

# Učinak nadomjestka karnozina na vaskularnu funkciju izoliranih aortalnih prstenova Sprague-Dawley štakora na visokoslanjoj dijeti

---

Zidar, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:152:462668>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-27**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Matea Zidar**

**UČINAK NADOMJESTKA KARNOZINA  
NA VASKULARNU FUNKCIJU  
IZOLIRANIH AORTALNIH  
PRSTENOVA SPRAGUE-DAWLEY  
ŠTAKORA NA VISOKOSLANOJ DIJETI**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2023.**

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

**Matea Zidar**

**UČINAK NADOMJESTKA KARNOZINA**  
**NA VASKULARNU FUNKCIJU**  
**IZOLIRANIH AORTALNIH**  
**PRSTENOVA SPRAGUE-DAWLEY**  
**ŠTAKORA NA VISOKOSLANOJ DIJETI**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2023.**

Rad je ostvaren u Medicinski fakultet Osijek

Mentor rada: doc.dr.sc. Zrinka Mihaljević

Rad ima 29 listova, 3 tablice i 4 slike

## **ZAHVALE**

Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Zrinki Mihaljević na danom povjerenju, velikoj pomoći i korisnim savjetima tijekom izrade ovoga diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na podršci, strpljenju i razumijevanju tijekom studija.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Endotelna funkcija .....	1
1.1.1. Regulacija vaskularnog tonusa.....	1
1.1.2. Utjecaj prekomjernog unosa soli na endotel.....	1
1.2. Renin - angiotenzin sustav (RAS) .....	2
1.2.1. Angiotenzin II .....	2
1.3. Oksidativni stres .....	3
1.3.1. Antioksidativni enzimi .....	4
1.4. Karnozin.....	4
1.4.1. Biosinteza i metabolizam karnozina .....	5
1.4.2. Antioksidativna svojstva karnozina .....	6
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	7
<b>3. CILJEVI</b> .....	8
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	9
4.1. Ustroj studije .....	9
4.2. Materijali .....	9
4.3. Metode .....	9
4.3.1. Dijetni protokol.....	10
4.3.2. Izolacija aortalnih prstenova .....	10
4.3.3. Stabilizacija krvne žile.....	11
4.3.4. Inicijalni prekontrakcijski test.....	12
4.3.5. Testiranje intaktnosti i funkcije endotela.....	12
4.3.6. Priprema lijekova za istraživanje .....	12
4.4. Statističke metode.....	13
<b>5. REZULTATI</b> .....	14
5.1. Rezultati na aortalnim prstenovima.....	14
5.1.1. Bazični odgovor na ACh.....	14
5.1.2 Endotel- neovisna relaksacija.....	15
<b>6. RASPRAVA</b> .....	17
<b>7. ZAKLJUČAK</b> .....	20
<b>8. SAŽETAK</b> .....	21
<b>9. SUMMARY</b> .....	22
<b>10. LITERATURA</b> .....	23
<b>11. ŽIVOTOPIS</b> .....	28

## **Popis kratica**

AT1 - angiotenzin II receptor tip 1 (engl. *angiotensin II receptor type I*)

AT2 - angiotenzin II receptor tip 2 (engl. *angiotensin II receptor type II*)

CAR -karnozin (engl. *carnosine*)

CAT - katalaza (engl. *catalase*)

CN1 - serumska karnozinaza (engl. *serum carnosinase*)

CN2 - citosolna nespecifična karnozinaza (engl. *cytosolic non-specific carnosinase*)

GPx - glutation-peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase*)

RAS - renin-angiotenzin sustav (engl. *renin angiotensin system*)

SAH - sistemska arterijska hipertenzija (engl. *systemic arterial hypertension*)

SOD - superoksid dismutaza (engl. *superoxide dismutase*)

SNP - natrijev nitroprusid (engl. *sodium nitroprusside*)

## 1. UVOD

### 1.1. Endotelna funkcija

Endotel je važan organ koji oblaže unutrašnji sloj krvnih žila. Ima vrlo važne funkcije koje obuhvaćaju inhibiciju agregacije trombocita, kontrolu vaskularnog tonusa, regulaciju proliferacije glatkih mišićnih stanica i moduliranje propusnosti vaskularne stijenke (1). Endotel ima važnu ulogu u odgovoru na kemijske signale pri čemu proizvodi velik broj čimbenika koji reguliraju upalu stijenke krvnih žila trombozistenciju i staničnu adheziju. Dušikov oksid koji ima zaštitnu ulogu u regulaciji vazodilatacije oslobađa se iz endotelnih stanica prilikom stimulacije endotela (2). Endotelna disfunkcija karakteristika je sistemske arterijske hipertenzije (SAH) i rani je marker ateroskleroze (3). Vaskularni endotel kontrolira bazalni vaskularni tonus i glavni je regulator vaskularnog remodeliranja i upale (4).

#### 1.1.1. Regulacija vaskularnog tonusa

Uloga endotela važna je zbog njegovog djelovanja na vaskularni tonus. Kao odgovor na modifikaciju vazoaktivnih medijatora bradikininina i trombina dolazi do otpuštanja vazoaktivnih molekula koje dilatiraju ili kontrahiraju krvnu žilu. Ovaj proces važan je u uspostavljanju ravnoteže u opskrbi tkiva kisikom. Endotel otpušta i sintetizira različite vazoaktivne posrednike na način da posreduje vazomotorni tonus u odgovoru na razne kemijske (ACh) i fizičke (sila smicanja) poticaje (2).

#### 1.1.2. Utjecaj prekomjernog unosa soli na endotel

Uloge endotelnih stanica su različite, a jedna od najvažnijih je njihov utjecaj na glatke mišićne i imunološke stanice. Dugotrajno izlaganje rizičnim čimbenicima može oslabiti zaštitni učinak endotelnih stanica kao što je njihov protuupalni učinak (5). Posljedično tomu endotelne stanice gube svoj integritet i endotel postaje disfunkcionalan. Endotelna disfunkcija može doprinijeti nastanku kardiovaskularnih bolesti. Kardiovaskularni rizični čimbenici aktiviraju molekularne mehanizme u endotelu. Što kao posljedicu ima ekspresiju kemokina i citokina.

Kada dođe do razvoja endotelne disfunkcije dolazi do promjene velikog broja cirkulirajućih endotelnih biljega. U koronarnoj bolesti i hipertenziji javljaju se promjene vazoaktivnih agenasa kao što su nitriti, endotelin, nitrati i NO (5). Prevelika konzumacija kuhinjske soli dovodi do porasta krvnog tlaka, nastanka slobodnih kisikovih radikala i poremećaja mikrocirkulacije. Visoka izloženost slobodnim kisikovim radikalima aktivira upalni odgovor koji dovodi do pojačanog izražaja promotora oksidativnog stresa i adhezijskih molekula.



Ukoliko dođe do poremećaja u vaskularnom endotelu može se pospješiti razvoj kardiovaskularnih bolesti. Oksidativni stres ima važnu ulogu u aktivaciji endotela, razvoju ateroskleroze i hipertenzije koje pridonose progresiji strukturnih i funkcionalnih kardiovaskularnih oštećenja.

### **1.2. Renin - angiotenzin sustav (RAS)**

Renin-angiotenzin sustav (RAS) najvažniji je sustav koji ima ulogu u kontroli volumena tjelesnih tekućina, krvnog tlaka, ravnoteže elektrolita i neophodan je za održavanje arteriolne strukture i vaskularne reaktivnosti (6). Također, sudjeluje u homeostazi elektrolita, regulaciji tkivne perfuzije i regulaciji krvnog tlaka. Važan je za uspješno liječenje hipertenzije pomoću inhibitora angiotenzin-konvertirajućeg enzima i blokatora ANG II receptora (7). Djelovanje sustava renin-angiotenzin aktivira se u uvjetima niskog tlaka. Dolazi do otpuštanja renina koji potiče otpuštanje angiotenzina I. Od angiotenzina I nastaje angiotenzin II koji je jak vazokonstriktor (8).

Inhibicija (RAS) i niska razina angiotenzina II pospješuje oštećenje endotela i mikrovaskularne funkcije kod zdravih bolesnika bez promjene arterijskog tlaka i na taj način uzrokuje povišene razine oksidativnog stresa (9). Također, povećan unos kuhinjske soli uz inhibiciju RAS-a može uzrokovati upalni proces i endotelno-leukocitnu aktivaciju što pospješuje oštećenje vaskularne funkcije (10). RAS je glavni regulatorni sustav uključen u regulaciju kardiovaskularnih procesa. Njegova abnormalna aktivnost može dovesti do razvoja različitih kardiovaskularnih bolesti (11).

#### **1.2.1. Angiotenzin II**

Angiotenzin II djeluje kao vazoaktivni agonist i inducira kontrakciju krvnih žila (12). Jedna od glavnih njegovih funkcija je vazokonstriktorno djelovanje na venule te povećanje volumnog opterećenja i udarnog volumena. Također, djeluje vazokonstriktorno na arteriole na način da poveća tlačno opterećenje podižući dijastolički tlak (12). Ima važnu ulogu u proizvodnji kemokina, citokina i adhezijskih molekula (13). Provedena istraživanja na animalnim modelima pokazala su nisku razinu angiotenzina II povećanjem unosa soli koje je doprinijelo povećanju oksidativnog stresa i oštećenju vaskularne reaktivnosti. U takvom stanju povećava se stvaranje ROS-a u stjenkama krvnih žila i sve to pridonosi razvoju hipertenzije (14). ANG II se veže na specifične transmembranske receptore; angiotenzin II receptor tip 1 (AT1) i angiotenzin II receptor tip 2 (AT2). Oni se nalaze na različitim tkivima i krvnim žilama (15).

AT1 receptori djeluju kao vazokonstriktori te potiču otpuštanje vazopresina, aldosterona i endotelina. Smatra se da je vazodilatacija glavni mehanizam hipotenzivnog učinka nakon inhibicije aktivnosti ANG II (16).

### 1.3. Oksidativni stres

Oksidativni stres nastaje zbog štetnog djelovanja reaktivnih kisikovih radikala. Posljedično tome dolazi do poremećaja u ravnoteži oksidacijsko-redukcijskih procesa u biološkim sustavima. Pod utjecajem oksidativnog stresa može doći do promjene u stanicama, tkivima i organima što može uzrokovati oštećenje funkcije biomolekula. Oksidativni stres uzrokuje oštećenja koja mogu poremetiti prijenos signala u stanicama, homeostazu iona, gensku transkripciju i uzrokovati brojne poremećaje (17). Pod utjecajem visokih razina oksidativnog stresa može doći do staničnih ozljeda i oštećenja tkiva do čega dolazi ako kapacitet nastalih slobodnih radikala prelazi mogućnosti obrambenog sustava (2). Prekomjerna produkcija reaktivnih kisikovih spojeva koja je posljedica poremećaja redukcijsko-oksidacijskih procesa u biološkim sustavima može dovesti do nastanka oksidativnog stresa (18). Dokazano je kako oksidativni stres može doprinijeti razvoju mnogih bolesti kao što su hipertenzija, ishemija, ateroskleroza, neurološki poremećaji (19). Slobodni kisikovi radikali nestabilne su molekule koje imaju visoku reaktivnost, a nastaju kao rezultat staničnog metabolizma.

Prekomjerna koncentracija NaCl-a uzrokuje porast krvnog tlaka, poremećaj mikrocirkulacije i nastanak slobodnih radikala te može dovesti do nastanka oksidativnog stresa. Mikrocirkulacija služi za regulaciju krvotoka i perfuziju tkiva. Ukoliko dođe do neravnoteže između proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva i antioksidativnog obrambenog mehanizma dolazi do nastanka oksidativnog stresa (2). Pri visokim razinama oksidativnog stresa javlja se masovno stvaranje proupalnih citokina te se pobuđuje imunološki sustav. Stanice imunološkog sustava stvaraju slobodne kisikove radikale koji oštećuju normalno tkivo domaćina. Pri velikoj izloženosti slobodnim kisikovim radikalima dolazi do aktivacije upalnog odgovora te povećanja izražaja promotora oksidativnog stresa i adhezijskih molekula (2). Utjecaj oksidativnog stresa na organizam ovisi o mjestu i intenzitetu stvaranja antioksidansa, vrsti oksidansa i mogućnosti oporavka organizma. Laboratorijskim metodama može se izmjeriti ukupna razina oksidativnog stresa ili antioksidativnog kapaciteta te mjerenjem izražaja i koncentracije antioksidativnih enzima utvrditi oksidativni status (20). Također, dosadašnja istraživanja dokazala su kako supresija RAS-a visokim unosom soli može uzrokovati poremećenu dilataciju ovisnu o endotelu koja je uzrokovana povećanjem oksidativnog stresa i promjenama u nastanku metabolita arahidonske kiseline (21).

### 1.3.1. Antioksidativni enzimi

Kako bi se spriječio štetan učinak uzrokovan oksidativnim stresom postoji nekoliko mehanizama obrane organizma. Antioksidativni sustav suprotstavlja se oštećenju uzrokovanom reaktivnim kisikovim radikalima pomoću primarnih antioksidativnih enzima kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GPx) (22). Najvažniji u borbi protiv reaktivnih vrsta su antioksidativni enzimi koji djeluju na njihovo uklanjanje (23). Superoksid dismutaza (SOD) najvažniji je antioksidativni enzim koji sudjeluje u procesu anaerobnog metabolizma (23). Aktivnost superoksid dismutaze značajno utječe na vaskularne promjene akutnog i kroničnog oksidativnog stresa. Poznato je nekoliko oblika superoksid dismutaze, Cu/Zn-SOD1 koji je izražen u svim stanicama i krvnim žilama, Mn-SOD ili SOD2 koji predstavlja prvu liniju obrane protiv oksidativnog stresa, njegov pojačan izražaj poboljšava funkciju endotela (2). EC-SOD ili SOD3 koji sudjeluje u borbi protiv različitih bolesti kao što su ateroskleroza, hipertenzija i dijabetes.

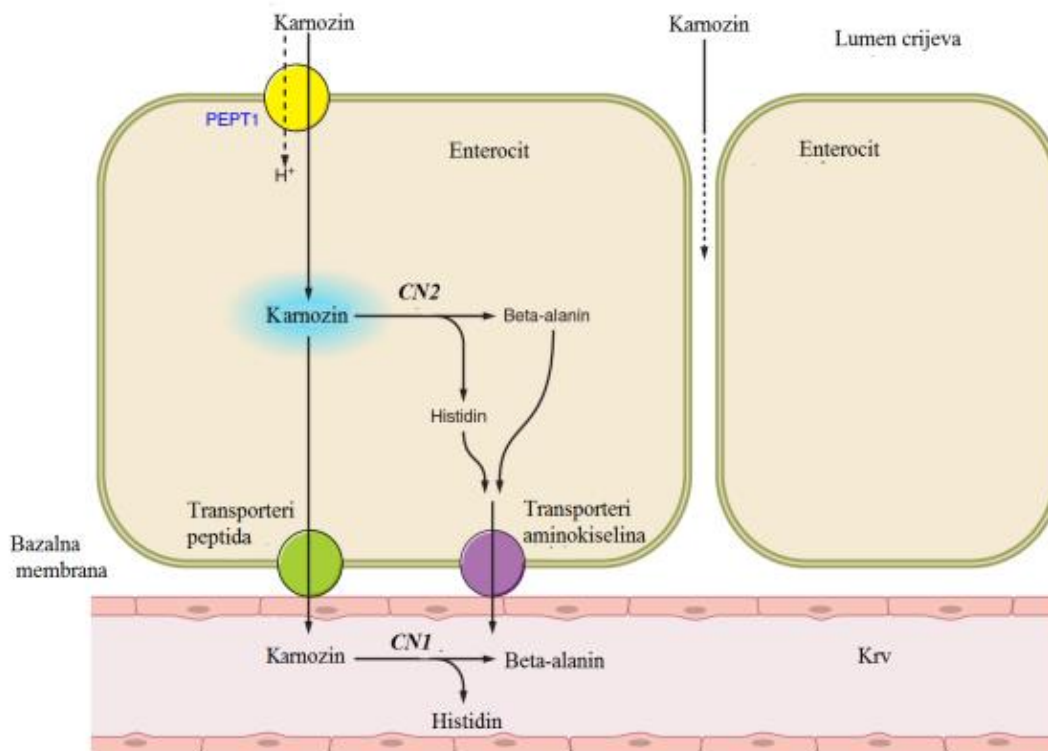
### 1.4. Karnozin

Karnozin (CAR;  $\beta$ -alanil-L-histidin) je dipeptid koji je građen od aminokiselina L-histidina i  $\beta$ -alanina. U najvećim koncentracijama karnozin se nalazi u poprečnoprugastim mišićima i mozgu (24). Karnozin ima protuupalno, antioksidativno djelovanje i djeluje kao "čistač" ROS-a. Dokazano je kako smanjuje razinu peroksidacije lipida i lipoproteina niske gustoće u serumu starih štakora. Dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je kako ovaj dipeptid ima korisna antioksidativna svojstva, svojstva fiziološkog pufera, pronalaska i smanjenja aktivnosti radikala (25). Karnozin može obavljati više funkcija u istoj vrsti tkiva no njegova uloga nije jednaka u svim tkivima u kojima se endogeno nalazi (25). U poprečno-prugastim mišićima ima najviše karnozina zbog čega je visok izražaj gena za karnozin-sintetazu (26). Karnozin pokazuje i značajnu pufersku aktivnost, ima važnu ulogu u fiziološkim procesima, regulira unutarstanični pH, sprječava oksidaciju i sprječava normalan prijenos iona (27). Također dokazano je kako ima neuroprotektivan učinak, može reagirati s potencijalno štetnim nusproduktima glikolize. Svojom antioksidativnom funkcijom štiti makromolekule, proteine, nukleinske kiseline i lipide (28). Fiziološka uloga karnozina nije još u potpunosti shvaćena, no dokazana su njegova korisna protuupalna i neuroprotektivna svojstva.

### 1.4.1. Biosinteza i metabolizam karnozina

Karnozin se sintetizira vezanjem aminokiselina L-histidina koji daje biološku aktivnost i  $\beta$ -alanina koji ima regulatornu funkciju, uz pomoć karnozin sintetaze kao katalizatora (29). L-histidin je esencijalna aminokiselina koja je prisutna u serumu i služi kao proteinogeni prekursor s bioaktivnim svojstvima. Dok se  $\beta$ -alanin smatra neproteinogenim prekursorom karnozina (30).

Karnozin se sintetizira u mišićnim i glija stanicama. Apsorbira se u tankom crijevu gdje se u enterocitima odmah hidrolizira ili putuje krvlju do mišića jetre i bubrega (**Slika 2**). Metabolički putevi u razgradnji karnozina vrlo dobro su regulirani. Razgradnja karnozina odvija se u serumu i tkivima započinje procesom hidrolize koju katalizira enzim karnozinaza. Postoje dvije izoforme enzima karnozinaze, serumska karnozinaza (CN1) i citosolna nespecifična karnozinaza (CN2). Karnozin ulazi u krvotok pomoću molekula oligopeptid transporter 1 (PEPT1) i 2 (PEPT2) te peptid/histidin transporter 1 (PHT1) i 2 (PHT2) (30). Ako je potreban karnozin se troši u tkivima, u suprotnim uvjetima se hidrolizira na  $\beta$ -alanin i L-histidin pomoću enzima karnozinaze.



**Slika 1.** Transport i apsorpcija karnozina u krvotok (Pribavljeno iz (30) uz dozvolu autora)

#### **1.4.2. Antioksidativna svojstva karnozina**

Brojnim do sada provedenim istraživanjima dokazano je kako karnozin ima korisna antioksidativna svojstva koja su važna u obrani od oksidativnog stresa. Antioksidativno djelovanje karnozina posredovano je različitim mehanizmima koji uključuju uklanjanje ROS i peroksilnih radikala. Antioksidativna svojstva karnozina omogućuju mu smanjenje negativnih posljedica peroksidacije lipida i ostalih mehanizama oksidativnog stresa. Antioksidativno djelovanje karnozina očituje se njegovom sposobnošću uklanjanja štetnih tvari (31). Antioksidativna svojstva karnozina rezultat su njegove sposobnosti vezanja metalnih iona i uklanjanja nekoliko vrsta slobodnih radikala (slobodni kisik, vodikov peroksid, peroksidni i hidroksidni radikali) (32).

**2. HIPOTEZA**

Suplementacija karnozina poboljšat će vaskularnu funkciju narušenu visokim unosom soli kod Sprague-Dawley štakora.

### 3. CILJEVI

Cilj istraživanja je:

1. Istražiti učinak suplementacije karnozina na vaskularnu funkciju ispitivanjem acetilkolinom izazvane dilatacije izoliranih aortnih prstenova.

### 4. MATERIJALI I METODE

#### 4.1. Ustroj studije

Provedeno istraživanje eksperimentalna je studija na izoliranim krvnim žilama pokusnih laboratorijskih životinja (Sprague-Dawley štakorima). Etičko povjerenstvo za istraživanja Medicinskog fakulteta Osijek odobrilo je ovo istraživanje (KLASA: 602-04/23-08/03, URBROJ: 2158-61-46-23-35).

#### 4.2. Materijali

U istraživanju su korištene aorte Sprague-Dawley štakora oba spola u dobi od 8-10 tjedana starosti. Štakori su nasumično podijeljeni u 4 skupine:

- 1) KONTROLNA SKUPINA (CTRL) – zdravi netretirani štakori
- 2) HSD – štakori koji su kroz 7 dana konzumirali hranu sa visokim udjelom kuhinjske soli (4 % NaCl-a u svom sastavu)
- 3) CTRL + CAR – štakori koji su tijekom 7 dana konzumirali uobičajenu hranu sa niskim udjelom kuhinjske soli (0,4 % NaCl-a u svom sastavu) i kroz oralnu sondu dobivali 150 mg/kg suplementacije karnozina
- 4) HSD + CAR – štakori koji su kroz 7 dana konzumirali hranu sa visokim udjelom kuhinjske soli (4 % NaCl-a u svom sastavu) i kroz oralnu sondu (kanilu) dobivali 150 mg/kg tjelesne mase suplementacije karnozina

#### 4.3. Metode

Uzgoj životinja provodio se u Vivariju Medicinskog fakulteta Osijek, a istraživanje učinka suplementacije karnozina na vaskularnu funkciju ispitivanjem acetilkolinom izazvane dilatacije izoliranih aortalnih prstenova u Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije Medicinskog fakulteta Osijek.

Provedeni eksperimentalni postupci usklađeni su sa europskim smjernicama za primjenu i skrb laboratorijskih životinja (direktiva 86/609). Poduzeti su svi postupci kako bi se spriječila patnja životinja. Sva istraživanja odobrena su od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek, Državnog etičkog povjerenstva (EPP355/2022) te Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (#525-09/566-22-3).



#### 4.3.1. Dijetni protokol

Istraživanje se sastoji od funkcionalnih *in vitro* pokusa na izoliranim krvnim žilama. Nakon dijetnog protokola, uobičajena prehrana (0,4 % NaCl-a u svom sastavu) sa ili bez suplementacije karnozina (150 mg/kg tjelesne mase), hrana sa visokim udjelom NaCl-a (4 % NaCl-a u svom sastavu) sa i bez suplementacije karnozina (150 mg/kg tjelesne mase) žrtvovane su životinje i izolirane aorte za potrebe funkcionalnih studija za procjenu vaskularne funkcije (izolirani aortalni prstenovi).

#### 4.3.2. Izolacija aortalnih prstenova

Pokusi su provedeni na izoliranim aortalnim prstenovima. Kao uzorak za aortalne prstenove koristila se torakalna aorta Sprague-Dawley štakora. Štakori su anestetizirani kombinacijom ketamina 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2 ml, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma) te je potom napravljena torakotomija, nakon čega je izvađena torakalna aorta i odložena u Petrijevu zdjelicu s oksigeniranom Krebs – Henseleitovom otopinom (sastav otopine u mmol/L: 120 NaCl; 4,8 KCl; 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5 CaCl<sub>2</sub>; 1,2 MgSO<sub>4</sub>; 25,5 NaHCO<sub>3</sub>; 10 glukoza i 0,02 EDTA). Sastojci su odvagani za otopinu prema **Tablici 1**.

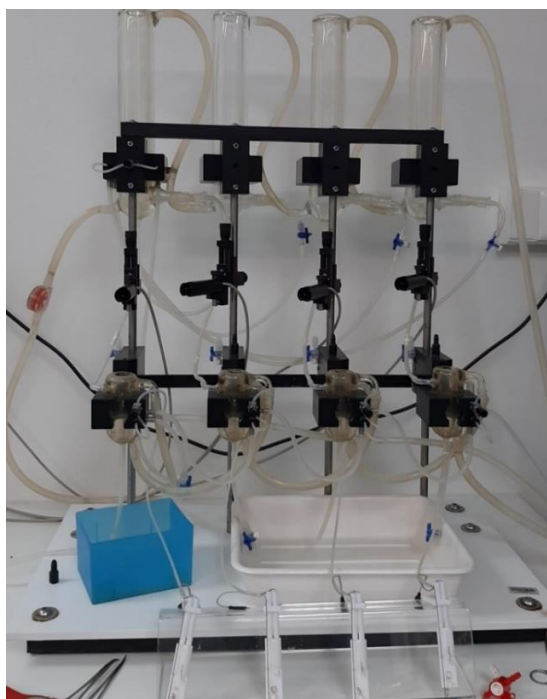
Prvo je u Erlenmayerovu tikvicu dodano 2 l deionizirane vode i ubačen magnetič te je sve postavljeno na magnetsku miješalicu. Postupno su dodani svi sastojci te je otopina miješana na magnetskoj miješalici 10ak minuta dok se svi sastojci nisu otopili.

**Tablica 1.** Priprema Krebs – Henseleitove otopine

Sastojak	Koncentracija/mM	Masa/g	Masa/g
Deionizirana voda	-	2 L	4 L
NaCl	113	13,79	27,580
KCl	4,7	0,701	1,402
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	2,5	0,735	1,470
EDTA	0,026	0,0152	0,0304
MgSO <sub>4</sub> × 6H <sub>2</sub> O	1,2	0,593	1,185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2	0,327	0,653
NaHCO <sub>3</sub>	22	3,698	7,395
Glukoza	-	3,998	7,999

### 4.3.3. Stabilizacija krvne žile

Izolirani aortalni prstenovi širine 3 – 4 mm stavljani su u organske bazenčice (10 ml zapremine) s konstantno grijanom i oksigeniranom Krebs – Henseleitovom otopinom ( $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ) pomoću dvije paralelne čelične žice provučene kroz lumen prstena. Jedna žica učvršćena je za dno držača koji je uranjan u bazenčić kupelji. Druga žica povezana na pretvarač vlačne sile preko kojega je mjerena tonus žilnog prstena (**Slika 3**). Nakon što su aortalni prstenovi postavljeni u tkivne kupelji i spojeni sa transducerima, prenapregnuti su sa 2 g (20 mN) sile. Nakon toga su ostavljeni 45 do 60 minuta da se stabiliziraju. Aortalni prstenovi su u to vrijeme izuzetno nestabilni zbog stresa kojeg su doživjeli tijekom preparacije aorte te montiranja na sustav što se očituje značajnim otklonima od postavljene sile prenaprežanja, stoga su povremeno vraćeni na +2 g te je svakih 15 min izmijenjena otopina u tkivnoj kupelji. Stabilizacija krvne žile (aortnog prstena) očitovana se kontinuiranom vrijednostima sile te je to bio znak za početak pokusa. Tijekom cijelog pokusa nužno je bilo obratiti pozornost na optimalnu oksigenaciju kupelji koja se može regulirati vijkom na prednjoj strani držača kupelji. Pretvarač vlačne sile spojen je na pojačalo i analogno/digitalni pretvarač pomoću kojega je praćen grafički prikaz tijeka pokusa na ekranu računala.



**Slika 2.** Sustav komorica za izolirane organe sa pretvaračem vlačne sile preko kojega je mjerena tonus žilnog prstena (izvor: original autorice rada)

#### 4.3.4. Inicijalni prekontrakcijski test

Inicijalni prekontrakcijski test provodi se radi provjere vitalnosti krvne žile. Tri uzastopna puta u bazenčić se dodaje 200  $\mu$ l 3 M KCl-a. Nakon treće aplikacije ispire se 3 puta.

#### 4.3.5. Testiranje intaktnosti i funkcije endotela

Funkcija i intaktnost endotela procjenjuju se mjerenjem vazodilatacijskog odgovora krvne žile (aortnog prstena) na acetilkolin. Prije primjene tvari s vazodilatirajućim učinkom potrebno je krvnu žilu kontrahirati, za što je korišten noradrenalin ( $10^{-7}$  M). Za ispitivanje intaktnosti endotela korištena je jedna doza acetilkolina ( $10^{-6}$  M), dok je za procjenu funkcije endotela korišten slijed koncentracija acetilkolina ( $10^{-9}$  –  $10^{-5}$  M).

Prstenovi su prekontrahirani pomoću NA ( $10^{-7}$  M), a zatim je dodan acetilkolin u koncentracijama od  $10^{-9}$  M –  $10^{-5}$  M u razmaku od dvije minute kao provjera produkcije NO-a i dilatacijskog odgovora ovisnog o endotelu. Na istim aortalnim prstenovima provjeren je dilatacijski odgovor neovisan o endotelu i funkcija glatkih mišićnih stanica izravnim dodavanjem dušičnog oksida. Nakon prekontraksije noradrenalinom dodan je natrijev nitroprusid (SNP, Sodium Nitroprusside Dihydrate, 25 g, Fluka) (izravni donator NO-a) u dozi od  $10^{-10}$  M do  $10^{-4}$  M.

#### 4.3.6. Priprema lijekova za istraživanje

Korišteni lijekovi u istraživanju na izoliranim krvnim žilama prikazani su u **Tablici 2**. Lijek se prilikom aplikacije u bazenčić dodatno razrijedio. Faktor razrjeđenja (F) proizlazi iz omjera volumena bazenčića ( $V_b$ ) i volumena otopine lijeka koji apliciramo u bazenčić ( $V_a$ ). Koncentraciju lijeka u otopini koju pripremamo ( $C_p$ ) izračunavamo tako da koncentraciju lijeka koju želimo postići u bazenčiću ( $C_b$ ) pomnožimo sa faktorom razrjeđenja (F). Volumen bazenčića ( $V_b$ ) našeg sustava je 10 ml, stoga ako je aplicirano 100  $\mu$ l otopine lijeka ona će se pri tome razrijediti još 100 puta ( $F_R = 10\ 000\ \mu\text{l}/100\ \mu\text{l}$ ). Iz toga proizlazi da koncentracija otopine lijeka ( $C_p$ ) koju pripremamo mora biti 100 puta veća od one koncentracije koju želimo postići u bazenčiću ( $C_p = 100 \times C_b$ ).

**Tablica 2.** Korišteni lijekovi i njihove koncentracije

Lijek/aktivna tvar	Mr (g/L)	Koncentracija za pripremu lijeka	Koncentracija nerazrijeđenog lijeka u bazenčiću	Koncentracija u pokusu
KCl	74,56	3 M	60 mM (200 $\mu$ l)	60 mM
Noradrenalin	205,0	10 mM	$10^{-4}$	$1000 \times (10^{-7})$
Acetilkolin	181,7	10 mM	$10^{-4}$	$100 \times (10^{-6})$

#### 4.4. Statističke metode

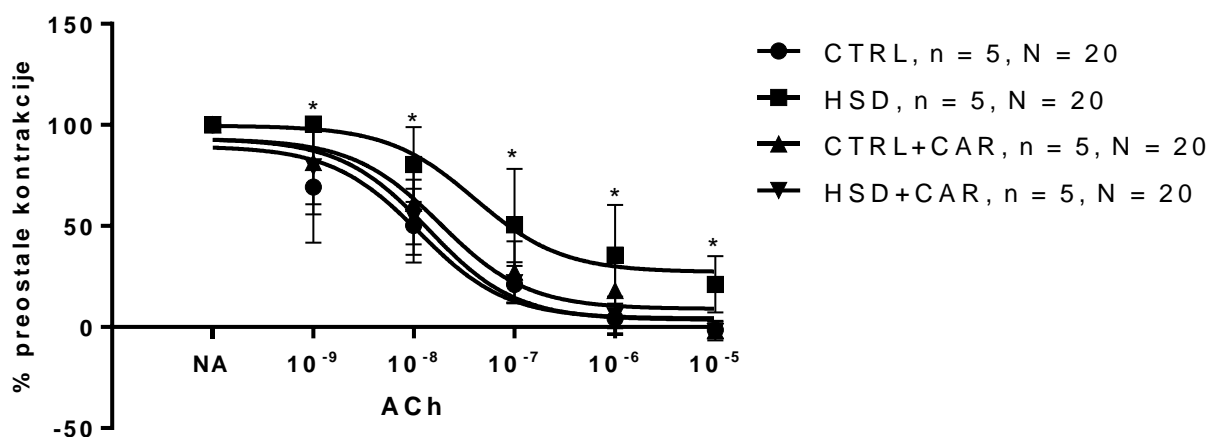
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Relaksacija uzrokovana acetilkolinom i natrijevim nitroprusidom, izražena je u postotku u odnosu na maksimalnu kontrakciju. Za statističku analizu promjena u vazodilataciji aortalnih prstenova u kontroliranim uvjetima i pri primjeni acetilkolina ili natrijevog nitroprusida (SNP) korištena je dvosmjerna analiza varijanci (2-way ANOVA test) s post hoc Bonferroni testom. Razina statističke značajnosti određena je sa  $p < 0,05$ . Za statističku analizu upotrebljen je statistički program SigmaPlot 11.2 (Systat Software, Inc., Chicago, SAD). Za grafički prikaz dobivenih rezultata korišten je GraphPad Prism5 (San Diego, CA, SAD).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Rezultati na aortalnim prstenovima

#### 5.1.1. Bazični odgovor na acetilkolin

Primjenom acetilkolina provjerena je razina očuvanosti i funkcija endotela. Primjena acetilkolina u koncentracijama  $10^{-9}$  do  $10^{-5}$  M u sve četiri grupe štakora izazvala je vazodilatacijski odgovor. Usporedbom rezultata između ispitivanih skupina dokazana je poremećena ACh - inducirana relaksacija aortalnih prstenova u skupini HSD štakora koji su kroz 7 dana konzumirali hranu sa visokim udjelom kuhinjske soli od 4 % NaCl-a u svom sastavu u usporedbi s kontrolnom skupinom (CTRL) zdravih netretiranih štakora. (Slika 4).



\* $p < 0.05$  HSD+CAR u usporedbi s CTRL, CTRL+CAR, HSD+CAR

**Slika 3. Bazični odgovor aortalnih prstenova u testiranim skupinama na primjenu acetilkolina u koncentracijama  $10^{-9}$  do  $10^{-5}$  M.** Rezultati su prikazani kao postotak preostale kontrakcije nakon primjene noradrenalina u koncentraciji  $10^{-7}$  M  $\pm$  SD. Relaksacija uzrokovana acetilkolinom izražena je u postotku u odnosu na maksimalnu kontrakciju. Razina statističke značajnosti određena je sa  $p < 0,05$ . CTRL - kontrola; zdravi netretirani štakori, CAR - karnozin, HSD - štakori hranjeni hranom s visokim udjelom kuhinjske soli. N - broj prstena – 4 aortna prstena po štakoru, n predstavlja broj štakora.

Utvrđena je statistički značajna razlika u bazičnom odgovoru u HSD skupini štakora u odnosu na CTRL i preostale skupine. Također, u HSD skupini utvrđena je smanjena osjetljivost na

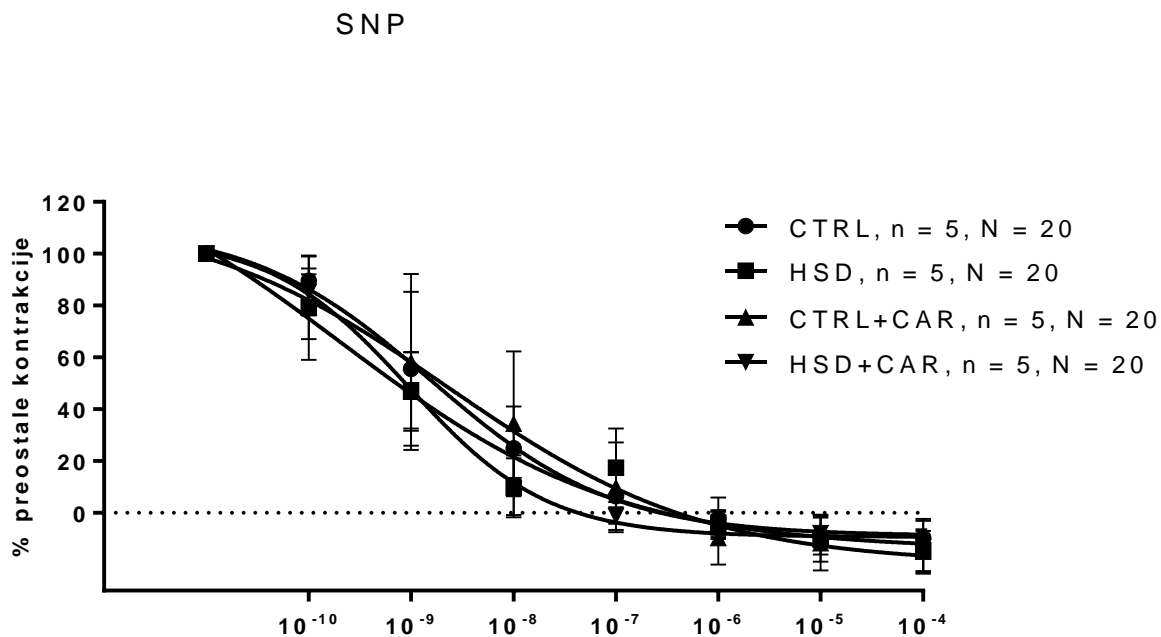
ACh što pokazuje  $\text{LogEC}_{50}$  vrijednost (**Tablica 3**).  $\text{EC}_{50}$  (polovica maksimalne učinkovite koncentracije) predstavlja koncentraciju ACh koja izaziva odgovor na pola puta između bazičnog odgovora i maksimuma u tablici. U HSD skupini utvrđena je statistički značajna razlika koja pokazuje osjetljivost na ACh u odnosu na ostale skupine štakora što pokazuje  $\text{EC}_{50}$  vrijednost (**Tablica 3**). Nije utvrđena razlika u relaksacijskom odgovoru na ACh u aortama štakora koje su primale oralni nadomjestak karnozina (CTRL + CAR, HSD + CAR) u odnosu na kontrolnu skupinu (CTRL) kao ni u osjetljivosti na ACh. U odnosu na HSD skupinu u aortama karnozinskih štakora pokazana je značajno poboljšana relaksacija u odgovoru na ACh.

**Tablica 3. Vrijednosti  $\text{LogEC}_{50}$  i  $\text{EC}_{50}$  koje pokazuju osjetljivost na ACh**

Skupina	$\text{LogEC}_{50}$ (CI)	$\text{EC}_{50}$
● CTRL	-7,946 (-8,146 do -7,747)	1,131e-008
■ HSD	-7,393 (-7,669 do -7,116)*	4,050e-008*
▲ CTRL+CAR	-7,736 (-7,953 do -7,520)	1,835e-008
▼ HSD+CAR	-7,857 (-8,054 do -7,659)	1,391e-008

### 5.1.2. Endotel- neovisna relaksacija

Usporedbom rezultata na aortalnim prstenovima provjeren je dilatacijski odgovor neovisan o endotelu i funkcija glatkih mišićnih stanica izravnim dodavanjem dušičnog oksida. Nakon prekontrakcije noradrenalinom i dodatka SNP-a izravnog donora NO-a pokazano je kako nema statistički značajne razlike u odgovoru na SNP među testiranim skupinama. Sve izolirane krvne žile imale očekivani vazodilatacijski odgovor (**Slika 5**).



**Slika 4. Reaktivnost aortnih prstenova na primjenu SNP-a u koncentracijama  $10^{-10}$  do  $10^{-4}$  M.** Rezultati su prikazani kao postotak preostale koncentracije nakon primjene noradrenalina u koncentraciji  $10^{-7}$  M  $\pm$  SD. Razina statističke značajnosti određena je sa  $p < 0,05$ . CTRL - kontrola; zdravi netretirani štakori, CAR - karnozin, HSD - štakori hranjeni hranom s visokim udjelom kuhinjske soli. N - broj prstena – 4 aortna prstena po štakoru, n predstavlja broj štakora.

## 6. RASPRAVA

Cilj ove studije bio je ispitati učinak karnozina na vaskularnu funkciju nakon visokog unosa soli. Do sada su provedene brojne studije koje su proučavale utjecaj visokog unosa soli na oštećenje vaskularne funkcije i povećanje razine oksidativnog stresa (2, 21) te antioksidativna svojstva karnozina (33). Međutim, nije utvrđen učinak karnozina na razinu oksidativnog stresa i vaskularnu funkciju nakon visokog unosa soli.

Ovim istraživanjem pobliže smo istražili učinak suplementacije karnozinom na vaskularnu funkciju Sprague-Dawley štakora ispitujući acetilkolinom potaknutu dilataciju izoliranih aortalnih prstenova kojom je utvrđena poremećena ACh inducirana relaksacija aortalnih prstenova u skupini HSD štakora što je u skladu s našim i drugim prijašnjim istraživanjima koja su pokazala poremećenu vaskularnu reaktivnost nakon visokog unosa soli uzrokovanu povećanim oksidativnim stresom (44, 48, 49). Usporedbom rezultata na aortalnim prstenovima provjeren je dilatacijski odgovor neovisan o endotelu i funkcija glatkih mišićnih stanica izravnim dodavanjem dušikovog oksida čime je dokazano kako nema značajne razlike u odgovoru na SNP među testiranim skupinama što je također u skladu s našim prijašnjim rezultatima (50, 51). Nadalje, rezultati su pokazali opravak, odnosno poboljšanu relaksaciju aorti štakora koji su primali nadomjestak karnozina uz visoki unos soli. Prema našim saznanjima, do sada nije ispitivan antioksidativni učinak karnozina na krvne žile, međutim, postoji veliki broj istraživanja koja mogu potvrditi kako karnozin sadržava važna svojstva za obranu organizma od oksidativnog stresa (34). Studije pokazuju da karnozin djeluje izravnim antioksidativnim mehanizmom (33, 35). Dosadašnjim istraživanjima dokazano je kako svojom posebnom kombinacijom antioksidativnih i antiglikacijskih svojstava, karnozin može ublažiti stanični oksidativni stres i može inhibirati unutarstanično stvaranje reaktivnih vrsta kisika i reaktivnih vrsta dušika (36). Brojne kliničke studije proučavale su terapijski potencijal karnozina za liječenje bolesti poput dijabetesa, neuroloških poremećaja i starenja. Jedan od značajnih učinaka karnozina uočili su Prokopieva VD i suradnici (37). Njihova studija prikazala je učinkovitost primjene karnozina u različitim patologijama. Posebna pozornost posvećena je pitanjima primjene karnozina kod neuroloških i psihičkih bolesti te kod fizioloških stanja praćenih aktivacijom slobodno-radikalnih procesa i nastankom oksidativnog stresa (37). Isto tako Evran B i suradnici svojim istraživanjem dokazali su obećavajuću uporabu karnozina u metaboličkom sindromu, stanju praćenom oksidativnim stresom i upalom koje dovodi do razvoja dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti (38). Rezultati istraživanja na štakorima koje su proveli Nagai i suradnici pokazali su kako karnozin ubrzava metaboliziranje



kortizola i noradrenalina otpuštenih u krv životinja pod stresom pokazujući na taj način posrednički učinak karnozina. Također, još jednim značajnim istraživanjem s korištenjem posebno uzgojene linije miševa koji brzo stare, dokazano je protektivno djelovanje karnozina (39). Istraživanjem je utvrđeno kako uključivanje karnozina u njihovu prehranu dovodi do odgode starenja životinja zbog povećanja njihovog antioksidativnog statusa (39). Također, postoje podaci koji pokazuju da karnozin ima nefroprotektivna svojstva (40). Rezultati provedenih studija o ulozi karnozina u bubrežnim bolestima, pokazali su protektivna svojstva karnozina posebno u akutnom zatajenju bubrega izazvanom ishemijom, u dijabetičkoj nefropatiji, nefrotoksičnosti i regulaciji krvnog tlaka (41), a sve od navedenog usko je povezano s normalnom vaskularnom i endotelnom funkcijom.

U fiziološkim uvjetima velik broj antioksidativnih molekula štiti krvne žile od štetnih učinaka povišene razine reaktivnih kisikovih spojeva. Jedan od važnijih štetnih učinaka oksidativnog stresa je disfunkcija endotela koja predstavlja snažan prognostički čimbenik višestrukih kardiovaskularnih bolesti poput moždanog udara, ishemije miokarda, hipertenzije i iznenadne moždane smrti (42). Prediktivni čimbenik razvoja endotelne disfunkcije smanjena je dostupnost NO kojeg oslobađaju i proizvode endotelne stanice. Također, povišena razina ROS-a može poremetiti normalne mehanizme prijenosa signala u endotelnim i krvožilnim stanicama i može potaknuti stvaranje dodatnog ROS-a (43). Prethodne studije provedene u našem laboratoriju koje su proučavale utjecaj oksidativnog stresa na vaskularnu funkciju ukazuju na smanjenu osjetljivost na različite vazodilatacijske podražaje (2, 44). Studija koja je proučavala utjecaj visokog unosa soli pokazala je kako visok unos soli dovodi do pojave imunoloških bolesti praćene upalnim odgovorom (45). Također, potiče nastanak hipertenzije jednog od najvažnijih čimbenika rizika koji dovodi do razvoja kardiovaskularnih bolesti (43). Međutim, najnovije animalne i humane studije pokazuju da promjene i oštećenja nastala na endotelu, pod utjecajem visokog unosa soli, pojavljuju se prije nastanka hipertenzije (2). Dakle i kratkotrajna konzumacija visokih koncentracija soli oštećuje krvne žile bez vidljivih promjena (46). Iz tog razloga vrlo je važno naglasiti kako je smanjenje NO snažno povezano s povećanim razinama reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) koje stvara NAD(P)H oksidaza, ksantin oksidaza ili nevezana endotelna NO sintaza unutar vaskularne stjenke, što dovodi ne samo do uklanjanja NO, već i do poremećaja nekih signalnih putova koji posreduju njegovu proizvodnju (47). Endotel gubi svoju zaštitnu ulogu u prisutnosti kardiovaskularnih čimbenika rizika. Istraživanja su dokazala kako povećana razina oksidativnog stresa može doprinijeti razvoju endotelne disfunkcije aktivirajući endotelne stanice, isto tako može se narušiti homeostaza iona, genska transkripcija i prijenos signala u stanicama (44, 48).

Iako ovom studijom nismo istraživali razinu oksidativnog stresa nakon visokog unosa soli, na temelju navedenih prethodnih istraživanja temeljimo zaključak da karnozin ima pozitivan učinak na vaskularnu funkciju štakora na dijeti s visokim udjelom soli praćenu kroz promjenu reaktivnosti, odnosno relaksacije izoliranih aortnih prstenova na acetilkolin najvjerojatnije djelujući antioksidativno.

## 7. ZAKLJUČAK

Glavni zaključci ove studije su:

1. Dijeta sa visokim unosom soli narušava acetilkolinom-izazvanu endotel-ovisnu relaksaciju izoliranih aortnih prstenova Sprague-Dawley štakora
2. Oralna suplementacija karnozina oporavlja vaskularnu reaktivnost izoliranih aortnih prstenova narušenu visokim unosom soli.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Istražiti učinak suplementacije karnozina na vaskularnu funkciju ispitivanjem acetilkolinom izazvane dilatacije izoliranih aortnih prstenova.

**Nacrt studije:** Pokusno (eksperimentalno) istraživanje

**Materijali i metode:** Zdravi štakori Sprague-Dawley starosti 8-10 tjedana podijeljeni su u četiri skupine (3 štakora po skupini) – CTRL (kontrolna skupina 0,4 % NaCl-a), HSD (dijeta s visokim udjelom soli 4 % NaCl-a u prehrani tijekom 7 dana), CTRL + CAR (oralna suplementacija karnozinom, 150 mg/kg/dan tijekom 7 dana), HSD + CAR skupina (HSD i suplementacija karnozina). Odgovor na ACh i SNP (natrijev nitro-prusid) proučavan je u izoliranim aortnim prstenovima kontrahiranim noradrenalinom (Isolated Organ Bath (Experimetria LTD)). Svi eksperimentalni postupci u skladu su s Europskim smjernicama za brigu i korištenje laboratorijskih životinja (direktiva 86/609) i odobreni su od strane lokalnih i nacionalnih etičkih odbora (#2158-61-46-22-14, EP355/2022).

**Rezultati:** Rezultati su pokazali poremećenu ACh - induciranu relaksaciju aortnih prstenova u skupini HSD štakora koji su kroz 7 dana konzumirali hranu sa visokim udjelom kuhinjske soli od 4 % NaCl-a u svom sastavu u usporedbi s kontrolnom skupinom (CTRL) zdravih netretiranih štakora. Dokazana je obnovljena relaksacija nakon nadomjestka karnozina. Pokazano je kako nema razlika u odgovoru na SNP među testiranim skupinama.

**Zaključak:** Suplementacija karnozina ima pozitivan učinak i poboljšava vaskularnu funkciju Sprague-Dawley štakora na dijeti sa visokim udjelom soli.

**Ključne riječi:** aortni prstenovi; karnozin; oksidativni stres; štakori

## 9. SUMMARY

### **The effect of carnosine supplementation on the vascular function of isolated aortic rings of Sprague-Dawley rats on a high-salt diet**

**Objectives:** To investigate the effect of carnosine supplementation on vascular function by examining acetylcholine-induced dilation of isolated aortic rings.

**Study design:** Experimental research

**Materials and Methods:** Healthy Sprague-Dawley rats (8 - 10 weeks old) were divided in four groups (3 rats per group) – CTRL (control group, 0,4 % NaCl), HS (high salt diet, 4 % NaCl in diet for 7 days), CTRL + CAR (oral carnosine supplementation, 150 mg/kg/day for 7 days) and HS + CAR group (HS and carnosine supplementation). Response to ACh and SNP (sodium nitro-prusside) was studied in isolated norepinephrine precontracted aortic rings (Isolated Organ Bath (Experimetria LTD). All experimental procedures conformed to the European Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (directive 86/609) and were approved by the local and national Ethical Committees (#2158-61-46-22-14, EP355/2022).

**Results:** The results showed impaired Ach - induced relaxation of aortic rings in the group of HS rats compared to the control group CTRL of healthy untreated rats. Restored relaxation after carnosine supplementation has been proven. There are no differences in the response to SNP among the tested groups.

**Conclusion:** Carnosine supplementation has a positive effect and improve vascular function in Sprague-Dawley rats fed with a high-salt diet.

**Keywords:** antioxidant enzymes; aortic rings; carnosine; oxidative stress; rats

**10. LITERATURA**

1. Čavka A, Tadžić R, Grizelj I, Unfirer S, Mihaljević Z, Mihalj M i sur. Endotelna funkcija-funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. *Medicinski Vjesnik*. 2012;44(1-4):135-146.
2. Čosić A. Uloga oksidativnog stresa u razvoju poremećenog vaskularnog odgovora pod utjecajem visokog unosa natrijeva klorida kod Sprague-Dawley štakora (doktorska disertacija). Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera, Medicinski fakultet Osijek; 2016.
3. Pedralli ML, Marschner R, Kollet D, Neto S, Eibel B, Tanaka H i sur. Different exercise training modalities produce similar endothelial function improvements in individuals with prehypertension or hypertension: a randomized clinical trial Exercise, endothelium and blood pressure. *Sci Rep*. 2020;10(1):7628.
4. Sevket Balta. Endothelial Dysfunction and Inflammatory Markers of Vascular Disease. *Curr Vasc Pharmacol*. 2021;19(3):243-249.
5. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*. 2004;93:105- 13.
6. Drenjancevic-Peric I, Jelakovic B, Lombard JH, Kunert MP, Kibel A, Gros M. HighSalt Diet and Hypertension: Focus on the Renin-Angiotensin System. *Kidney & blood pressure research*. 2011;34:1-11.
7. Vuković M. Utjecaj supresorskih doza angiotenzina II na promjenu genskog izražaja antioksidativnih enzima pri unosu visokih koncentracija soli kod Sprague-Dawley štakora (diplomski rad). Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, 2019.
8. Lucić S. Utjecaj Renin-Angiotenzin-Aldosteron sustava na metabolizam glukoze kod incidentaloma nadbubrežne žlijezde (diplomski rad). Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, 2019.
9. Knezović A, Kolobarić N, Drenjanjčević I, Mihaljević Z, Šušnjara P, Jukić I i sur. Role of Oxidative Stress in Vascular Low- Grade Inflammation Initiation Due to Acute Salt Loading in Young Healthy Individuals. *Antioxidants*. 2022. (međunarodna recenzija, članak, znanstveni).
10. Stupin A, Drenjančević I, Šušnjara P, Debeljak Ž, Kolobarić N, Mihaljević Z i sur. Is There Association between Altered Adrenergic System Activity and Microvascular Endothelial Dysfunction Induced by a 7-Day High Salt Intake in Young Healthy Individuals. *Nutrients*. 2021. (međunarodna recenzija, članak, znanstveni).

11. Stupin A, Drenjančević I, Rašić L, Čosić A, Stupin M. A Cross-Talk between the Renin-Angiotensin and Adrenergic System in Cardiovascular Health and Disease. *Southeastern European Medical Journal*. 2017;1:90-107 (pregledni rad, znanstveni).
12. Ljutić D, Jeličić I. Lijekovi koji djeluju na renin-angiotenzin-aldosteronski sustav. *Medicus*. 2010;19(2):139-146.
13. Kelčić M. Promjena serumske koncentracije oksidiranih lipoproteina niske gustoće i naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda pod utjecajem visokog unosa soli kod Sprague-Dawley štakora (diplomski rad). Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, 2019.
14. Drenjančević-Perić I, Lombard JH. Reduced angiotensin II and oxidative stress contribute to impaired vasodilation in Dahl salt-sensitive rats on low-salt diet. *Hypertension*. 2005;45(4):687-91.
15. Muray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
16. Jeong JH, Hanevold K, Harris RA, Kapuku G, Pollock J, Pollock D i sur. Angiotensin II receptor blocker attenuates stress pressor response in young adult African American. *J Clin Hypertens*. 2019;21(8):1191-1199.
17. Belupo. Oksidacijski stres, slobodni radikali i antioksidansi. Dostupno na adresi: <http://www.belupo.ba/Default.aspx?sid=4763>. Datum pristupa: 10.5.2023.
18. Puljak A, Perko G, Mihok D, Radašević H. Antioksidansi i oligoelementi u starijih ljudi. *Medix. Specijalizirani medicinski dvomjesečnik*. 2004:98-102.
19. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defence. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9-19.
20. Čosić A, Novak S, Jukić I, Stupin A, Mihaljević Z, Rašić L i sur. Primjena laboratorijskih metoda u dijagnosticiranju oksidativnog stresa na primjeru animalnog modela prekomjernog unosa soli. *Cardiologija Croatica* 3. 2017. (međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
21. Planinac J. Utjecaj kratkotrajnog visokog unosa soli na razinu staničnog oksidativnog stresa kod mononuklearnih stanica periferne krvi Sprague Dawley štakora (diplomski rad). Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2015.
22. Mihaljević Z. Utjecaj akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na reaktivnost krvnih žila kod zdravih Sprague-Dawley štakora (doktorska disertacija). Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera, Medicinski fakultet Osijek; 2018.

23. Šurina M. Antioksidacijski enzimi kao biomarkeri oksidacijskog stresa (završni rad). Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek; 2018.
24. Čalić M. Antioksidativna svojstva karnozina (završni rad). Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera, Medicinski fakultet Osijek; 2019.
25. Kawahara M, Tanaka K, Kato-Negishi M. Zinc, carnosine and neurodegenerative diseases. *Nutrients*. 2018;10:1–20.
26. Boldyrev A, Aldini G, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev*. 2013;93:1803–1845.
27. Kralik G, Kralik Z, Gvozdanić K. Carnosine – A polyfunctional, biologically active ingredient. *Agriculture* 2022.
28. Hipkiss AR, Cartwright SP, Bromley C, Gross SR, Bill RM. Carnosine: can understanding its actions on energy metabolism and protein homeostasis inform its therapeutic potential? *Chem. Cent. J*. 2013;7(1):38.
29. Chan KM, Decker EA, Feustman C. Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1994;34:403.
30. Jukić I, Kolobarić N, Stupin A, Matic A, Kozina N, Mihaljević Z i sur. Carnosine, Small but Mighty-Prospect of Use as Functional Ingredient for Functional Food Formulation. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(7):1037.
31. Ivančić A. Karnozin-eliksir mladosti: derivati, primjena i strukturna svojstva (završni rad). Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera, Medicinski fakultet Osijek; 2021.
32. Mihaljević M. Elektrokemijska karakterizacija L-karnozina (diplomski rad). Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera, Odjel za kemiju; 2017.
33. Solana-Manrique C, José Sanz F, Martínez-Carrión G, Paricio N. Antioxidant and Neuroprotective Effects of Carnosine: Therapeutic Implications in Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(5):848.
34. Agrawal A, Rathor R, Kumar R, Singh SN, Kumar B, Suryakumar G. Endogenous dipeptide-carnosine supplementation ameliorates hypobaric hypoxia-induced skeletal muscle loss via attenuating endoplasmic reticulum stress response and maintaining proteostasis. *IUBMB Life*. 2021.
35. Aldini G, Courten B, Regazzoni L, Gilardoni E, Ferrario G, Baron G i sur. Understanding the antioxidant and carbonyl sequestering activity of carnosine: direct and indirect mechanisms. *Free Radic Res*. 2021;55(4):321-330.



36. Budzen S, Rymaszewska J. Biološka uloga karnozina i njegove moguće primjene u medicini. *Adv Clin Exp Med*. 2013;22:739-744.
37. Prokopieva VD, Yarygina EG, Bokhan NA i sur. Primjena karnozina za smanjenje oksidativnog stresa kod različitih patologija. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;1-8.
38. Evran B, Karpuzoğlu H, Develi S i sur. Učinci karnozina na status prooksidansa-antioksidansa u srčanom tkivu, plazmi i eritrocitima štakora s infarktom miokarda izazvanim izoproterenolom. *Pharmacological Reports*. 2014;6(1):81-86.
39. Boldyrev AA, Stvolinsky SL, Fedorova TN, Suslina A. Karnozin kao prirodni antioksidans i geroprotektor: od molekularnih mehanizama do kliničkih ispitivanja. *Rejuvenation Research*. 2010;13(2-3):156-158.
40. Kiliš-Pstrusińska K, Postepy Higieny, Medycyny Doswiadczalnej. Karnozin, karnozinaza i bolesti bubrega. 2012;66:215-221.
41. Riedl E, Pfister F, Braunagel M i sur. Karnozin sprječava apoptozu glomerularnih stanica i gubitak podocita u dijabetičkih štakora. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2011;28(2):279-288.
42. Yoshimura S, Sakai N, Yamagami H, Uchida K i sur. Endovascular Therapy for Acute Stroke with a Large Ischemic Region. *N Engl J Med*. 2022;386(14):1303-1313.
43. Matic A, Jukic I, Stupin A, Baric L, Mihaljevic Z, Unfirer S i sur. 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;315(3):H718-H730.
44. Čosic A, Jukic I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljevic Z, Novak S i sur. 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;594(17):4917-31.
45. Yi B, Titze J, Rykova M, Feuerecker M, Vassilieva G, Nichiporuk I, i sur. Effect of dietary salt levels on monocytic cells and immune responses in healthy human subjects: a longitudinal study. *Transl Res*. 2017;166(1):103-110.
46. Alkadi H. A review on free radicals and antioxidants. *Infect Disord Drug Targets*. 2020;20(1):16-26.
47. Mihalj M, Matic A, Mihaljević Z, Barić L, Stupin A, Drenjančević I. Short-Term High-NaCl Dietary Intake Changes Leukocyte Expression of VLA-4, LFA-1, and Mac-1 Integrins in Both Healthy Humans and Sprague-Dawley Rats: A Comparative Study. *Mediators Inflamm*. 2019.

48. Kozina N, Mihaljević Z, Lončar MB, Mihalj M, Mišir M, Radmilović MD i sur. Impact of high salt diet on cerebral vascular function and stroke in Tff3<sup>-/-</sup>/C57BL/6N knockout and WT (C57BL/6N) control mice. *Int J Mol Sci.* 2019;20(20):5188.
49. Hui F, Ji-Kuai C, Wen-Jie L, Yu-Jie J, Yuan-Yuan W, Dong-Jie L i sur. Inflammasome-Independent NALP3 Contributes to High-Salt Induced Endothelial Dysfunction. *Front Pharmacol.* 2018;9:968.
50. Zidar M. Utjecaj visokog prehrambenog unosa kuhinjske soli na genski izražaj antioksidativnih enzima i biljega upale u aortama miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom Tff3. (završni rad). Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera, Medicinski fakultet Osijek; 2021.
51. Alpeza A. Utjecaj visokoslane prehrane na genski izražaj antioksidativnih enzima u mikro i makrocirkulaciji te bubrezima mladih Sprague-Dawlw štakora. (diplomski rad). Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera, Medicinski fakultet Osijek; 2021.

**11. ŽIVOTOPIS**

Osobni podatci: Ime i prezime: Matea Zidar

Datum i mjesto rođenja: 08.06.1999., Osijek

Adresa: Bana Josipa Jelačića 27, 33515 Orahovica

Adresa e-pošte: [mzidar@mefos.hr](mailto:mzidar@mefos.hr)

Obrazovanje:

2015.-2018. Srednja škola Stjepan Ivšić Orahovica, smjer Opća gimnazija

2018.-2021. Medicinski fakultet Osijek, smjer Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2021. - Upisuje Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Osijek

Projekti:

Sudjelovanje na Festivalu znanosti 8.4. - 13.4.2019.

Sudjelovanje na seminaru "Primjena rekombinantne DNA tehnologije u biotehnologiji", Osijek 2.10.2020.

Sudjelovanje u radionici "Osnove znanstvenog istraživanja", Medicinski fakultet Osijek 4.-5.12.2020.

Sudjelovanje na studentskom kongresu OSCON 2021."International translational medicine congress of students and young physicians", Medicinski fakultet Osijek 19.3.-20.3.2021.

Sudjelovanje na studentskom kongresu OSCON 2022."Mind and Matter", Medicinski fakultet Osijek, 30.3. - 01.4.2022.

Sudjelovanje na "8th Internacional Student Congress Graz - Connecting Health Sciences", Medical University of Graz Austria, 16.6. - 18.6.2022.

Sudjelovanje na konferenciji Plexus – "Internacionalna Plexus conference- connecting and inspiring young biomedical professionals from around the world", održana u Hrvatski dom Split 23.7. - 25.7.2022.

Sudjelovanje na konferenciji Brain Gut- "Brain-Gut Axis Conference,, održana u Zagrebu 8.10. - 9.10.2022.

Aktivno sudjelovanje na studentskom kongresu OSCON 2023. "Pediatrics", "International translational medicine congress of students and young physicians". Medicinski fakultet Osijek 30.3. – 1.4.2023.

Sudjelovanje na festivalu znanosti 24.4 - 29.4.2023. Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku.

Aktivno sudjelujem u znanstvenom dijelu pisanja radova za studentski časopis Anamnesis Medicinskog fakulteta Osijek.