uvjetima.

Ključne riječi: antioksidansi; karnozin; genski izražaj; natrijev klorid; oksidativni stres; Sprague-Dawley štakori

9 SUMMARY

The expression of antioxidative enzymes in blood vessels of Sprague-Dawley rats on high salt and carnosine diet

Objectives: To investigate the influence of a high salt diet and carnosine supplementation on gene expression of antioxidative enzymes in the blood vessels of Sprague-Dawley rats.

Material 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 a high salt diet), CTRL + CAR (group that received 150mg/kg oral carnosine supplementation for 7 days), HSD + CAR (group that was exposed to a high salt diet for 7 days and was given a carnosine supplement once a day). Relative gene expression was determined by the RTqPCR method on a Bio-Rad Real Time PCR CFX96 device.

Results: After conducting the research, the results showed that the gene expression levels of *SOD2*, *SOD3*, *GPx1*, *GPx4*, and *CAT* were elevated in the HSD + CAR group. The expression of *SOD3*, *GPx1*, and *GPx4* genes was also elevated in the CTRL + CAR group compared to the CTRL group.

Conclusion: Based on the collected data, it can be concluded that carnosine significantly increases the expression of antioxidant enzyme genes, particularly under conditions of high salt intake. This suggests that carnosine not only neutralizes free radicals, but also stimulates the activity of genes responsible for producing enzymes that protect cells from oxidative stress, thereby providing additional protection under such conditions.

Key words: antioxidants; carnosine; gene expression; sodium chloride; oxidative stress; Sprague-Dawley rats

10 LITERATURA

2. 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.
3. Harvard T.H. Chan. The Nutrition Source, Salt and Sodium [Internet]. Boston: Harvard T.H. Chan; 2023. Dostupno na: <https://nutritionsource.hsph.harvard.edu/salt-and-sodium/> Datum pristupa: 31.07.2024.
4. World Health Organization. Sodium Reduction. [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2023. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salt-reduction> Dostupno na: 02.07.2024.
5. He FJ, Tan M, Ma Y, MacGregor GA. Salt Reduction to Prevent Hypertension and Cardiovascular Disease: JACC State-of-the-Art Review. Am Coll Cardiol. 2020;75(6):632-47: doi: 10.1016/j.jacc.2019.11.055.
6. Patel Y, Joseph J. Sodium Intake and Heart Failure. Int J Mol Sci. 2020;21(24):9497. doi:10.3390/ijms21249474.
7. Grillo A, Salvi L, Coruzzi P, Salvi P, Parati G. Sodium Intake and Hypertension. Nutri. 2019;11(9):1970. doi: 10.3390/nu11091970.
8. Zhu J, Mori T, Huang T, Lombard JH. Effect of high-salt diet on NO release and superoxide production in rat aorta. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004;286(2):575-83.
9. Boegehold MA, Drenjancevic I, Lombard JH. Salt, Angiotensin II, Superoxide, and Endothelial Function. Compr Physiol. 2015;6(1): 215-54. doi: 10.1002/cphy.c150008.
10. 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. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:774360> Datum pristupa: 29.06.2024.
11. Poliklinika Svečnjak. Oksidativni stres – kisik nam daje život, ali nas i ubija [Internet]. Zagreb: Poliklinika Svečnjak; 2015. Dostupno na: [Oksidativni stres - KISIK NAM DAJE ŽIVOT, ALI NAS I UBIJA - Poliklinika Svečnjak \(poliklinikasvecnjak.com\)](https://www.poliklinikasvecnjak.com) Datum pristupa: 13.07.2024.
12. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Oxid Med Cell Longev. 2017.

- Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28819546/> Datum pristupa: 15.07.2024.
13. Iqbal M.J., Kabeer A., Abbas Z., Siddiqui H.A., Calina D., Sharifi-Rad J. Cho W.C., Cell Commun Signal. 2024;22(7). <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01398-5>.
 14. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol. 1997; 82(2): 291-295. doi: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024.
 15. Di Meo S, Venditti P. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. Oxid Med Cell Longev. 2020. doi: 10.1155/2020/9829176.
 16. Yang S, Lian G. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. Mol and Cell Biochem. 2020;467(1-2);1-12.
 17. Zidar A. Učinak nadomjestka karnozina na razinu oksidativnog stresa kod Sprague-Dawley štakora na visokoslanoj dijeti. [diplomski rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek, 2023. Dostupno na: Učinak nadomjestka karnozina na razinu oksidativnog stresa kod Sprague-Dawley štakora na visokoslanoj dijeti | Repozitorij MEFOS Datum pristupa: 23.07.2024.
 18. Jomova K, Alomar SY, Alwasel SH. i sur.. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. Arch Toxicol. 2024;98:1323-67. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03696-4>. Datum pristupa: 25.07.2024
 19. Zidar M. Učinak nadomjestka karnozina na vaskularnu funkciju izoliranih aortalnih prstenova Sprague-Dawley štakora na visokoslanoj dijeti [diplomski rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:462668>. Datum pristupa: 26.07.2024.
 20. Šmuc, Tomislav Kiselo-bazna svojstva Mn(III) meso-tetrakis((N-butil)piridin-2-il) porfirina u vodenom mediju / Budimir, Ana (mentor). [diplomski rad] Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2012, Dostupno na: <https://www.croris.hr/crosbi/publikacija/ocjenski-rad/372495#>. Datum pristupa 26.07.2024.
 21. Čosić 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 (2024). Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:300285>. Datum pristupa: 27.07.2024.
22. Tomac P. Promjena proteinskog izražaja antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora primjenom subpresorskih doza angiotenzina II kod unosa visokih koncentracija soli (Diplomski rad). Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek;2019(2024) Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:445517>. Datum pristupa: 27.07.2024.
23. 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(2024). Dostupno na <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:138616>. Datum pristupa: 27.07.2024.
24. Nandi A, Yan LJ, Kumar JC, Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*, 2019;2019(1). <https://doi.org/10.1155/2019/9613090>. Datum pristupa: 27.07.2024.
25. Pei J, Pan X, Wei G, Hua Y. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxiation. *Front Pharmacol*. 2023 Mar 2;14:1147414. doi: 10.3389/fphar.2023.1147414.
26. Bezkorovainy A. Carnosine, carnitine, and Vladimir Gulevich. *J Chem Edu*. 1974.;51(10):652. doi:10.1021/ed051p652.
27. Jukić I, Kolobarić N, Stupin A, Matic A, Kozina N, Mihaljević Z, i sur. Carnosine, Small but Mighty-Prospect of Use as Functional Ingredient for Functional Food Formulation. *Antiox*. 2021;10(7):1037. doi: 10.3390/antiox10071037.
28. Cesak O, Vostalova J, Vidlar A, Bastlova P, Student V Jr. Carnosine and Beta-Alanine Supplementation in Human Medicine: Narrative Review and Critical Assessment. *Nutri*. 2023;15(7):1770. doi: 10.3390/nu15071770.
29. Creighton JV, de Souza Gonçalves L, Artioli GG, Tan D, Elliott-Sale KJ, Turner MD, i sur. Physiological Roles of Carnosine in Myocardial Function and Health. *Adv Nutr*. 2022;13(5):1914-1929. doi: 10.1093/advances/nmac059.
30. Solana-Manrique C, Sanz FJ, Martínez-Carrión G, Paricio N. Antioxidant and Neuroprotective Effects of Carnosine: Therapeutic Implications in Neurodegenerative Diseases. *Antiox*. 2022;11(5):848. doi: 10.3390/antiox11050848.

31. Özdoğan K, Taskin E, Dursun N. Protective effect of carnosine on adriamycin-induced oxidative heart damage in rats.. *Anatol J Cardiol.* 2011; 11(1). doi:10.5152/akd.2011.003.
32. Rezzani R, Favero G, Ferroni M, Lonati C, Moghadasian MH. A carnosine analog with therapeutic potentials in the treatment of disorders related to oxidative stress. *PLoS One.* 2019;14(4). doi:10.1371/journal.pone.0215170.
33. Kitiyakara C, Chabrashvili T, Chen Y, Blau J, Karber A, Aslam S, i sur. Salt intake, oxidative. *J Amer Soc Nephro.* 2003;14(11):2775-82. doi:10.1097/01.asn.0000092145.90389.65.
34. Aydın AF, Küçükgergin C, Özdemirler-Erata G, Koçak-Toker N, Uysal M. The effect of carnosine treatment on prooxidant–antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats. *Biogeront.* 2009; 11(1):103-9. doi:10.1007/s10522-009-9232-4.
35. Barić L, Drenjančević I, Mihalj M, Matić A, Stupin M, Kolar L, i sur. Enhanced antioxidative defense by vitamins C and E consumption prevents 7-day high-salt diet-induced microvascularendothelial function impairment in young healthy individuals. *J Clin Med.* 2020;9(3):843. doi:10.3390/jcm9030843.

11 ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Filip Ćirić

Datum rođenja: 31.8.2001.

Mjesto rođenja: Slavonski Brod

Adresa: Đure Pilara 24

E-pošta: filipciric2000@gmail.com

Obrazovanje:

2008. – 2016. Osnovna škola Antun Mihanović

2016. – 2020. Gimnazija Matija Mesić

2020. – danas - Studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku