

# Utjecaj primjene blokatora angiotenzin II AT-1 receptora (losartana) na izražaj proteina superoksid dismutaze i katalaze u krvnim žilama Sprague-Dawley štakora

---

Marinčić, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:303444>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Ana Marinčić**

**UTJECAJ PRIMJENE BLOKATORA  
ANGIOTENZINA II AT-1 RECEPTORA  
(LOSARTANA) NA IZRAŽAJ PROTEINA  
SUPEROKSID DISMUTAZE I  
KATALAZE U KRVNIM ŽILAMA  
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Ana Marinčić**

**UTJECAJ PRIMJENE BLOKATORA  
ANGIOTENZINA II AT-1 RECEPTORA  
(LOSARTANA) NA IZRAŽAJ PROTEINA  
SUPEROKSID DISMUTAZE I  
KATALAZE U KRVNIM ŽILAMA  
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**

Rad je ostvaren na Katedri za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Osijek.

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

Neposredni voditelj: dr. sc. Zrinka Mihaljević, prof.

Rad sadrži: 20 stranica i 8 slika.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Oksidativni stres.....	1
1.2. Superoksid dismutaza (SOD).....	2
1.3. Katalaza (CAT).....	2
1.4. Losartan.....	3
2. HIPOTEZA.....	4
3. CILJ.....	5
4. MATERIJALI I METODE.....	6
4.1. Materijali.....	6
4.1.1. Izolacija proteina.....	7
4.2. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu.....	7
4.3. Western blot.....	9
4.3.1. Natrij dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeza (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE).....	9
4.3.2. Prijenos proteina na membranu (blotting) i kemiluminiscencijska detekcija.....	10
4.4. Statistička analiza.....	11
5. REZULTATI.....	12
5.1. Relativni izražaj proteina katalaze (CAT) i superoksid dismutaze 2 (SOD-2) u krvnim žilama mozga štakora.....	12
6. RASPRAVA.....	14
7. ZAKLJUČAK.....	15
8. SAŽETAK.....	16
9. SUMMARY.....	17
10. LITERATURA.....	18
11. ŽIVOTOPIS.....	20

## **KRATICE**

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

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - kisikov radikal

**HO** - hidroksilni radikal

**ROS** - reaktivni oblici kisika (engl. reactive oxygen species)

**SOD-2** - superoksid dismutaza 2

**CAT** - katalaza

**AT II** - angiotenzin 2

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - vodikov peroksid

**NAD** - nikotinamid adenin dinukleotid

**NADP** - nikotinamid adenin dinukleotidni fosfat

**ARB** - blokator angiotenzinskih receptora (engl. angiotensin II receptor blocker)

## 1. UVOD

### 1.1 Oksidativni stres

Postoji uska povezanost između oksidativnog stresa i raznih bolesti povezanih s načinom života (1). Oksidativni stres nastaje kada dolazi do povećane produkcije slobodnih radikala koji prelaze kapacitet organizma da ih neutralizira (2). Oksidativni stres također se može definirati kao stanje u kojem oksidacija prevladava antioksidativni sistem u organizmu (1).

Oksidativni stres neravnoteža je između slobodnih radikala i antioksidansa u tijelu. Slobodni su radikali molekule koje u sebi sadrže kisik i imaju nesparene elektrone. Nespareni elektroni dopuštaju im da lako reagiraju s ostalim molekulama. Slobodni radikali u tijelu stvaraju reakcije oksidacije koje mogu biti štetne ili korisne. Antioksidansi su molekule koje mogu donirati elektrone slobodnim radikalima, a da ne prijeđu u nestabilno stanje. To je način na koji se slobodni radikali stabiliziraju te postaju manje reaktivni. Oksidacija je normalan i nužan proces u tijelu. Kada ispravno funkcioniraju, slobodni radikali pomažu u borbi protiv patogena. Kada je prisutno više slobodnih radikala koji nisu u ravnoteži s antioksidansima, tada oni počinju štetiti masnim tkivima, DNA-i i proteinima u tijelu. Djelovanjem radikala može doći do raznih bolesti npr. dijabetesa, ateroskleroze, hipertenzije i bolesti srca (3).

Slobodni su radikali molekule s jednim ili više nesparenih elektrona kao npr. superoksidni anion ( $O_2^-$ ) i hidroksilni radikal (HO) (4). Formirani su da primaju ili gube elektrone. Radikali primanjem elektrona postaju stabilni (5). Slobodni radikali nastaju zbog kidanja hemolitičke veze pa dolazi do gubljenja elektrona. Molekule su vrlo reaktivne upravo zbog nesparenih elektrona u vanjskoj ljusci (6). Jedan su od značajnih slobodnih radikala kisikove reaktivne vrste (engl. Reactive oxygen species, ROS) (7). Male količine ROS-a stvaraju se normalno u aerobnom organizmu. Nesposobnost organizma da ih ukloni ili njihovo pretjerano stvaranje za posljedicu ima stvaranje oksidativnog stresa (6).

Antioksidansi služe kao obrambeni mehanizam koji tijelo proizvodi kako bi neutralizirao učinke ROS-a. U tijelu se mogu nalaziti u dva oblika: enzimatski i neenzimatski. Neenzimatski izvor antioksidansa uključuje vitamin C, vitamin E, beta-karoten, selen, cink, taurin, hipotaurin i glutation. Enzimatski antioksidansi uključuju SOD, katalazu, glutation peroksidazu i citokrom oksidazu. Kako tijelo stari, razina antioksidansa opada što dovodi do poremećaja u ravnoteži između antioksidansa i prooksidacijskih molekula (8).



## 1.2. Superoksid dismutaza (SOD)

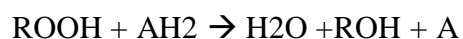
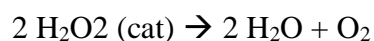
Superoksid dismutaza enzim je koji katalizira dismutaciju superoksidnog aniona u vodikov peroksid i kisik. Gotovo je uvijek antioksidacijska obrana u stanicama izloženima kisiku. Postoje tri forme SOD-a u ljudskom tijelu. SOD1 koji se nalazi u citoplazmi, SOD2 u mitohondrijima i SOD3 u izvanstaničnom prostoru. „SOD1 je dimer sastavljen od dviju jedinica ukupne mase 32 kDa (1 dalton = masa jednog atoma vodika) dok su SOD2 i SOD3 tetrameri ukupne mase 89 kDa i 135 kDa. SOD1 i SOD3 sadrže Cu i Zn, a SOD2 ima Mn na aktivnom mjestu. Aktivno mjesto Mn-SOD sadrži tri bočna histidinska lanca, aspartatni lanac i molekulu vode, ovisno o oksidacijskom broju Mn“ (9).

SOD također štiti od slobodnih radikala koji su nastali procesom starenja i ishemičnog oštećenja tkiva (10). SOD uništava slobodne radikale superoksida tako što pretvara visoke reaktivne superoksidne radikale u manje reaktivne:  $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$  (11).

Na primjeru pokusa s miševima možemo prikazati fiziološku važnost SOD enzima. Miš koji nema SOD2 enzim ugiba nakon okota zbog jakog oksidativnog stresa. Miš kojemu fali SOD1 razvija niz patoloških stanja kao što su gubitak mišićne mase, rak jetre te ubrzan proces starenja. Miš kojemu nedostaje SOD3 neće razviti nikakve zdravstvene posljedice. Ovim pokusom pokazana je važnost enzima SOD1 u razvijanju raznih neuroloških i ostalih oboljenja te prisutnost SOD2 i njegove primarne uloge u procesu neutralizacije prilikom nastanka oksidativnog stresa i njegovih posljedica (9).

## 1.3. Katalaza (CAT)

Katalaza je enzim koji uklanja vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) kada se nalazi u visokim koncentracijama u organizmu (6). CAT reagira s  $H_2O_2$  u obliku vode i molekularnog kisika i s donorima H (metanol, etanol, mravlja kiselina..) koristeći 1 mol peroksida u nekoj vrsti peroksidaze:



Iako CAT nije esencijalna u nekim stanicama, ona igra važnu ulogu u stjecanju tolerancije na oksidativni stres u adaptivnom odgovoru stanice. Ona održava koncentraciju kisika ( $O_2$ ) ili za kemijske redukcije ili za izravnu interakciju s toksinima (11).

#### **1.4. Losartan**

Losartan je oralni lijek, pripada skupini lijekova koji se nazivaju antagonisti receptora angiotenzina II (12). Angiotenzin II je endogeni peptidni hormon te glavni efektor u renin-angiotenzin sustavu za održavanje homeostaze u kardiovaskularnom sustavu. Također je i stimulator NAD(P)H oksidaze koji je glavni izvor i primarni pokretač stvaranja reaktivnih vrsta kisika (ROS) u različitim tkivima (13). Kad se angiotenzin veže za receptore u krvnim žilama, dolazi do njihovog sužavanja (vazokonstrikcije) što dovodi do povećanja krvnog tlaka (hipertenzija). U hipertenziji dolazi do povećanog stvaranja kisikovih radikala (ROS) koji nisu u ravnoteži s raspoloživim antioksidansima pa se kao posljedica javlja oksidativni stres. Losartan se u jetri pretvara iz neaktivnog u aktivni oblik i tako blokira receptor angiotenzina. Tim se blokiranjem opuštaju krvne žile (dilatacija) čime se smanjuje krvni tlak (12).

## **2. HIPOTEZA**

Blokiranje AT1 receptora losartanom dovest će do smanjenja izražaja proteina SOD i CAT u cerebralnim krvnim žilama Sprague Dawley štakora.

### **3. CILJ**

Cilj je istraživanja utvrditi izražajnost proteina superoksid dismutaze i katalaze u cerebralnim krvnim žilama štakora koji su tjedan dana pili vodu s losartanom (blokatora angiotenzina II AT-1 receptora) na modelu zdravih Sprague-Dawley štakora.

## 4. MATERIJALI I METODE

Izražaj proteina superoksid dismutaze i katalaze određen je korištenjem Western blot metode u uzorcima krvnih žila mozga. Zbog premale količine uzoraka za određivanje proteina, kao jedan uzorak korištene su krvne žile mozga dvaju životinja za jedno mjerenje.

### 4.1. Materijali

U istraživanju su se koristili zdravi Sprague-Dawley štakori stari 9-11 tjedana. Štakori su bili podijeljeni u 2 skupine: 1. skupina bile su kontrolne životinje (CTRL), a 2. skupina životinje koje su primale losartan u vodi za piće (CTRL+ LOSARTAN). Za vrijeme trajanja protokola sve su životinje hranjene hranom za laboratorijske glodavce (Mucedola, Italija) s 0,4 % udjelom NaCl. Skupina CTRL+LOSARTAN je u vodi za piće primala 40 mg losartana (ukupna dnevna doza) tijekom 7 dana. Životinje su bile žrtvovane 8. dan te su izolirane krvne žile mozga. Svi štakori, podijeljeni u 2 skupine prema opisu uzgojeni u Vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku u starosti od 8 tjedana, bili su prebačeni iz uzgojnog u eksperimentalni dio nastambe radi adaptacije na novi prostor i kako bi se smanjio stres zbog premještanja. Štakorima iz 2. skupine po navršetku 10 tjedana starosti obična voda za piće zamijenjena je otopinom losartana tijekom 7 dana. Prije žrtvovanja dekapitacijom štakori su izvagani i zatim anestezirani kombinacijom ketamina 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2 ml, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma) te kratko vrijeme ostavljeni kako bi započelo djelovanje anestetika. Kada je anestetik počeo djelovati, štakori su dekapitirani. Nakon toga su uzrokovane krvne žile mozga bile pohranjene u Eppendorf tubice i stavljene u tekući dušik. Potom su prebačene na -80 °C do homogenizacije uzoraka. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo za istraživanje Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Medicinskog fakulteta Osijek ( #2158-61-07-14-04). U izvođenju pokusnog dijela rada koristilo se: PBS (eng. Phosphate Bufferd Saline), koktel inhibitora proteaza, homogenizacijski pufer, MiliQ H<sub>2</sub>O, BSA (eng. bovine serum albumin), kit za određivanje koncentracije proteina/Bradfordov reagens, pufer za donji poliakrilamidni gel (eng. Resolving gel), pufer za gornji poliakrilamidni gel (eng. Stacking gel), pufer za SDS-elektroforezu, TEMED, TBST, pufer za prijenos proteina na membranu, pufer za blokiranje membrane, otopina za primarna protutijela, otopina za sekundarna protutijela, Western Lightning Chemiluminiscence Reagent Plus, primarno protutijelo, sekundarno protutijelo konjugirano s peroksidazom iz hrena, Amido BlueBlack AB 10-B boja, otopina za odbojavanje membrana, pipete, staklene tikvice i posude za mješanje, 1 M i 5 M HCl i NaOH za puferiranje, pH-metar, magnetska mješalica, Tris base, SDS, glicin,

akrilamid, bisakrilamid, amonij-persulfat (APS), nonidet-P, nemasno potpuno obrano mlijeko u prahu, tween 20,  $\beta$ -merkaptotanol, glicerol, HEPES, EDTA, EGTA, homogenizator, sustav za elektroforezu i prijenos proteina (Bio-Rad Mini Protean sustav za elektroforezu i prijenos proteina).

### 4.1.1. Izolacija proteina

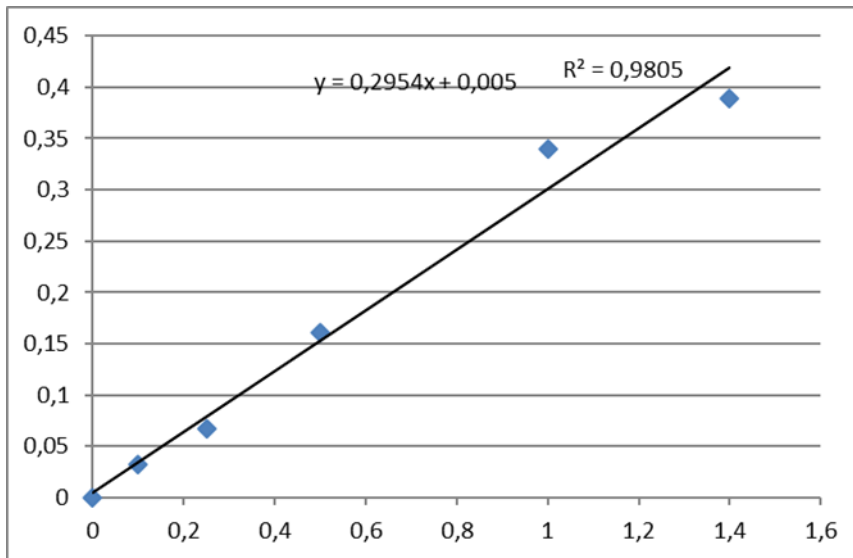
Uzorci su u tarioniku tučkom usitnjeni do praha u tekućem dušiku. Nakon toga su izvagani i dodatno homogenizirani pomoću mehaničkog homogenizatora na 4 °C kako ne bi došlo do denaturacije proteina. Dodan je homogenizacijski pufer u omjeru 1 ml pufera na 100 mg usitnjenog tkiva krvnih žila mozga. Homogenizacijski pufer sastojao se od 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,4 % SDS i koktela inhibitora proteaza (0,4  $\mu$ l/100  $\mu$ l). Dodan je Triton-X u koncentraciji 0,062 % u kojoj ne interferira s Bradfordom te SDS u koncentraciji 0,1 %. Koktel inhibitora proteaza (1 tableta u 1,5 ml dH<sub>2</sub>O) dodan je (0,4  $\mu$ l/100  $\mu$ l pufera) kako bi se spriječila razgradnja proteina. Nakon homogenizacije uzorci su centrifugirani 30 minuta na 17000 g, 4 °C. Alikvotirani supernatanti su pohranjeni na -80°C do korištenja. Jedan alikvot je bio iskorišten za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu koristeći BSA kao standard. Uzorci su prije nanošenja na gel prokuhani s Laemmli puferom u omjeru 1:1, 5 minuta na 95 °C.

### 4.2. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Za mjerenje koncentracija proteina metodom po Bradfordu potrebno je napraviti standardnu krivulju BSA (engl. bovine serum albuminum) poznatih koncentracija (0,1, 0,25, 0,5, 1, 1,4 mg/ml) mjerenjem apsorbancije svjetlosti na 595 nm. Standardna krivulja napravljena je tako da se poznate koncentracije BSA nalaze na os apcisi, a izmjerene apsorbancije na os ordinati (*slika 1.*). Intezitet plavog obojenja nastalog pri reakciji proteina s Bradfordovim reagensom proporcionalan je koncentraciji proteina.

Stock otopina BSA (engl. bovine serum albuminum) pripremila se otapanjem 100 mg BSA u 10 ml destilirane vode. Takva pripremljena stock otopina pohranjena je u alikvotima od 1 ml na -20°C. Nakon odmrzavanja koristila se za pripremu standarda. Uzorci krvnih žila mozga dviju životinja tvorile su tzv. „pool“ proteina kako bi ukupna količina proteina bila dovoljna za provođenje Western blot metode. Napravljeni standardi poznatih koncentracija nanoseni su na mikrotitarsku pločicu kako bi se usporedila njihova apsorbancija s apsorbancijom nepoznatih uzoraka. Svi standardi pripremljeni su u dvije replike. Nakon pripreme standarda, u ostale jažice dodan je ekstrat proteina nepoznate koncentracije u različitim volumenima.

Prije mjerenja apsorbancije u svaku jažicu dodano je još 250  $\mu$ l gotovog Bradfordovog reagensa, a u ostale 4 jažice dodan je čisti reagens. Reakcija se jako brzo odvija pa se unutar deset minuta mjeri apsorbancija koja je izmjerena na čitaču mikrotitarskih pločica (*slika 2.*). Nulta proba koristila se kao kontrola za poravnavanje vrijednosti apsorbancije 0 na spektrofotometru. Volumen uzoraka nepoznate koncentracije morao se prilagoditi tako da se izmjerena apsorbancija morala nalaziti unutar intervala koji se dobio mjerenjem uzoraka BSA poznate koncentracije.



**Slika 1.** Grafički prikaz ovisnosti koncentracije i apsorbancije



**Slika 2.** Mikrotitarski čitač (fotografirala autorica rada)

### 4.3. Western blot

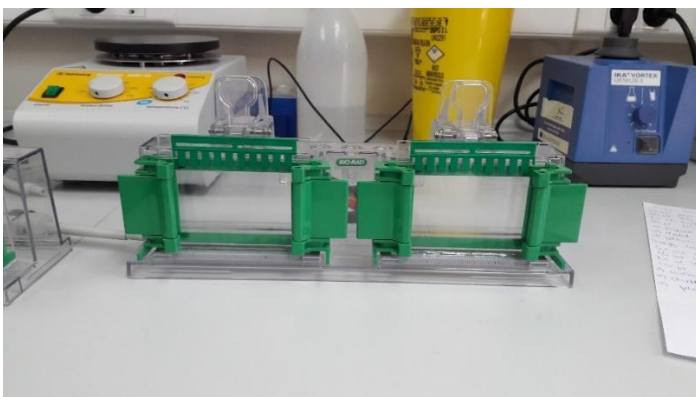
Za sve mjerne parametre koristit će se Western Blot metoda. Western blot je metoda razdvajanja proteina pomoću električnog polja na temelju njihove molekularne mase.

#### 4.3.1. Natrij dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeza (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

SDS (anionski detergent) daje negativan naboj proteinima kako bi se mogli razdvojiti prema masi jer su proteini različitih naboja.

#### POSTUPAK:

Stakla su složena i stavljena na postolje za izljevanje gelova (casting stand) (*slika 3.*). Pripremljen je 10 %-tni donji gel (gel za razdvajanje) koji odgovara veličini proteina. Takav pripremljeni gel izlijeva se do razine ispod donjeg ruba češljica koja se prethodno označila. Potom se nadsloji donji gel s 1 mL izopropanola kako se ne bi prekinula polimerizacija u trajanju od 45 minuta. Tijekom polimerizacije donjeg gela pripremljen je 4 %-tni gornji gel koji služi za sabijanje. Prije samog izlijevanja gornjeg gela, površina donjeg gela isprana je destiliranom vodom i posušena filter papirom. Zatim je izliven gornji gel do ruba stakla i umetnut češljic. Pričekano je 30 minuta za polimerizaciju gornjeg gela. Nakon polimerizacije češljic se pažljivo uklanja te se postavlja sustav za elektroforezu. Takav pripremljen sustav postavljen je u kadu koja je prethodno napunjena puferom (pH 8.3). Potom se jažice dobro ispiru puferom za elektroforezu kako bi se uklonio nepolimerizirani akrilamid. Nakon nanošenja uzoraka u jažice (5-10  $\mu$ l) zajedno s puferom za nanošenje uzorka, puštena je elektroforeza na 200 V dok svi uzorci nisu prešli u donji gel. Zatim je ponovo puštena na 100 V do samog kraja elektroforeze (1,5 h) na 4 °C.

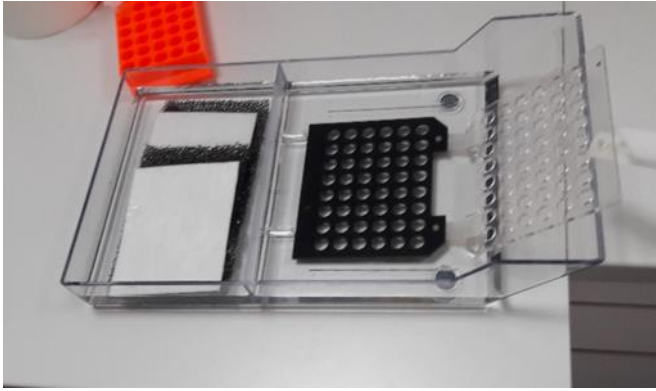


**Slika 3.** Sustav za polimeriziranje gelova kod elektroforeze (fotografirala autorica rada)



### 4.3.2. Prijenos proteina na membranu (blotting) i kemiluminiscencijska detekcija

Prethodno pripremljen pufer za transfer potrebno je ohladiti na 4 °C. Poliviniliden difluorid (engl. polyvinylidene difluoride, PVDF) membrana i filter papiri izrezani su prema dimenzijama gela. Prije kraja elektroforeze stavljena je membrana, filter papiri i spužvice u široku posudu u kojoj je prethodno dodan pufer za prijenos (*slika 4.*). Kazeta za prijenos se rastvara. Na crnu šupljikavu stranu koja će biti okrenuta prema negativnoj elektrodi stavljena je spužvica te filter papiri. Nakon završene elektroforeze, stakla su izvađena i uklonjen gornji gel. Donji gel na kojem su ostali proteini pažljivo je prenesen na filter papir te potom dodana membrana. Na membranu su dodani filter papir i potom spužvica. Svi slojevi pređeni su valjkom kako bi se uklonili mjehurići zraka. Tako posloženi dijelovi poklopljeni su bijelom šupljikavom stranom kazete koja će biti okrenuta prema pozitivnoj elektrodi. Posuda za transfer proteina napunjena je hladnim puferom i uronjena je zatvorena kazeta. Transfer proteina na membranu se provodio 2 sata na 200 mA. Nakon završetka transfera, membrana se bojala u Amido-BlueBlack boji te je potom prebačena u otopinu za odbojavanje (propanol, octena kiselina i mQ H<sub>2</sub>O) 3 x po 5 minuta. Nakon što je membrana odbojana, ispirala se u TBST puferu 2 x po 15 minuta. Nakon toga membrana je blokirana u 4 %-tnoj otopini bezmasnog mlijeka u prahu razrijeđenom TBST-u, 30 minuta na sobnoj temperaturi pomoću tresilice. Nakon završetku blokiranja, membrana je inkubirana u otopini za primarna protutijela (3 %). Stavlja se 2 ml otopine po jednoj membrani. Membrana se inkubirala primarnim protutijelom preko noći na 4 °C na rotary shakeru. Za primarna protutijela koristi se zečje protu-štakorsko poliklonalno protutijelo (GeneTex, GTX116093) u razrjeđenju 1:1000 za SOD-2 te zečje protu-štakorsko poliklonalno protutijelo (Novusbio, NBP2-24916) u razrjeđenju 1:500 za CAT. Nakon toga membrana je isprana u TBST puferu 4 x po 15 minuta i stavljena na inkubaciju sa sekundarnim protutijelom dva sata na sobnoj temperaturi. Za sekundarno protutijelo koristi se kozje protu-zečje HRP obilježeno protutijelo (engl. Horse radish peroxidase) u razrjeđenju 1:7500 i kozje protu-mišje HRP obilježeno protutijelo u razrjeđenju 1:7500. Membrana se ponovo ispire u TBST puferu 4 x po 15 minuta. Nakon ispiranja, membrana je obrisana Kimtech maramicom i na nju je stavljen kemiluminiscencijski reagens (Pierce ECL Western Blotting Substrate Thermo Scientific USA) te je inkubirana 1 minutu na sobnoj temperaturi. Nakon završene inkubacija, višak reagensa se obriše, a membrana se stavlja između dvije folije da se ne posuši i istisne se sav zrak. Membrana je sada spremna za slikanje. Korišten je uređaj BioRad Touch (*slika 5.*). Za kontrolu nanošenja uzoraka određena je i koncentracija β-aktina. Korišteno je mišje protu-štakorsko monoklonalno protutijelo (Sigma, A5316-2ML) u razrjeđenju 1:7500.



*Slika 4.* Sustav za prenošenje proteina na membranu (fotografirala autorica rada)



*Slika 5.* BioRad Touch (fotografirala autorica rada)

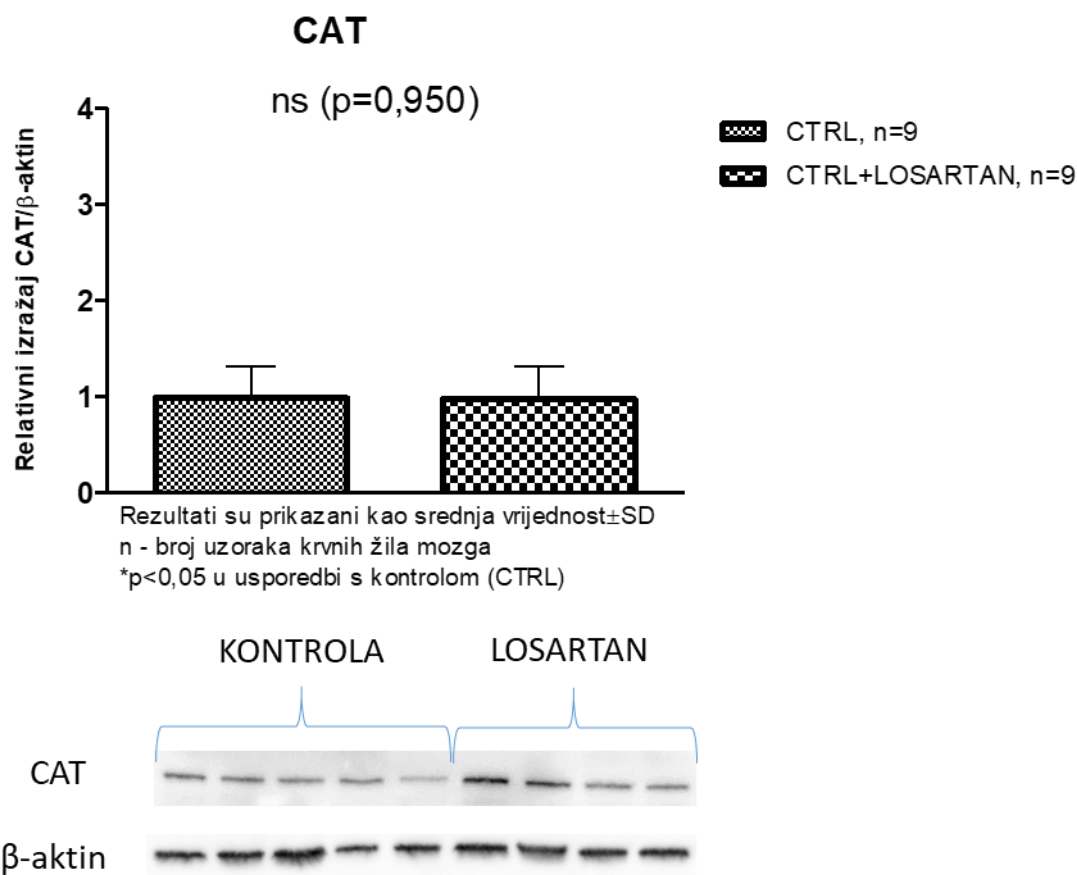
#### **4.4. Statistička analiza**

Normalnost distribucije podataka određena je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Rezultati kontrolne skupine i losartanske skupine uspoređivano je t-testom u slučaju normalne distribucije, a Wilcoxon rank-sum testom ukoliko podaci nisu bili normalno distribuirani. Kao prag statističke značajnosti uzelo se  $p < 0,05$ . Za statističku analizu uporabljen je SigmaPlot, v11.2 (Systat Software, Inc., Chicago, IL, SAD). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija.

## 5. REZULTATI

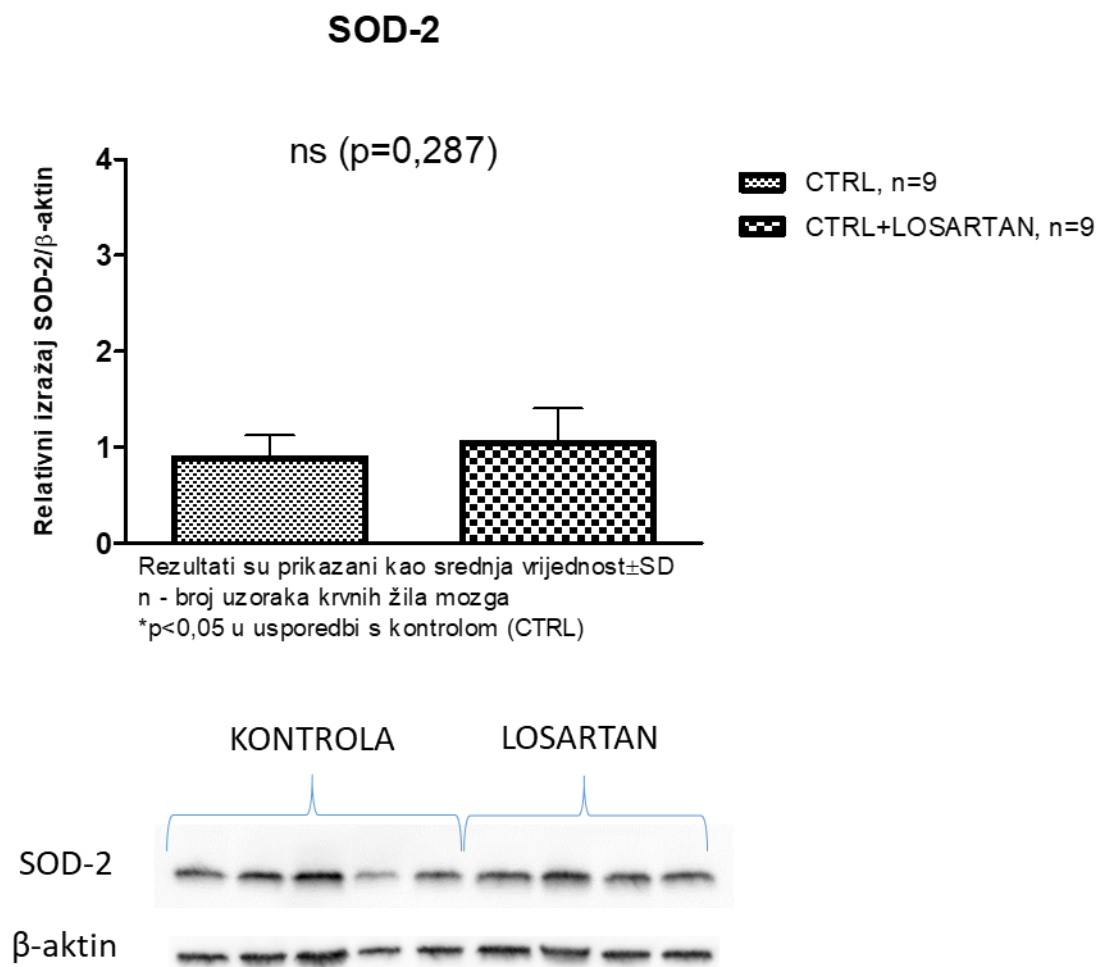
### 5.1. Relativni izražaj proteina katalaze (CAT) i superoksid dismutaze 2 (SOD-2) u krvnim žilama mozga štakora

Izražaj proteina katalaze (CAT) nije promijenjen i nisu uočene statistički značajne razlike između skupine eksperimentalnih životinja, odnosno životinja koje su primale Losartan u vodi za piće u odnosu na kontrolnu skupinu (*slika 7.*).



**Slika 7.** Relativni izražaj CAT u uzorcima krvnih žila mozga zdravih životinja na standardnoj prehrani (CTRL) i životinja koje su tijekom sedam dana pile vodu za piće s losartanom (CTRL+LOSARTAN). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija (SD). n predstavlja broj uzoraka, pri čemu su jedan uzorak činile krvne žile mozga dvaju životinja.

Izražaj proteina superoksid dismutaze 2 (SOD-2) povišen je između ispitivanih grupa, ali statistički neznačajno (*slika 8*).



**Slika 8.** Relativni izražaj SOD-2 u uzorcima krvnih žila mozga zdravih životinja na standardnoj prehrani (CTRL) i životinja koje su tijekom sedam dana pile vodu za piće s losartanom (CTRL+LOSARTAN). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. n predstavlja broj uzoraka, pri čemu su jedan uzorak činile krvne žile mozga dvaju životinja.

## 6. RASPRAVA

Ovim istraživanjem dobili smo uvid u izražaj proteina, superoksid dismutaze 2 i katalaze, u zdravih muških Sprague-Dawley štakora tretiranim blokatorima angiotenzina II AT-1 receptora (losartanom). MnSOD (SOD2) smatra se prvom linijom obrane protiv oksidativnog stresa zbog svoje substancične lokalizacije. Vaskularni izražaj i/ili aktivnost MnSOD mogu biti promijenjene u nekoliko fizioloških i patofizioloških stanja. Na primjer, MnSOD posebno je osjetljiv i reagira na povećani oksidativni stres. U normalnoj aorti miša i kod CuZn SOD-deficitarnih miševa pokazalo se kako aktivnost CuZn SOD čini 50 % do 80 % od ukupne SOD aktivnosti (14-15). MnSOD (SOD2) predstavlja oko 2 % do 12 % od ukupnog vaskularnog SOD dok EC-SOD predstavlja ostatak (16-17). AT-1 receptori imaju ulogu u vazokonstrikciji te vezanjem angiotenzina II na receptore dolazi do porasta krvnog tlaka. Losartan sprječava vezivanje angiotenzina II na te receptore što dovodi do opuštanja krvnih žila i posljedničkog snižavanja krvnog tlaka (12). U dosadašnjim istraživanjima dokazano je da blokada AT-1 receptora glatkih mišićnih krvnih žila utječe na vazorelaksaciju (18). Losartan je prvi ARB s kliničkim studijama koje dokazuju njegovu djelotvornost u liječenju arterijske hipertenzije (19). Eksperimentalno je dokazano kako oksidativni stres s ostalim prohipertenzivnim faktorima utječe na povišenje krvnog tlaka (20). U novodijagnosticiranim i netretiranim hipertenzivnim subjektima uočena je smanjena aktivnost superoksid dismutaze i glutation peroksidaze koji su obrnuto korelirani s krvnim tlakom (21). U prošlim istraživanjima opisana je smanjena aktivnost SOD i glutation-peroksidaze u tkivima dok je aktivnost katalaze bila neznatno povećana u bubregu kod hipertenzivnih štakora (22).

Utvrđen je cijeli protokol za metodu Western blota te se može koristiti u svrhu istraživanja i drugih proteina. U našem istraživanju dobiven je rezultat koji je omogućio analizu razlike izražaja proteina katalaze i superoksid dismutaze između dviju skupina Sprague-Dawley štakora. Terapija losartanom nije utjecala na izražajnost tih proteina. Statističkom analizom napravljenom t-testom dobiven je  $p=0,950$  za katalazu i  $p=0,287$  za SOD-2 koji nam ukazuje da nema statističke značajne razlike proteina između dviju skupina. Razlog za to može biti kratko trajanje terapije losartanom kao i mogućnost da druge izoforme SOD sudjeluju u regulaciji oksidativnog stresa (npr. SOD1 i SOD3), ali i da su promijenjeni drugi antioksidativni mehanizmi neovisni o enzimatskoj regulaciji oksidativnog stresa. Također treba naglasiti da se istraživanje radilo na zdravim životinjama. Ograničenje ovog istraživanja je što zbog nedostatka drugih protutijela nismo bili u mogućnosti odrediti ostale izoforme SOD.

## **7. ZAKLJUČAK**

Blokiranje AT-receptora losartanom ne mijenja se izražajnost proteina CAT i proteina SOD-2 u cerebralnim krvnim žilama Sprague-Dawley štakora.

## 8. SAŽETAK

**Cilj:** Pomoću Western blot metode utvrditi razliku u izražaju proteina katalaze i superoksid dismutaze 2 u cerebralnim krvnim žilama kod zdravih Sprague-Dawley štakora koji su primali losartan u vodi za piće.

**Materijali i metode:** Zdravi SD štakori starosti 11 tjedana hranjeni su standardnom hranom (0,4 % NaCl), a podijeljeni su u dvije skupine, kontrolnu (CTRL, zdravi netretirani štakori, n=18) i CTRL+LOSARTAN skupina koja je u vodi za piće primala 40 mg losartana dnevno tijekom sedam dana. U uzorcima krvnih žila mozga Western blot metodom određen je izražaj proteina superoksid dismutaze 2 i katalaze.

**Rezultati:** Izražaj proteina superoksid dismutaze 2 i katalaze nije se statistički značajno promijenio u CTRL+LOSARTAN skupini u odnosu na CTRL.

**Zaključak:** Unos losartana u organizam neće značajno utjecati na izražaj proteina superoksid-dismutaze 2 i katalaze u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora.

**Ključne riječi:** katalaza; Losartan; oksidativni stres; superoksid dismutaza 2; Western blot

## 9. SUMMARY

**The effect of blockade of angiotensin II AT-1 receptors (losartan) on the protein expression of superoxide dismutase 2 and catalase in blood vessels of Sprague-Dawley rats**

**Objectives:** Using the Western blot method to determine the difference in the expression of catalase and superoxide-dismutase 2 proteins in cerebral blood vessels of Sprague-Dawley rats with or without Losartan treatment in drinking water.

**Materials and methods:** Healthy SD rats aged 11 weeks fed with standard food (0,4 % NaCl) were separated into two groups, control (CTRL, healthy Sprague-Dawley rats, n=18) and CTRL+LOSARTAN group which received 40 mg of Losartan per day in drinking water for 7 days, n=18. The expression of superoxide dismutase 2 and catalase in cerebral blood vessels was determined using the Wester blot method.

**Results:** The expression of superoxide dismutase 2 and catalase proteins hasn't statistically changed in the CTRL+LOSARTAN group compared to the CTRL group.

**Conclusion:** Intake of Losartan in the organism will not significantly affect the superoxide dismutase 2 and catalase proteins expressions in the cerebral blood vessels of the Sprague-Dawley rats.

**Key words:** catalase; Losartan; oxidative stress; superoxide dismutase 2; Western blot



**10. LITERATURA**

- 1) Yoshikawa T, Naito Y. What is oxidative stress? *JMAJ*. 2002; 45(7): 271-276
- 2) Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000;49:3-8
- 3) Dix M. Everything you should know about oxidative stress. Dostupno na adresi:  
<https://www.healthline.com/health/oxidative-stress>
- Datum pristupa: 11.05.2018.
- 4) Rolak L.A. *Neurology Secrets*. 5. izd. Mosby; 2010.
- 5) Diana Howard. What is free radical?. Dostupno na adresi:  
[http://www.dermalinstitute.com/us/library/22\\_article\\_What\\_Is\\_A\\_Free\\_Radical\\_.html](http://www.dermalinstitute.com/us/library/22_article_What_Is_A_Free_Radical_.html)
- Datum pristupa: 3.9.2018.
- 6) Štefan L, Tepšić T, Zaviđić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija uzroci i posljedice. *Medicina* 2007;43:84-93.
- 7) Stvaranje superoksida u krvnim žilama štakora pod utjecajem akutne hiperbarične oksigenacije, Starčević M, diplomski rad
- 8) Watson R.R. *Handbook of Fertility*. Academic Press; 2015.
- 9) Šmuc T. (2009) Kiselo-bazna svojstva Mn(III) meso-tetrakis((N-butil)piridin-2-il) porfirina u vodenom mediju. Farmaceutsko-biokemijski fakultet
- 10) Aldred EM, Buck C, Vall K. *Pharmacology*. 1. izd. Churchill Livingstone; 2009.
- 11) Matés JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 1999;4:D339-45.
- 12) Ogbru O. Losartan. Dostupno na adresi:  
<https://www.medicinenet.com/losartan/article.htm> Datum pristupa : 15.5.
- 13) Wen H, Gwathmey J.K, Xie L.H. Oxidative stress-mediated effects of angiotensin II in the cardiovascular system. *World J.Hypertens*. 2012; 2(4): 34–44.
- 14) Guo Z, Van Remmen H, Yang H, Chen X, Mele J, Vijg J i sur. Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 1131–1138.

- 15) Didion SP, Ryan MJ, Didion LA, Fegan PE, Sigmund CD, Faraci FM. Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ Res.* 2002; 91: 938–944.
- 16) Fukai T, Galis ZS, Meng XP, Parthasarathy S, Harrison DG. Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1998; 101: 2101–2111.
- 17) Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest.* 2000; 105: 1631–1639
- 18) Čulić V. ACE Inhibitors: Hypertension Treatment, Organoprotection and Precautionary Measures. *Medicus.* 2016;25:127-137.
- 19) Knežević A. Antagonisti angiotenzinskih receptora. *Cardio list.* 2010; 5(11):270.
- 20) Utjecaj areterijskog krvnog tlaka na biljege oksidativnog stresa u novootkrivenih hipertenzivnih bolesnika, Teodosić A, diplomski rad
- 21) Baradaran A, Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *J Res Med Sci.* 2014; 19(4): 358-367.
- 22) Polizio A.H, Pena C. Effects of angiotensin II type 1 receptor blockade on the oxidative stress in spontaneously hypertensive rat tissues. *Regulatory peptides.* 2005; 128: 1-5

## 11. ŽIVOTOPIS

ANA MARINČIĆ

Datum i mjesto rođenja:

- 30. listopada 1996. godine, Vinkovci

Kontakt:

- amarincic5@gmail.com

Obrazovanje:

- 2011.-2015. Gimnazija M.A. Reljkovića, smjer Prirodoslovno matematička gimnazija, Vinkovci
- 2015.-2018. Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku