

# Promjena proteinskog izražaja antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora primjenom subpresorskih doza angiotenzina II kod unosa visokih koncentracija soli

---

**Tomac, Petra**

**Master's thesis / Diplomski 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:445517>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET

Sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Petra Tomac

**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, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET

Sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Petra Tomac

**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, 2019.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Odsjek za fiziologiju i imunologiju

Mentor: Doc. dr. sc. Anita Matić, dipl. ing.

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

Rad ima 38 listova, 4 tablice i 9 slika.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Aniti Matić, dipl. ing., koja mi je omogućila sve potrebno za izvođenje istraživanja i pisanja diplomskog rada. Hvala joj na pomoći, strpljivosti i brojnim savjetima koji su mi pomogli u pisanju rada.*

*Također zahvaljujem i neposrednoj voditeljici, dr. sc., prof. Zrinki Mihaljević na pomoći tijekom provedbe istraživanja i pisanja rada.*

*Želim zahvaliti i svim svojim prijateljima koji su bili uz sve moje uspone i padove tijekom studiranja, bez kojih studiranje ne bi prošlo tako lako i zabavno.*

*I na kraju, najveće hvala mojoj obitelji, posebno roditeljima, koji su uvijek bili tu, uz mene, koji su mi omogućili preddiplomski i diplomski studij i bez kojih sve ovo što sam postigla ne bi bilo moguće. Hvala im na velikoj potpori i povjerenju koje su mi ukazali tijekom studiranja.*

*Veliko HVALA svima!*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Sol - čimbenik rizika za razvoj kroničnih nezaraznih bolesti .....	1
1.2. Mikrocirkulacija .....	2
1.2.1. Moždana cirkulacija .....	3
1.2.2. Uloga endotela.....	3
1.3. Oksidacijski stres i slobodni kisikovi spojevi .....	4
1.4. Antioksidacijski mehanizmi .....	5
1.4.1. Enzimski antioksidansi .....	5
1.4.2. Neenzimski antioksidansi .....	6
1.5. Uloga renin-angiotenzin sustava (RAS) .....	8
2. HIPOTEZA .....	10
3. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	11
4. MATERIJALI I METODE.....	12
4.1.MATERIJALI .....	12
4.2. METODE.....	13
4.2.1. Način hranjenja pokusnih životinja i izolacija uzoraka .....	13
4.2.2. Izolacija proteina .....	14
4.2.3. Kvantifikacija proteina .....	14
4.2.4. Western blot metoda .....	15
4.2.4.1. SDS denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE elektroforeza).....	15
4.2.4.2. Prijenos proteina na membranu (engl. blotting) .....	18
4.2.4.3. Inkubacija s protutjelima .....	19
4.2.4.4. Kemiluminiscencijska detekcija .....	20
4.2.5. Statistička analiza .....	21
5. REZULTATI .....	22
5.1. Tjelesna masa i srednji arterijski tlak životinja .....	22
5.2. Relativan proteinski izražaj antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga .....	23
5.2.1. Proteinski izražaj SOD izoformi .....	23
5.2.2. Proteinski izražaj GPx4 .....	26
5.2.3. Proteinski izražaj katalaze u krvnim žilama mozga.....	27
6. RASPRAVA.....	28
7. ZAKLJUČCI .....	31

8. SAŽETAK.....	32
9. SUMMARY .....	33
10. LITERATURA .....	35
11. ŽIVOTOPIS.....	38

## Kratice

ANG II	angiotenzin II
APS	amonijev persulfat
AT	angiotenzinski receptor
BSA	albumin govedeg seruma (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
CAT	katalaza
COX	enzim ciklooksigenaza
COX-1	enzim ciklooksigenaza-1
COX-2	enzim ciklooksigenaza-2
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>Ethylendiaminetetraacetic Acid</i> )
GPx	glutation peroksidaze
GPx1	glutation peroksidaza 1
GPx4	glutation peroksidaza 4
GSH	glutation
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodikov peroksid
NADPH	nikotinamid dinukleotid fosfat
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	superoksid
PVDF	poliviniliden difluorid
RAS	renin-angiotenzin sustav
ROS	reaktivni kisikovi spojevi
SDS	natrij dodecil sulfat (engl. <i>Sodium Dodecil Sulphate</i> )
SOD	superoksid dismutaza
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija



TEMED	tetrametiletildiamin
Tris	hidroksimetil aminometan
UN	Ujedinjeni narodi

## 1. UVOD

### 1.1. Sol - čimbenik rizika za razvoj kroničnih nezaraznih bolesti

Sol je po sastavu kemijski spoj natrija (40 %) i klora (60 %). Najvažniji je začim na svijetu bez kojeg nema života. Glavni izvori natrija u prehrani su industrijski proizvodi (77 %), prirodni sadržaj natrija u namirnicama (12 %), dosoljavanje tijekom konzumacije objeda (6 %) i pripreme obroka kod kuće (5 %) (1). Važnost soli njezino je sudjelovanje u regulaciji vode u organizmu i sprječavanju pretjerane kiselosti u stanicama. Regulira različite metaboličke procese i razinu šećera u krvi, usporava starenje organizma, potiče upijanje čestica hrane u crijevima, pomaže tijelu u rješavanju pretjerane sluzi u plućima, pomaže čišćenju sinusa, sprječava grčenje mišića, očvršćuje kosti, sređuje ciklus sna i budnosti i sl. U normalnim uvjetima bubrezi reguliraju razinu soli u organizmu i izlučuju je putem urina. Kod prekomjernog unosa soli, bubrezi nisu u mogućnosti izlučiti svu količinu soli i na taj način dolazi do njezinog zadržavanja u krvotoku, povećane količine vode u organizmu i povećanja krvnog tlaka. Povećani krvni tlak predstavlja faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti koje su prema podacima europske statistike, vodeći uzrok smrti i odgovorne su za 4,3 milijuna smrti godišnje što čini 42 % smrti u zemljama Europske unije (2). Nadalje, unos visokih koncentracija soli usko je povezan s pojavom moždanog udara. Procjenjuje se da u svijetu godišnje od moždanog udara oboli oko 4 milijuna ljudi. Od toga na Europu otpada otprilike 570 000, a na Sjedinjene Američke Države (SAD) oko 500 000 oboljelih (3). Javlja se kao posljedica tromboze ili embolije zbog ateroskleroze velikih krvnih žila, embolije porijeklom iz srca, okluzije malih krvnih žila, ostalih utvrđenih ili neutvrđenih uzroka (3). Prema preporuci Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) preporučeni dnevni unos soli za odraslu osobu ne bi trebao biti iznad 5 - 6 g/dan. U razvijenim je zemljama dnevni unos vrlo često dva do tri puta veći od preporučenog. Procjenjuje se da u Hrvatskoj ukupni dnevni unos soli u populaciji školske djece iznosi oko 9 g dnevno, a u odrasloj se populaciji kreće u rasponu od 12 - 16 g dnevno (1). Različitim istraživanjima dokazano je da smanjeni unos soli u prehrani rezultira snižavanjem krvnog tlaka i kardiovaskularnih oboljenja. Tako bi smanjenje soli u prehrani za samo tri grama dnevno moglo doprinijeti smanjenju moždanog udara za 13 % i ishemične bolesti srca za 10 %. Prema podacima SZO-a, smanjivanjem unosa za 50 % spasilo bi se oko 180 000 ljudskih života u Europi godišnje (1). Smanjenje soli u prehrani predstavlja jednu od najlakše provedivih javnozdravstvenih mjera za što je potrebna međusektorska suradnja, prvenstveno s prehrambenom industrijom. Upravo zbog veličine javnozdravstvenog problema

i važnosti smanjenja unosa soli 2005. godine osnovana je Svjetska inicijativa za smanjenje unosa kuhinjske soli u organizam (World Action on Salt and Health – WASH) kojoj se pridružila i Hrvatska (Croatian Action on Salt and Health – CRASH), koja kroz različite akcije nastoji utjecati na smanjenje dnevnog unosa soli u prehrani. Hrvatska je, također, po preporuci Ujedinjenih naroda (UN), SZO i Europske unije u izradi Strateškog plana kojemu je cilj smanjenje prekomjernog unosa kuhinjske soli u općoj populaciji Republike Hrvatske za prosječno 4 % godišnje, sa sadašnjih 11,6 grama dnevno na 9,3 grama 2019. godine (4). To bi u konačnici bio doprinos ostvarenju plana SZO-je i UN-a o smanjenju unosa kuhinjske soli za 30 % do 2025. godine, usvojen u Europskom okviru za nacionalne inicijative za smanjenje unosa kuhinjske soli putem hrane (ESAN - National Salt Initiatives implementing the EU Framework for salt reduction initiatives) (4).

## **1.2. Mikrocirkulacija**

Mikrocirkulacija predstavlja najvažniji dio krvotoka čineći razgranatu mrežu najmanjih krvnih žila, kapilara (5). Jedna od primarnih funkcija joj je opskrba tkiva i organa kisikom i hranjivim tvarima kako bi se zadovoljile potrebe svake stanice unutar organa (5). Nadalje, važna je za uklanjanje krajnjih produkata metabolizma i aktivaciju imunološkog sustava. Slaba cirkulacija sve je češći zdravstveni problem današnjice koji ne dolazi sam od sebe. Pogoduju joj brojni čimbenici: tjelesna neaktivnost, nedostatak sna, pušenje, nezdrava i nepravilna prehrana, povišene vrijednosti masnoća u krvi, povišeni krvni tlak, prekomjerna tjelesna težina, depresija i stres. Gustoća perfuzijskih (funkcionalnih) kapilara je dovoljno visoka da osigura kisik na odgovarajuće udaljenosti, a arteriole reguliraju raspodjelu kisika unutar organa točno tamo gdje je potrebno. Glavne komponente ovog regulacijskog sustava su endotel, koji komunicira i integrira signale duž mikrovaskularne mreže, i eritrociti, crvene krvne stanice, koje direktno prate i reguliraju opskrbu kisikom u svim organima. U slučaju njezine disfunkcije dolazi do hipoksije tkiva, smanjene opskrbe tkiva kisikom, i otkazivanja organa (5).

### 1.2.1. Moždana cirkulacija

Mozak koristi približno 20 % raspoloživog kisika za normalnu funkciju, čineći čvrstu regulaciju protoka krvi i dostavu kisika ključnu za preživljavanje. U normalnom fiziološkom stanju, ukupni protok krvi u mozak je iznimno konstantan, djelomično zbog istaknutog doprinosa velikih arterija prema vaskularnoj rezistenciji. Omogućena je stabilna i kontinuirana opskrba moždanog tkiva i stalno održavanje intrakranijalnog volumena i tlaka. Visoka metabolička potreba neuronskog tkiva zahtijeva tijesnu koordinaciju između neuronske aktivnosti i protoka krvi unutar moždanog parenhima, poznata kao funkcionalna hiperemija. Međutim, da bi se protok unutar mozga povećao na područja koja to zahtijevaju, uzvodne žile moraju se raširiti kako bi se izbjeglo smanjenje nizvodnog mikrovaskularnog tlaka. Stoga se u mozgu javljaju koordinirani protok reakcija, vjerojatno zbog provedene vazodilatacije od distalnih do proksimalnih arterijskih segmenata i do miogenih mehanizama koji povećavaju protok kao odgovor na smanjeni tlak (5).

### 1.2.2. Uloga endotela

Iako je bio smatran jednostavnom barijerom između stijenke krvnih žila i krvi, endotel danas predstavlja izuzetno važan organ koji izgrađuje cijeli krvožilni sustav. Građen je od endotelnih stanica koje se protežu unutar stijenki. Njegove najznačajnije funkcije su kontrola vaskularnoga tonusa, inhibicija agregacije trombocita, modulacija migracije leukocita, regulacija proliferacije glatkih mišićnih stanica i moduliranje propusnosti vaskularne stijenke (6). Različitim mehanizmima prilagodbe nastoji kompenzirati mehanička i kemijska oštećenja krvnih žila. Gubitak kontrole nad tim reparacijskim procesima dovodi do nastanka trajne i neprikladne endotelne aktivacije poznate pod nazivom endotelna disfunkcija (ED). Danas se ED može smatrati sindromom sistemnih manifestacija koji definira kardiovaskularni morbiditet i mortalitet. Patofiziološki faktori koji dovode do nastanka endotelne disfunkcije i koji su posebno važni rizični čimbenici za nastanak, razvoj i progresiju kardiovaskularnih bolesti su aktivacija citokina u upalnim procesima, slobodni radikali kisika (ROS) i/ili oksidativni stres te glikozilacija metabolita koji su prisutni u dijabetesu i procesu starenja, pušenje i hipertenzija, kronična hiperhomocisteinemija i/ili hiperkolesterolemija i povišena koncentracija plazmatskih oksidiranih lipoproteina male gustoće i njihova akumulacija u stijenku krvne žile, kao i infekcije bakterijama, virusima ili drugim patogenima (6). S obzirom da je jedna od temeljnih značajki

endotelne disfunkcije reverzibilnost, procjenu endotelne funkcije treba uzeti kao univerzalnu metodu za procjenu kardiovaskularnoga rizika te primarnu i sekundarnu prevenciju kardiovaskularnih incidenata (6).

### 1.3. Oksidacijski stres i slobodni kisikovi spojevi

Kisik je potreban svakom živom organizmu, ali u prevelikim koncentracijama postaje vrlo opasan, pa čak i smrtonosan. Oksidacijski se stres može definirati kao poremećaj u ravnoteži između slobodnih kisikovih spojeva i antioksidacijske obrane. Slobodne kisikove spojeve (ROS) stvaraju mitohondriji stanica živih organizama u kojima se nalazi transportni lanac elektrona za proizvodnju energije u stanici. ROS nastaju kao rezultat normalnog staničnog metabolizma i okolišnih čimbenika. Fiziološki ROS u niskim je koncentracijama važan za rast stanica, njihovu diferencijaciju, starenje i apoptozu. ROS se ubrajaju u visoko reaktivne molekule zbog nesparenog elektrona, odnosno slobodne valencije, pa u visokim koncentracijama mogu dovesti do oštećenja staničnih struktura kao što su ugljikohidrati, nukleinske kiseline, proteini, lipidi, ali i mijenjati njihove funkcije. Pomak u ravnoteži između oksidansa i antioksidansa u korist oksidansa upravo je oksidacijski stres, a štetnost mu se očituje na vaskularnom endotelu čija je poremećena funkcija podloga kardiovaskularnih bolesti. Smanjena regulacija oksidacijskog stresa i oksidirajuće stanje izuzetno su kritični za vijabilnost stanica, njihovu aktivaciju, proliferaciju i funkciju organa (7). Kako bi se spriječili svi štetni učinci ROS-a, organizam aktivira antioksidacijske sustave, bili oni enzimski ili neenzimski. Međutim, u patološkim stanjima, uključujući oštećenje miokarda tijekom ishemije, akutni infarkt zbog opstrukcije koronarnih arterija, aterosklerozu, dijabetes, hipertenziju, upalu, neurološke poremećaje ili rak, funkcija antioksidacijskih sustava može biti narušena (7). U ROS ubrajaju se superoksid, vodikov peroksid, singlet kisik, ozon i organski peroksidi, a u patofiziološkim stanjima postoje mnogi izvori ROS-a. Glavni endogeni izvori ROS-a predstavljaju sedam izoformi NADPH oksidaza, mitohondrijski respiratorni transportni lanac, ksantin oksidaza, citokrom P450 i metabolizam arahidonske kiseline, a egzogeni su primjerice dim cigareta, različite vrste zračenja, lijekovi i sl. (8).

## 1.4. Antioksidacijski mehanizmi

Svaki živi organizam posjeduje antioksidacijski obrambeni mehanizam koji služi za suprotstavljanje štetnog učinka ROS-a. Dijeli se na enzimski i neenzimski mehanizam. Općenito, antioksidansi predstavljaju male molekule koje mogu izbaciti slobodne radikale tako da prihvate ili daju elektron kako bi spriječili ili ublažili pojedina štetna stanja uzrokovana ROS-om. Mogu se podijeliti u tri osnovne skupine. U primarnu skupinu pripadaju oni koji onemogućuju nastajanje ROS-a, sekundarni antioksidansi su oni koji uništavaju već stvorene slobodne radikale, dok tercijarni ispravljaju nastala oštećenja stanica (9). Enzimskoj antioksidacijskoj obrani pripadaju superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza i katalaza koji kataliziraju mnoge reakcije pretvorbe ROS-a u stabilnije molekule, primjerice vodu i kisik. U neenzimsku obranu ubrajaju se  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), askorbinska kiselina (vitamin C), glutation (GSH), nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), tioredoksin, metali u tragovima kao što je selen i brojni drugi.

### 1.4.1. Enzimski antioksidansi

Superoksid dismutaza (SOD) pripada skupini bjelančevina koje kao kofaktor mogu sadržavati cink, mangan, željezo, bakar ili nikal. Ubraja se u prvu crtu obrane, a javlja se u pet različitih izoformi od kojih su tri strukturno karakteristične: bakar-cink SOD (Cu/Zn SOD ili SOD-1), mangan SOD (MnSOD ili SOD-2) koji su smješteni u matriksu mitohondrija i izvanstanični oblik EC-SOD ili SOD-3. Svojim obrambenim mehanizmom katalizira reakciju dismutacije superoksida, štiti stanice od slobodnih radikala:  $2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$  i na taj način umjesto toksičnog HO\* radikala nastaju vodikov peroksid i kisik. U normalnim uvjetima mitohondrijski lanac prijenosa elektrona predstavlja najvažniji izvor superoksida, a pretvara oko 5 % molekularnog kisika u superokside. Povećana aktivnost bilo koje izoforme SOD-a može se shvatiti kao odgovor vaskularnog endotela i stanica na oksidacijski stres. Primjerice, u normalnoj aorti miša pokazalo se da Cu/Zn SOD čini 50 do 80 % ukupne SOD aktivnosti, MnSOD predstavlja oko 2 do 12 % ukupnog vaskularnog SOD-a, a EC-SOD ostatak. Osim toga, studije na MnSOD heterozigotnim deficijentnim miševima pokazale su da MnSOD štiti od oštećenja vaskularnog mitohondrija i razvoja ateroskleroze (7). Jedina izoforma SOD-a koja je izražena izvan stanice jest EC-SOD, a za tkivo vezana je uz pomoć svojih heparin- vezujućih domena. EC-SOD smješten je u stijenci krvne žile, pogotovo između endotela i vaskularnih

mišića. Također, i njegova se aktivnost može mijenjati kao odgovor na različite podražaje kao što su hipertenzija, ateroskleroza i dijabetes (7).

Osim superoksid dismutaze, važnu ulogu antioksidacijske obrane ima i glutation peroksidaza (7, 9). Nalazi se u citosolu stanica, ali i u mitohondrijima. Glutation peroksidaze (GPx) čini osam (GPx1 - 8) enzima koji su važni za smanjenje razine vodikova peroksida, tj. za njegovu detoksifikaciju. Pripadaju selenocistein enzimima koji koriste glutation kao redukcijsko sredstvo, odnosno supstrat. Glutation ima sposobnost vraćanja važnih vitamina, vitamina C i E, u njihov aktivni oblik, a smatra se i glavnim izvorom zaštite od blagog oksidacijskog stresa u odnosu na katalazu koja je sve važnija u zaštiti od teškog oksidacijskog stresa (10). U odsutnosti selena koji je dio aktivnog mjesta GPx, GPx gubi svoje antioksidacijsko djelovanje. Poznato je da se GPx natječe s katalazom za  $H_2O_2$  kao supstrat, ali i da je vodeći antioksidacijski enzim jer ima veći afinitet od katalaze prema  $H_2O_2$  pa ga bolje detoksificira (9).

Katalaza (CAT,  $H_2O_2$ :  $H_2O_2$ - oksidoreduktaza) je enzim koji karakterizira brza redukcija  $H_2O_2$  do molekularnog kisika i vode, a njegova je aktivnost izražena u eritrocitima, hepatocitima i ponekad u bubregu. Unutarstanični je enzim te se nalazi u citosolu stanice, točnije peroksisomima. Građen je od četiri podjedinice i svaka od njih sadržava hem skupinu u aktivnom centru. Kao i glutation peroksidaza, značajna je u uklanjanju  $H_2O_2$  (10).

#### **1.4.2. Neenzimski antioksidansi**

Uz primarne enzimatske antioksidanse, velik učinak u suzbijanju oksidacijskog stresa imaju i neenzimski antioksidansi.

Glutation (GSH) je tripeptid koji je sučimbenik glutation peroksidaze. Sastoji se od tri aminokiseline, cisteina, glicina i glutamične kiseline. Široko je rasprostranjen u biosferi. U zdravim stanicama i tkivu više od 90 % ukupnog glutationa nalazi se u reduciranom obliku (GSH), a manje od 10 % čini glutation u disulfidnom obliku (GSSG). Povećana razina GSSG-a, a smanjena razina GSH u tijelu pokazatelj je oksidativnog stresa kojemu je organizam izložen pa je vjerojatnost od ubrzanog starenja i različitih oboljenja velika. Već je spomenuto da ima važnu ulogu u uklanjanju vodikovog peroksida, ali i kloriranih oksidansa i hidroksil radikala.

Osim toga, važan je u regulaciji proliferacije limfocita, sintezi i popravljanju DNA, sintezi imunoglobulina i citokina te reguliranju staničnih procesa (7).

Vitamin E vitamin je poznat pod nazivom alfa tokoferol. Topljiv je u ulju, a nalazi se u raznolikim namirnicama. Primjerice u sojinom i suncokretovom ulju, pšeničnim klicama, kikirikiju, orasima, bademima i drugim orašastim plodovima. Njegova dnevna preporučena količina za žene je 8 mg, a za muškarce 10 mg. Glavni mehanizam antioksidativnog djelovanja je antiaterogeno djelovanje tako što štiti molekulu LDL-a (*Low-density lipoproteins*) od oksidacije, tj. štiti strukturu staničnih membrana sprječavajući lipidnu peroksidaciju (9, 11). Također pridonosi smanjenju adhezivnosti i agregacije trombocita. Zato je vitamin E najkorisniji u prevenciji ateroskleroze koja prethodi brojnim kardiovaskularnim i cirkulacijskim poremećajima. Smatra se da je ovaj vitamin i najaktivniji kao antioksidans. Pojedina istraživanja govore i o njegovoj učinkovitosti kod usporavanja progresije Alzheimerove bolesti, čija je incidencija u starijoj populaciji u sve većem porastu, a javlja se sve više i u mlađim dobnim skupinama (9). Pretpostavlja se i njegova važna uloga u prevenciji karcinoma prostate, koji je sve učestaliji u muškaraca starije životne dobi, te uloga u smanjivanju učestalosti karcinoma kolona i karcinoma dojke (9).

Vitamin C, poznat kao askorbinska kiselina, također pripada skupini neenzimatskih antioksidansa. Topljiv je u vodi, a najviše ga ima u svježem voću, posebno u agrumima. Dnevne potrebe iznose oko 60 mg za oba spola. Vitamin C za uklanjanje superoksidnog i hidroksilnog radikala (11) služi kao čistač već nastalih slobodnih kisikovih radikala i njihovog štetnog djelovanja na deoksiribonukleinsku kiselinu (DNA) u stanici. Omogućuje ponovno recikliranje alfa tokoferola iz spoja s radikalom na način da detoksificira ozon u plućima. Također je dokazano da može sniziti količinu bakra i željeza koji služe u prijenosu radikala. Njegov oksidirani oblik ima snažno antioksidacijsko djelovanje u zaštiti naše DNA, membrane lipida i proteina od nastanka oksidacijskog stresa. Vrlo je učinkovit kod bolesnika s osteoartritisom, dijabetesom i aterosklerozom. Kod bolesnika s dijabetesom snižava razinu inzulina, LDL kolesterola i triglicerida u plazmi te tako djeluje pozitivno na raspoloživost glukoze (12). Aterosklerozi sprječava tako što štiti LDL kolesterol od oksidacije.

Beta karoten-provitamin A vitamin je topljiv u vodi, a nalazi se u zelenom lisnatom povrću, mrkvi, mlijeku, jajima i sl. Glavni mehanizam mu je neutralizacija molekularnog kisika u pobuđenom stanju koji je preteča svim slobodnim radikalima.



## 1.5. Uloga renin-angiotenzin sustava (RAS)

Renin-angiotenzin sustav (RAS) sustav je koji ima ključnu ulogu u regulaciji arterijskog tlaka, regulaciji perfuzije tkiva i homeostazi elektrolita i tjelesnih tekućina. Početkom 1970.- ih otkrivene su glavne komponente RAS sustava.

Renin je enzim koji spada u skupinu proteaza, a izlučuje se bubrezima. Do njegovog otpuštanja dolazi kod pada arterijskog tlaka. Neaktivni oblik renina naziva se prorenin i nalazi se u jukstaglomerularnim stanicama bubrega, a promjene koje uzrokuje nizak arterijski tlak dovode do pucanja molekula prorenina i oslobađanja renina. Renin nije u mogućnosti modificirati tlak, ali djeluje na angiotenzinogen kojeg najvećim dijelom stvaraju jetra, ali ga sintetiziraju i bubreg, mozak, srce, vaskulatura, nadbubrežna žlijezda, ovariji, placenta i masno tkivo (13). Kao rezultat ove reakcije iz angiotenzinogena oslobađa se dekaeptid angiotenzin I koji djeluje blago vazokonstriktivno. Odmah nakon njegovog stvaranja, djelovanjem angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACE), koji se najvećim dijelom nalazi na endotelnim stanicama pluća, odvajanjem dvije aminokiseline angiotenzin I pretvara se u oktapeptid angiotenzin II (ANG II).

Angiotenzin II glavni je aktivni i konačni produkt RAS sustava. Snažan je vazokonstriktor, a odgovoran je za većinu učinaka RAS sustava: vazokonstrikciju venula i arteriola, lučenje antidiuretskog hormona iz hipofize, aldosterona iz nadbubrežne žlijezde, aktivaciju simpatikusa, stimulaciju centra za žeđ, koji u konačnici imaju za posljedicu porast sistoličkog i dijastoličkog arterijskog tlaka. Učinci Ang II posredovani su receptorima. Danas su poznata dva angiotenzinska receptora: AT1 i AT2. Većina poznatih učinaka Ang II povezana je s aktivacijom AT1 receptora. AT1 receptor pripada G-protein spregnutim receptorima (GPCR) koji su poznati i pod nazivom sedam-transmembranski domen receptori (7TM receptori) (14). Ekspimiran je u glatkim mišićnim stanicama krvnih žila, srcu, plućima, mozgu, jetri i nadbubrežnoj žlijezdi. Vezan je za različite intracelularne signalne molekule uključujući fosfolipaze A2, C i D, adenilat-ciklazu, kalcijeve kanale i na različite kinaze (14). Ovisno o tipu stanica i organu, aktivacijom ovih signalnih putova može doći do stanične kontrakcije, hipertrofije, proliferacije i/ili apoptoze. U fiziološkim uvjetima AT1 pomaže Ang II u regulaciji krvnog tlaka i homeostazi elektrolita. Njegova povećana aktivnost dovodi do vazokonstrikcije, retencije vode i natrija u organizmu i povećane proizvodnje slobodnih kisikovih radikala. Čimbenici rizika kao što su hipertenzija, hiperkolesterolemija i dijabetes usko su povezani s prekomjernim izražajem i povećanom aktivacijom AT1 receptora. Rezultat toga može dovesti

do ateroskleroze, koronarne bolesti srca i infarkta. U odnosu na AT1 receptor, uloga AT2 receptora danas još nije u potpunosti razjašnjena. U tkivima odraslih AT2 pretežno je eksprimiran u mozgu i nadbubrežnoj žlijezdi (14). Njegovom stimulacijom dolazi do vazodilatacije krvnih žila i inhibicije rasta glatkih mišića krvnih žila.

## 2. HIPOTEZA

Primjena subpresorske doze angiotenzina II, u muških Sprague-Dawley štakora na prehrani s visokim udjelom kuhinjske soli, značajno će povećati proteinski izražaj antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga.

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog istraživanja ispitati promjenu proteinskog izražaja važnih antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga muških Sprague-Dawley štakora hranjenih visoko slanom dijetom uz dodatak subpresorskih doza angiotenzina II.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. MATERIJALI

Istraživanje se provodilo na zdravim, muškim Sprague-Dawley štakorima u starosti od 9 do 11 tjedana. U toj dobi životinje su podijeljene u 3 skupine (N - broj životinja):

- 1) NISKOSLANA (NS) skupina (N = 9) - životinje su konzumirale standardnu hranu za laboratorijske štakore koja sadrži 0,4 % NaCl-a
- 2) VISOKOSLANA (VS) skupina (N = 8) - životinje su tijekom 7 dana konzumirale specijalnu hranu s visokim udjelom soli (4 % NaCl-a)
- 3) VISOKOSLANA+ANGIOTENZIN II (VS + ANG II; N = 8) skupina - životinje su tijekom 7 dana konzumirale specijalnu hranu s visokim udjelom soli (4 % NaCl-a), a 4. - ti dan takve ishrane joj je ugrađena angiotenzinska osmotska minipumpa koja otpušta 100 ng/ kg/ min angiotenzina kroz 3 dana



**Slika 1.** Prikaz pokusnih skupina

## 4.2. METODE

Izražaj antioksidativnih enzima (SOD, GPx i katalaze) određena je korištenjem Western blot metode za određivanje izražaja proteina u uzorcima krvnih žila mozga. Metoda se temelji na specifičnom vezanju protutijela na izolirane proteine. Zbog premale količine uzorka za određivanje izražaja proteina kao uzorak su se koristile krvne žile mozga dviju životinja.

Veličina uzorka određena je pomoću SigmaPlot v11. 2 (Systant Software, Inc.) statističkog programa. Uz razinu značajnosti ( $\alpha$ ) 0,05 te snagu testa od 0,80 te predviđenu najmanju detektabilnu razliku u prosječnim vrijednostima od 0,25, potrebno je minimalno 4 pokusne životinje po grupi.

### 4.2.1. Način hranjena pokusnih životinja i izolacija uzoraka

U istraživanju su se koristili zdravi Sprague - Dawley štakori muškoga spola u starosti od 9 do 11 tjedana. Prva skupina bila je niskoslana (NS) koja je konzumirala standardnu hranu za laboratorijske štakore koja je sadržavala 0,4 % NaCl-a. U drugoj skupini životinje su konzumirale visokoslana (VS) hranu s udjelom soli od 4 %. Treću skupinu činile su životinje koje su 7 dana bile izložene visokoslanjoj prehrani s udjelom soli od 4 %, a četvrti dan takve prehrane ugrađena im je bila angiotenzinska osmotska minipumpa koja je otpuštala 100 ng/kg/min angiotenzina (VS + ANG II). Nakon 7 dana dijetnog protokola, životinje su bile izvagane, anestezirane ketaminom (75 mg/kg) i midazolamom (2,5 mg/kg), izmjeren im je krvni tlak te su potom žrtvovane dekapitacijom, postupkom odvajanja glave od ostatka tijela. Poduzete su sve mjere kako bi se spriječila patnja životinja. Navedena istraživanja su odobrena za provedbu od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/14-08/06, Broj: 2158-61-07-14-119) te Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske te su dio HRZZ projekta „Poremećena vazorelaksacija i endotelno-leukocitna interakcija u razvoju aterosklerotskih lezija“ – HRZZ IP-09-2014-6380 (V-ELI Athero), voditeljica: prof. dr. sc. Ines Drenjančević. Uzorci su prikupljeni u Vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku i Laboratoriju za mikrocirkulaciju. Pokusi proteinskog izražaja antioksidativnih enzima provedeni su u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju u sklopu Medicinskog fakulteta Osijek.

#### 4.2.2. Izolacija proteina

Uzorci krvnih žila mozga dobiveni su uz pomoć škarica i pincete nakon čega su brzo pohranjeni u označene Eppendorf tubice. Do postupka homogenizacije, stavljeni su u tekući dušik na - 80 °C. Izolacija uzoraka provedena je pomoću tekućeg dušika u tarioniku te je uzorak usitnjen pomoću tučka što je više moguće, do praha. Nakon toga, 100 mg usitnjenog tkiva krvnih žila mozga pomiješano je s 1 ml homogenizacijskog pufera. Homogenizacijski pufer sadržavao je 1 mM EDTA, 10 mM Tris-a (FisherScientific, Belgija), 0,4 % SDS-a (AcrosOrganics, SAD) i koktel inhibitora proteaza u koncentraciji 0,4 µl / 100 µl (SigmaAldrich). Dodan je i Triton-X, u koncentraciji 0,062 %, u kojoj ne interferira s Bradfordom koji služi kao reagens za određivanje koncentracije proteina koja je slijedila nakon homogenizacije. Koncentracija SDS-a smanjila se na 0,1 % da bi određivanje proteina po Bradfordu bilo pravilnije. Kako bi se spriječila razgradnja proteina, uzorcima je dodan koktel inhibitora proteaza (1 tableta u 1,5 ml dH<sub>2</sub>O). Svi reagensi s uzorkom dobro su izmiješani na miješalici (vortexu), a da se izbjegne denaturacija proteina, uzorci su dodatno homogenizirani mehaničkim homogenizatorom (IKA Thurax) na 4 °C. Nakon homogenizacije uzorci su centrifugirani na 17000 g 30 min na 4 °C, a supernatanti alikvotirani i čuvani na - 80 °C do analize.

#### 4.2.3. Kvantifikacija proteina

Koncentracija proteina odredila se pomoću spektrofotometrijske Bradford metode. Metoda se bazira na reakciji proteina s bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) u kiselom mediju. CBB reagira prvenstveno s pobočnim grupama Arg, a u manjoj mjeri i s pobočnim grupama His, Lys, Tyr, Trp i Phe. Hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama boja se veže na otopljene proteine što stabilizira boju u anionskom obliku i dovodi do vidljive promjene boje iz smeđe u plavu. Pri tome se apsorpcijski maksimum boje pomiče sa 465 nm na 595 nm što se prati spektrofotometrijski. Intenzitet obojenja proporcionalan je koncentraciji proteina u uzorku. Kako bi se odredile nepoznate koncentracije proteina, napravljena je kalibracijska krivulja nizom razrjeđenja standardne otopine poznate koncentracije koja pokazuje ovisnost koncentracije o apsorpciji i iz koje se očitavaju nepoznate koncentracije. Kao standardna otopina koristio se albumin goveđeg seruma – BSA (engl. bovine serum albumin).

Ova metoda široko se primjenjuje zbog svoje jednostavnosti, brzine i širokog opsega proporcionalnosti intenziteta obojenja i koncentracije proteina.

#### 4.2.4. Western blot metoda

Za određivanje proteinskog izražaja antioksidativnih enzima (SOD, GPx i katalaze) u žilama mozga, koristila se Western blot metoda kojom se detektira specifičan protein. Metoda se provela u nekoliko koraka:

1. SDS (eng. sodium dodecyl sulfat) denaturirajuća elektroforeza upoliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE elektroforeza)
2. prijenos proteina na membranu (eng. blotting)
3. inkubacija s protutijelima
4. kemiluminiscencijska detekcija

##### 4.2.4.1. SDS denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE elektroforeza)

Neke molekule kao što su agarozna ili akrilamid imaju svojstvo stvaranja kompleksnih mrežastih struktura. U takvim strukturama, makromolekule (proteini, DNA ili RNA) pod djelovanjem električnog polja putuju prema suprotno nabijenom polu. Prema tome, elektroforeza je usmjereno gibanje električno nabijenih molekula kroz potporni medij (gel) pod utjecajem električnog polja te na taj način omogućava razdjeljivanje molekula DNA, RNA ili proteina. Putovanje molekula kroz gel ovisi o veličini i konformaciji molekule, gustoći gela, struji i temperaturi.

SDS PAGE elektroforeza je uspravna elektroforeza koja se često koristi zbog svoje jednostavnosti, dobre rezolucije, brzine i osjetljivosti. Kao nosač, koji omogućava da razdvojene komponente ostanu u oštro razdvojenim zonama, koristi poliakrilamidni gel, agarozni gel i dr. U ovom istraživanju nosač je bio poliakrilamidni gel koji nastaje polimerizacijom monomera akrilamida u duge lance poliakrilamida, na kojeg se pod utjecajem određene jakosti struje nanosi određena količina proteina koji se razdvajaju prema svojoj molekularnoj masi. Manje molekule putuju brže u odnosu na veće pa u zadanom vremenu prijeđu veći put. Nakon što se proteini razdvoje, prenose se na membranu pod utjecajem



električne struje na kojoj se fiksiraju. Željeni protein se vizualizira vezanjem za specifična protutijela koja uz dodatak supstrata emitiraju svjetlost (kemiluminiscencija). Na kraju se signali očitavaju pomoću digitalne kamere. Prije izvedbe elektroforeze, potrebna je priprema donjeg i gornjeg poliakrilamidnog gela koji se izlijeva između stakala debljine 1 mm pričvršćenih na postolje za izlijevanje gelova. Elektroforezi je prethodila priprema donjeg i gornjeg poliakrilamidnog gela.

#### Priprema poliakrilamidnog gela

Donji gel, 10 % - tni, pripremljen je od reagensa koji su navedeni u tablici 1. Svi reagensi za pripremu donjeg gela, osim amonijeva persulfata (APS) i tetrametiletilendiamina (TEMED), otpipetirani su i pomiješani te ostavljeni 30 do 45 minuta na magnetskoj miješalici da se otopina zagrije na sobnu temperaturu. TEMED i 10 % - tni APS dodani su prije izlijevanja donjeg gela. Na izliveni gel kojeg je bilo otprilike 5 ml dodan je izopropanol, količine otprilike 1 ml. Izopropanol služi za blokiranje kontakta gela sa zrakom jer bi u suprotnom zrak spriječio polimerizaciju. Nakon toga, gel je ostavljen da se polimerizira 45 do 60 minuta.

Dok se čekala polimerizacija donjeg gela, pripremljen je 4 % - tni gornji gel (stacking gel). Sastav gornjeg gela prikazan je u Tablici 2., a priprema je jednaka kao za donji gel samo u različitim volumenima. Izopropanol je uklonjen s površine donjeg gela, a površina donjeg gela isprana destiliranom vodom i pažljivo osušena filter papirom. Zatim je izliven gornji gel na površinu polimeriziranog donjeg gela, do ruba stakla, te je umetnut češljic pomoću kojega se formiraju utori (jažice) u koje su se nakon polimerizacije nanosili uzorci. Gornji gel ostavljen je da se polimerizira nešto kraće, oko 30 do 45 minuta.

Dok se odvijala polimerizacija, sastavio se sustav za elektroforezu koji je postavljen u kadicu koja je prethodno bila napunjena puferom za elektroforezu (10 x Stock, pH 8,3) do razine prekrivanja jažica. Uklonjen je češljic pa je slijedilo ispiranje jažica puferom za elektroforezu od nepolimeriziranog akrilamida.

Pufer za nanošenje uzoraka na gel čiji je sastav prikazan u tablici 3. pomiješan je sa homogeniziranim uzorcima proteina u omjeru 1 : 1. Smjesa je prokuhana 5 minuta na 95 °C, kratko centrifugirana i nanesena na gel u količini od oko 5 do 10 µl po jažici. U posljednjoj jažici na gelu dodan je standard za Western blot obilježen Strep-tag biljegom (Precision Plus Protein Western C Standard tvrtke BioRad). Zatim je započela elektroforeza u trajanju od 3 sata, na 100 volti i temperaturi od 4 °C.

**Tablica 1.** Sastav 10 % - tnog donjeg gela (10 ml)

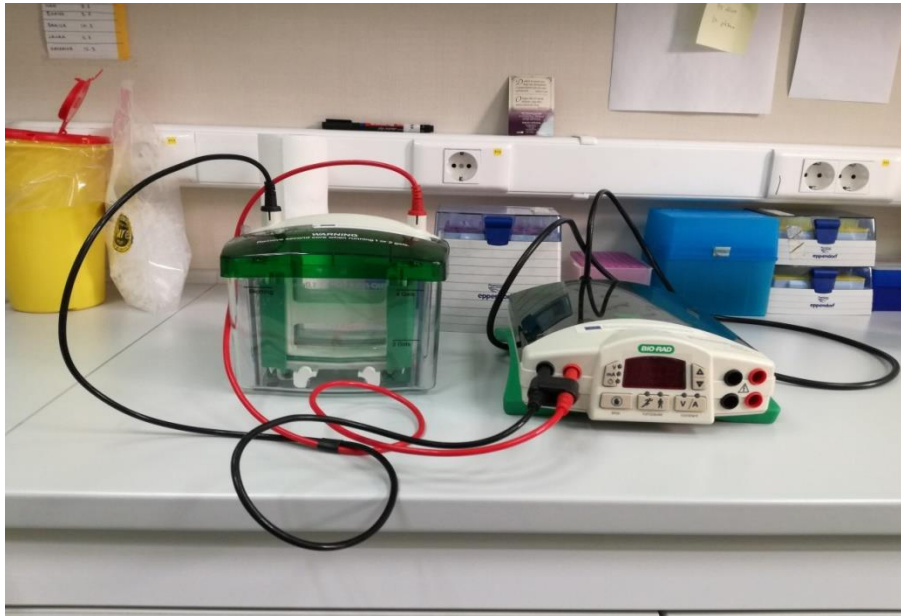
MiliQ H <sub>2</sub> O	4,1 ml
Stock akrilamid/bis	3,3 ml
Pufer za donji gel (1,5M Tris-HCl, pH 8,8)	2,5 ml
10 % SDS (natrij dodecil sulfat)	100 µl
10 % APS (amonijev persulfat)	50 µl
TEMED (tetrametiletilendiamin)	5 µl

**Tablica 2.** Sastav 4 % - tnog gornjeg gela (10 ml)

MiliQ H <sub>2</sub> O	6,1 ml
Stock akrilamid/bis	1,3 ml
Pufer za gornji gel (0,5M Tris-HCl, pH 6,8)	2,5 ml
10 % SDS (natrij dodecil sulfat)	100 µl
10 % APS (amonijev persulfat)	50 µl
TEMED (tetrametiletilendiamin)	10 µl

**Tablica 3.** Sastav pufera za nanošenje uzoraka na gel (600 µl)

Laemmli Sample Buffer	475 µl
β-merkaptetanol	25 µl
Glicerol	100 µl



**Slika 2.** Sustav za elektroforezu (izvor: original autorice rada)

#### **4.2.4.2. Prijenos proteina na membranu (*engl. blotting*)**

Nakon što su se proteini razdvojili elektroforezom, s gela su prebačeni na PVDF (poliviniliden difluorid) membranu. Prijenos je napravljen pomoću kazeta za prijenos. Za prijenos proteina potreban je bio pufer čiji je sastav za pripremu naveden u tablici 4. Pufer je prije prijenosa proteina ohlađen na 4 °C, a membrana aktivirana metanolom. Zatim su membrana i filter papir izrezani prema dimenzijama gela te namočeni spužvicama unutar kazete. Nakon završene elektroforeze, stakla su izvađena iz kadice. Gornji gel (stacking gel) uklonjen je pomoću plastične špatule, a donji gel s proteinima pažljivo je prenesen u posudu s hladnim puferom za prijenos. Na crni šupljikavi okvir postavljena je spužvica (*eng. fiber pads*), filter papir, donji gel, PVDF membrana, drugi filter papir i druga spužvica čineći tzv. sendvič. Kako bi se zrak uklonio, preko sendviča je prijeđeno valjkom. Cijela se struktura na kraju pričvrsti bijelim (prozirnim) šupljikavim okvirom te se postavlja u kadicu za transfer tako da je crna strana kazete okrenuta na crnu stranu kadice (Slika 3.). Prijenos proteina provodi se 1,5 h na 200 mA pri temperaturi od 4 °C. Nakon što je transfer završen, membrane su obojene, odnosno uronjene u boju Amid-BlueBlack na nekoliko sekundi kako bi se proteini vizualizirali, a potom su odmah prebačene u kadicu s otopinom za odbojavanje koja se sastojala od propanola, octene kiseline i destilirane vode. Sve to je napravljeno tri puta po 5 minuta.



**Slika 3.** Sustav za elektroforezu s kadicom za prijenos proteina s gela na membranu  
(izvor: original autorice rada)

#### 4.2.4.3. Inkubacija s protutijelima

Nakon odbojavanja, membrana je dva puta isprana od otopine za odbojavanje u TBST puferu (tris-base, NaCl, mQ H<sub>2</sub>O, Tween-20) po 15 min. Nakon toga membrana je blokirana u 4 % - tnoj otopini bezmasnog mlijeka u prahu u TBST-u jedan sat na sobnoj temperaturi na tresilici kako bi se reduciralo nespecifično vezanje protutijela na proteine ili membranu. Također treba paziti koliko se membrana blokira jer, ako se previše blokira, može doći do redukcije signala, a ako premalo, može doći do jakog pozadinskog obojenja.

Završetkom blokiranja, membrana je inkubirana u otopini za primarna protutijela (3 % bezmasno mlijeko u prahu u TBST-u) u količini od 1,5 do 2 ml po membrani. Inkubacija se odvila preko noći na 4 °C na *rotary shakeru*, a nakon završetka inkubacije isprana je u TBST-u 4 puta po 15 min.

Nakon ispiranja primarnog protutijela, membrana je inkubirana sekundarnim protutijelom u otopini za sekundarna protutijela (50 mM Tris-base, 150 mM NaCl, pH 7,5 uz dodatak 5 % v/v BM Chemiluminescence Blotting Substrate - Blocking reagent). Inkubacija se odvijala na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 sata. U otopinu su dodana i protutijela StrepTactin (BioRad), streptaktinska protutijela koja služe za detekciju Step-tag aminokiselinske sekvence standarda koje sadrže proteini poznate molekulske mase. Protutijela su konjugirana s peroksidazom iz hrena (HRP) kako bi se proteinski standard zajedno s traženim proteinima prenio na film i uočio. Nakon inkubacije, membrana je ponovo isprana u TBST-u 4 puta po 15 minuta.

Kao sekundarno protutijelo korišteno je kozje protu-zečje HRP (eng. horseradish peroxidase) obilježeno protutijelo u razrjeđenju 1 : 7500 te kozje protu-mišje HRP obilježeno protutijelo u razrjeđenju 1 : 7500 za određivanje  $\beta$ -aktina.

#### **4.2.4.4. Kemiluminiscencijska detekcija**

Poslije ispiranja sekundarnih protutijela, membrana je lagano obrisana Kimtech maramicom i na nju je stavljen kemiluminiscencijski reagens (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, USA). Inkubacija je trajala 1 min na sobnoj temperaturi. Peroksidaza iz hrena, enzim je koji katalizira stvaranje aktiviranog intermedijarnog reakcijskog produkta, radikala luminola (endoperoksid), koji se vraća u primarno stanje (3-aminoflatni ion) emitirajući svjetlost. Kao medijator prijenosa elektrona, koristi se 4-jodofenolom kojim se dobiva pojačana emisija svjetlosti. Nakon završetka inkubacije, višak reagensa je uklonjen, a membrana je stavljena između dvije folije kako bi se spriječilo sušenje te je istisnut višak zraka. Membrana je snimljena uz pomoć Bio-Rad ChemiDoc digitalne kamere na Medicinskom fakultetu u Osijeku. Nakon snimanja, membrana je dva puta isprana TBST puferom 5 min te pohranjena na 4 °C kako bi se mogla ponovo upotrijebiti ako bude potrebno.

Za kontrolu i normalizaciju nanošenja uzoraka određena je koncentracija  $\beta$ -aktina veličine 42 kDa koji u Western blot metodi služi kao kontrola jer je visoko konzerviran protein eukariotskih stanica. Kao primarno protutijelo koristilo se mišje protu-štakorsko  $\beta$ -aktin u razrjeđenju 1 : 1000, a kao sekundarno kozje protu-mišje protutijelo u razrjeđenju 1 : 10000.



**Slika 4.** Bio-Rad ChemiDoc digitalna kamera

(izvor: original autorice rada)

#### 4.2.5. Statistička analiza

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

## 5. REZULTATI

### 5.1. Tjelesna masa i srednji arterijski tlak životinja

25 zdravih, muških Sprague-Dawley štakora slučajnim je odabirom podijeljeno u 3 skupine (8 - 9 po skupini). Za svaku životinju je izmjerena tjelesna masa i srednji arterijski tlak prilikom samog završetka protokola. Srednji arterijski tlak je vrijednost koja se dobije zbrajanjem dvostrukog dijastoličkog tlaka i sistoličkog tlaka te se dobivena vrijednost podijeli s tri.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u tjelesnoj masi između ispitivanih skupina ( $p = 0,133$ ; analiza varijance (ANOVA)) kao ni razlika u srednjem arterijskom tlaku ( $p = 0,181$ ; analiza varijance (ANOVA)) (Tablica 4.)

**Tablica 4.** Izmjerene vrijednosti tjelesne mase i srednjeg arterijskog tlaka

Pokusna skupina (N; broj životinja)	Aritmetička sredina (standardna devijacija)	
	Tjelesna masa (g)	Srednji arterijski tlak (mmHg)
NS (N=9)	360 (15)	114,5 (1,85)
VS (N=8)	370 (20)	114,2 (3,26)
VS+ANG II (N=8)	378 (18)	110 (5,16)

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija

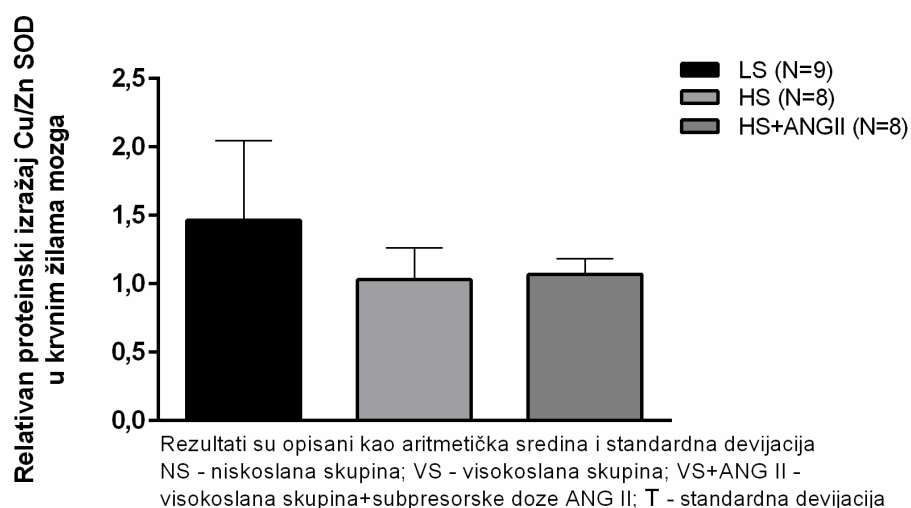
NS - niskoslana skupina; VS - visokoslana skupina; VS + ANGI - visokoslana skupina + subpresorske doze ANG II

## 5.2. Relativan proteinski izražaj antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga

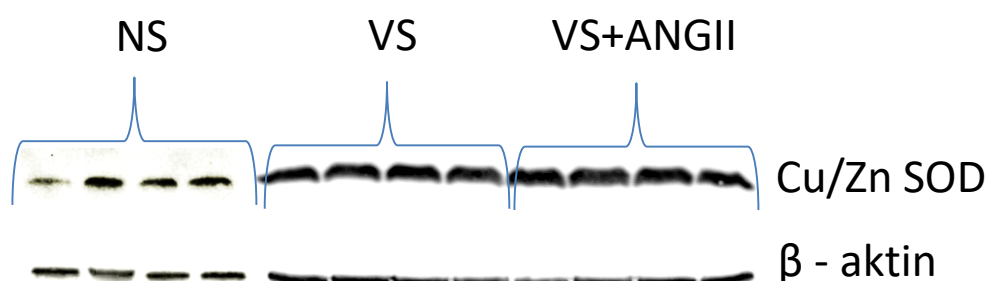
### 5.2.1. Proteinski izražaj SOD izoformi

Slika 5A. prikazuje relativan proteinski izražaj Cu/Zn SOD izoforme u krvnim žilama mozga za sve ispitivane skupine. Nije utvrđena statistički značajna razlika u proteinskom izražaju između ispitivanih skupina [NS 1,46 (0, 58); VS 1,03 (0,23); VS+ANG II 1,07 (0, 11),  $p = 0,126$ ; analiza varijance (ANOVA)]. Slika 5B. predstavlja reprezentativnu Western blot detekciju Cu/Zn SOD i  $\beta$ -aktinskog izražaja u krvnim žilama mozga (NS - niskoslana skupina, VS – visokoslana skupina, VS+ANG II - visokoslana skupina uz primjenu angiotenzina II).

**A**



**B**

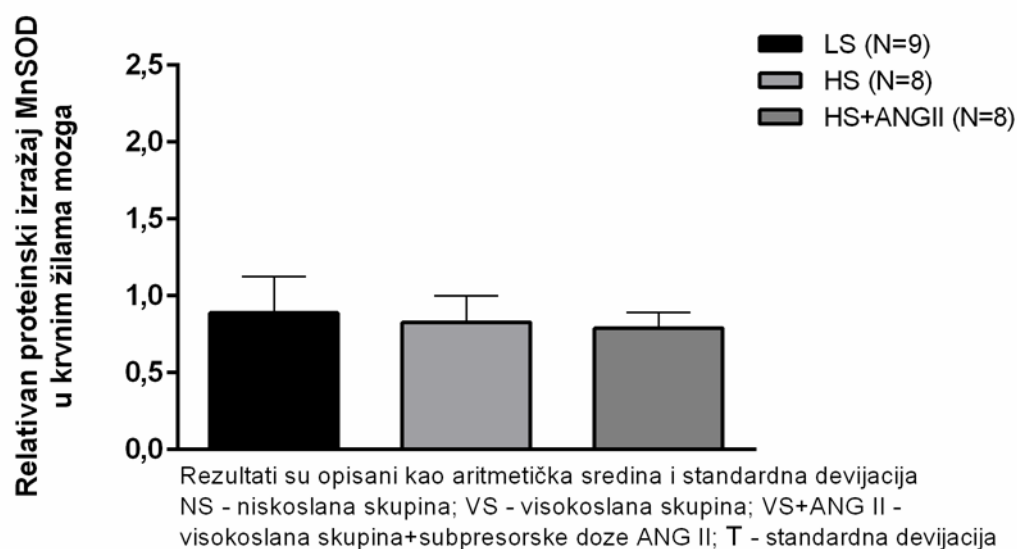


**Slika 5.** Relativan proteinski izražaj Cu/Zn SOD (A) antioksidativnog enzima te prikaz Western blot detekcije (B) Cu/Zn SOD i  $\beta$ -aktinskog izražaja u krvnim žilama mozga

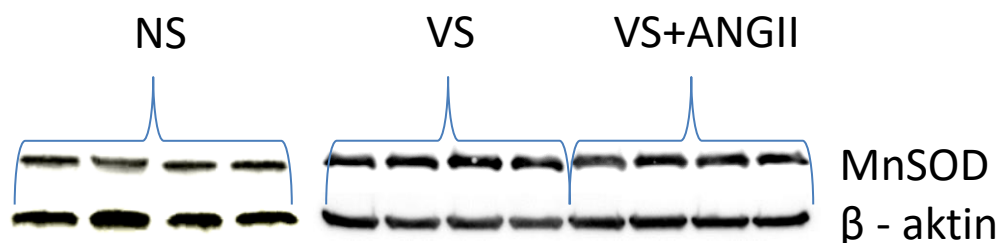


Na Slici 6A. prikazan je relativan proteinski izražaj MnSOD izoforme u krvnim žilama mozga za sve ispitivane skupine. Nije utvrđena statistički značajna razlika u proteinskom izražaju između ispitivanih skupina [NS 0,88 (0, 23); VS 0,82 (0,17); VS+ANGII 0,79 (0, 10),  $p = 0,550$ ; analiza varijance (ANOVA)]. Slika 6B. predstavlja reprezentativnu Western blot detekciju MnSOD i  $\beta$ -aktinskog izražaja u krvnim žilama mozga (NS - niskoslana skupina, VS – visokoslana skupina, VS+ANG II - visokoslana skupina uz primjenu angiotenzina II).

A



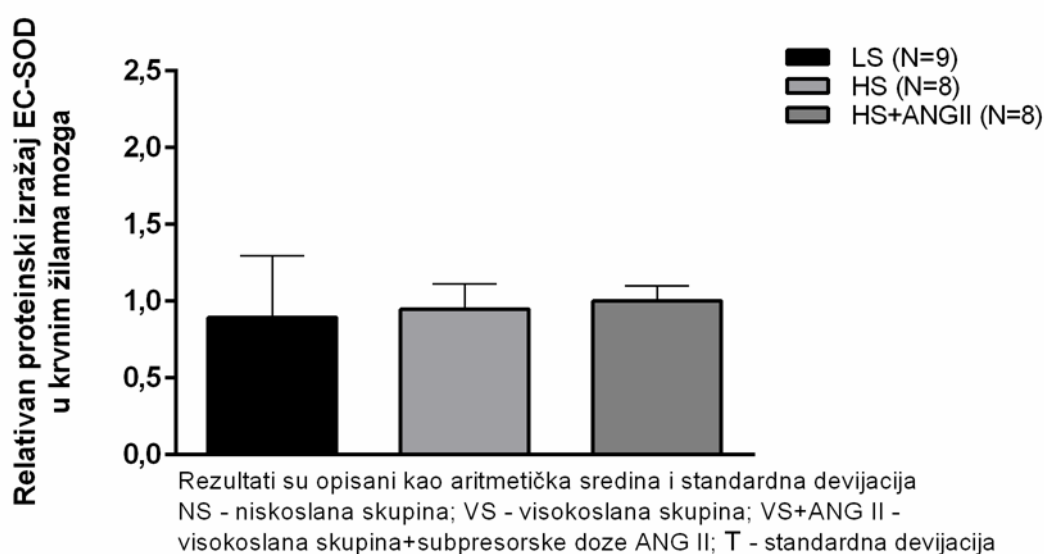
B



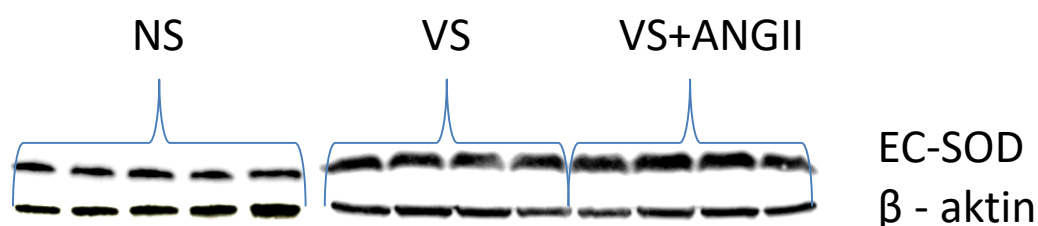
**Slika 6.** Relativan proteinski izražaj MnSOD (A) antioksidativnog enzima te prikaz Western blot detekcije (B) MnSOD i  $\beta$ -aktinskog izražaja u krvnim žilama mozga

Slika 7A. prikazuje relativan proteinski izražaj EC-SOD izoforme u krvnim žilama mozga za sve ispitivane skupine te je vidljivo kao nije utvrđena statistički značajna razlika između ispitivanih skupina [NS 0,89 (0,41); VS 0,95 (0,16); VS+ANGII 1,00 (0,09),  $p = 0,700$ ; analiza varijance (ANOVA)]. Slika 7B. predstavlja reprezentativnu Western blot detekciju EC-SOD i  $\beta$ -aktinskog izražaja u krvnim žilama mozga (NS - niskoslana skupina, VS – visokoslana skupina, VS+ANG II - visokoslana skupina uz primjenu angiotenzina II).

A



B

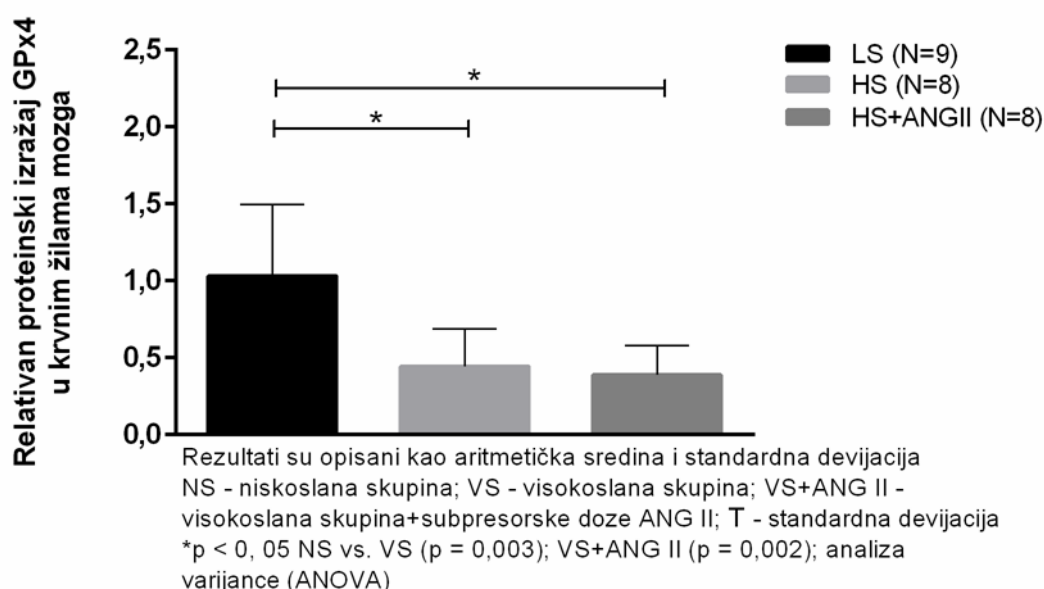


**Slika 7.** Relativan proteinski izražaj EC-SOD (A) antioksidativnog enzima te prikaz Western blot detekcije (B) EC-SOD i  $\beta$ -aktinskog izražaja u krvnim žilama mozga

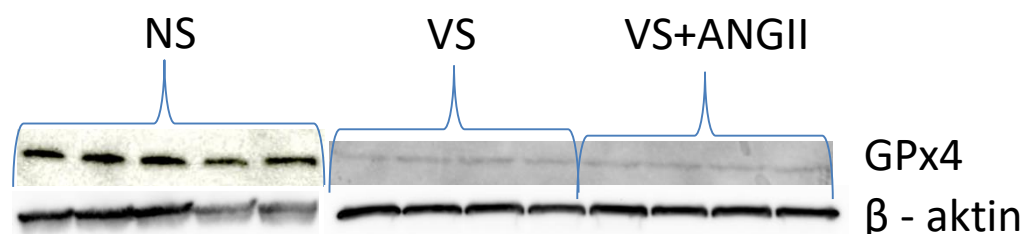
### 5.2.2. Proteinski izražaj GPx4

Usporedbom proteinskog izražaja GPx4 antioksidativnog enzima između ispitivanih skupina utvrđeno je kako visokoslana skupina [(0,44 (0,24),  $p = 0,032$ ; analiza varijance (ANOVA)] te visokoslana skupina uz primjenu angiotenzina II [(0,38 (0,19),  $p = 0,0022$ ; analiza varijance (ANOVA)] ima značajno snižen proteinski izražaj GPx4 u odnosu na niskoslana skupina [(1,03 (0,46)] (Slika 8A). Slika 8B. predstavlja reprezentativnu Western blot detekciju GPx4 i  $\beta$ -aktinskog izražaja u krvnim žilama mozga (NS - niskoslana skupina, VS – visokoslana skupina, VS + ANG II - visokoslana skupina uz primjenu angiotenzina II).

A



B

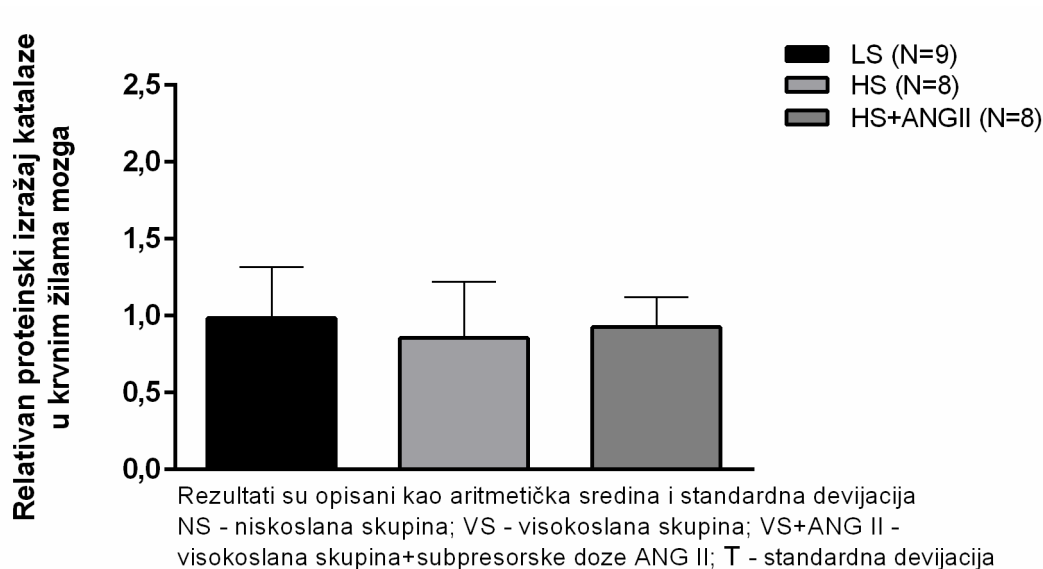


**Slika 8.** Relativan proteinski izražaj glutation peroksidaze 4 (GPx4) (A) te prikaz Western blot detekcije (B) GPx4 i  $\beta$ -aktinskog izražaja u krvnim žilama mozga

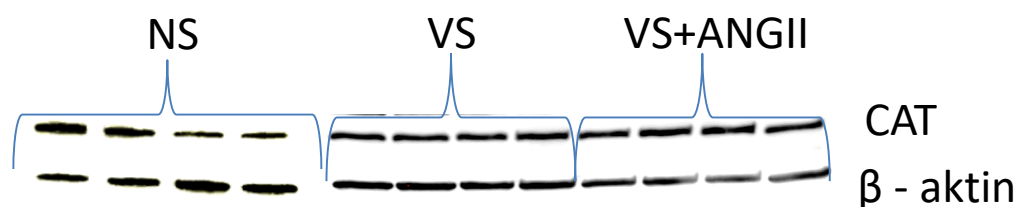
### 5.2.3. Proteinski izražaj katalaze u krvnim žilama mozga

Na Slici 9A. prikazan je relativan proteinski izražaj katalaze u krvnim žilama mozga za sve ispitivane skupine. Nije utvrđena statistički značajna razlika u proteinskom izražaju između ispitivanih skupina [NS 0,98 (0,33); VS 0,85 (0,36); VS+ANGII 0,92 (0,19),  $p = 0,699$ ; analiza varijance (ANOVA)]. Slika 9B. predstavlja reprezentativnu Western blot detekciju GPx4 i  $\beta$ -aktinskog izražaja u krvnim žilama mozga (NS - niskoslana skupina, VS – visokoslana skupina, VS+ANG II - visokoslana skupina uz primjenu angiotenzina II).

A



B



**Slika 9.** Relativan proteinski izražaj katalaze (CAT) (A) te prikaz Western blot detekcije (B) katalaze i  $\beta$ -aktinskog izražaja u krvnim žilama mozga

## 6. RASPRAVA

Akutni povišeni unos soli ne mijenja značajno proteinsku razinu antioksidativnih enzima osim enzima GPx4, unatoč pojavi povećanog oksidativnog stresa kojega su pokazala prethodna istraživanja (16). Također postoji mogućnost kako bi mjerenja genskog izražaja istih enzima pokazalo značajnije promjene. Unosom hrane s visokim udjelom kuhinjske soli, razvija se predispozicija za hipertenziju koja dovodi do disfunkcije endotela koji je zadužen za opstanak krvožilnog sustava. Ove promjene dovode do razvoja kardiovaskularnih bolesti koje su vodeći uzrok smrti u svijetu (2).

Istraživanjima na životinjama dokazano je da dijeta s visokim udjelom soli dovodi do značajnog porasta arterijskog tlaka što ujedno rezultira povećanjem slobodnih kisikovih spojeva (ROS-a). Sve ove promjene ostavljaju utjecaj i na renin-angiotenzinski sustav (RAS) gdje dolazi do snižene razine Ang II koji također potiče stvaranje ROS-a i dovodi do oksidativnog stresa u središnjem živčanom sustavu i stanicama endotela aktivacijom nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat oksidaze (NADPH), ksantin oksidaze i ciklooksigenaze (COX-1, 2) (15). Kao posljedica javlja se povišeni krvni tlak koji rezultira razvojem hipertenzije. No, povišeni krvni tlak visokim unosom soli događa se kod kroničnih konzumacija soli. Na animalnim i humanim studijama pokazano je kako kratkotrajna (7 dana) konzumacija visokih koncentracija soli ne dovodi do značajne promjene krvnog tlaka, ali dovodi do endotelne disfunkcije i pojave oksidativnog stresa što je pokazatelj kako se negativni utjecaji soli očituju puno prije pojave hipertenzije (16-18). Navedene smo rezultate ponovno potvrdili i našim istraživanjem.

Istraživanja pokazuju kako superoksid ( $O_2^{\cdot-}$ ) igra središnju ulogu u smanjenoj raspoloživosti NO-a na način da oksidira iz endotela nastali NO i time ometa njegovo djelovanje na tonus krvnih žila (19 - 21). Povećana razina superoksida jedan je od parametara koji narušava o endotelu ovisnu vaskularnu kontrolu koja je povezana s različitim patološkim stanjima (22, 23).

Smanjena aktivnost antioksidativnog obrambenog mehanizma, bilo samostalno ili u kombinaciji s povećanom  $O_2^{\cdot-}$  proizvodnjom, može doprinijeti povećanju vaskularne  $O_2^{\cdot-}$  razine povezane s visokim unosom soli. Visoki unos prehrane soli može dovesti do smanjenog izražaja Cu/Zn SOD izoforme i mangan MnSOD u otporničkim krvnim žilama

(24, 25). Takav učinak nije uniforman za svaku vaskulaturu; visok unos soli nema utjecaja na izražaj niti Cu/Zn SOD ili MnSOD u mezenteričim arterijama (26) niti na izražaj Cu/Zn SOD u arterijama skeletnih mišića (27). Povećanje razine  $O_2^-$  u arteriolama koje prati inhibiciju Cu/Zn SOD znatno je manje kod štakora hranjenih VS dijetom, nego u onih hranjenih NS dijetom što govori u prilog kako visoki unos soli u arteriolama dovodi do snižavanja Cu/Zn SOD. Točni uzročnici koji dovode do povećanja  $O_2^-$  proizvodnje i/ili smanjenog antioksidativnog djelovanja u vaskularnoj stijenci nisu još do kraja istraženi, ali smanjenje razine Ang II u plazmi koji se normalno javlja kao jedna od fizioloških prilagodbi prilikom povećanja  $Na^+$  i izlučivanja vode pod takvim uvjetima čini se da igra središnju ulogu. U našem istraživanju, proteinska razina SOD enzima nije se značajno promijenila između ispitivanih skupina što podupire prijašnje istraživanje Čosić i suradnici (16) koje je pokazalo kako na genskoj razini također nema značajne promjene u izražaju SOD enzima. No, pokazali su da visoki unos soli značajno snižava genski izražaj GPx4 antioksidativnog enzima što daje pretpostaviti da je povećani oksidativni stres upravo posljedica snižavanja tog enzima (16). U našoj smo studiji na proteinskoj razini također potvrdili navedenu činjenicu bez značajne promjene katalaze.

Snižen izražaj Ang II također izaziva narušenu endotel ovisnu dilataciju i dovodi do endotelne disfunkcije. Na taj način Ang II stimulira NADPH oksidazu koja je višeenzimski sustav vezan za membranu, a ključna je u stvaranju ROS-a. Nije jednako izražena u svim stanicama pa se u pojedinim stanicama aktivira pomoću različitih medijatora: kemokina ili kemoatraktivnih peptida (19). Djelovanje joj se veže uz neutrofile koji tijekom stvaranja ROS-a troše velike količine kisika, tj. dovodi do povećane respiracije neutrofila. NADPH naposljetku stvara superoksidni radikal koji dismutacijom prelazi u vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) (19). Istraživanja na animalnim modelima hipertenzije, kod kojih je utvrđena snižena razina Ang II, pokazala su značajno povišenu produkciju ROS-a u stijenka krvnih žila te njihov izravni učinak na razvoj hipertenzije te kako supresija Ang II (npr. povećanim unosom soli) za posljedicu imaju oštećenu funkciju krvne žile i povećanu produkciju ROS-a (28). Proteinski izražaj nakon primjene doze angiotenzina nije uzrokovala ponovno povećan izražaj antioksidativnih enzima kako smo očekivali što daje pretpostaviti da su možebitno veće promjene u genskom izražaju istih enzima.

Upravo se zbog toga sve više daje naglasak na smanjenje svakodnevnog unosa soli kako bi se smanjio oksidativni stres i povećao izražaj antioksidacijskih enzima koji ne bi rezultirali

aktivacijom endotela, razvojem ateroskleroze i hipertenzije koji dovode do raznih kardiovaskularnih oštećenja.

## 7. ZAKLJUČCI

- 1) Akutni povišeni unos soli ne mijenja značajno proteinsku razinu antioksidativnih enzima SOD i katalaze što potvrđuje prijašnje rezultate genskih izražaja istih enzima.
- 2) Značajna promjena je utvrđena samo za proteinski izražaj GPx4 što daje pretpostaviti kako je povećana razina oksidativnog stresa kod visokoslane skupine najvećim dijelom ovisna upravo o tom enzimu.
- 3) Pozitivan efekt angiotenzina II na snižavanje oksidativnog stresa i povećanje razine antioksidativnih enzima nije utvrđen na proteinskoj razini.



## 8. SAŽETAK

**CILJ ISTRAŽIVANJA:** Cilj je ovog istraživanja ispitati promjenu proteinskog izražaja važnih antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga muških Sprague-Dawley štakora hranjenih visoko slanom dijetom uz dodatak subpresorskih doza angiotenzina II.

**NACRT STUDIJE:** Eksperimentalna studija na pokusnim laboratorijskim životinjama

**ISPITANICI I METODE:** Zdravi muški Sprague-Dawley štakori, starosti 10 tjedana, nasumično su podijeljeni u tri eksperimentalne skupine (N = 8 - 9): niskoslana skupina (NS skupina, koja je konzumirala 0,4 % NaCl u hrani za štakore) te dvije visokoslane skupine (VS) koje su konzumirale specijalnu hranu s 4 % NaCl-a u svom sastavu tijekom 7 dana. Jednoj od slanijih skupina zadnja tri dana protokola je ugrađena pumpa subpresorske doze angiotenzina II (100 ng/kg/min/3 dana). Nakon dijetnog protokola životinje su bile izvagane, anestezirane kombinacijom ketamina (75 mg/kg) i midazolama (2,5 mg/kg) te žrtvovane dekapitacijom. Prikupljene su krvne žile mozga u svrhu određivanja proteinskog izražaja antioksidativnih enzima (Cu / Zn SOD, MnSOD, EC-SOD, GPx4 i katalaze (CAT)) metodom Western blot.

**REZULTATI:** Proteinski izražaj antioksidativnog enzima GPx4 značajno je snižen u skupinama VS [0,44 (0,24)] i VS+ANG II [0,38 (0,19)] skupinama ( $p > 0,05$ ) u odnosu na NS [1,03 (0,46)] skupinu. Izražaj drugih antioksidativnih enzima nije se značajno promijenio između ispitivanih skupina ( $p < 0,05$ ).

**ZAKLJUČAK:** Povećana razina oksidativnog stresa u visokoslanjoj skupini posljedica je sniženog izražaja GPx4 antioksidativnog enzima, dok pozitivan efekt angiotenzina II na snižavanje oksidativnog stresa i povećanje razine antioksidativnih enzima nije utvrđen na proteinskoj razini, subpresorske doze angiotenzina II ne dovode do značajne promjene izražaja antioksidativnih enzima na proteinskoj razini.

**KLJUČNE RIJEČI:** visokoslana dijeta, antioksidativni enzimi, proteinski izražaj gena, krvne žile mozga

## 9. SUMMARY

Changes in protein expression of antioxidative enzymes in brain blood vessels of Sprague-Dawley rats using suppressor doses of Angiotensin II by the intake of high concentration of salt.

**RESEARCH OBJECTIVE:** The aim of this study was to assess the change in the protein expression of important antioxidant enzymes in the brain blood veins of male Sprague-Dawley rats under high salt intake and angiotensin II subpressor dose administration.

**STUDY DESIGN:** Experimental study on laboratory animals

**MATERIALS AND METHODS:** Healthy male Sprague-Dawley rats, aged 10 weeks, were randomly divided into three experimental groups (N = 8 - 9): low-salt group (LS group, which consumed 0,4 % NaCl in rat food) and two high-salt groups (HS) which consumed special food with 4 % NaCl for 7 days. In the last three days of the protocol a subpressor dose of angiotensin II (100 ng / kg/ min/ 3 days) pump was included to one of the saline groups. After the dietary protocol, the animals were weighed, anesthetized by ketamine (75 mg / kg) and midazolam (2,5 mg / kg) and sacrificed by decapitation. Brain blood vessels were collected for determining the protein expression of antioxidative enzymes (Cu / Zn SOD, MnSOD, EC-SOD, GPx4 and Catalase (CAT)) by Western blot method.

**RESULTS:** Protein expression of the antioxidant enzyme GPx4 was significantly decreased in high salt [0,44 (0,24)] and high salt+angiotensin II group [0,38 (0,19);  $p > 0,05$ ] compared to low salt group [1,03 (0,46)]. The expression of other antioxidant enzymes did not change significantly between the investigated groups ( $p < 0,05$ ).

**CONCLUSION:** Increased level of oxidative stress in the high salt group is the result of the lower expression of the GPx4 antioxidant enzyme while the positive effect of angiotensin II on lowering oxidative stress and increasing the level of antioxidative enzymes is not established at the protein level, subpressor doses of angiotensin II do not result in significant changes in the expression of antioxidant enzymes at the protein level.

KEY WORDS: high salt diet, antioxidative enzymes, protein expression of the genes, blood vessels of the brain

## 10. LITERATURA

1. Pucarín Cvetković J. (2013) Sol u prehrani – čimbenik rizika od razvoja kroničnih nezaraznih bolesti. U: 100 (i pokoja više) crtica iz znanosti o prehrani, 1. izd., Štalić Z. Hrvatsko društvo prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, Zagreb, str. 184-185.
2. Kralj V, Sekulić K, Šekerija M. Kardiovaskularne bolesti u Hrvatskoj, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske, Zagreb 2013.
3. Kadojić D. Epidemiologija moždanog udara (Epidemiology of stroke), Zagreb. Hrvatska. 2012;22-24:11.
4. Strateški plan za smanjenje prekomjernog unosa kuhinjske soli u Republici Hrvatskoj, 2015.-2019., <https://www.hzjz.hr/wpcontent/uploads/2014/11/Strate%C5%A1ki-plan-za-smanjenje-prekomjernog-unosa-kuhinjske-soli-u-RH-2015.-2019.pdf>
5. Čavka A, Tadžić R, Grizelj I, Unfirer S, Mihaljević Z, Mihalj M, et al. Endotelna funkcija - funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. Med Vjesn (Osijek). 2012;44(1-4):135–46.
6. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. World Allergy Organ J. 2012 Jan;5(1):9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613> PMID:23268465
7. Rahal R, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S. Dhama K, Oxidative Stress, Prooxidants and Antioxidants: BioMed Research International Volume 2014 (2014), Article ID 761264, 19 pages
8. Puljak A, Perko G, Mihok D, Radačević H, Antioksidansi i oligoelementi u starijih ljudi, Medix, Ožujak 2004., broj 52
9. Jurković S, Osredkar J, Marc J. Molekularni utjecaj glutation-peroksidaza u antioksidacijskim procesima. Biochem Med (Zagreb). 2008;18(2):162–74. <https://doi.org/10.11613/BM.2008.016>.
10. Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M, Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions, Journal of Botany
11. San Rafael (CA). Morgan & Claypool Life Sciences; 2009., The Cerebral Circulation <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53082/>
12. G Ellis C, Jagger J, Sharpe M, The microcirculation as a functional system

13. Ljutić D, Jeličić I, Drugs Targeting the Renin-Angiotensin-Aldosterone System, Interna klinika Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu
14. Wassmann S, Nickenig G. The role of the AT1 receptor in the cardiovascular continuum. *Eur Heart J Suppl.* 2004;6 Supplement H:H3–9. [https://doi.org/10.1093/eurheartj/6.suppl\\_h.h3](https://doi.org/10.1093/eurheartj/6.suppl_h.h3).
15. Agostino Viridis, Emiliano Duranti, and Stefano Taddei: Review Article Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of Angiotensin II; (2011.)
16. Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipid peroxidation-causes and consequences. *Medicina (B Aires).* 2007;43:84–93.
17. Ćosić, Anita; Jukić, Ivana; Stupin, Ana; Mihalj, Martina; Mihaljević, Zrinka; Novak, Sanja; Vuković, Rosemary; Drenjančević, Ines. Attenuated flow-induced dilation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet. // *The Journal of Physiology.* 594 (2016), 17; 4917-4931
18. Čavka, Ana; Ćosić, Anita; Jukić, Ivana; Jelaković, Bojan; Lombard, Julian H.; Phillips, Shane A.; Šerić, Vatroslav; Mihaljević, Ivan; Drenjančević, Ines. The role of cyclooxygenase-1 in high salt diet- induced microvascular dysfunction in humans. // *The Journal of Physiology.* 593 (2015), 24; 5313-5324
19. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 1986 Apr;320(6061):454–6. <https://doi.org/10.1038/320454a0> PMID:3007998
20. Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun.* 1993;18(4):195–9. <https://doi.org/10.3109/10715769309145868> PMID:8396550
21. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 1986 May;250(5 Pt 2):H822–7. PMID:3010744
22. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000 Nov;87(10):840–4. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.10.840> PMID:1107387
23. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004 Nov;287(5):R1014–30. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00124.2004> PMID:15475499
24. Durand MJ, Lombard JH. Low-dose angiotensin II infusion restores vascular function in cerebral arteries of high salt-fed rats by increasing copper/zinc superoxide dimutase

25. expression. *Am J Hypertens*. 2013 Jun;26(6):739–47. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpt015>  
PMID:23443725
26. McEwen ST, Schmidt JR, Somberg L, Cruz LL, Lombard JH. Time-course and mechanisms of restored vascular relaxation by reduced salt intake and angiotensin II
27. Infusion in rats fed a high-salt diet. *Microcirculation*. 2009 Apr;16(3):220–34.  
<https://doi.org/10.1080/10739680802544177> PMID:19235625
28. Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*. 2004 Oct;44(4):381–6.  
<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000142232.29764.a7> PMID:15337734
29. Lenda DM, Boegehold MA. Effect of a high salt diet on microvascular antioxidant enzymes. *J Vasc Res*. 2002 Jan-Feb;39(1):41–50. <https://doi.org/10.1159/000048992>  
PMID:11844936
30. 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. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000154684.40599.03>  
PMID:15710779

## 11. ŽIVOTOPIS

### **Petra Tomac**

Datum rođenja: 18. studenog 1994.

Adresa: J. J. Strossmayera 38, 31500 Našice, Hrvatska

Email adresa: petratomac6@gmail.com

JMBAG: 0062069602

### **Obrazovanje:**

- rujan 2009. – lipanj 2013.: Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku
- rujan 2009. – lipanj 2013.: Glazbena škola Franje Kuhača Osijek
- rujan 2014. – 2017.: Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- listopad 2017. – danas: Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku