

# Uloga ionskih kanala u protokom-potaknutoj dilataciji kod Sprague- Dawley štakora na visokoslanjoj dijeti

---

Lukačević, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:949833>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Ivana Lukačević**

**ULOGA IONSKIH KANALA U  
PROTOKOM POTAKNUTOJ  
DILATACIJI KOD SPRAGUE-DAWLEY  
ŠTAKORA NA VISOKOSLANOJ DIJETI**

**Završni rad**

**Osijek, 2022.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Ivana Lukačević**

**ULOGA IONSKIH KANALA U**  
**PROTOKOM POTAKNUTOJ**  
**DILATACIJI KOD SPRAGUE-DAWLEY**  
**ŠTAKORA NA VISOKOSLANOJ DIJETI**

**Završni rad**

**Osijek, 2022.**

Rad je ostvaren na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskoga fakulteta u Osijeku.

Mentorica je rada: doc. dr. sc. Ivana Jukić, dr. med.

Rad ima 23 lista i 7 slika.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1 Kuhinjska sol.....	1
1.2 Endotel.....	2
1.3 Protokom potaknuta dilatacija.....	2
1.4 Uloga ionskih kanala u vaskularnoj funkciji.....	3
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	5
<b>3. CILJ</b> .....	6
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	7
4.1 Ustroj studije.....	7
4.2 Ispitivane grupe.....	7
4.3 Izolacija središnje moždane arterije.....	7
4.4. Određivanje protokom potaknute dilatacije i aktivnosti ionskih kanala.....	8
4.5 Statističke metode.....	9
<b>5. REZULTATI</b> .....	10
5.1 Bazalni odgovor središnje moždane arterije kontrolne i eksperimentalne skupine na protokom potaknutu dilataciju.....	10
5.2 Protokom potaknuta dilatacija središnjih moždanih arterija kontrolne skupine u odgovoru na primjenu antagonista.....	10
5.3 Protokom potaknuta dilatacija središnjih moždanih arterija eksperimentalne HSD skupine u odgovoru na primjenu antagonista.....	11
5.4 Protokom potaknuta dilatacija središnjih moždanih arterija kontrolne skupine u odgovoru na primjenu agonista.....	12
5.5 Protokom potaknuta dilatacija središnjih moždanih arterija eksperimentalne HSD skupine u odgovoru na primjenu agonista.....	13
<b>6. RASPRAVA</b> .....	15
<b>7. ZAKLJUČAK</b> .....	17
<b>8. SAŽETAK</b> .....	18

<b>9. SUMMARY</b> .....	19
<b>10. LITERATURA</b> .....	20
<b>11. ŽIVOTOPIS</b> .....	24

## POPIS KRATICA

ATP – adenzin trifosfat

BK<sub>Ca</sub> – o kalciju ovisni kalijevi kanali velike vodljivosti (engl. *large-conductance calcium-activated potassium channels*)

CO<sub>2</sub> – ugljikov dioksid

CTRL skupina – kontrolna skupina štakora

EDCF – endotelni čimbenici konstrikcije (engl. *endothelium-derived constricting factors*)

EDHF – endotelni čimbenici hiperpolarizacije (engl. *endothelium-derives hyperpolarizing factors*)

EDRF - endotelni čimbenici relaksacije (engl. *endothelium-derived relaxing factors*)

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

HSD skupina – visokoslana skupina štakora

K<sub>ATP</sub> – adenzin trifosfat-kontrolirani kalijevi kanali

K<sub>Ca</sub> – o kalciju ovisni kalijevi kanali (engl. *calcium-activated potassium channels*)

MCA – središnja moždana arterija (engl. *middle cerebral artery*)

NaCl – natrijev klorid

NO – dušikov oksid

PGI<sub>2</sub> – prostaglandin I<sub>2</sub> (prostaciklin)

PSS otopina – fiziološka slana otopina (engl. *physiological salt solution*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

TRP kanal – kanalni receptor prolaznog potencijala (engl. *transient potential receptor channel, TRP channel*)

TRPV kanal – vaniloidni kanalni receptor prolaznog potencijala (engl. *vanilloid TRP channel*)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)



## 1. UVOD

### 1.1 Kuhinjska sol

Natrijev klorid (NaCl), poznatiji pod nazivom kuhinjska sol, neophodan je i nezamjenjiv za održavanje čovjekova zdravlja i kvalitete njegova života. Međutim, prekomjerna konzumacija NaCl-a predstavlja značajan problem današnjice, jer uzrokuje nastanak arterijske hipertenzije, a onda time i povećava mogućnost za nastanak koronarne bolesti i zatajenja srca, moždanog udara i zatajenja bubrega kod ljudi s neadekvatno reguliranim i neliječnim visokim krvnim tlakom (1).

Konzumacija soli se kroz povijest značajno povećala, ali glavni uzrok prekomjerne konzumacije predstavlja sveprisutna sol u prerađenoj hrani, pekarskim proizvodima, menzama, školama i restoranima, dok manji dio dodajemo i sami prilikom kuhanja. Svjetska zdravstvena organizacija preporuča dnevni unos natrija 2 g/dan, što odgovara 5 g soli dnevno (2), dok je u Hrvatskoj prosječan dnevni unos kuhinjske, određen pomoću koncentracije natrija u 24-satnom urinu, iznosi 11,6 g, što je dvostruko više od preporučenog dnevnog unosa, a peterostruko više od fiziološke potrebe (3). Zbog nezdravih prehrambenih navika i pretjerane konzumacije, danas kuhinjska sol uzrokuje puno više štete nego što je korisna za ljudski organizam (4). Upravo zato što je prekomjerna konzumacija soli postala javnozdravstveni problem, mnoge europske države, među kojima je i Hrvatska, provode razne programe s ciljem smanjenja prekomjernog unosa soli kako bi se povećala svjesnost o njezinom negativnom učinku na zdravlje. Po uzoru na Veliku Britaniju, u kojoj je nacionalni program postigao veliki uspjeh, u Republici Hrvatskoj je 2007. godine predstavljena inicijativa CRASH (*Croatian Action on Salt and Health*) s ciljem povećanja svjesnosti o štetnom učinku soli. Smanjen unos kuhinjske soli rezultirao bi snižavanjem krvnog tlaka, čime bi se smanjila arterijska hipertenzija te brojne bolesti kojima je uzrok (4,5).

Do sada su provedena brojna istraživanja o učinku soli na animalnim modelima, ali su isto tako provedene i brojne humane studije, čiji je glavni cilj bio odrediti povezanost visokog unosa soli s razvojem povišenog krvnog tlaka, odnosno razvoja hipertenzije te otkriti kakav učinak to ostavlja na kardiovaskularni sustav. Prijašnje studije dokazale su da visok unos soli najprije ima štetan učinak na endotel, odnosno uzrokuje njegovu disfunkciju, nakon čega se i s odmakom i od nekoliko godina može razviti hipertenzija. Disfunkcija endotela povezuje se sa starenjem,

ali i kardiovaskularnim bolestima poput hipertenzije, pušenja, dislipidemije, pretilosti, zatajenja bubrega i raznih drugih bolesti (6).

## 1.2 Endotel

Endotel oblaže unutrašnjost svih krvnih žila i sudjeluje u mnogobrojnim aktivnostima kao što su kontroliranje tonusa krvnih žila, sprječavanje agregacije trombocita, upravljanje migracijom leukocita, kontrola proliferacije glatkih mišićnih stanica i mijenjanje propusnosti vaskularne stijenke (7). Endotelne stanice obavljaju mnoge važne funkcije poput prepoznavanja i prilagodbe na humoralne, mehaničke i hemodinamske promjene (8). Najvažnija je uloga endotela otpuštanje vazoaktivnih tvari jer upravo ravnoteža stvorenih vazodilatatora i vazokonstriktora presudna za zdravu endotelnu funkciju i kontrolu vaskularnog tonusa. Ključne vazoaktivne tvari koje endotel sintetizira su endotelni čimbenici relaksacije (engl. endothelium-derived relaxing factors, EDRF): dušikov oksid (NO), endotelni hiperpolarizirajući čimbenik (engl. endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF) te prostaciklin (PGI<sub>2</sub>), dok su glavni čimbenici konstrikcije (engl. endothelium-derived constricting factors, EDCF) endotelin-1 (ET-1) i tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (7-9). NO je najbolje opisan EDRF, a sintetiziraju ga endotelne stanice kao odgovor na žilni stres ali i djelovanje brojnih spojeva (npr. acetilkolina) (9).

S druge strane, endotelna disfunkcija (ED) se definira kao narušena endotelna funkcija, a karakterizira ju smanjena proizvodnja NO-a te smanjena osjetljivost na NO (10). Kada se smanji razina NO-a, endotel aktivira razne kompenzacijske fiziološke mehanizme. U različitim kardiovaskularnim bolestima, poput ateroskleroze ili hipertenzije, endotel je promijenjene strukture i funkcije, odnosno takav endotel karakterizira smanjena vazodilatacija, proupalno stanje i protrombotička svojstva (11). Također, povećano stvaranje ROS-a narušava funkciju zdravog endotela odnosno ravnotežu između ROS-a i antioksidativnog obrambenog sustava organizma te dolazi do vaskularnog oštećenja (12).

## 1.3 Protokom potaknuta dilatacija

Protokom potaknuta dilatacija (engl. *flow-induced dilation*, FID) predstavlja vrlo važan fiziološki način reguliranja vaskularnog tonusa i homeostaze periferne cirkulacije, koji je ovisan o endotelu (13). Mehanizam protokom posredovane dilatacije proučavan je u brojnim krvnim žilama te ovisi o vrsti i veličini krvne žile (14). Istraživanja su pokazala da NO nedvojbeno ima najveću ulogu u održavanju vazodilatacije krvne žile, međutim povećana razina oksidativnog stresa dovodi do snižene razine NO-a i samim time narušene mehanizmom potaknute dilatacije

(15). NO regulira kontrakcije glatkih mišićnih stanica i propusnost endotelnih stanica, kao odgovor na biokemijske i biomehaničke podražaje (16), a nastaje tako što dušik-oxid sintetaza katalizira oksidaciju L-arginina u NO (17). Smanjena proizvodnja NO-a dovodi do disfunkcije endotela (18), što rezultira snižavanjem protokom potaknute dilatacije. Mnoge studije pokazale su da vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) može također biti posrednik u protokom potaknutoj dilataciji (19), posebice u stanjima smanjene proizvodnje NO-a u koronarnoj cirkulaciji kardiovaskularnih bolesnika (20). Vodikov je peroksid toksičan u velikim koncentracijama, a vrlo je važan jer prolazi kroz biološke membrane i stvara reaktivnije spojeve (21). Poznato je kako je u postojanju endotelne disfunkcije oslabljen o endotelu ovisan protokom potaknut odgovor relaksacije krvne žile, odnosno smanjena je protokom potaknuta dilatacija (15). Također, narušena protokom potaknuta dilatacija prvi je znak razvoja kardiovaskularnih bolesti (22).

#### 1.4 Uloga ionskih kanala u vaskularnoj funkciji

U endotelnim funkcijama sudjeluju brojni ionski kanali, poput adenozin trifosfat-kontroliranih kalijeveih kanala ( $K_{ATP}$ ), kalijevih kanala aktiviranih kalcijem ( $K_{Ca}$ ) te vaniloidnih kanalnih receptora prolaznog potencijala (TRPV). EDHF uzrokuju vazodilataciju zahvaljujući hiperpolarizaciji glatkih mišićnih stanica zbog povećane koncentracije endotelnog intracelularnog kalcija (23). Povećana koncentracija intracelularnog kalcija aktivira kalijeve kanale osjetljive na kalcij, koji se mogu podijeliti u tri skupine:  $BK_{Ca}$  (o kalciju ovisni kalijevei kanali velike vodljivosti),  $IK_{Ca}$  (o kalciju ovisni kalijevei kanali srednje vodljivosti) i  $SK_{Ca}$  (o kalciju ovisni kalijevei kanali male vodljivosti) (24). Kalijevski kanali aktivirani kalcijem ( $K_{Ca}$ ) karakterizirani su iznimnom vodljivošću kalijeveih iona te su kontrolirani ligandom, koji kada se veže na specifično mjesto uzrokuje konformacijsku promjenu i dovodi do otvaranja kanala (25).  $BK_{Ca}$  kanali najčešće su eksprimirani u stanicama glatkih mišića i unutarnjoj membrani mitohondrija kardiomiocita, a rezultat njihove aktivacije jest vazodilatacija (26).

$K_{ATP}$  osjetljivi kalijevei kanali otkriveni su u više tkiva i organa kao što su srce, gušterača te skeletni mišići te reguliraju membranski potencijal glatkih mišića. Postoje različite vrste  $K_{ATP}$  kanala, koje se razlikuju jedna od druge u različitim tkivima i tipovima stanica - različitom osjetljivošću na nukleotide, biofizičkim svojstvima i osjetljivošću na farmakološke agense (27). Nedavne studije pokazale su da  $K_{ATP}$  imaju ulogu u lučenju inzulina u  $\beta$ -stanicama gušterače te kontroli vaskularnog tonusa (28).  $K_{ATP}$  kanali najviše su privukli pozornost istraživača, zbog njihove uloge u bolestima kao što su šećerna bolest te bolesti kardiovaskularnog sustava.

Najznačajniji regulatori  $K_{ATP}$  kanala su adenzin trifosfat (ATP), koji zatvara kanal, te magnezijev ATP i magnezijev adenzin difosfat (Mg ADP), koji stimuliraju aktivnost kanala (28, 29).

Kanali receptora prolaznog potencijala (TRP kanali) su ionski kanali, podijeljeni u šest skupina: kanonski (TRPC), vaniloidni (TRPV), melastatinski (TRPM), ankirinski (TRPA), mukolipinski (TRPML) i policistinski (TRPP). Jedna od glavnih uloga kanala prolaznog potencijala jest kontrola ulaska kalcija u endotelne stanice, koji je neophodan endotelnim stanicama kako bi one ispravno obavljale svoje funkcije. Ionski kanal TRPV4 modulira ulazak  $Ca^{2+}$  u stanicu, regulira staničnu signalizaciju te se povezuje s brojim patofiziološkim procesima (30). Osim toga, TRPV4 kanali široko su rasprostranjeni u cirkulaciji, u endotelnim stanicama i stanicama glatkog mišićja gdje vrše brojne funkcije (31). Oni mogu biti aktivirani različitim fiziološkim, mehaničkim i kemijskim podražajima, uključujući silu smicanja, nizak pH te sniženi intravaskularni tlak (32). Budući da je TRPV4 široko rasprostranjen ionski kanal, koji ima važnu ulogu u fiziološkim i patološkim stanjima, postaje sve češća meta sintetičkih farmakoloških spojeva (33).

## **2. HIPOTEZA**

Glavna je pretpostavka ovog istraživanja da visokoslana dijeta utječe na aktivnost ionskih kanala u mehanizmu protokom potaknute dilatacije (FID).

### **3. CILJ**

Cilj ovog istraživanja je odrediti utjecaj visokoslane dijetе na aktivnost ionskih kanala kod pokusnih životinja (štakori soja Sprague-Dawley) metodom mjerenja protokom potaknute dilatacije.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1 Ustroj studije

Provedeno istraživanje eksperimentalna je studija na pokusnim laboratorijskim životinjama, mužjacima Spragu-Dawley soja, iz vlastitog uzgoja Vivarija pri Medicinskom fakultetu Osijek.

Svi eksperimentalni postupci su usklađeni s europskim smjernicama za skrb i primjenu laboratorijskih životinja (direktiva 86/609) te su poduzete sve mjere kako bi se spriječila patnja životinja. Navedeno istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/22-08/02; Ur.Br: 2158-61-46-22-76) te Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (Klasa:602-04/22-08/02, Broj: 2158-61-46-22-76), a financirano je iz Institucijskih znanstveno-istraživačkih projekata IP3-MEFOS-2021 i IP1-MEFOS-2022, oba voditeljice prof.dr.sc. Ines Drenjančević.

### 4.2 Ispitivane grupe

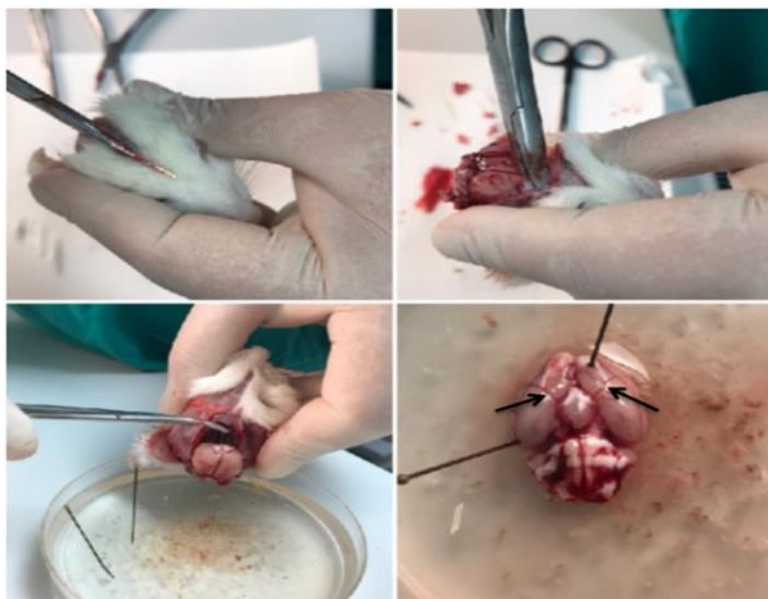
Ovo istraživanje provedeno je na Medicinskom fakultetu u Osijeku, u Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije. Za istraživanje su korišteni modeli izoliranih krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora koji su u vlasništvu Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek. Štakori iz kojih su izolirani modeli za provedbu istraživanja bili su starosti od devet do jedanaest tjedana. U svrhu provedbe istraživanja, SD štakori bili su podijeljeni u dvije skupine:

1) CTRL skupina - zdravi netretirani štakori, hranjeni standardnom hranom za glodavce (koja sadrži 0,4% NaCl-a)

2) Visokoslana skupina – štakori izloženi visokoslanjoj dijeti (engl. *high salt diet*, HSD) tijekom jednog tjedna (4% NaCl)

### 4.3 Izolacija središnje moždane arterije

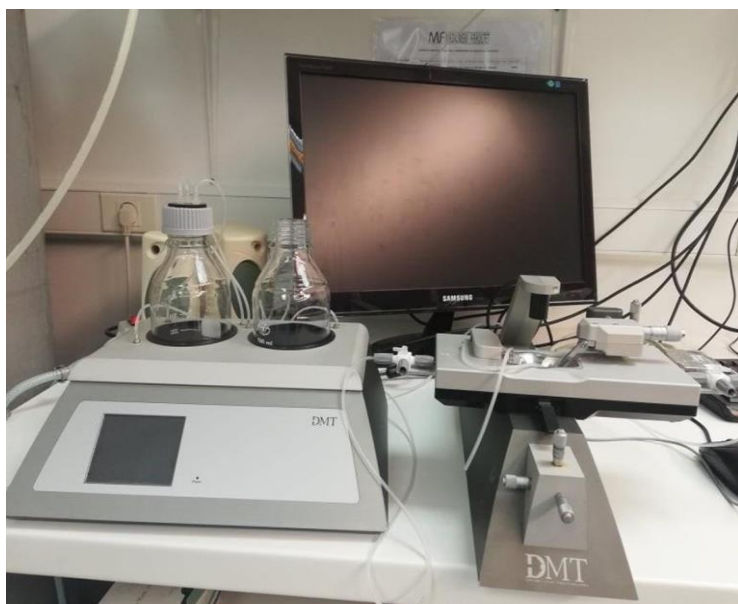
Nakon vaganja, slijedila je anestezija štakora kombinacijom ketamina 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2ml, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma). Nakon dekapitacije, izolirana im je središnja moždana arterija (Slika 1), koja je postavljena između dvije mikropipete, uz pomoć mikrotribora i mikroskopa, u komoricu koja je bila ispunjena fiziološkom slanom otopinom (PSS, pH = 7.4 ± 0.05).



**Slika 1.** Izolacija središnje moždane arterije (izvor: original autorice rada)

#### **4.4. Određivanje protokom potaknute dilatacije i aktivnosti ionskih kanala**

Nakon postavljanja u sustav, izolirana žila bila je inkubirana u trajanju od 60 minuta, kako bi se procijenio osnovni promjer. Izolirana žila cijelo je vrijeme bila prikazana na monitoru. Promjer krvne žile pratio se na zaslonu sustava tlačnog miografa (The Myograph System, DMT, Slika 2).



**Slika 2.** Sustav tlačnog miografa – DMT (izvor: original autorice rada)

Protokom posredovana promjena promjera krvne žile postiže se s različitim gradijentima tlaka:  $\Delta 10$ ,  $\Delta 20$ ,  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$ ,  $\Delta 80$  i  $\Delta 100$  mmHg. Nakon što smo odredili osnovni promjer izolirane žile,



protokom potaknuta dilatacija pratila se u odsutnosti, odnosno prisutnosti različitih agonista i antagonista ionskih kanala - kalijskih kanala aktiviranih kalcijem ( $KCa^{2+}$ ),  $K_{ATP}$  osjetljivih kalijevih kanala te TRPV4 kanala. Po završetku eksperimentalnog protokola, uslijedila je zamjena PSS otopina s Ca-free otopinom kako bi se izmjerio maksimalni mogući promjer izolirane žile. Krvne žile koje nisu imale značajnu razinu aktivnog tonusa (oko 50 %), nisu ulazile u statističku obradu.

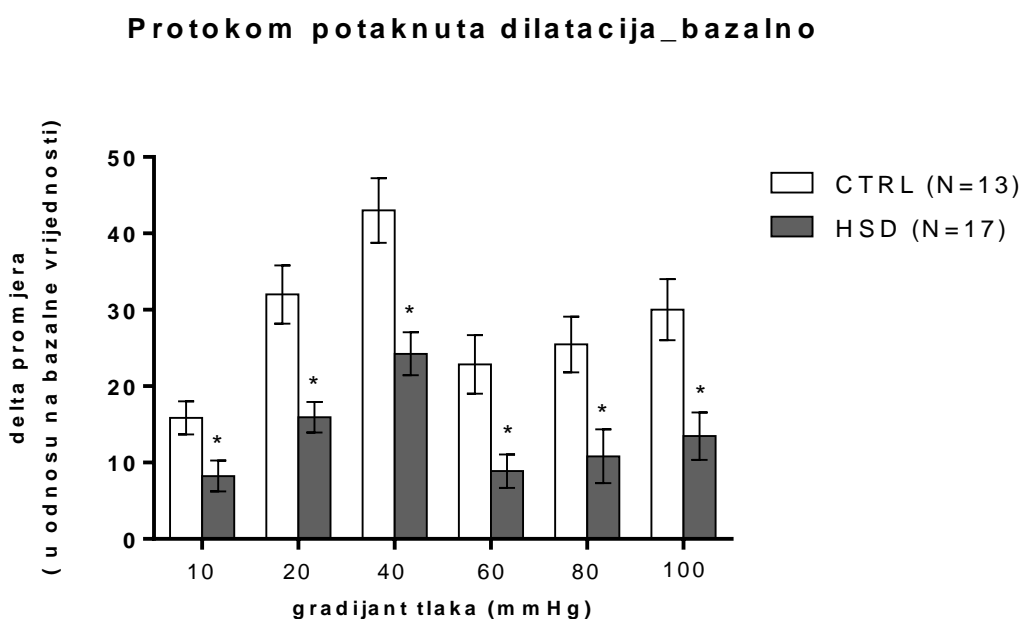
### 4.5 Statističke metode

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Koristila sam statistički program SigmaPlot 11.2 (Systat Software, Inc.) te GraphPad Prism5. Dilatacija koju proizvodi protok izražena je u promjeni promjera ( $\Delta$  promjera) u odnosu na bazalne vrijednosti izmjerene pri  $\Delta 0$  mmHg. Odgovor na protok analiziran je s Two-Way ANOVA testom za ponavljane uzorke (engl. repeated measures ANOVA) kako bi se odredio učinak tretmana na odgovor krvne žile. Razina statističke značajnosti određena je sa  $P < 0,05$ .

## 5. REZULTATI

### 5.1 Bazalni odgovor središnje moždane arterije kontrolne i eksperimentalne skupine na protokom potaknutu dilataciju

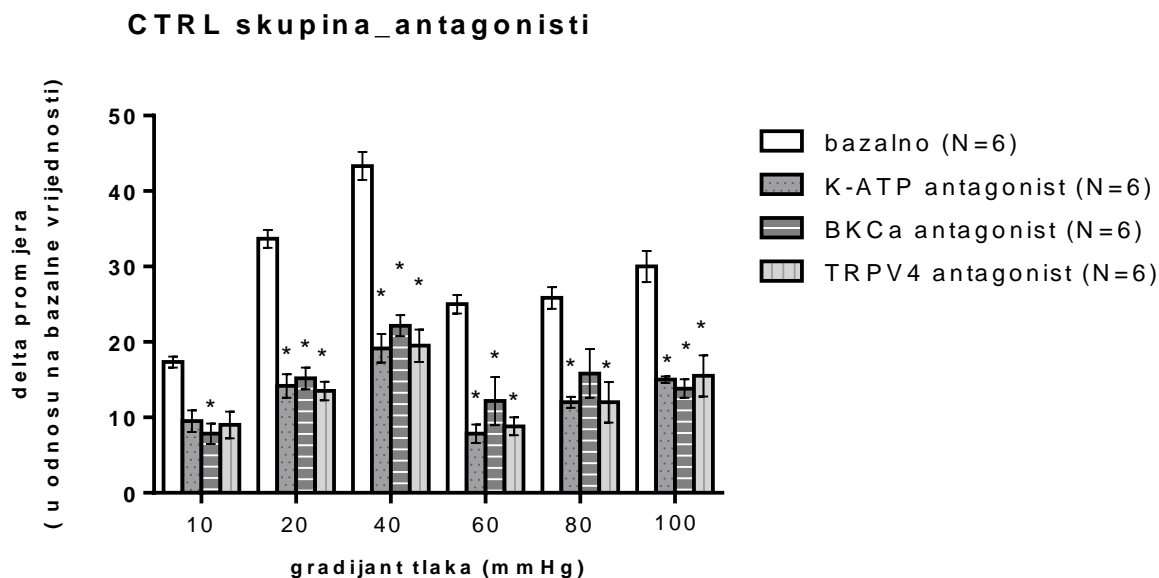
Protokom potaknuta dilatacija statistički je značajno snižena u eksperimentalnoj skupini, odnosno kod štakora koji su bili na 7-dnevnoj visokoslanoj dijeti u odnosu na kontrolnu skupinu, i to pri svakom gradijentu tlaka (Slika 3).



**Slika 3.** Odgovor središnje moždane arterije kontrolne netretirane (CTRL) skupine (N=13) i visokoslane (HSD) skupine (N=17), na promjene gradijenta tlaka, izražen kao delta promjera u odnosu na bazalnu vrijednost. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (standardna devijacija SD). \*P < 0,05

### 5.2 Protokom potaknuta dilatacija središnjih moždanih arterija kontrolne skupine u odgovoru na primjenu antagonista

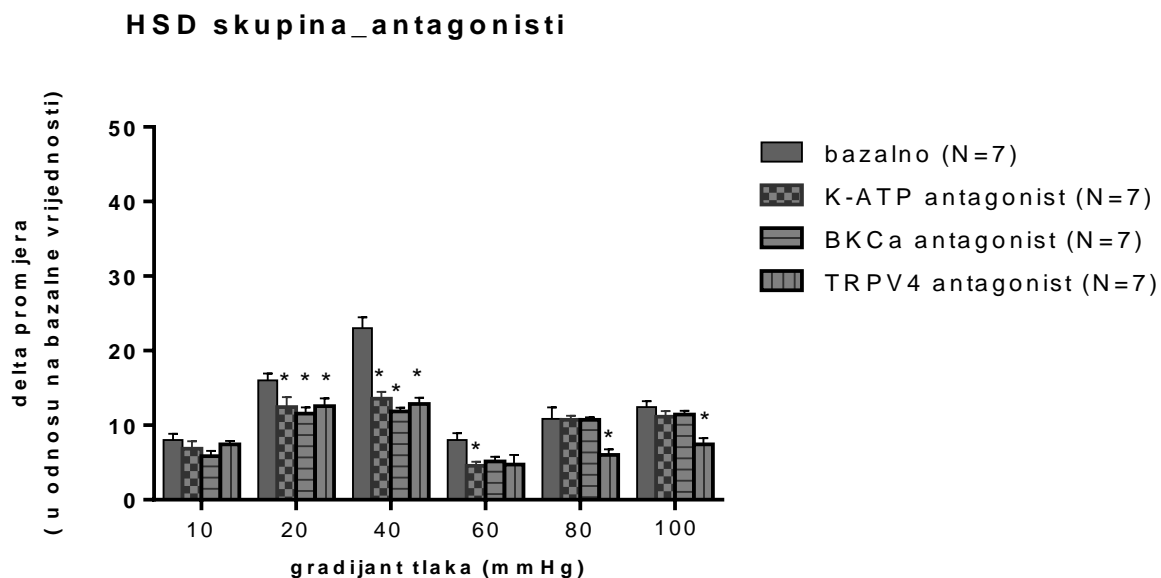
Kod kontrolne skupine životinja antagonisti  $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$  te TRPV4 kanala značajno smanjuju protokom potaknutu dilataciju, pri svakom gradijentu tlaka, u usporedbi s bazalnim odgovorom bez primijenjenog antagonista (Slika 4).



**Slika 4.** Protokom potaknuta dilatacija središnjih moždanih arterija kontrolne netretirane (CTRL) skupine nakon primjene antagonista  $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$  te TRPV4 kanala, izražen kao delta promjera u odnosu na bazalnu vrijednost. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $P < 0,05$

### 5.3 Protokom potaknuta dilatacija središnjih moždanih arterija eksperimentalne HSD skupine u odgovoru na primjenu antagonista

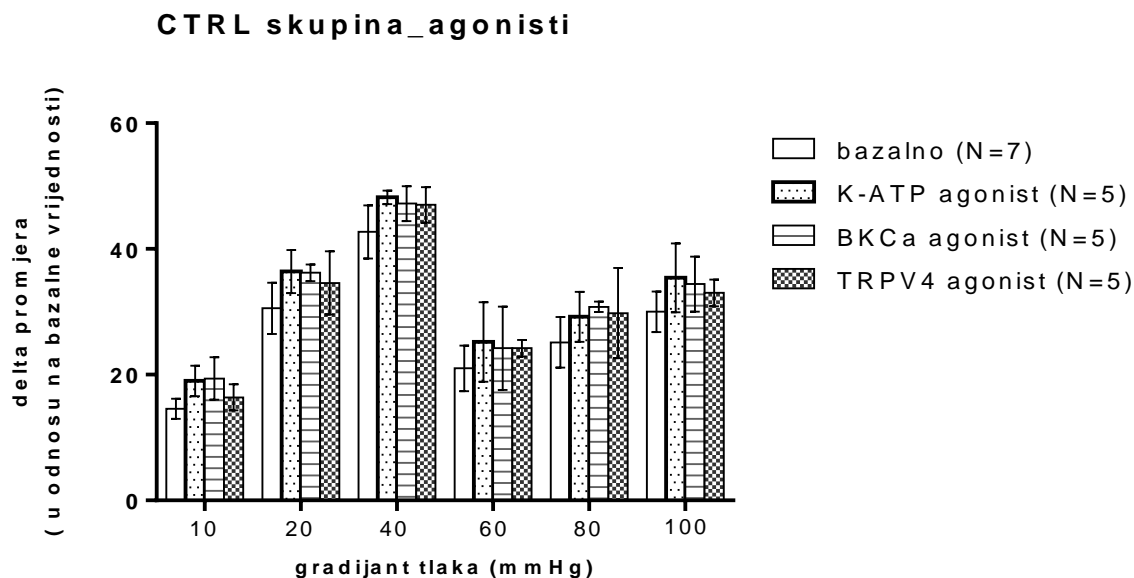
Primjenom antagonista  $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$  te TRPV4 kanala, protokom potaknuta dilatacija kod visokoslane skupine smanjena je pri gradijentima tlakova  $\Delta 20$  mmHg i  $\Delta 40$  mmHg, dok je pri višem gradijentu tlaka ( $\Delta 80$  mmHg i  $\Delta 100$  mmHg) samo antagonist TRPV4 značajno djelovao na smanjenu protokom potaknutu dilataciju (Slika 5).



**Slika 5.** Protokom potaknuta dilatacija središnjih moždanih arterija HSD skupine nakon primjene antagonista  $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$  te TRPV4 kanala, izražena kao delta promjera u odnosu na bazalnu vrijednost. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $P < 0,05$

#### **5.4 Protokom potaknuta dilatacija središnjih moždanih arterija kontrolne skupine u odgovoru na primjenu agonista**

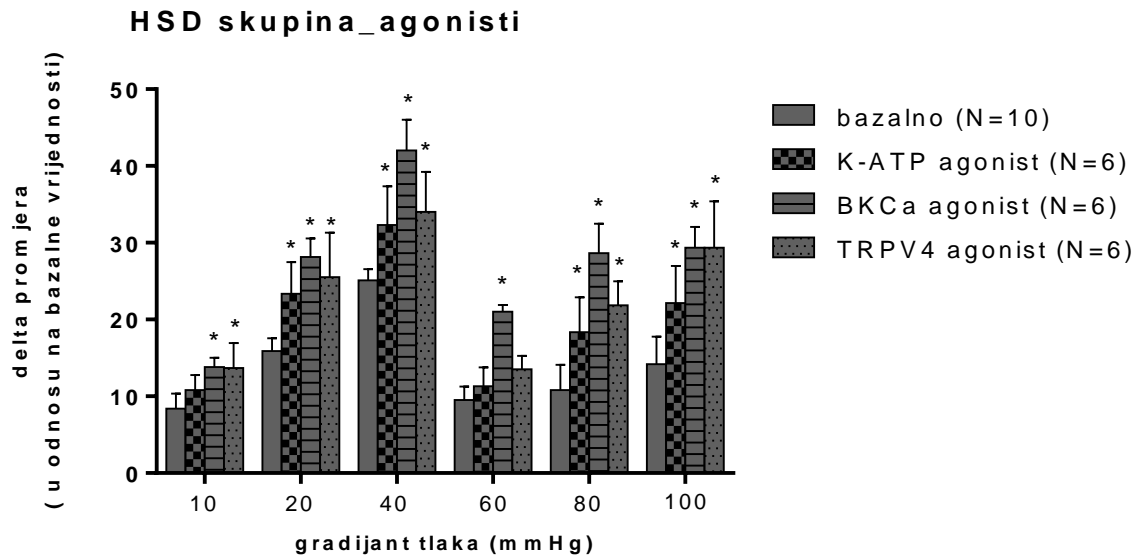
Primjena agonista  $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$  te TRPV4 kanala kod kontrolne netretirane skupine nije imala statistički značajan učinak na protokom potaknutu dilataciju, u odnosu na bazalne vrijednosti FID-a (Slika 6).



**Slika 6.** Protokom potaknuta dilatacija središnjih moždanih arterija kontrolne netretirane (CTRL) skupine nakon primjene agonista  $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$  te TRPV4 kanala, izražena kao delta promjera u odnosu na bazalnu vrijednost. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $P < 0,05$

### 5.5 Protokom potaknuta dilatacija središnjih moždanih arterija eksperimentalne HSD skupine u odgovoru na primjenu agonista

Primjena agonista  $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$  te TRPV4 kanala kod visokoslane skupine značajno poboljšava razinu dilatacije u usporedbi s bazalnim vrijednostima, i to pri svim gradijantima tlaka. Naime, protokom potaknuta dilatacija u prisutnosti agonista  $K_{ATP}$  kanala značajno je povećana pri gradijentima tlakova  $\Delta 20$ ,  $\Delta 40$ ,  $\Delta 80$  i  $\Delta 100$  mmHg, u odnosu na bazalne vrijednosti FID-a. Agonist  $BK_{Ca}$  kanala značajno povećava protokom potaknutu dilataciju pri svakom gradijentu tlaka ( $\Delta 10$  -  $\Delta 100$  mmHg), u odnosu na bazalni odgovor, a također i primjena agonista TRPV4 kanala (Slika 7).



**Slika 7.** Protokom potaknuta dilatacija središnjih moždanih arterija visokoslane (HSD) skupine nakon primjene agonista  $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$  te TRPV4 kanala, izražena kao delta promjera u odnosu na bazalnu vrijednost. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $P < 0,05$

## 6. RASPRAVA

Velik unos kuhinjske soli vodeći je rizični čimbenik za nastanak arterijske hipertenzije i obolijevanje od različitih kardiovaskularnih bolesti, te predstavlja velik problem današnjice (34).

Provedeno istraživanje ispitivalo je utjecaj 7- dnevne visokoslane dijeta na mehanizam protokom potaknute dilatacije kod zdravih muških Sprague-Dawley štakora te ulogu ionskih kanala  $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$  i  $TRPV4$ , u tom mehanizmu. Izolirane središnje moždane arterije bile su model na kojem se istraživanje provodilo. Glavne spoznaje ove studije su te da visok unos soli kroz sedam dana ima značajan tjecaj na protokom potaknutu dilataciju, odnosno smanjuje ju, te da  $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$  i  $TRPV4$  ionski kanali imaju značajnu ulogu u tom mehanizmu.

Protokom potaknuta dilatacija je o endotelu ovisan mehanizam regulacije protoka te s obzirom na to da ju 7-dnevni velik unos soli značajno smanjuje dilataciju krvnih žila izazvanu povećanjem protoka, dolazimo do zaključka kako soli štetno djeluje upravo na žilni endotel. Pri Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek ranije su provedene studije o utjecaju povećanog unosa kuhinjske soli na vaskularnu funkciju. Naime, studije na animalnim modelima pokazale su kako velik unos soli dovodi do oslabljene vaskularne reaktivnosti, i bez promjene vrijednosti krvnog tlaka, a u podlozi ovoga je povećana razina stvorenog vaskularnog oksidativnog stresa (35). Osim toga, daljnje studije su pokazale kako prehrana s povećanim unosom soli mijenja mehanizme dilatacije izazvane protokom u srednjim cerebralnim arterijama štakora (36). Međutim, uloga ionskih kanala u protokom potaknutoj dilataciji do sada nije istraživana. Fokus ovog istraživanja upravo je stavljen na ulogu ionskih kanala  $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$  i  $TRPV4$  te je dokazana njihova značajna uloga u odgovoru na vazodilataciju zbog povećanja protoka, budući da i u kontrolnoj CTRL i u HSD skupini primjena antagonista  $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$  i  $TRPV4$  kanala značajno smanjuje FID u odnosu na bazalne vrijednosti. S druge strane, primjena agonista  $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$  i  $TRPV4$  kanala u CTRL skupini nema značajan učinak, dok u HSD skupini značajno povećava FID u odnosu na bazalne vrijednosti, već ionako narušenog FID odgovora zbog visokog unosa soli što potvrđuje njihovu značajnu ulogu u tom mehanizmu.

Nadalje, humana studija koja istražuje učinak visokog unosa soli na vaskularnu funkciju, pokazala je da tjedan dana dijeta s visokim udjelom soli dovodi do smanjene o endotelu ovisne vazodilatacije u mikrocirkulaciji kože u populaciji zdravih mladih žena, bez utjecaja na vrijednosti krvnog tlaka (37). Osim toga, postoje brojni dokazi o povezanosti

prehrane s velikim udjelom soli s oslabljenom vaskularnom reaktivnosti i disfunkcijom endotela, a disfunkcija endotela prethodi razvoju kardiovaskularnih bolesti.

U odgovoru na aktivaciju receptora ligandom, kao i na mehaničku stimulaciju silom smicanja, stvaraju se posrednici pomoću kojih endotel regulira vaskularni tonus, uključujući NO, prostaciklin i EDHF (38). Sintezu ovih čimbenika pokreće povećana koncentracija intracelularnog  $\text{Ca}^{2+}$  u endotelnim stanicama, gdje je ključna pojava ulazak  $\text{Ca}^{2+}$  iz izvanstaničnog prostora kroz ionske kanale propusne za  $\text{Ca}^{2+}$  (39), a sam način i trajanje ulaska kalcija u stanice može varirati između endotelnih stanica te ovisi i o vrsti podražaja. Točna uloga pojedinih ionskih kanala u protokom-potaknutoj dilataciji nije poznata, no zna se da povećana razina oksidativnog stresa, koje je dokazano u stanjima povećanog unosa soli (40), ima sposobnost modulirati ionske kanale (41). Ova studija istražuje potencijalnu važnu ulogu ionskih kanala u mehanizmu FID-a, kako u fiziološkim uvjetima, tako i u stanju povećanog unosa soli. Upravo kod povećanog unosa soli primjena antagonista pojedinih ionskih kanala značajno smanjuje i tako već oslabljenu FID, a primjena agonista kanala značajno povećava FID u odnosu na bazalne vrijednosti, možemo zaključiti kako ispitivani kanali  $\text{K}_{\text{ATP}}$ ,  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  te TRPV4 imaju značajnu ulogu u FID-u, posebice pri nižim vrijednostima gradijenata tlakova, dok pri višim gradijentima najznačajniju ulogu imaju TRPV kanali. Ova studija pokazuje značajnu ulogu ispitivanih kanala i u fiziološkim uvjetima.



## 7. ZAKLJUČAK

Nakon provedenog istraživanja i obradom svih dobivenih rezultata mogu se izvesti zaključci:

- Velik unos soli kroz 7 dana narušava protokom potaknutu dilataciju, odnosno smanjuje ju, kod zdravih muških Sprague-Dawley štakora;
- Protokom potaknuta dilatacija u prisutnosti antagonista ionskih kanala ( $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$  i TRPV4) značajno je smanjena u odnosu na bazični odgovor središnje moždane arterije u kontrolnoj skupini, što potvrđuje važnost ispitivanih kanala u mehanizmu protokom potaknute dilatacije, dok primjena agonista ionskih kanala nema značajan učinak na protokom potaknutu dilataciju
- Protokom potaknuta dilatacija u prisutnosti antagonista ionskih kanala ( $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$  i TRPV4) značajno je smanjena u odnosu na bazični odgovor središnje moždane arterije u eksperimentalnoj HSD skupini pri nižim gradijentima tlakova, a primjena agonista ionskih kanala značajno povećava protokom potaknutu dilataciju u odnosu na bazalne vrijednosti, potvrđujući važnost ispitivanih kanala u mehanizmu već ionako narušene protokom potaknute dilatacije kod 7-dnevne visokoslane dijete.

## 8. SAŽETAK

**Cilj:** Odrediti ulogu  $K_{ATP}$ ,  $KCa^{2+}$  i TRPV4 ionskih kanala u protokom potaknutoj dilataciji kod Sprague-Dawley štakora na visokoslanjoj dijeti.

**Nacrt studije:** Eksperimentalna studija na izoliranim krvnim žilama.

**Materijali i metode:** Kao model ovom istraživanju poslužile su izolirane središnje moždane arterije muških Sprague-Dawley štakora, starosti 9-11 tjedana, koji su bili podijeljeni u dvije skupine - kontrolnu (CTRL, štakori hranjeni standardnom hranom za glodavce) i visokoslanu (HSD) skupinu (štakori koji su konzumirali hranu s 4% NaCl-a). Na izoliranim žilama, koje su bile postavljene u sustav tlačnog miografa (Myograph Pressure System Model 110P MyoView Version 1.2.0 DMT; Danish Myo Technology) i pričvršćene između dvije staklene pipete, određivala se reaktivnost u odgovoru na stupnjevito povećanje protoka, bazalno te u prisutnosti agonista / antagonista ionskih kanala  $K_{ATP}$ ,  $KCa$  te TRPV4.

**Rezultati:** FID je značajno snižen kod visokoslane skupine pri svakom gradijentu tlaka u odnosu na kontrolnu skupinu. Svaki od primijenjenih antagonista doveo je do smanjenog FID-a, pri svakom gradijentu tlaka kod CTRL skupine, dok je u HS skupini FID smanjen samo pri  $\Delta 20$  mmHg i  $\Delta 40$  mmHg, dok je pri višem gradijentu tlaka ( $\Delta 80$  mmHg i  $\Delta 100$  mmHg) samo antagonist TRPV4 kanala značajno djelovao na smanjenu protokom potaknutu dilataciju. U CTRL skupini, niti jedan od primijenjenih agonista ionskih kanala nije imao značajan učinak na FID, dok je u HS skupini FID značajno obnovljen nakon primjene svakog od pojedinih agonista ionskih kanala.

**Zaključak:** Visokoslana dijeta utječe na mehanizam protokom potaknute dilatacije moduliranjem ionskih kanala.

**Ključne riječi:** ionski kanali, središnja moždana arterija, Sprague-Dawley štakori

## 9. SUMMARY

### **The role of ion channels in flow-induced dilation in Sprague-Dawley rats on a high-salt diet**

**Aim:** The aim of this study is to determine the role of  $K_{ATP}$ ,  $K_{Ca}$  and TRPV4 ion channels in mechanism of flow-induced dilation of Sprague-Dawley (SD) rats subjected to a high salt (HS) diet.

**Study design:** Experimental study on isolated blood vessels.

**Materials and methods:** The experiment was conducted on model of isolated middle cerebral arteries of male Sprague-Dawley rats, 9-11 weeks old, which were divided into two groups - control (CTRL, rats fed with standard rodent chow) and high salt (HSD) group (rats fed with 4% NaCl). Isolated vessels, a model on which flow-induced dilatation was determined, were set in the pressure myograph system (Myograph Pressure System Model 110P MyoView Version 1.2.0 DMT; Danish Myo Technology) and cannulated between two glass pipettes, reactivity was determined in response to a stepwise increases in pressure gradients, at the base level and in the presence of  $K_{ATP}$ ,  $K_{Ca}$  and TRPV4 ion channel agonists/antagonists.

**Results:** FID was significantly reduced in HS compared with CTRL group at each pressure gradient. Each of applied antagonists reduced FID at each pressure gradient in CTRL group, whereas in HS group impaired FID at  $\Delta 20$  and  $\Delta 40$  mmHg, but at high pressure gradient ( $\Delta 80$  and  $\Delta 100$  mmHg) only TRPV4 antagonist reduced FID. In CTRL group, each of applied agonists has no effect on FID, whereas in HS group, each of them restored FID at each pressure gradients.

**Conclusion:** Results suggest that HS dietary intake affect the mechanisms of FID by modulating ion channels.

**Key words:** Ion Channels, Middle Cerebral Artery, Sprague-Dawley Rats

**10. LITERATURA**

1. Drenjančević I. Prekomjieran unos kuhinjske soli i utjecaj na zdravlje vaskularnog i koštanog sustava kod mladih ljudi. // 1. Međunarodni znanstveno-stručni skup „Fizioterapija u sportu, rekreaciji i wellnessu“, Vukovar, Hrvatska, 2015. (pozvano predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
2. Zavod za javno zdravstvo Dubrovačko neretvanske županije. Sol u hrani. Dostupno na adresi: <https://www.zzjzdnz.hr/zdravlje/hrana-i-zdravlje/888>
3. Drenjančević I, Jelaković B, Kusić Z, Reiner Ž, Ugarčić Ž. Manje soli – više zdravlja. 1. izd. Osijek: Hrvatska agencija za hranu; 2014.
4. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Strateški plan za smanjenje prekomjernog unosa kuhinjske soli u Republici Hrvatskoj 2015. – 2019. Dostupno na adresi: <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2014/11/Strate%C5%A1ki-plan-za-smanjenje-prekomjernog-unosa-kuhinjske-soli-u-RH-2015.-2019..pdf>
5. Jelakovic B, Kaic-Rak A, Milicic D, Premuzic V, Skupnjak B, Reiner Z. Manje soli – više zdravlja. Hrvatska inicijativa za smanjenje nosa kuhinjske soli (CRASH). Liječnički Vjesnik.2009; 131:87-92.
6. Endemann DH and Schiffrin EL. Endothelial Dysfunction Canadian Institutes of Health Research Multidisciplinary Research Group on Hypertension and Hypertension Clinic, Clinical Research Institute of Montréal, Montréal, Québec, Canada. J Am Soc Nephrol. 2004;15: 1983–1992.
7. Čavka A, Tadžić R, Grizelj I, Unfirer T, Mihaljević Z, Mihalj M i sur. Endotelna funkcija funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. Medicinski Vjesnik. 2012; 44: 135-146.
8. Stupin A. Utjecaj dijete s visokim udjelom soli na mikrovaskularnu reaktivnost u populaciji zdravih mladih žena (doktorska disertacija). Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera, Medicinski fakultet Osijek; 2013.
9. Ana Čavka i suradnici: Endotelna funkcija - funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika Med Vjesn 2012; 44(1-4): 135-146

10. Grizelj I. (2014.) Vaskularna reaktivnost otporničkih krvnih žila potkožnog i visceralnog masnog tkiva u ljudskoj pretilosti. Doktorska disertacija. Osijek: Medicinski fakultet.
11. Ćosić A. (2016.) Uloga oksidativnog stresa u razvoju poremećenog vaskularnog odgovora pod utjecajem visokog unosa natrijeva klorida kod Sprague-Dawley štakora. Doktorska disertacija. Osijek: Medicinski fakultet.
12. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol.* 2018 Jan;100:1-19.
13. Grizelj I. (2014.) Vaskularna reaktivnost otporničkih krvnih žila potkožnog i visceralnog masnog tkiva u ljudskoj pretilosti. Doktorska disertacija. Osijek: Medicinski fakultet.
14. Pohl U, Holtz J, Busse R, et al. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension.* 1986; 8: 37–44.
15. Koller A, Huang A. Impaired nitric oxide-mediated flow-induced dilation in arterioles of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.*1994;74:416-421.
16. Malinski T. The vital role of nitric oxide; *Oakland university Journal*; 2016; 47-58.
17. Li H, Poulos T. Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem.* 2005 Jan;99(1):293-305.
18. Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, Zuckerbraun BS. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin.* 2020 Apr;36(2):307-321.
19. Phillips SA, Hatoum OA, Gutterman DD. The mechanism of flow-induced dilation in human adipose arterioles involves hydrogen peroxide during CAD. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*2007;292:H93–100.
20. Kuo L, Chilian WM, Davis MJ. Interaction of pressure- and flow-induced responses in porcine coronary resistance vessels. *Am J Physiol.*1991;261:H1706–H1715.
21. Čvorišćec D, Čepelak I i sur. Štrausova medicinska biokemija. Poglavlje 30: Slobodni radikali i antioksidansi, 638-648. Medicinska naklada, Zagreb, 2009.

22. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endotheliumdependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interactions. *J Am Coll Cardiol.*1994;24:1468-74.
23. Garland CJ, Dora KA. EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. *Acta Physiol (Oxf).* 2017; 219(1) :152-161.
24. Hughes JM i sur. Novel role of endothelial BKCa channels in altered vasoreactivity following hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010 Nov;299(5):H1439-50.
25. Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF. Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Compr Physiol.* 2017;7(2):485-581.
26. Dong DL, Bai YL, Cai BZ. Calcium-Activated Potassium Channels: Potential Target for Cardiovascular Diseases. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2016;104:233-261
27. Foster MN, Coetzee WA. KATP Channels in the Cardiovascular System. *Physiol Rev.* 2016 Jan;96(1):177-252.
28. Chowdhury UR, Dosa PI, Fautsch MP. ATP sensitive potassium channel openers: a new class of ocular hypotensive agents. *Exp Eye Res.* 2017 May; 158: 85–93.
29. Hattersley AT, Ashcroft FM. Activating mutations in Kir6.2 and neonatal diabetes: new clinical syndromes, new scientific insights and new therapy. *Diabetes* 2005;54:2503–13.
30. Lawhorn B, Brnardic E, Behm D. TRPV4 antagonists: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2021 Sep;31(9):773-784.
31. Chen M, Li X. Role of TRPV4 channel in vasodilation and neovascularization. *Microcirculation.* 2021 Aug;28(6):e12703.
32. Hill-Eubanks DC, Gonzales AL, Sonkusare SK, Nelson MT. Vascular TRP channels: performing underpressure and going with the flow. *Physiology (Bethesda).* 2014; 29(5): 343-360.
33. Grace MS, Bonvini SJ, Belvisi MG, McIntyre P. Modulation of the TRPV4 ion channel as a therapeutic target for disease. *Pharmacol Ther.* 2017 Sep;177:9-22.

34. He FJ, Brown M, Tan M, MacGregor GA. Reducing population salt intake-An update on latest evidence and global action. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2019 Oct;21(10):1596-1601
35. Cosic A, Jukic I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljevic Z, Novak S, Vukovic R, Drenjancevic I. Attenuated flow-induced dilatation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet. *J Physiol*. 2016 Sep 1;594(17):4917-31.
36. Matic A, Jukic I, Stupin A, Baric L, Mihaljevic Z, Unfirer S, Tartaro Bujak I, Mihaljevic B, Lombard JH, Drenjancevic I. High salt intake shifts the mechanisms of flow-induced dilation in the middle cerebral arteries of Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018 Sep 1;315(3):H718-H730.
37. Barić L, Drenjančević I, Matić A, Stupin M, Kolar L, Mihaljević Z, Lenasi H, Šerić V, Stupin A: Seven-Day Salt Loading Impairs Microvascular Endothelium-Dependent Vasodilation without Changes in Blood Pressure, Body Composition and Fluid Status in Healthy Young Humans. *Kidney Blood Press Res* 2019;44:835-847. doi: 10.1159/000501747.
38. Edwards G, Félétou M, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. *Pflugers Arch*. 2010; 459:863–879.
39. Nilius B, Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev*. 2001 Oct;81(4):1415-59.
40. Cosic A, Jukic I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljevic Z, Novak S, Vukovic R, Drenjancevic I. Attenuated flow-induced dilatation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet. *J Physiol*. 2016 Sep 1;594(17):4917-31.
41. Kiselyov K, Muallem S. ROS and intracellular ion channels. *Cell Calcium*. 2016 Aug;60(2):108-14.

## 11. ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODATCI

Ivana Lukačević, studentica 3.godine preddiplomskog sveučilišnog studija medicinsko laboratorijske dijagnostike

Datum i mjesto rođenja: 11. travnja 2000., Osijek, Republika Hrvatska

Adresa: Vukovarska 17, 31432 Budimci

Mobitel: 091 114 0002

E-mail: ilukacevic@mefos.hr

### OBRAZOVANJE

2007. - 2015. Osnovna škola Podgorač, Podgorač

2015. - 2019. Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku

2019. - 2022. Medicinski fakultet Osijek, preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska dijagnostika